Glutaryl-Coenzym A Dehydrogenase-Defizienz: *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen zu Pathomechanismen am Mausmodell (*Mus musculus*; Linnaeus, 1758) der neurodegenerativen Erkrankung

Dissertation zur Erlangung des Grades Doktor der Naturwissenschaften im Department Biologie, an der Fakulät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg

> vorgelegt von Dipl.-Biologin

Britta Keyser

aus Hamburg

Hamburg 2008

Genehmigt vom Department Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg auf Antrag von Professor Dr. T. BRAULKE Weiterer Gutachter der Dissertation: Professor Dr. K. WIESE Tag der Disputation: 09. Mai 2008

Hamburg, den 25. April 2008



Professor Dr. Jörg Ganzhorn Leiter des Departments Biologie

- 1. Gutachter: Prof. T. Braulke
- 2. Gutachter: Prof. K. Wiese

Diese Arbeit wurde teilweise vom Graduiertenkolleg 336 "Molekulare Endokrinologie – Molekularer Stoffwechsel" finanziert.

Zusammenfassung

Die Glutarazidurie Typ 1 (GA1) ist eine neurodegenerative Erkrankung, bei der es in Folge des Defekts der mitochondrialen Glutaryl-Coenzym A Dehydrogenase (GCDH) zur Anhäufung der spezifischen Metabolite Glutarsäure (GA) und 3-Hydroxyglutarsäure (3OHGA) in allen Geweben und Körperflüssigkeiten kommt. Die GCDH ist am Abbau der Aminosäuren Lysin, Hydroxylysin und Tryptophan beteiligt. Es sind über 150 Mutationen im *GCDH*-Gen bekannt, die jedoch nicht mit dem klinischen Phänotyp korrelieren. Während kataboler Zustände, z.B. im Rahmen fiebriger Infektionen, können GA1-Patienten, enzephalopathische Krisen entwickeln. Hierbei kommt es zu einer Degeneration des Striatums und in dessen Folge zur Ausbildung einer irreversiblen dyston-dyskinetischen Bewegungsstörung. Verschiedene Pathomechanismen, die von NMDA-Rezeptor-vermittelter Exzitotoxizität bis zu Endothelschädigung reichen, wurden diskutiert.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Expressionsanalysen mutanter GCDH und Untersuchungen der Pathomechanismen der GA1 mit Hilfe eines Mausmodells der Krankheit.

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Ergebnisse gewonnen:

- Expressionsanalysen von vier ausgesuchten pathogenen *Missense*-Mutationen in der *GCDH* zeigten, dass die enzymatischen Aktivitäten unterschiedlich betroffen waren. Keine der Mutationen beeinflusste die Syntheserate, Lokalisierung und Multimerisierung der GCDH. Die GCDH p.Arg402Trp-Mutante weist jedoch eine fünffach erhöhte Abbaurate gegenüber der Wildtyp-GCDH auf. 3D-Modell-Analysen ließen keine signifikanten Strukturveränderungen erkennen, die die verringerte Stabilität der p.Arg402Trp-Mutante erklären. Dagegen lässt die Position des mutierten Met263-Restes gestörte Wechselwirkungen der GCDH mit anderen mitochondrialen Proteinen vermuten.
- Durch intravenöse Injektion radioaktiv-markierter 3OHGA in Wildtyp- und Gcdh-defiziente Mäuse konnte gezeigt werden, dass die Blut-Hirn-Schranke bei Gcdh-defizienten Mäusen weder unter basalen

Bedingungen noch während induzierten enzephalopathischen Krisen geschädigt ist und dass der potenziell toxisch wirkende Metabolit 3OHGA nicht aus der Zirkulation stammt, sondern endogen vom Hirn selbst produziert werden muss.

- Gcdh-defiziente Mäuse scheiden radioaktiv-markierte 3OHGA unter basalen Bedingungen, neben dem bekannten Ausscheidungsweg über den Urin ebenfalls in großen Mengen über den Kot aus. Dieser Ausscheidungsweg ist bei Gcdh-defizienten Mäusen während einer metabolischen Krise gestört.
- 4. Neurone sind darauf angewiesen, von Astrocyten mit Citratzyklus-Intermediaten wie z.B. Succinat oder α-Ketoglutarat versorgt zu werden. Bei diesen handelt es sich ebenso wie bei GA und 3OHGA um Dicarboxylate. Es wurde gezeigt, dass 3OHGA und GA den Transport von radioaktiv-markiertem Succinat in kultivierten Astrocyten und Neuronen hemmen und so den Intermediaten-Transfer zwischen diesen Zellpopulationen regulieren. Die Daten lassen vermuten, dass in *Gcdh*defizienten Astrocyten und Neuronen der Transport von Succinat über unterschiedliche Mechanismen reguliert wird, die sowohl die Expression der beteiligten Transporter, *cis/trans*-Modulation der Transporteraktivität durch GA1-Metabolite, wie auch intrazelluläre Umverteilung von Transportern umfassen kann.

Inhaltsverzeichnis

Z	ZusammenfassungIV		
1	Einleit	ung	1
	1.1 G	lutarazidurie Tvp 1	1
	12 G	lutaryl-Coenzym A Debydrogenase	З
			0
	1.3 Pa	atnomechanismen der GA1	6
	1.4 M	ausmodell der GA1	8
2	Zielset	zung	10
3	Materia	al und Methoden	12
	3.1 M	aterial	12
	3.1.1	Bakterienstämme	12
	3.1.2	Chemikalien und Reagenzien	12
	3.1.3	Radioaktive Substanzen	15
	3.1.4	Kits und Assays	15
	3.1.5	Plasmide, DNA und DNA-Standards	16
	3.1.6	Enzyme und Nukleotide	16
	3.1.7	Proteine und Proteinstandards	16
	3.1.8	Mauslinien und Mausfutter	17
	3.1.9	Zelllinien	17
	3.1.10	0 Medien	18
	3.1	.10.1 Medien für die Anzucht von Bakterien	18
	3.1	.10.2 Medien und sonstige Medienzusatze für die Zeilkultur	18
	3.1.1	Verbrauchsmaterialien	19
	3.1.14	2 Gerate	20
	3.1.1	13.1. primäre Antikärper	∠ I 21
	3.1	13.2 sekundäre und fluoreszenzmarkierte Antikörper	21
	3.2 M	olekularbiologische Methoden	22
	3.2.1	Isolierung genomischer DNA aus Schwanzspitzen zur	
		Genotypisierung	22
	3.2.2	Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung	23
	3.2.3	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	23
	3.2.4	Ligation von DNA-Fragmenten	23
	3.2.5	Klonierungen der GCDH-Mutanten	24
	3.2.6	Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA	24
	3.2	.6.1 Praparation von chemokompetenten <i>E.coli</i> -Zellen	24
	3.2	.o.2 Isolierung von Plasmid-DINA aus Bakterien	25
	3.Z.1	Autrennung von DNA in Agarosegelen	25
	J.Z.8	Exitantion von DINA aus Agalosegelen	20

3.2.9	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	26
3.2.10	Sequenzierung von DNA	26
3.2.11	Isolierung von RNA aus Zellen	27
3.2.12	Synthese von cDNA	28
3.2.13	B DNA-Microarray	28
3.2.14	Quantitative Real-Time PCR	28
3.3 Ze	Ilbiologische Methoden	30
3.3.1	Kultivierung von Zelllinien	30
3.3.2	Isolierung und Kultivierung primärer Zellen aus Mäusen	30
3.3.	2.1 Isolierung und Kultivierung von primären Neuronen	30
3.3.	2.2 Isolierung und Kultivierung von primären Astrocyten	32
3.3.3	Trypsinieren von Zellen	33
3.3.4	Gefrierkonservierung und Revitalisierung von Zellen	33
3.3.5	Transiente Transfektion von BHK-Zellen	34
3.3.6	Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse (IFA)	34
3.3.7	Metabolische Markierung von Zellen mit [³⁵ S]-Methionin	35
3.3.8	Immunpräzipitation von GCDH und GCDH-Mutanten	36
3.3.9	[¹⁴ C]-Succinat Aufnahme in Zellen	37
3.3.10) [¹⁴ C]-Succinat Efflux aus Zellen	37
3.3.11	Crosslink von GCDH-Monomeren	38
3.4 Bio	ochemische Methoden	39
3.4.1	Herstellung von Homogenaten aus Zellen	39
3.4.2	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	39
3.4.3	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS- PAGE) und Fluorographie	39
3.4.4	Western-Blot-Analyse	41
3.4.5	Immunhistochemie	42
3.4.6	3D-Strukturanalyse	43
3.4.7	Aktivitätsbestimmung von GCDH	43
3.5 Tie	erexperimentelle Methoden	43
3.5.1	Perfusion von Mäusen	43
3.5.2	Aufarbeitung der Organe für histologische und	12
252	Hospitalinistochemische Ontersuchungen	43
3.5.5	Hochproteinulat	
3.5.4	4 1 Injektion von Dextranen	
3.5	4.2 Injektion von Bektigher	
4 Erachr		
4 ⊏rgebr		45
4.1 Ex	pression und Stabilität von mutanter GCDH	45
4.1.1	AKTIVITAT MUTANTER GUDH-Proteine	46
4.1.2	3D-Strukturanalyse der Mutationen	46
4.1.3	Expressionsanalyse mutanter GCDH	48
4.1.4	Stabilität der GCDH-Mutanten	49

	4.1.5 Intrazelluläre Lokalisierung der GCDH	51 51
	4.2 Verteilung von 3-Hydroxyglutarsäure unter basalen und	
	pathophysiologischen Bedingungen	53
	4.2.1 Verteilung von [³ H]-3-Hydroxyglutarsäure in 42 und 100 Tage alten <i>Gcdh</i> -defizienten Mäusen unter basalen Bedingungen	53
	4.2.2 Hochproteindiät-induzierte metabolische Krise	55
	4.2.2.1 Histologische und immunnistologische Untersuchungen	50
	4.2.2.2 Venenung von [H]-3-Hydroxygiularsaure in 42 Tage allen G <i>can</i> - defizienten Mäusen unter Hochproteindiät	60
	4.3 Untersuchungen zu spezifischen Transportern bei Gcdh-Defizienz	62
	4.3.1 DNA-Microarray	63
	4.3.2 Expression von Transportern in primär isolierten Hirnzellen	64
	4.3.2.1 Natrium-abhängiger Dicarboxylat-Transporter 3 (NaC3)	64
	4.3.2.2 Organische Anionen Transporter 1 (OAT1)	65
	4.3.2.3 Organische Anionen Transporter 2 (OAT2)	66
	4.3.3 [¹⁴ C]-Succinat Aufnahme-Studien	67
	4.3.3.1 [¹⁴ C]-Succinat Aufnahme in Astrocyten	67
	4.3.3.2 [CJ-Succinat Authanme in Kultivierte Neurone	70 74
	4.3.4 [C]-Succinal Emux-Studien	/ 71
	4.3.4.2 Efflux aus Neuropen	71
	T.J.T.Z LINUX dus Neuronen	
		/ 2
5	Diskussion	74
5	Diskussion 5.1 Untersuchungen von mutanter GCDH	74 74
5	Diskussion 5.1 Untersuchungen von mutanter GCDH 5.1.1 Enzymaktivitäten mutanter GCDH	74 74 75
5	Diskussion 5.1 Untersuchungen von mutanter GCDH 5.1.1 Enzymaktivitäten mutanter GCDH 5.1.2 Expression und Stabilität der mutanten GCDH	74 74 75 77
5	 Diskussion	74 74 75 77 79
5	 Diskussion	74 74 75 77 79 81
5	 Diskussion	74 75 77 77 79 81 84
5	 Diskussion	74 75 75 77 79 81 84
5	 Diskussion	74 75 77 79 81 84 87
5	 Diskussion	74 75 77 79 81 84 87 88
5	 Diskussion	74 75 77 79 81 84 84 88 88 90
5	 Diskussion	74 75 77 79 81 84 87 88 90 90
5 6 7	 Diskussion	74 75 77 79 81 84 84 88 90 90 95 95
5 6 7 8	Diskussion. 5.1 Untersuchungen von mutanter GCDH 5.1.1 Enzymaktivitäten mutanter GCDH 5.1.2 Expression und Stabilität der mutanten GCDH 5.2 Diät-induzierte metabolische Krise 5.2.1 Blut-Hirn-Schranken-Permeabilität unter HPD 5.2.2 Ausscheidung von 3OHGA 5.3 Transporter in Astrocyten und Neuronen von Gcdh-defizienten Mäusen 5.3.1 Expression von OAT1, OAT2 und NaC3 5.3.2 Transport von [¹⁴ C]-Succinat in Astrocyten und Neuronen Literaturverzeichnis Abkürzungsverzeichnis	74 75 77 79 81 84 87 90 90 95 105 109
5 6 7 8 9	Diskussion	74 75 77 79 81 84 84 87 90 90 95 105 109 111

1 Einleitung

1.1 Glutarazidurie Typ 1

Die Glutarazidurie Typ 1 (GA1, Glutaryl-Coenzym A Dehydrogenase-Defizienz, OMIM: 231670) ist eine autosomal rezessive Erkrankung, die 1975 von Goodman erstmals beschrieben wurde. Sie wird durch Mutationen im Gen des mitochondrialen Matrix-Proteins Glutaryl-Coenzym A Dehydrogenase (GCDH) ausgelöst. Die GCDH spielt im Abbau der Aminosäuren Lysin, Hydroxylysin und Tryptophan eine Rolle (siehe 1.2) (Besrat *et al.*, 1969, Lenich and Goodman, 1986). Durch den Enzymdefekt kommt es bei GA1-Patienten in allen Geweben und Körperflüssigkeiten zur Anhäufung der Metabolite Glutarsäure (GA), 3-Hydroxyglutarsäure (30HGA) und Glutaconsäure (Liesert *et al.*, 1999).

Bei der Geburt sind die meisten Patienten unauffällig, mit Ausnahme einer häufig beschriebenen Makrozephalie, sowie subduralen Hämatomen (Drigo *et al.*, 1993, Osaka *et al.*, 1993, Hoffmann *et al.*, 1996, Woelfle *et al.*, 1996, Goodman and Frerman, 2001). Erst im Rahmen kataboler Situationen, wie fieberhafter Infekte, kann es bei betroffenen Kindern zur Ausbildung einer enzephalopathischen Krise und zu einem weiteren Anstieg der GA- und 3OHGA-Konzentrationen kommen. In der Folge kommt es zum Untergang von Neuronen im Striatum mit anschließender Gliose (Goodman *et al.*, 1977, Leibel *et al.*, 1980, Chow *et al.*, 1988, Soffer *et al.*, 1992). Die Folge des Neuronen-untergangs ist eine irreversible dyston-dyskinetische Bewegungsstörung variablen Phänotyps (Abb. 1) (Hoffmann *et al.*, 1994, Brismar and Ozand, 1995, Hoffmann *et al.*, 1996, Bjugstad *et al.*, 2000, Kölker *et al.*, 2006). Histologisch zeigt sich im Striatum eine postsynaptische Vakuolisierung (Goodman and Frerman, 2001, Funk *et al.*, 2005).

Enzephalopathische Krisen treten vor allem während des Zeitraums vom 6.-14. Lebensmonat auf. Bei Patienten jenseits des 4. Lebensjahres wurden bisher keine derartigen Krisen beschrieben (Bjugstad *et al.*, 2000, Strauss *et al.*, 2003a).



Abb. 1: Glutarazidurie Typ 1-Patient vor (A) und nach (B) einer metabolischen Krise. Deutlich sind nach der metabolischen Krise die dyston-dyskinetischen Bewegungsstörungen, in Form von Verkrampfung der linken Hand und Durchstrecken des Beines zu sehen.

Die Häufigkeit der GA1 wird auf 1:100.000 geschätzt (Lindner et al., 2004). In einigen genetisch homogenen Populationen, wie den Old Order Amish in Pennsylvania oder den Island Lake Indianern in Kanada, tritt GA1 sehr viel häufiger auf, nämlich 1:400 bzw. 1:225 (Morton et al., 1991, Greenberg et al., Die Diagnose der GA1 kann anhand der Bestimmung der 1995). Konzentrationen von GA und 30HGA im Urin erfolgen. Seit 2005 wird in ganz Deutschland durch das erweiterte Neugeborenenscreening jedes Neugeborene auf GA1 hin untersucht. Hierbei wird die Konzentration von Glutarylcarnitin im Blut mittels Tandem-Massenspektrometrie (Meyburg et al., 2001) bestimmt. Glutarylcarnitin wird im mitochondrialen Intermembranraum aus Glutaryl-CoA und Carnitin gebildet. Durch dieses Screening ist es möglich, noch asymptomatische GA1-Patienten zu identifizieren, bevor sie eine mögliche enzephalopathische Krise bekommen. Bisher gibt es keine rationale Therapie für GA1-Patienten, es kann aber durch vorbeugende Maßnahmen versucht werden, katabole Situationen und damit den Ausbruch enzephalopathischer Krisen zu verhindern. So bekommen Patienten eine Lysin-arme Diät mit aleichzeitiger Zugabe eines Lysin-freien und Trypthophan-reduzierten Aminosäure-Gemisches (Kölker et al., 2007), um die Konzentration der GCDH-Substrate möglichst gering zu halten. Außerdem wird den Patienten Carnitin verabreicht, um den Mangel dieses Amins, der durch die Bildung von Glutarylcarnitin entsteht, auszugleichen. Ohne diese Behandlung bekommen 80-90 % der GA1-Patienten eine metabolische Krise (Strauss *et al.*, 2003a), mit Behandlung sind es jedoch immer noch etwa 20 % der Patienten (Goodman and Frerman, 2001, Kölker *et al.*, 2006). Entwickeln GA1-Patienten (trotz Behandlung) eine enzephalopathischen Krise, wird die Proteinzufuhr der Patienten unterbrochen und den Kindern intravenös Glukose verabreicht. Außerdem werden potenzielle Ursachen der enzephalopathischen Krise, wie Fieber oder Erbrechen, schnell und intensiv behandelt (Kölker *et al.*, 2007).

1.2 Glutaryl-Coenzym A Dehydrogenase

GCDH ist ein mitochondriales, homotetrameres Matrixenzym, das ein FAD-Molekül pro Monomer als Koenzym enthält (Abb. 2) (Tanaka *et al.*, 1990, Härtel *et al.*, 1993).



Abb. 2: Struktur des Homotetramers der Glutaryl-Coenzym A Dehydrogenase (GCDH). Die aktive GCDH ist ein Homotetramer. Die einzelnen Monomere sind farbig dargestellt. In 2 Monomeren (gelb und braun) ist das FAD (rot) im aktiven Zentrum zu erkennen.

Die GCDH katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Glutaryl-CoA zu Crotonyl-CoA. Dabei wird Glutaryl-CoA zunächst zu Glutaconyl-CoA oxidiert, das dann wiederum zu Crotonyl-CoA decarboxyliert wird (Abb. 3) (Gomes *et al.*, 1981). Dieses wird anschließend von weiteren Enzymen zu Acetyl-CoA abgebaut, das in den Citratzyklus einfließt.



Abb. 3: Gestörter Stoffwechselweg der Glutarazidurie Typ 1. Glutaryl-Coenzym A Dehydrogenase (E) katalysiert im Abbauweg von Lysin, Hydroxylysin und Tryptophan die oxidative, FAD-abhängige Decarboxylierung von Glutaryl-CoA zu Crotonyl-CoA. Bei mutierter GCDH, entstehen Glutarylcarnitin, sowie über noch nicht geklärte Wege Glutarsäure aus Glutaryl-CoA, 3-Hydroxyglutarsäure und Glutaconsäure aus Glutaconyl-CoA, welches vermutlich über andere Enzyme aus Glutaryl-CoA entsteht.

Das GCDH-codierende Gen liegt auf dem Chromosom 19p13.2 (Greenberg et al., 1994) und besitzt 11 Exons. Das abgeleitete Protein besteht aus 438 Aminosäuren, wovon die ersten 44 Aminosäuren das mitochondriale Lokalisierungssignal bilden und durch die Aktivität der mitochondrialen Prozessierungspeptidase (MPP) abgespalten werden (Goodman et al., 1995). Mitochondriale Vorläuferproteine, die im Zytoplasma synthetisiert werden, werden von Chaperonen (in den meisten Fällen vom Hitze-Schock-Protein 70 (Thulasiraman et al., 1999)) gebunden. Damit wird zum einen eine inkorrekte Faltung und Aggregation des Proteins verhindert und zum anderen der Transport des Vorläuferproteins zum Mitochondrium vermittelt (Mihara and Omura, 1996). Das mitochondriale Lokalisierungssignal interagiert mit dem TOM-Komplex (translocase of the outer mitochondrial membrane). Dieser transportiert das Protein über die äußere mitochondriale Membran. Schon während dieses Vorganges, bindet das Vorläuferprotein an den TIM-Komplex (translocase of the inner mitochondrial membrane), der an der inneren

mitochondrialen Membran lokalisiert ist (Bolender *et al.*, 2008). Sobald der N-Terminus des Vorläuferproteins in der Matrix erscheint, binden das mitochondriale Hitze-Schock-Protein 70 (Hsp70) und das Cochaperon Mge1p an das Protein und "ziehen" es unter ATP-Verbrauch in die Zelle (Bolender *et al.*, 2008).

Es sind über 150 Mutationen im GCDH-Gen bekannt (Goodman et al., 1998, Schwartz et al., 1998, Busquets et al., 2000, Zschocke et al., 2000), darunter sind Mutationen im Intronbereich, die das Spleißen der mRNA beeinflussen (Greenberg et al., 1995, Goodman et al., 1998, Tang et al., 2000, Zschocke et al., 2000). Neben Missense-Mutationen sind Basendeletionen oder --insertionen beschrieben worden, die meist zu vorzeitigen Translationsabbrüchen führen. Die Mutation p.Arg402Trp¹ ist bei Kaukasiern die häufigste (Schwartz et al., 1998, Busquets et al., 2000, Zschocke et al., 2000, Christensen et al., 2004). Mutationen, die bei GA1-Patienten der Old Order Amish community aus Pennsylvania besonders häufig auftreten, betreffen den Austausch des Ala421-Restes zu Valin (Biery et al., 1996). Bei den Island Lake Indianern aus Kanada befindet sich dagegen die Mutation im Intron 1, was zu Fehlern beim Spleißen der prä-mRNA und zu einem Verlust der letzten 8 Aminosäuren aus Exon 1 führt (Greenberg et al., 1995). Die Restaktivitäten mutanter GCDH reichen von 0 % bis 30 % der Aktivität in Kontrollfibroblasten gesunder Patienten. Es ist aber bisher keine Korrelation zwischen Restaktivität und dem Verlauf der Krankheit beschrieben worden. So ist bei einem Patienten mit der homozygoten Mutation Met263Val eine Restaktivität der GCDH von 30 % gefunden worden. Jedoch weist dieser GA1-Patient einen schweren Verlauf der Krankheit auf (Mühlhausen et al., 2003). Auf der anderen Seite gibt es Patienten, die fast keine Restaktivität haben, jedoch einen milden Verlauf der Krankheit zeigen (Busquets et al., 2000). Aufgrund der heutigen Erkenntnisse können Patienten biochemisch in 2 Gruppen eingeordnet werden, high excretors und low excretors. Bei ersteren sind im Urin hohe Mengen an GA und 3OHGA nachweisbar, bei den low excretors hingegen sind die GA-Konzentrationen im

¹ Die in dieser Arbeit angegebene Nummerierung der Aminosäuren der GCDH bezieht sich immer auf das Vorläuferprotein und nicht auf die reife Form.

Urin fast normal, während die 3OHGA-Spiegel erhöht sind (Baric *et al.*, 1999, Busquets *et al.*, 2000).

1.3 Pathomechanismen der GA1

Bisher ist nicht bekannt durch welche Mechanismen es zur Degeneration des Striatums bei GA1 kommt. Es wird allgemein angenommen, dass 3OHGA der toxisch wirkende Metabolit ist, da er für GA1 spezifisch ist (Ullrich *et al.*, 1999). Erhöhte Konzentrationen von GA wurden auch bei anderen Krankheiten wie GA2 oder GA3 beschrieben (Knerr *et al.*, 2002).

3OHGA ähnelt strukturell dem Neurotransmitter Glutamat. Daher wurde lange Zeit spekuliert, dass der Neuronenuntergang bei GA1 durch Exzitotoxizität hervorgerufen wird (Ullrich *et al.*, 1999, Kölker *et al.*, 2004). Als Exzitotoxizität werden Pathomechanismen bezeichnet, denen eine erhöhte Konzentration des Neurotransmitters Glutamat im synaptischen Spalt zugrunde liegen. Es kommt dabei zu einer permanenten Erregung von Glutamat-Rezeptoren, was wiederum zu einem Einstrom von Ca²⁺-Ionen in die Zelle führt. In der Folge schwellen die Zellen und die Zellorganellen an, es kommt zur Stimulation von Enzymen wie z.B. der NO-Synthase (Olney, 1993, Bittigau and Ikonomidou, 1997) oder zur Inhibition von Enzymen wie z.B. der Protein Kinase C (Durkin *et al.*, 1996) und letzten Endes zur Apoptose der Zelle.

Die experimentellen Untersuchungen zu Pathomechanismen der GA1 konzentrierten sich daher anfänglich auf NMDA-Rezeptoren, die zu den ionotropen Glutamatrezeptoren gehören. Als *in vitro* Modell für diese Untersuchungen dienten hippocampale und striatale Schnittkulturen (Ullrich *et al.*, 1999), primär kultivierte Neurone aus Kücken und Mischkulturen aus hippocampalen Neuronen und Gliazellen (Kölker *et al.*, 2004), die mit millimolaren Konzentrationen von GA und 3OHGA in An- und Abwesenheit von NMDA-Antagonisten behandelt wurden. Zu den beschriebenen veränderten Parametern gehörten Zellvitalität, Apoptose und Nekrose, der Spiegel an reaktiven Sauerstoffspezies, Expression der NR2B-Untereinheit des NMDA-Rezeptors und intrazelluläre Ca²⁺-Konzentrationen (Ullrich *et al.*, 1999, Kölker *et al.*, 2004). Jedoch lag die gemessene Absterberate der für 10 Tage

kultivierten Neuronen und Glia-Mischkulturen nach Inkubation mit 1 mM 3OHGA nur bei 20 % (Kölker *et al.*, 2000). Was immer die oben genannten zellbiologischen Effekte auslöste, die NMDA-Rezeptor-vermittelte Wirkung von 3OHGA kann als gering angesehen werden und erklärt nicht die Vielzahl der klinisch und biochemisch veränderten Parameter.

Eine weitere pathologische Wirkung von 3OHGA, die diskutiert wurde, geht von einem durch die Defizienz der GCDH induzierten alternativen Abbauweg der Aminosäure Tryptophan aus, der über Kynurenin ablaufen soll (Schwarcz *et al.*, 1983, Heyes, 1987). Diese These wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die bei einer viralen Infektion gebildeten Interferone zu einer gesteigerten Expression eines der Schlüsselenzyme des Kynurenin-Weges führen. Hierdurch würde eine erhöhte Konzentration von Chinolinat in der Zelle vorliegen. Bei Chinolinat handelt es sich um ein potenzielles Neurotoxin (Schwarcz *et al.*, 1983, Heyes, 1987, Varadkar and Surtees, 2004), dessen Konzentration im *Liquor cerebrospinalis* von GA1-Patienten allerdings normal ist (Land *et al.*, 1992).

In weiteren Studien an hippocampalen und striatalen Schnittkulturen konnte eine inhibitorische Wirkung von 3OHGA auf die Atmungsketten-Komplexe II und V gezeigt werden (Ullrich *et al.*, 1999). Die ATP-Konzentration in diesen Kulturen ist unter Inkubation mit 3OHGA und GA nur leicht erniedrigt, jedoch weisen sie einen stark reduzierten Spiegel des Energielieferanten Phosphokreatin auf (Ullrich *et al.*, 1999, Das *et al.*, 2003).

Schließlich wurde spekuliert, dass die neurotoxische Wirkung von 3OHGA indirekt als Folge eines primären Endothelschadens mit Beeinträchtigung der Blut-Hirn-Schranke auftritt, der einen Einstrom großer Mengen des Metaboliten aus der Zirkulation in das Hirngewebe ermöglicht (Strauss and Morton, 2003b). Für eine Beteiligung endothelialer Effekte spricht unter anderem die klinische Beobachtung chronisch subduraler Hämatome. Experimentell konnte gezeigt werden, dass 3OHGA die Migration von humanen mikrovaskulären Endothelzellen der Haut (HDMEC) inhibiert, dass in Gegenwart von 3OHGA die Endothelintegrität *in vitro* gebildeter Kapillaren beeinträchtigt ist und es zu einer Erweiterung der Gefäße und zu Einblutungen kommt (Mühlhausen *et al.*, 2006). Des Weiteren zeigten mit 3OHGA behandelte HDMEC eine erniedrigte Expression von VE-Cadherin (Mühlhausen *et al.*, 2006). Dieses Protein ist ein

Bestandteil der *Adherens Junctions*, die sich zwischen den Endothelzellen befinden und zusammen mit den *Tight Junctions* für die Impermeabilität der Blut-Hirn-Schranke (BHS) sorgen. Durch das Eindringen von 3OHGA in das Hirn über eine gestörte BHS könnte 3OHGA das empfindliche Gleichgewicht zwischen Astrocyten und Neuronen stören. Von Interesse ist außerdem, dass die verwendeten HDMEC keine NMDA-Rezeptoren exprimieren und damit die Effekte von 3OHGA über andere Signalwege vermittelt werden müssen (Mühlhausen *et al.*, 2006).

Die Spezifität der toxischen Wirkung auf Neurone des Striatums innerhalb eines engen Zeitfensters (6.-14. Lebensmonat) wird auf die Unterschiede in der Gefäßentwicklung zwischen dem Striatum und dem Rest des Hirns zurückgeführt (Kuban and Gilles, 1985).

1.4 Mausmodell der GA1

Von der Arbeitsgruppe um Steven Goodman wurde im Jahr 2002 eine *Gcdh* Knockout-Maus durch Deletion der Exons 1-7 generiert. *Gcdh*-defiziente Mäuse wiesen keine *Gcdh*-Restaktivität auf. Ihr biochemischer Phänotyp entsprach dem von GA1-Patienten mit erhöhten Spiegeln an GA und 3OHGA in Urin und Hirn. Die Nieren der *Gcdh*-defizienten Mäuse waren signifikant größer als die von Wildtyp- oder heterozygoten Mäusen. Außerdem fand sich im frontalen Cortex und im Striatum eine Spongiose, während weder Nekrosen oder Gliosen nachweisbar waren. Äußerlich waren die *Gcdh*-defizienten Mäuse nicht von den Wildtyp- oder heterozygoten Mäusen zu unterscheiden. Sie zeigten lediglich leichte motorische Defizite auf dem *Rotarod*. *Gcdh*-defiziente Mäuse entwickelten unter basalen Bedingungen keine enzephalopathische Krise. Auch unter Injektion von Lipopolysacchariden zur Vortäuschung einer bakteriellen Infektion oder durch Stress in Form von Hunger und Kälte gelang keine Induktion einer Krise (Koeller *et al.*, 2002).

Während der Zeit, in der die hier vorgestellten Ergebnisse gewonnen wurden, publizierten Zinnanti *et al.* (2006) ein Modell zur Induzierung einer metabolischen Krise bei *Gcdh*-defizienten Mäusen. Durch Gabe einer Hochproteindiät (HPD) oder einer Diät mit erhöhten Lysin- (HLD) bzw. Tryptophan-

Konzentration konnte eine metabolische Krise bei Gcdh-defizienten Tiere ausgelöst werden. Dabei starben 28 und 56 Tage alte Gcdh-defiziente Mäuse nach Gabe der HPD innerhalb von 2-8 Tagen. Der Verlauf der Symptome war Hypothermie, Dehydrierung, Hypoaktivität, immer identisch: Paralyse, Krampfanfälle und Tod. Zinnanti et al. (2006) verwendeten im Weiteren nur die HLD. Gcdh-defiziente Mäuse unter HLD wiesen erhöhte GA-Konzentrationen im Serum und Hirn gegenüber den asymptomatischen Gcdh-defizienten Tieren auf. Des Weiteren konnten im Cortex und Striatum von Gcdh-defizienten Mäusen unter HLD eine stärker ausgeprägte Vakuolisierung als unter basalen Bedingungen, sowie Neuronenverlust und Gliose festgestellt werden. Außerdem konnten subarachnoidale, subdurale und intraventrikulare Einblutungen im Hirn nachgewiesen werden. Bei Perfusion Gcdh-defizienter Mäuse innerhalb einer Krise mit Evans Blue konnte eine Extravasation des Farbstoffes im Striatum beobachtet werden, was als gestörte Blut-Hirn-Schranken-Funktion interpretiert wurde.

2 Zielsetzung

Die Glutarazidurie Typ 1 (GA1) ist eine angeborene Stoffwechselkrankheit, bei der ein Defekt im Glutaryl-Coenzym A Dehydrogenase (GCDH)-Gen vorliegt. Dieses Enzym ist am mitochondrialen Abbau der Aminosäuren Lysin, Hydroxylysin und Tryptophan beteiligt. Bei GA1-Patienten können zwischen dem 6. und 14. Lebensmonat in Folge kataboler Zustände enzephalopathischen Krisen auftreten, in deren Folge es zur striatalen Neurodegeneration mit dystondyskinetischen Bewegungsstörungen kommt. Außerdem kommt es zu einer Akkumulation der Metabolite Glutarsäure (GA), 3-Hydroxyglutarsäure (30HGA) und Glutaconsäure im Serum, Urin und in den Geweben der Patienten. Im Verlauf dieser Arbeit wurde von der eigenen Arbeitsgruppe der erste Transporter für die Metabolite GA und 3OHGA identifiziert und charakterisiert. Die molekularen Veränderungen und Pathomechanismen, die zur spezifischen Neurodegeneration in einem begrenzten Hirnareal während eines engen Zeitfensters in der frühkindlichen Entwicklung führen, sind unklar. Voruntersuchungen deuten auf Gefäßschäden bei GA1 hin, von denen möglicherweise auch die Blut-Hirn-Schranke (BHS) betroffen sein könnte.

Es sind über 150 Mutationen im *GCDH*-Gen bekannt. Bisher konnte jedoch keine Korrelation zwischen einer Mutation und dem Schweregrad der Krankheit oder zwischen der Restaktivität einer mutanten GCDH und dem Schweregrad der Krankheit beobachtet werden.

In der vorliegenden Arbeit lagen drei Fragestellungen den experimentellen Ansätzen zugrunde:

 Anhand von vier ausgewählten Mutationen, die bei GA1-Patienten identifiziert wurden, sollten erste Erkenntnisse über Wirkung der Mutationen auf die Enzymaktivität, Synthese und Stabilität, sowie auf die Multimerisierung der GCDH-Proteine gewonnen werden. 3D-Modelling Analysen sollten helfen, die veränderten biochemischen Parameter strukturell zu erklären.

- Mit Hilfe eines Mausmodells der GA1 sollte untersucht werden, ob es unter basalen Bedingungen und bei einer induzierten Krise zu Schädigungen von Endothelfunktionen, besonders der Permeabilität der BHS mit Einstrom [³H]-markierter 3OHGA in das Hirn kommt.
- 3. An primär kultivierten Neuronen und Astrocyten aus Wildtyp- und Gcdhdefizienten Mäusen sollte untersucht werden, ob Transporter-abhängige Ein- und Ausströme von Citratzyklus-Intermediaten, die zur ATP-Gewinnung und zur Biosynthese von Amino- und Fettsäuren in Neuronen benötigt werden, durch die GA1 Metabolite GA und 30HGA beeinflusst werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Bakterienstämme

Escherichia coli TOP10F

Rif^r, F', *proAB*, *laclqz*⊿*M15*, Tn10,Tet^r

3.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Alle Chemikalien und Reagenzien wurden von den folgenden Firmen bezogen.

Chemikalien	Firma
3-Hydroxyglutarsäure	Synthetisiert und zur Verfügung gestellt von Prof. J. Thiem, Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agar	Sigma-Aldrich, München
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin	Serva, Heidelberg
APS	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Bio-Rad, München
BS ³	Pierce, Bonn
BSA	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt
Canusal (Heparin-Natrium 100E/ml)	CP Pharmaceuticals Ltd, Großbritannien
Chloroform	Sigma-Aldrich, München
Cholinchlorid	Sigma-Aldrich, München
Coomassie® Blue G	Serva, Heidelberg
DAPI	Roth, Karlsruhe
DEPC	Sigma-Aldrich, München
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt

DMSO	Roth, Karlsruhe
DTT	Sigma-Aldrich München
EDTA	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich München
Formaldehvd	Merck Darmstadt
Glukose	Sigma-Aldrich München
Glutarsäure	Sigma-Aldrich München
Glycerin	Merck Darmstadt
Glycin	Sigma-Aldrich München
Hefeextrakt	Roth Karlsruhe
HEPES	Roth Karlsruhe
Isopropanol	Roth Karlsruhe
Kalium-Acetat	Sigma-Aldrich München
Kaliumehlorid (KCI)	LT Baker Griesbeim
Kaliumchonu (KCI)	Morek Dermetedt
(KH ₂ PO ₄)	Merck, Darnistaut
Ketanest S	Pfizer, USA
Luminol	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich, München
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck, Darmstadt
Manganchlorid (MnCl ₂)	Sigma-Aldrich, München
Methanol	Merck, Darmstadt
Methionin	Sigma-Aldrich, München
Milchpulver	Natura Flor
MOPS	Roth, Karlsruhe
Mowiol [®]	Hoechst, Frankfurt a.M.
Natrium-Acetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natrium-desoxycholat	Sigma-Aldrich, München
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt

Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Nonidet P40	Roche Diagnostics, Mannheim
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
p-Cumarinsäure	Sigma-Aldrich, München
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, München
PPO	Roth, Karlsruhe
Protaminsulfat	Sigma-Aldrich, München
Protein A-Agarose- Macrobeads	Sigma-Aldrich, München
Rompun 2 %	Bayer, Leverkusen
Rotiszint [®] eco plus	Roth, Karlsruhe
Rubidiumchlorid (RbCl)	Sigma-Aldrich, München
Saccharose	J.T. Baker, Griesheim
Salzsäure (HCI)	Merck, Darmstadt
Saponin	Sigma-Aldrich, München
SDS	Sigma-Aldrich, München
Succinat	Sigma-Aldrich, München
TEMED	Bio-Rad, München
Tissue-Solubilizer (Solvable™)	Perkin-Elmer, USA
Tricin	Sigma-Aldrich, München
Tris	Sigma-Aldrich, München
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München
Tween-20	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck, Darmstadt

3.1.3 Radioaktive Substanzen

Radioaktive Substanz	Spezifische Aktivität	Firma
[³ H]-3- Hydroxyglutarsäure	25,2 mCi/mg 3OHGA	Von Herrn Dr. Wilhelm Herdering, Institut für Anorganische Chemie, Universität Hamburg synthetisiert
[35S]-Methionin	1.000 Ci/mmol	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
[¹⁴ C]-Succinat	54 mCi/mmol	Moravek Biochemicals, Brea California, USA

3.1.4 Kits und Assays

Kit	Firma
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystem, Darmstadt
pcDNA™Gateway®Directional TOPO Expression Kit	Invitrogen, Karlsruhe
peqGOLD RNA pure	peqLab, Erlangen
QIAplasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
QIAplasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Spin Gelextraction	Qiagen, Hilden
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Niederlande
TaqMan® Gene Expression Assay	Applied Biosystem, Darmstadt
TNT®T7 Quick Coupled Transcription/Translation System	Promega, Mannheim

DNA-Standard, 1 kb-Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
DNA-Standard, 100 bp-Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA.6.2/V5/GW/D-TOPO	Invitrogen, Karlsruhe
pOTB7-GCDH	RZPD Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung

3.1.5 Plasmide, DNA und DNA-Standards

3.1.6 Enzyme und Nukleotide

Benzonase	Merck, Darmstadt
DNase I	Sigma-Aldrich, München
dNTP-Set (ultrapure)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Papain	Sigma-Aldrich, München
<i>Pfu-Turbo</i> ™-Polymerase	Stratagene, USA
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich, München
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Restriktionsendonukleasen	New England BioLabs, Frankfurt a.M.
Taq-DNA-Polymerase	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

3.1.7 Proteine und Proteinstandards

Dextran-Konjugate	Molecular Probes, USA
Rainbow™-coloured Protein- Standard	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg

3.1.8 Mauslinien und Mausfutter

Heterozygote Tiere der Mauslinien GAC57BI6 und GA129SVJ mit dem gleichen Knockout des *Gcdh*-Gen wurden freundlicherweise von Dr. S.I. Goodman (Denver, USA) bereitgestellt. Durch Kreuzung von Heterozygoten von je einer Linie erhält man die für die Versuche verwendeten GAexp-Tiere ("Hybridvigour"-Kreuzungsverfahren). Für die Astrocyten- und Neuronenisolierung wurden C57BI6/J10 Wildtyp-Mäuse verwendet.

Alle Mauslinien wurden in der zentralen Tierhaltung des UKE (Hamburg) gezüchtet.

Alle Tierversuche wurden nach Prüfung und Genehmigung durch die Tierschutzkommission des Amts für Gesundheit und Verbraucherschutz, Abteilung für Veterinärwesen der Freien und Hansestadt Hamburg durchgeführt (Genehmigung Nr. A6/68 vom 26.09.2001, Nr. 26/05 vom 11.04.2005 und Zusatzgenehmigung zu Nr. 26/05 vom 02.06.2006).

Die Mäuse bekamen als Standarddiät ssniff R/M-H, extrudiertes Futter (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest). Die für die Mäuse als Futter verwendete Hochproteindiät (TD.03637) wurde von Harland Teklad, USA bezogen.

11+/+ immortalisierte Astrocyten	Dr. U. Matzner, Institut für physiologische Chemie, Universität Bonn
Baby hamster kidney cells (BHK)	Prof. Figura, Institut für Biochemie 2, Georg- August-Universität, Göttingen
Primäre isolierte Astrocyten	Eigene Herstellung
Primäre isolierte Neurone	Eigene Herstellung

3.1.9 Zelllinien

3.1.10 Medien

3.1.10.1 Medien für die Anzucht von Bakterien

<u>L</u> uria- <u>B</u> ertani-Medium (LB-Medium)	10 g/l Bacto-Trypton;		
	5 g/l Bacto-Hefeextrakt;		
	8 g/l NaCl;		
	pH= 7,2 mit NaOH		
	Vor Gebrauch Zugabe von 100 mg/l		
	Ampicillin.		
Luria-Bertani-Agarplatten (LB-Platten)	15 g Agar in 1I LB-Medium gelöst und		
	autoklaviert; nach Abkühlen auf 55°C,		
	Zugabe von 100 mg/l Ampicillin.		

3.1.10.2 Medien und sonstige Medienzusätze für die Zellkultur

Chemikalien	Firma
AraC Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, München
B27	Invitrogen, Karlsruhe
DMEM	GIBCO/BRL, Eggenstein
DMEM ohne Methionin:	PAA, Österreich
FKS	PAA, Österreich
Glutamat	Sigma-Aldrich, München
GlutaMax™	GIBCO/BRL, Eggenstein
Lipofectamin™2000	Invitrogen, Karlsruhe
MEM	GIBCO/BRL, Eggenstein
Neurobasalmedium	GIBCO/BRL, Eggenstein
Optimem [®] -1 + GlutaMax™	GIBCO/BRL, Eggenstein
PBS (10X)	GIBCO/BRL, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin	GIBCO/BRL, Eggenstein
Pferdeserum	GIBCO/BRL, Eggenstein
Trypsin/EDTA	GIBCO/BRL, Eggenstein

3.1.11 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Firma
Cellophanfolie	Pütz Folien, Taunusstein
Deckgläser	Glaswarenfabrik Karl Heckt KG, Sondheim
Einfrierröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Einmalküvetten	Plastibrand, Wertheim
Einwegmaterial für Zellkultur	BD Falcon, Heidelberg Sarstedt, Nümbrecht Nunc, Wiesbaden
Einweg-Schaber	Sarstedt, Nümbrecht
Filmkassetten	Rego, Augsburg
Filterschwämme	Amersham
Gel-Glasplatten	Amersham
Gen-Chip Mouse Expression Set 430	Affymetrix, Großbritannien
Immersionsöl 518 C	Zeiss, Oberkochen
Kanülen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Linsenpapier MN 10 B	Zeiss, Oberkochen
Nitrocellulosemembran	Schleicher & Schuell, Daßel
Nylon Net Filters	Millipore, USA
Objektträger	Engelbrecht, Kassel
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht Eppendorf, Hamburg Greiner, Essen
Röntgenfilme	Kodak, Stuttgart
Skalpelle	BBraun, Melsungen
Spritzen	BBraun, Melsungen
Sterilfilter	VWR, Darmstadt
Stripes/Deckel für Real-Time PCR	Applied Biosystems, Darmstadt
Szintillationsröhrchen	Perkin-Elmer, USA
Teflonkämme	Hoefer, USA
UV-Küvetten	Eppendorf, Hamburg
Whatman-Papier	Whatman, Daßel

3.1.12 Geräte

Gerät	Тур	Firma
Absaugpumpe	Miniport	SMT
Autoklav	3850 EL	Systec, Wettenberg
Blockthermostat	Rotilabo H250	Roth, Karlsruhe
	TM130-6	HLC, Bovenden
Counter	β – γ -Handdetektor	Berthold, Bad Wildbad
	β–Counter LS3801	Beckman Coulter, Krefeld
Drehrad	Rotator	Neolab, Heidelberg
Eismaschine	AF 10	Scotsman, Herborn
Elektrophoresekammer	Agagel Midi Wide	Biometra, Göttingen
	SE600	Hoefer, USA
Entwicklermaschine	Curix 60	Agfa, Leverkusen
Geltrockner	GelAir Dryer	Bio-Rad, München
Horizontalschüttler	Rocky	Fröbel Labortechnik, Wasserburg
Injektionsblock für Mäuse		Eigenbau, Werkstatt des Institut für Biochemie 2, Georg-August Universität, Göttingen
Inkubationsschrank	CO ₂ -Inkubator	Sanyo
	Gasboy C20A	Labotect, Wiesbaden
Inkubationsschüttler	Innova 4230	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Kryo-Einfriergerät	Nalgene™ Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene, USA
Magnetrührer	MSH-basic	IKA-Werke, Staufen
Mikroskope	Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen
	Leica DM IRE2	Leica, Wetzlar
Mikrowelle	Promicro	Whirlpool, Stuttgart
Perfusionspumpe P1		Pharmacia Biotech, USA
pH-Meter	MP220	Mettler Toledo, Giessen
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten/Multipette		Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschmann, Eberstadt

Sterilbank	Herasafe	Heraeus, Hanau
	Gelaire	Flow Laboratories, USA
Stickstoff-Einfriertank	Airpege 55	Air Liquide, Düsseldorf
Thermocycler	Tpersonal	Biometra, Göttingen
	Real-Time MX3000P™	Stratagene, USA
	Mastercycler, Gradient	Eppendorf, Hamburg
Transferkammer	TE 50X	Hoefer, USA
UV-Transilluminator	Darkroom Evo III	Raytest, Straubenhardt
Vortex	Genie 2	Scientific Industries, USA
Waagen	AC100	Mettler Toledo, Giessen
	BP2100 S	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	C 10	Schütt Labortechnik, Göttingen
Zentrifugen	Centrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
	Speed Vac [®]	Savant
	Centrifuge 5417	Eppendorf, Hamburg
	Centrifuge 5702 R	Eppendorf, Hamburg
	Minifuge RF	Heraeus, Hanau
	Varifuge RF	Heraeus, Hanau
	MC6 Centrifuge	Sarstedt, Nümbrecht

3.1.13 Antikörper

3.1.13.1 primäre Antikörper

Antigon	Spazias Bafaranz/Firma	Verdünnung			
Antigen	Spezies	Referenz/Tirria	WB	IF	IPP
α Gcdh (Maus)	К	Dr.M. Woontner, Denver, USA	1:10.000		1:1000
α MnSOD	К	Upstate, USA	1:1000	1:200	
α myc	М	Sigma-Aldrich, München		1:1000	

Sekundärantikörper	Firma	Verdünnung
Schaf α Kaninchen Cy3	Sigma-Aldrich, München	1:400 (IFA)
Schaf α Maus FITC	Sigma-Aldrich, München	1:400 (IFA)
Ziege α Kaninchen IgG HRP	Dianova, Hamburg	1:10.000 (WB)
Ziege α Maus IgG HRP	Dianova, Hamburg	1:10.000 (WB)

3.1.13.2 sekundäre und fluoreszenzmarkierte Antikörper

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Isolierung genomischer DNA aus Schwanzspitzen zur Genotypisierung

Lysispuffer	100 mM Tris/HCl pH 7,4
	5 mM EDTA
	200 mM NaCl

SDS-Lösung 10 % SDS

Proteinase K-Lösung 10 mg/ml in Lysispuffer

Zur Genotypisierung *Gcdh*-defizienter Mäuse wurde genomische DNA aus den Schwanzspitzen isoliert. Dazu wurden die Schwanzspitzen ü. N. in je 500 µl Lysispuffer, 15 µl SDS-Lösung und 20 µl Proteinase K-Lösung unter Schütteln bei 56°C inkubiert. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 16.000 x g wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und 500 µl Isopropanol (100 %) zugegeben. Nach mehrmaligem Invertieren erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 20.800 x g und 4°C. Der Überstand wurde abgenommen und die pelletierte DNA mit 500 ml Ethanol (70 %) gewaschen. Anschließend wurde das Pellet für ca. 20 min bei 37°C getrocknet. Die DNA wurde in 100 µl Aqua bidest. aufgenommen und die Konzentration photometrisch bestimmt. Die DNA-Lösung wurde zur anschließenden Genotypisierung eingesetzt.

3.2.2 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Die photometrische Messung von DNA erfolgte bei 260 nm in einer UV-Küvette gegen Aqua bidest. Eine OD_{260} von 1 entspricht einer Konzentration von 50 μ g/ml doppelsträngiger DNA.

3.2.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische kurze Nukleotidsequenzen und spalten die DNA in diesem Bereich. Um die optimalen Bedingungen für das jeweils benutzte Enzym zu schaffen, wurde einem Restriktionsansatz neben dem Restriktionsenzym und der zu spaltenden DNA der vom Hersteller mitgelieferte 10 x Reaktionspuffer zugegeben. Ein 20 μ l Restriktionsansatz wurde beispielsweise wie folgt zusammenpipettiert:

x μl DNA (ca. 0,1-1 μg) 2 μl 10 x Reaktionspuffer 1-2 μl Restriktionsenzym (10 U/μl) x μl dH₂O (ad 20 μl)

Der Restriktionsansatz wurde für 1-2 h bei 37°C bzw. bei der für das entsprechende Enzym optimalen Temperatur inkubiert.

Wenn eine DNA mit zwei Restriktionsenzymen gespalten werden sollte, die verschiedene Reaktionsbedingungen benötigten, so wurde ein Restriktionspuffer ausgewählt, in dem beide Enzyme laut Herstellerangaben noch eine gute Spaltaktivität zeigen.

3.2.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation werden zwei DNA-Moleküle miteinander verbunden, beispielsweise bei der Integration eines DNA-Fragmentes in einen Vektor.

Ligationen wurden gemäß den Herstelleranweisungen mit dem *pcDNATMGateway[®]Directional TOPO Expression Kit* durchgeführt.

3.2.5 Klonierungen der GCDH-Mutanten

Die Mutationen wurden in das GCDH-Gen mittels des QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit nach Angaben des Herstellers eingebracht.

3.2.6 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

Chemokompetente TOP10-*E.coli*-Zellen (100 µl) wurden auf Eis aufgetaut, mit einem Teil des Ligationsansatzes gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 30 sec bei 42°C und einer weiteren Inkubation für 5 min auf Eis wurden 0,7 ml LB-Medium zugegeben und der Ansatz 1 h bei 37°C und 220 rpm geschüttelt. Ein Teil des Transformationsansatzes wurde auf eine LB-Agarplatte, die ein entsprechendes Antibiotikum enthielt, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit je einer Kolonie wurden 5 ml LB-Medium (inkl. Antibiotikum) angeimpft. Diese Vorkultur wurde für die Präparation der Plasmide und zum Anlegen von Glycerinkulturen verwendet.

3.2.6.1 Präparation von chemokompetenten E.coli-Zellen

- Lösungen: Tfbl 100 mM RbCl 50 mM MnCl₂ 30 mM KAc 10 mM CaCl₂ 15 % (v/v) Glycerin pH 5,8 mit Essigsäure (0,2 M) eingestellt
 - TfbII 10 mM MOPS 10 mM RbCl 75 mM CaCl₂ 15 % (v/v) Glycerin pH 7,0 mit NaOH eingestellt

Tfbl und Tfbll wurden frisch angesetzt und sterilfiltriert. 5 ml LB-Medium wurde mit einer Kolonie *E.coli* TOP10 F von einer Stammplatte (LB-Agarplatte, ohne Antibiotikum) angeimpft und auf dem Drehrad bei 37°C bis zu einer OD₅₅₀ von 0,3 inkubiert. Mit 2 ml dieser Vorkultur wurden 200 ml LB-Medium in einem 1 I Schüttelkolben angeimpft und 2 bis 2,5 h unter Schütteln (200 rpm) bis zu einer OD₅₅₀ von 0,3 bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Kultur unter Schwenken 10 min in Eiswasser abgekühlt und 5 min bei 3000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde in 30 ml Tfbl (4°C) resuspendiert und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Anschließend wurde das Sediment in 4 ml Tfbll resuspendiert und in Aliquots von je 100 μ l in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.2.6.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Plasmid-Mini- und Midipräparationen wurden mittels des *Plasmid-Mini-Kits* (bis 20 µg DNA) und *Plasmid-Midi-Kits* (für 20-100 µg DNA) nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt.

3.2.7 Auftrennung von DNA in Agarosegelen

- TAE-Puffer 40 mM Tris/HCl pH 8.5 20 mM Essigsäure 2 mM EDTA
- DNA-Ladepuffer 40 % Saccharose 1 mM EDTA 0,25 % Bromphenolblau

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe wurden 1-2 % (w/v) Agarosegele verwendet. Die erforderliche Agarosemenge wurde in TAE-Puffer im Mikrowellenherd aufgekocht und nach dem Abkühlen auf ca. 55°C mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 0,5 µg/ml). Die Proben wurden mit DNA-Ladepuffer versehen und aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 3-4 V/cm durchgeführt. Unter UV-Licht wurden die DNA- Fragmente durch das in die DNA eingelagerte Ethidiumbromid sichtbar. Zur Dokumentation wurde das Agarosegel auf dem UV-Transilluminator mit einer Digitalkamera aufgenommen.

3.2.8 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Im Agarosegel aufgetrennte DNA wurde mit Hilfe des *Qiaquick-Spin-Gel-Extraction Kits* nach Anweisung des Herstellers aus der Agarose extrahiert.

3.2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode, um definierte DNA-Fragmente mit Hilfe der thermostabilen DNA-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermophilius aquaticus* (*Taq*) zu amplifizieren.

Als Template wurde DNA verwendet, die aus Schwanzspitzen (3.2.1) oder aus Bakterien (3.2.6.2) isoliert worden war. Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte in einem Thermocycler.

DNA- Template	Primer 3´ und 5´ (10 pmol/µl)	dNTP (10 mM je Nukleotid)	10 x PCR-Puffer	<i>Taq-</i> Polymerase (5 U/μl)	H₂O ad
50 ng	je 2,5 µl	2 µl	5 µl	1 µl	50 µl

Bei jeder PCR wurde eine Kontrolle ohne DNA-Template mitgeführt.

3.2.10 Sequenzierung von DNA

Die automatische Sequenzierung von DNA-Proben erfolgt nach dem Prinzip des Kettenabbruch-Verfahrens. Für eine Sequenzreaktion wurden folgende Komponenten zusammenpipettiert:

x μ l Plasmid-DNA (ca. 1 μ g)

- 1 µl sequenzspezifischer Primer (10 pmol/µl)
- 6 µl Puffer
- 2 µl Big Dye-Terminator-Mix
- x μl dH₂O (ad 20 μl)

Der Big Dye-Terminator-Mix enthielt dNTPs, fluoreszent-markierte ddNTPs, *Taq*-DNA-Polymerase und Reaktionspuffer. Die Kettenabbruchreaktion wurde als PCR in einem Thermocycler durchgeführt. Dabei wurden nach 5 min Denaturierung bei 96°C folgende Bedingungen für 25 Zyklen gewählt:

Denaturierung	95°C	10 sec
Anlagerung (Annealing)	50°C	5 sec
Elongation	60°C	4 min

Nach der Amplifikation wurde die DNA durch Zugabe von 80 μ l 0,3 M Na-Acetat (pH 4,6), 300 μ l Ethanol (96 %) und anschließendem mischen 15 min bei Raumtemperatur gefällt. Es folgte eine Zentrifugation für 20 min bei 17.000 x g. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen. Das Sediment wurde mit 200 μ l Ethanol (70 %) gewaschen, nochmals 10 min zentrifugiert und bei 60°C für 5 min getrocknet, bevor es der Sequenz-Analyse zugeführt wurde.

3.2.11 Isolierung von RNA aus Zellen

Das Medium von Zellen einer 3,5 cm-Kulturschale wurde abgesaugt und die Zellen einmal mit eiskaltem PBS gewaschen. Dann wurde 1 ml *peqGOLD RNA Pure* auf die Platte gegeben, und die Zellen wurden mit einem sterilem Einweg-Schaber abgeschabt, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 μ l Chloroform und 15-sekündigem Vortexen wurde erneut für 15 min bei RT inkubiert. Nach erfolgter Zentrifugation (15 min, 12.000 x g, 4°C) wurde die obere Phase vorsichtig abgenommen, ohne dabei die Interphase zu berühren, und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 500 μ l Isopropanol zugegeben und für 10 min bei RT inkubiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation (10 min, 12.000 x g, 4°C), und der Überstand wurde verworfen. Das resultierende RNA-Pellet wurde zweimal mit 70 % Ethanol/DEPC-Wasser gewaschen, dann für 20 min auf Eis getrocknet und in 30 μ l DEPC-Wasser aufgenommen. Die Quantität der RNA wurde photometrisch und die Qualität durch Auftrennung im Agarosegel überprüft.

3.2.12 Synthese von cDNA

RNA kann im Rahmen einer PCR nicht amplifiziert werden, da sie keine geeignete Matrize für die Polymerase darstellt. Es ist daher nötig, in einem Zwischenschritt mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase), zuerst eine zur RNA komplementäre cDNA zu synthetisieren. Die entstehende cDNA dient als Ausgangsmatrize für die Amplifikation mittels PCR.

Die cDNA wurde mit Hilfe des *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* nach Angaben des Herstellers synthetisiert.

3.2.13 DNA-Microarray

RNA aus Nieren von *Gcdh*-defizienten und Wildtyp-Mäusen der Altersstufe 42 Tage wurde zur Microarray-Analyse in das UKE-eigene Servicelabor (Institut für Klinische Chemie, Dr. T. Streichert) gegeben. Die Analyse erfolgte unter Verwendung des Affimetrix-Systems. Es wurde der *Gen-Chip Mouse Expression Set 430* verwendet.

3.2.14 Quantitative Real-Time PCR

Für die quantitative Analyse der RNA-Expression in Astrocyten und Neuronen wurden *TaqMan*[®] *Gene Expression Assays* verwendet. Dieser Assay enthält vorgefertigte Primer und Sonden. Die Sonde ist am 5`-Ende mit einem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff FAM markiert, während das 3´-Ende einen nicht fluoreszierenden Quencher-Farbstoff FAM-MGB trägt. Um die Extension der Sonde zu verhindern, ist das 3´-Ende zusätzlich mit einem Phosphatrest blockiert. Liegt der Quencher in ausreichende Nähe zu dem Reporterfarbstoff (max. 17-20 Basen), wird die Energie des Reporterfarbstoffs direkt an den Quencher-Farbstoff weitergeleitet (Cardullo *et al.*, 1988) und nur das Fluoreszenzspektrum des Quenchers emittiert. Dieser Mechanismus wird als Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) bezeichnet.

Während der Extension des Primers trifft die *Taq*-Polymerase auf die Sonde und beginnt diese zu verdrängen. Es entsteht eine Y-förmige Sekundärstruktur,
wodurch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase aktiviert wird (Holland *et al.*, 1991). Die Aktivierung bewirkt die Hydrolyse der Sonde. Die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher wird aufgehoben und das nun entstehende Fluoreszenzsignal kann detektiert werden.

Der Anstieg der Fluoreszenz ist proportional zum Anstieg der Konzentration des Amplifikationsproduktes. Die gemessene Fluoreszenz bleibt jedoch für eine gewisse Anzahl an Zyklen unverändert, da die entstehenden Produktmengen zu gering sind. In der exponentiellen Anstiegsphase wird der so genannte *cycle of threshold* (Ct) definiert. Der Ct-Wert einer Probe ist der Zyklus der PCR, bei dem erstmals eine exponentielle Zunahme des PCR-Produktes auftritt. Dieser Wert ist die Grundlage für die weitere Auswertung, mit der *Data Analysis for Real-Time PCR* (DART-PCR) Version 1.0 (Peirson *et al.*, 2003). Bei diesem Programm wird die relative RNA-Quantifizierung nach der 2^{-ΔΔCT}-Methode durchgeführt (Livak and Schmittgen, 2001). Jedoch wird auch die PCR-Effizienz ermittelt und in der Berechnung berücksichtigt. Die Effizienz errechnet sich aus einem Amplifikationsdiagramm mit der Formel:

Effizienz = $10^{(1/\text{Steigung})} - 1$.

Die Effizienz wird für jede Probe einzeln bestimmt.

Für die relative RNA-Quantifizierung wurde die Differenz zwischen dem Ct-Wert des zu untersuchenden Gens und dem Kontrollgen, *Gapdh* gebildet. Die relative Expression wurde aus dem Vergleich von Wildtyp- und *Gcdh*-defizienten Zellen nach der folgenden Gleichung ermittelt: relative Expression: $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Dabei ist

$$\Delta Ct = Ct_{Gen} - Ct_{Gapdh}$$
 und $\Delta(\Delta Ct) = \Delta Ct_{Gcdh}$ -defiziente Zellen - $\Delta Ct_{Wildtyp}$ -Zellen.

Für die graphische Auswertung wurde die relative Expression des Kontrollgewebes gleich 1 gesetzt.

Die PCR-Reaktionen erfolgten in einem 20 µl PCR-Ansatz in einer 96-Wellplatte in Triplikaten. Der Nachweis erfolgte mit dem Fluoreszenzdetektor MX3000P[™].

Real-time PCR-Ansatz:10 μ l TaqMan®2x Universal PCR Master Mix, No
AmpErase®UNG
7 μ l H2O
1 μ l TaqMan® Gene Expression Assay
2 μ l Template-cDNAPCR:95°C 10 min
95°C 30 sec
60°C 1 min \checkmark 40 Zyklen

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Kultivierung von Zelllinien

Die Kultivierung erfolgte bei 37°C, 85 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂. BHK-Zellen und immortalisierte Astrocyten (11+/+) wurden in DMEM + GlutaMax[™] + 10 % FKS und Penicillin/Streptomycin kultiviert. Alle 3 Tage wurden die Zellen passagiert.

3.3.2 Isolierung und Kultivierung primärer Zellen aus Mäusen

3.3.2.1 Isolierung und Kultivierung von primären Neuronen

 Hank's gepufferte Salzlösung (HBSS)
 1 mM MgCl₂

 5,5 mM Glukose

 137 mM NaCl

 5,4 mM KCl

 0,4 mM KH₂PO₄

 2,7 mM Na₂HPO₄*2H₂O

 4,2 mM NaHCO₃

 0,8 mM MgSO₄

 1,7 mM CaCl

Papain-Lösung (5 ml)	10 mM PBS 10 mM Glukose 50 µl DNase I 2,5 mg Papain
Ausplattiermedium	0,6 % Glukose 10 % Pferdeserum in MEM
Neurobasalmedium 1	2 % B27 0,5 mM GlutaMax™ 20 U/ml Penicillin 20 µg/ml Streptomycin 25 µM Glutamat
Neurobasalmedium 2	2 % B27 0,5 mM GlutaMax™ 20 U/ml Penicillin 20 µg/ml Streptomycin 10 µM AraC
Neurobasalmedium 3	2 % B27 0,5 mM GlutaMax™ 20 U/ml Penicillin 20 µg/ml Streptomycin

Zellkulturplatten wurden mit Poly-L-Lysin (0,5 mg/ml) beschichtet und bis zur Verwendung bei RT inkubiert.

Primäre Neurone wurden aus P0-P1 Tage alten Mäusen isoliert. Hierzu wurde das Hirn herauspräpariert. In kaltem HBSS wurden die Hirnhäute entfernt und die Cortices vom Stamm getrennt. Anschließend wurden die Cortices in 5 ml Papain-Lösung für 30 min bei 37°C geschüttelt. Nach Absaugen der Lösung wurden die Zellen 3 x mit 5 ml warmen Ausplattiermedium gewaschen. Die

Zellen wurden durch Resuspendieren in 2 ml Ausplattiermedium vereinzelt, gezählt und ausplattiert (siehe unten).

4-5 h später wurde das Medium gegen 1 ml Neurobasalmedium 1 gewechselt. Nach 3 Tagen wurden 500 μl des Mediums abgenommen und 500 μl des Neurobasalmedium 2 zugegeben, weitere 3-4 Tage später wurden wieder 500 μl abgenommen und 500 μl des Neurobasalmedium 3 zugegeben. 10-14 Tage nach der Präparation waren die Neurone ausdifferenziert und die Experimente wurden durchgeführt.

Zellkulturschale	Zellen
Glasplättchen	2 x 10 ⁵
12-Well	4 x 10 ⁵
3,5-cm	2,4 x 10 ⁶

3.3.2.2 Isolierung und Kultivierung von primären Astrocyten

Medium 10 % FKS 0,6 % Glukose 25 mM NaHCO₃ 200 nM Glutamin 50 U/ml Penicillin 50 μg/ml Streptomycin

Am Tag vor der Präparation wurden Zellkulturplatten mit Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) beschichtet und über Nacht bei 4°C gelagert oder die Platten wurden am gleichen Tag für 30 min bei 37°C beschichtet.

Für die Isolierung primärer Astrocyten wurden P0-P2 Tage alte Mäuse verwendet. Das Hirn wurde herauspräpariert. In kaltem HBSS wurden die Hirnhäute entfernt und die Hirne in kleine Stücke geschnitten. In einem 15 ml Reaktionsgefäß wurden die Stücke 3 x mit kaltem HBSS gewaschen, anschließend in 5 ml warmen Medium aufgenommen und mit einer Pasteur-Pipette homogenisiert. Die Zellsuspension wurde durch eine 180 µm, 140 µm

und eine 30 μ m Membran filtriert. Anschließend wurden die Zellen gezählt und in einer Dichte von 1x10⁵/cm² ausgesät.

Am nächsten Tag wurde vorsichtig das Medium gewechselt.

Alle 2-3 Tage wurden die Zellen PBS gewaschen und das Medium gewechselt. Nach 7 Tagen wurden die Experimente durchgeführt.

3.3.3 Trypsinieren von Zellen

Der Zellrasen wurde mit PBS gespült, um Trypsininhibitoren aus dem FKS zu entfernen. Nach dem Absaugen des PBS wurden die Zellen z.B. mit 0,5 ml Trypsin pro 25 cm²-Flasche für 2-5 min bei 37°C inkubiert. Die Trypsin-Reaktion wurde durch Zugabe von FKS-haltigem Medium gestoppt, die Zellen durch mehrfaches Aufsaugen mit einer Pipette vereinzelt und in der gewünschten Dichte ausgesät.

3.3.4 Gefrierkonservierung und Revitalisierung von Zellen

Einfriermedium	10 % DMSO
	20 % FKS

Zur Konservierung wurden konfluent gewachsene Zellen trypsiniert, in Medium aufgenommen und für 5 min bei 1.000 x g sedimentiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen(aus einer 75 cm²-Flasche in 3 ml Einfriermedium aufgenommen und auf drei Einfrierröhrchen verteilt. Die Zellen wurden über Nacht bei –80°C in einem "Nalgene™ Cryo 1°C Freezing Container" (Nalgene, Rochester, NY, USA) eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zur Revitalisierung wurde das eingelagerte Einfrierröhrchen für ca. 1 min bei RT angewärmt, bis nur noch ein kleiner Eiskern zu sehen war. Die Zellsuspension wurde entnommen, in 5 ml kaltem Medium aufgenommen und die Zellen 5 min bei 1.000 x g sedimentiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in 5 ml Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche (25 cm²) überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, um DMSO-Reste, tote Zellen und Zelltrümmer zu entfernen.

3.3.5 Transiente Transfektion von BHK-Zellen

BHK-Zellen wurden in Kulturschalen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80 bis 90 % kultiviert. Zur DNA-Transfektion wurde *Lipofectamine*[®]2000 verwendet. Die eingesetzte Menge an vektorieller DNA und Transfektionsreagenz richtete sich nach der Größe der Kulturschale (siehe unten). Die Durchführung der Transfektion erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Kulturschale	DNA	Lipofectamine
3,5-cm	2,5 µg	5,0 µg
6-cm	5,0 µg	10,0 µg

3.3.6 Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse (IFA)

Sterile Deckgläschen wurden in eine 12-Well-Gewebekulturschale ausgelegt. BHK-Zellen wurden in einer Dichte von 5 x 10^4 , primäre Neurone 2 x 10^5 und primäre Astrocyten 3,8 x 10^5 ausgesät. Die IFA wurde bei den BHK-Zellen am nächsten Tag, bei den primären Neuronen nach 10 Tagen und bei den primären Astrocyten nach 5 Tagen durchgeführt.

Die Zellen wurden für 30 min bei RT in 4 % Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Zellen 2 x 5 min mit PBS gewaschen, 5 min in 100 mM Glycin inkubiert und erneut 1 x 5 min mit PBS gewaschen. Die Plasmamembranen der Zellen wurden in einer 0,1 % Triton X-100 Lösung für 4 min permeabilisiert und zur Reduktion von unspezifischen Proteinwechselwirkungen für 30 min in 1 % BSA inkubiert. Es folgte eine Inkubation mit den entsprechenden in 1 % BSA verdünnten primären Antikörpern für 30 min. Daraufhin wurden die Proben dreimal 5 min mit PBS gewaschen und für 30 min mit den entsprechenden in 1 % BSA verdünnten sekundären Antikörpern inkubiert.

Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 5 min in einer DAPI-Lösung (Verdünnung 1:1000) inkubiert und erneut 2 x mit PBS gewaschen. Um eventuelle Salze zu entfernen, wurden die Zellen zweimal mit Wasser gewaschen. Mit Hilfe eines Eindeckmediums (Mowiol) wurden die Deckgläser auf Objektträgern fixiert und über Nacht bei RT getrocknet.

Die Zellen wurden durch konfokale Laser-Scan-Mikroskopie (Vergrößerung: 63 x, Leica DMIRE2) untersucht. Bei Doppel-Immunfluoreszenzanalysen erfolgten nach Einzelaufnahme der Fluoreszenz-Signale eine Überlagerung der digitalen Bilder (Adobe Photoshop Software).

3.3.7 Metabolische Markierung von Zellen mit [³⁵S]-Methionin

Hungermedium	Methionin-freies DMEM
	0,1 % BSA
Pulse-Medium	Methionin-freies DMEM
	4 % (v/v) dialysiertes FKS (hitze-inaktiviert)
	75 μCi/ml [³⁵ S]-Methionin
Chase-Medium	DMEM
	0,1 % BSA
	0,25 mg/ml Methionin
Lysispuffer	1 % Triton X-100
	0,5 % Na-deoxycholat
	0,5 % SDS
	2 % BSA
	in PBS
	\rightarrow 4 : 5 mit PBS verdünnen

Als metabolische Markierung bezeichnet man den Einbau radioaktiver Aminosäuren in neu-synthetisierte Proteine.

Dazu wurden die Zellen abends in einer Dichte von 5 x 10^5 Zellen je Zellkulturschale (35 mm Ø) ausgesät und am nächsten Morgen mit dem entsprechenden DNA-Konstrukten transfiziert (3.3.5). Am Tag darauf wurden die Zellen 3 x mit 2 ml PBS gewaschen und anschließend für eine Stunde mit Hungermedium inkubiert, bevor das Medium gegen 0,8 ml *Pulse*-Medium ausgetauscht wurde. Der Einbau in neu-synthetisierte Proteine erfolgte für 2 Stunden (*Pulse*). Zur Bestimmung der Prozessierung von Proteinen wurde das *Pulse*-Medium abgenommen und durch *Chase*-Medium ersetzt. Die Zellen wurden dann für weitere 2 bis 24 Stunden inkubiert (*Chase*).

Die Zellen wurden anschließend 2 x mit PBS gewaschen und in 500 µl Zell-Lysispuffer mit einem Gummispatel abgeschabt. Die Zellextrakte und Medien wurden zur Immunpräzipitation eingesetzt.

3.3.8 Immunpräzipitation von GCDH und GCDH-Mutanten

Neufeld-Puffer	10 mM Tris (pH 8,5)
	0,6 M NaCl
	0,1 % SDS
	0,05 % NP-40

IMM-Puffer	1 % Triton X-100
	0,5 % Na-desoxycholat
	in PBS

[³⁵S]-markierte Proteine aus Zellextrakten wurden mittels Immunpräzipitation analysiert. Die DNA-Fällung erfolgte durch Inkubation mit 50 U Benzonase für 10 min bei RT und Protaminsulfat (Endkonzentration: 0.03 %) für 20 min bei 4°C.

Anschließend wurde die gefällte DNA abzentrifugiert (10.000 x g, 10 Minuten, 4°C). Der Überstand wurde mit Präimmunserum aus Kaninchen und 40 μ l Protein A-Agarose versetzt und für 1 Stunde bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Die Protein A-Agarose und daran gebundene unspezifische Proteine wurden für 20 min bei 500 x g und 4°C abzentrifugiert. Zum Überstand wurden 2 μ l des *Gcdh*-Antikörpers gegeben und über Nacht bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Anschließend wurden jeweils 40 μ l Protein A-Agarose zu den Proben pipettiert und nochmals für 1 Stunde bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden abzentrifugiert (1 min, 500 x g, 4°C) und wie folgt gewaschen:

- 1 x 800 µl Neufeldpuffer
- 1 x 800 µl IMM-Puffer
- 1 x 800 µl IMM-Puffer + 2 M KCI
- 2 x 800 µl 0,1 x PBS

Anschließend wurden die präzipitierten Proteine durch 5-minütiges Erhitzen in Solubilisierungspuffer bei 95°C von den Protein A-Agarose getrennt mittels SDS-PAGE und anschließender Fluorographie analysiert.

3.3.9 [¹⁴C]-Succinat Aufnahme in Zellen

Transportpuffer	25 mM HEPES/Tris (pH 7,4)		
	140 mM NaCl / 140 mM Cholin-Chlorid (Bei der		
	Kontrolle der Natrium-abhängigen Aufnahme wird		
	statt NaCl Cholin-Chlorid genommen.)		
	5,4 mM KCl		
	1,8 mM CaCl ₂		
	0,8 mM MgSO₄		
	5 mM Glukose		
Aufnahme-Lösung	300 μl Transportpuffer		
	0,1 µCi ¹⁴ C-Succinat		

entsprechende Substanz

Für die [¹⁴C]-Succinat Aufnahme wurden die entsprechenden Zellen in 12-Well-Platten ausgesät.

Die Zellen wurden einmal mit Transportpuffer gewaschen. Anschließend wurden jeweils 300 μ l der Aufnahme-Lösung auf die Zellen gegeben und für 20 min bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nachdem das radioaktive Medium abgenommen war, wurden die Zellen schnell 3 x mit eiskaltem Transportpuffer gewaschen und in 300 μ l 0,2 M NaOH lysiert. 50 μ l wurde zur Proteinkonzentrationsbestimmung (3.4.2) abgenommen, von den restlichen 250 μ l wurde im β -Counter die Radioaktivität gemessen.

3.3.10 [¹⁴C]-Succinat Efflux aus Zellen

Die für den [¹⁴C]-Succinat-Efflux nötige Aufnahme der radioaktiven Substanz wurde wie unter 3.3.9 beschrieben durchgeführt. Nach der 20-minütigen

Inkubation wurde das radioaktive Medium abgesaugt und 300 μ l Transportpuffer auf die Zellen gegeben. Alle 2,5 min wurde der Transportpuffer aus einem Well abgenommen und 300 μ l 0,2 M NaOH auf die Zellen gegeben. Von den Zelllysaten wurden 50 μ l zur Proteinkonzentrationsbestimmung (3.4.2) abgenommen. Anschließend wurde die Radioaktivität in den restlichen 250 μ l und in dem Transportpuffer im β -Counter gemessen.

3.3.11 Crosslink von GCDH-Monomeren

Bindungspuffer	0,1 M HEPES (pH 7,6)
	120 mM NaCl
	1,8 mM MgSO₄
	5 mM KCl
	8 mM Glukose
	0,25 % Saponin
	1 % Triton X-100
	250 mM Saaabaraaa

Saccharose/EDTA 250 mM Saccharose 2 mM EDTA

Saccharose/EDTA 250 mM Saccharose 10 mM Tris/HCI (pH 7,4)

Transfizierte BHK-Zellen wurden 3 x mit PBS gewaschen, 1 x mit Saccharose/EDTA und 2 x in 1 ml Saccharose/Tris (3.4.1) abgeschabt. Die Zellen wurden durch eine 10-minütige Zentrifugation von 110 x g bei 4°C pelletiert. Das Pellet wurde in 100 μ l Bindungspuffer resuspendiert und nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wiederum 10 min bei 4°C und 1.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf 2 Reaktionsgefäße aufgeteilt und zu einem Ansatz wurden 200 μ M des *Crosslinkers* BS³ gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. In dieser Zeit bindet der *Crosslinker* an Proteine und kann diese kovalent *crosslinken*. BS³ gehört zu den N-Hydroxysuccinimid Estern und kann mit primären Aminen reagieren und stabile Amidbindungen bilden.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,2 M Tris/HCI (pH 7,4) beendet, da die primären Amine von Tris die *Crosslinker*-Bindung an Proteine blockieren. Anschließend wurden die Proben in einem SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western-Blot analysiert.

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 Herstellung von Homogenaten aus Zellen

Transient transfizierte BHK-Zellen wurden 48 Stunden nach Transfektion 3 x mit PBS und 1 x mit Saccharose /EDTA gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 2 x in 1 ml Saccharose/Tris abgeschabt und durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 110 x g und 4°C pelletiert. Die Zellen wurden in 200 µl Saccharose/Tris aufgenommen und mit einer Spritze (\emptyset = 0,9 mm) homogenisiert(45 Züge). Anschließend wurde dem Homogenat ein Protease-Inhibitor-Cocktail zugegeben und die Proteinkonzentration bestimmt (3.4.2).

3.4.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen mit dem Bio-Rad Protein Assay bestimmt.

3.4.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) und Fluorographie

Sammelgel	4 % Acrylamid
	0,1 M Tris/HCI (pH 6,8)
	0,1 % SDS
	0,1 % APS
	0,1 % TEMED
Trenngel	10 % Acrylamid
	0,375 M Tris/HCI (pH 8.8)
	0,1 % SDS
	0,016 % APS
	0,08 % TEMED

Solubilisierungspuffer (2x) 250 mM Tris/HCI (pH 6,8) 2 % SDS 20 % Glycerin Coomassie® Blue G (reduzierend: + 20 mM DTT)

Anodenpuffer 25 mM Tris/HCl, pH 8,6 192 mM Glycin

Kathodenpuffer 25 mM Tris/HCl, pH 8,6 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS

Proteine wurden nach ihrer Größe durch SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) in modifizierter Form nach Laemmli (1970) in einem diskontinuierlichen Puffersystem getrennt. Die Auftrennung erfolgte bei RT und 55 mA/Gel für ca. 2 h.

Für eine hohe elektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurden Tris-Tricin-Gele (Schagger and von Jagow, 1987) verwendet.

4 % Acrylamid	l 4 % A	k
0,7 M Tris/HCI (pH 8,	0,7 M	l (pH 8,45)
0,3 % SDS	0,3 %	
0,04 % APS	0,04 %	
0,16 % TEMED	0,16 %	D
0,3 % SDS 0,04 % APS 0,16 % TEMED	0,3 % 0,04 % 0,16 %	D

Trenngel

10 % Acrylamid 1 M Tris/HCl (pH 8,45) 0,1 % SDS 1 % Glycerin 0,025 % APS 0,07 % TEMED Solubilisierungspuffer (2x) 125 mM Tris/HCI (pH 6,8) 1 % SDS 10 % Glycerin Coomassie[®] Blue G

Anodenpuffer 200 mM Tris/HCl, pH 8,9

Kathodenpuffer 100 mM Tris-Base 100 mM Tricin 0,1 % (w/v) SDS

Zur Signalverstärkung wurde nach gelelektrophoretischer Auftrennung von radioaktiv-markierten Proteinen in Gelen eine Fluorographie angeschlossen. Die Gele wurden zunächst für 1 Stunde in DMSO inkubiert, wobei das DMSO 2 x gewechselt wurde. Anschließend wurden die Gele über Nacht in 20 % PPO/DMSO leicht geschwenkt.

Dann wurde das in die Gele diffundierte PPO durch Wässern der Gele für 1 Stunde ausgefällt, wobei das Wasser 2 x gewechselt wurde. Gleichzeitig erhielten die Gele ihre ursprüngliche Größe wieder, die sie beim Entwässern verloren hatten. Die Trocknung der Gele zwischen Cellophan-Folien erfolgte für 2 Stunden in einem Geltrockner. Auf die getrockneten Gele wurden Röntgenfilme aufgelegt und bis zur Entwicklung (1 bis 10 Tage) bei -80°C gelagert.

3.4.4 Western-Blot-Analyse

Transferpuffer	25 mM Tris
	192 mM Glycin
	20 % Methanol

Blockpuffer 1 x TBS 0,2 % Tween 20 5 % Milchpulver Waschpuffer 1 x TBS 0,2 % Tween 20

Enhanced Chemilumineszenz (ECL)

- Lösung 1 2,7 mM Luminol 0,44 mM p-Cumarinsäure 111 mM Tris/HCI (pH 8,5) x ml H₂O (ad 10 ml)
- Lösung 2 6 µl 30 % H₂O₂ 0,1 mM Tris/HCl (pH 8,5) x ml H₂O (ad 10 ml)

Zur spezifischen Detektion von Proteinen wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Der Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrocellulosemembran wurde für 2 h bei 900 mA in einer Elektroblot-Apparatur durchgeführt.

Nach dem Transfer wurde die Nitrocellulosemembran zum Absättigen unspezifischer Bindungen 1 h in Blockpuffer geschwenkt. Danach erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden primären Antikörper (in Blockpuffer verdünnt) entweder 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Es wurde 3 x 10 min mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 1 h mit dem entsprechenden sekundären Antikörper (in Blockpuffer verdünnt) bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde 3 x 10min mit Waschpuffer gewaschen.

Zur Detektion der Banden wurden die Lösung 1 und Lösung 2 der ECL in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und 1 min auf der Membran inkubiert. Anschließend wurde die Membran zwischen zwei Klarsichtfolien positioniert und ein Röntgenfilm aufgelegt. Der Film wurde nach geeigneter Expositionszeit entwickelt.

3.4.5 Immunhistochemie

Alle immunhistochemischen Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Neuropathologie des UKE unter Leitung von Herrn Prof. Glatzel durchgeführt.

3.4.6 3D-Strukturanalyse

Die 3D-Strukturanalyse der mutanten GCDH-Proteine wurden von Dr. Ernst Achim Dickmanns, Abteilung für molekulare Strukturbiologie, Göttinger-Zentrum für molekulare Biowissenschaften und Dr. Bernhard Schmidt, Institut für Biochemie 2, Georg-August Universität, Göttingen.

3.4.7 Aktivitätsbestimmung von GCDH

Die Aktivitätsmessungen der GCDH und der mutierten GCDH wurde durch Bestimmung der Freisetzung von [¹⁴]-CO₂ aus [¹⁴C]-Glutaryl-CoA (Christensen, 1983) und wurde von Herrn Prof. Ernst Christensen, Institut für klinische Genetik, Universität Kopenhagen.

3.5 Tierexperimentelle Methoden

3.5.1 Perfusion von Mäusen

Da bei einigen Untersuchungen das in den Organen enthalte Blut stört, wurden die betreffenden Tiere perfundiert.

Die Mäuse wurden zunächst mit 1,2 mg Ketanest, 0,16 mg Rompun/mg Körpergewicht narkotisiert und für 5 min mit 3,75 ml 10 mM PBS + Heparin (0,5 IE/ml) über die linke Herzkammer perfundiert.

3.5.2 Aufarbeitung der Organe für histologische und immunhistochemische Untersuchungen

Für histologische und immunhistochemische Untersuchungen wurden perfundierte (3.5.1) Organe entnommen und zur Anfertigung von Kryoschnitten in Hanks-Medium in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für Paraffinschnitte mit nachfolgender Hämotoxylin-Eosin-Färbung oder Immunhistochemie wurden die Organe in 4 % (w/v) Formalin fixiert.

3.5.3 Hochproteindiät

Durch Gabe einer Hochproteindiät lässt sich bei *Gcdh*-defizienten Mäusen eine akute Enzephalopathie induzieren (Zinnanti *et al.*, 2006, Keyser *et al.*, 2008). Die Mäuse erhielten als Futter eine Hochproteindiät mit einem Proteinanteil von 62 %.

3.5.4 Injektion von Substanzen in Mäuse

42 und 100 Tage alte Wildtyp- und *Gcdh*-defiziente Mäuse wurden für 4 Tage mit einer Standard- bzw. einer Hochproteindiät gefüttert. Anschließend wurden ihnen Dextrane bzw. [³H]-3OHGA über die Schwanzvene injiziert.

3.5.4.1 Injektion von Dextranen

Zur Untersuchung der Blut-Hirn-Schranke wurden den Mäusen 3 kDa Biotin, 10 kDa Biotin, 10 kDa Alexa Fluor 594 oder 70 kDa Fluorescein-markierte Dextrane injiziert (5 µg/g Körpergewicht). Nach 4 Stunden wurden die Mäuse mit 10 ml 10 mM PBS + Heparin (0,5 IE/ml) und anschließend mit 2 % Paraformaldehyd perfundiert (3.5.1). Die Organe wurden für histologische und immunhistologische Untersuchungen weiterverarbeitet.

3.5.4.2 Injektion von [³H]-3-Hydroxyglutarsäure in Mäuse

Um die Verteilung von 3OHGA *in vivo* zu untersuchen, wurden 42 und 100 Tage alten Mäusen ca. 1×10^7 cpm [³H]-3OHGA (in 50 µl 10 mM PBS) injiziert. In den folgenden 6 h wurden stündlich der Kot und der Urin gesammelt. Nach 6 h wurden die Tiere betäubt (3.5.1), etwas Blut aus dem Herzen abgenommen und in einem Reaktionsgefäß aufbewahrt. Die Tiere wurden dann sofort mit 0,9 % NaCl + Heparin (0,5 IE/ml) perfundiert (3.5.1). Die Organe, das Blut und eventueller Blasenurin wurden in Reaktionsgefäßen gesammelt.

Zur Aufarbeitung der Organe wurden zwischen 10-50 mg der Organe und des Kots abgeschnitten und in Tissue-Solubilizer bei 56°C über Nacht gelöst. Anschließend wurden die gelösten Organe/Kot zur Vermeidung von Quench-Effekten durch Zugabe von 30 % H_2O_2 bei 50°C entfärbt. Die Messung der in den Organen enthaltenen Radioaktivität erfolgte im β -Counter.

4 Ergebnisse

4.1 Expression und Stabilität von mutanter GCDH

Bei GA1 sind über 150 Mutationen im *GCDH*-Gen bekannt (Goodman *et al.*, 1998, Schwartz *et al.*, 1998, Busquets *et al.*, 2000, Zschocke *et al.*, 2000). Da es keine Korrelation zwischen der Restaktivität der GCDH und der Schwere der Krankheit gibt (Christensen *et al.*, 2004), müssen die Mutationen noch andere Auswirkungen auf das Protein haben. Deshalb wurden vier *Missense*-Mutationen ausgewählt, wovon zwei das katalytische Zentrum betreffen, eine die häufigste Mutation in Kaukasien ist und eine Mutation bei einem Patienten aus dem UKE festgestellt wurde (Tab. 1). Die Mutationen wurden in die cDNA der *GCDH* eingeführt, die mit einem myc-Tag am C-Terminus fusioniert war. BHK-Zellen wurden anschließend mit Wildtyp- und mutanten cDNA-Konstrukten transfiziert.

Mutation	Basen- austausch	Bedeutung	Restaktivität	
p.Arg138Gly	412A>G	Decarboxylierung	? *	(Goodman <i>et</i> <i>al.</i> , 1998)
p.Met263Val	787A>G	UKE Patient mit schwerem Verlauf	30 % (humane Fibroblasten)	(Mühlhausen <i>et al.</i> , 2003)
p.Arg402Trp	1204C>T	Häufigste Mutation in Kaukasien	3 % (<i>E.coli</i>) < 0,5 % (humane Fibroblasten)	(Biery <i>et al.</i> , 1996) (Schwartz <i>et</i> <i>al.</i> , 1998)
p.Glu414Lys	1240G>A	Katalytische Base	?*	(Biery <i>et al.</i> , 1996)

Tab. 1: Mutationsauswahl der GCDH

[#] Restaktivität der Mutation Arg138GIn = 0,1 % (*E.coli*)

* Restaktivität der Mutation Glu414Gln = 4,5 % (E.coli)

Die Position der ausgewählten Mutationen im GCDH-Protein sind in Abb. 4 schematisch dargstellt.



Abb. 4: Schematische Darstellung der GCDH und Positionen ausgewählter Mutationen. Das Vorläuferprotein der GCDH besteht aus 438 Aminosäuren (As). Die ersten 44 As (graue Box) dienen als mitochondriales Lokalisierungssignal, das nach dem Import in das Mitochondrium proteolytisch abgespalten wird. Die Nummerierung der Aminosäuren beginnt bei Methionin 1 des Vorläuferproteins.

4.1.1 Aktivität mutanter GCDH-Proteine

BHK-Zellen wurden mit der cDNA von Wildtyp- und mutanter GCDH transient transfiziert, die Zellen 48 h später geerntet und die Aktivität der GCDH bestimmt. Als Kontrolle dienten nicht-transfizierte Zellen (Tab. 2).

GCDH-Protein	Aktivität [% vom Wildtyp]		
Wildtyp	100 [*]		
-	1,7		
p.Arg138Gly	1,7		
p.Met263Val	10,4		
p.Arg402Trp	1,6		
p.Glu414Lys	1,7		

Tab. 2: GCDH-Aktivität von Wildtyp- und mutanter GCDH

* Die GCDH-Aktivität von Wildtyp-GCDH exprimierenden BHK-Zellen betrug 363 µmol/h/g Protein (Bereich: 354 – 371 µmol/h/g Protein).

4.1.2 3D-Strukturanalyse der Mutationen

Um zu untersuchen, ob die Mutationen Auswirkungen auf die Sekundär- bzw. Tertiärstruktur der GCDH haben, wurden 3D-Strukturanalysen (*3D-Remodeling*) mit Hilfe der Daten der kristallisierten GCDH (Fu *et al.*, 2004) durchgeführt.



Abb. 5: 3D-Strukturanalyse mutanter GCDH. A: Lokalisierung der Mutationen im GCDH-Protein. FAD (gelb) und Glutaryl-CoA (blau) befinden sich im aktiven Zentrum. B-E: Vergrößerungen der betroffenen Regionen der angegebenen Mutationen. In braun sind die Wildtyp- und in blau die mutierten Aminosäuren zu sehen.

Die Mutationen p.Arg138Gly und p.Glu414Lys liegen im aktiven Zentrum (Abb. 5 D, E), haben aber keine Auswirkungen auf die Struktur des Enzyms. Die Mutation p.Met263Val liegt an der Oberfläche in einer β -Faltblattstruktur (Abb. 5 B) und p.Arg402Trp ist Teil einer α -Helix (Abb. 5 C). Die Aminosäureaustausche Met263Val und Arg402Trp haben keinen Einfluss auf die Struktur der GCDH.

4.1.3 Expressionsanalyse mutanter GCDH

Transient transfizierte BHK-Zellen wurden nach 48 h geerntet und ein Homogenat hergestellt (3.4.1). Nach Auftrennung eines Aliquots des Homogenats in einem Tris-Tricin-Gel wurde die Expression der Wildtyp- und der mutanten GCDH durch Western-Blot-Analyse untersucht. Als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung des Gels mit äquivalenten Proteinmengen wurde das mitochondriale Protein MnSOD verwendet (Abb. 6). Die Intensitäten der GCDH wie auch der MnSOD immunreaktiven Banden wurden densitometrisch ausgewertet und in Relation gesetzt.



Abb. 6 Expression der mutanten GCDH in BHK-Zellen. Homogenate von BHK-Zellen, die Wildtyp- oder mutante GCDH exprimierten, wurden durch Tris-Tricin-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels GCDH Western-Blot analysiert. Bei der densitometrischen Auswertung wurde die relative Intensität der Wildtypbande gleich 100 % gesetzt. Eine gleichmäßige Beladung des Gels wurde durch Western-Blot-Analyse gegen MnSOD nachgewiesen. Als Negativkontrolle dienten nicht-transfizierte (-) BHK-Zellen.

Im Vergleich zum Wildtyp-GCDH-Protein war die durchschnittliche Expression der GCDH-Mutanten p.Arg138Gly und p.Met263Val um 30 % erniedrigt. Die *steady-state* Konzentration der GCDH-Mutante p.Glu414Lys war dagegen um das 1,3-fache gegenüber den Wildtyp exprimierenden Zellen erhöht. In nicht-transfizierten BHK-Zellen konnte eine schwache Bande mit ähnlicher elektrophoretischer Mobilität wie Wildtyp-GCDH nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um das endogene GCDH-Protein. Die Expression der p.Arg402Trp-Mutante lag um etwa 80 % unter der Wildtyp-GCDH (Abb. 6).

4.1.4 Stabilität der GCDH-Mutanten

Die niedrige Expression der mutanten GCDH p.Arg402Trp kann entweder auf eine verringerte Synthese oder einen erhöhten Abbau zurückgeführt werden. Um die Rate der Synthese bzw. des Abbaus zu bestimmen, wurden Pulse-Chase-Experimente durchgeführt. Dazu wurden nicht-transfizierte und BHK-Zellen, die Wildtyp- und mutante GCDH exprimierten zunächst für 2 h mit [³⁵S]-Methionin inkubiert. Nach diesem Pulse, wurde ein Teil der Zellen geerntet und ein Teil einem 24-stündigem Chase in nicht-radioaktivem Medium unterzogen. Anschließend wurde GCDH immunpräzipitiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Fluorographie sichtbar gemacht. Nach 2-stündigem Pulse, war in allen GCDH exprimierenden Zellen eine 48/43 kDa Doppelbande von etwa gleicher Intensität nachweisbar. Die 48 kDa Bande repräsentiert das Vorläuferprotein, das 43 kDa Polypeptid die reife GCDH-Form. Nach 24 Stunden wurden alle GCDH Vorläuferproteine zu reifem Protein prozessiert. Von der p.Arg402Trp-Mutante war nach 24 h kein [³⁵S]-markiertes Polypeptid mehr nachweisbar (Abb. 7). Bei nicht-transfizierten BHK-Zellen konnte keine [³⁵S]-markierte GCDH präzipitiert werden.



Abb. 7: Synthese und Stabilität von Wildtyp- und mutanter GCDH. Nicht-transfizierte und BHK-Zellen, die mit Wildtyp- und mutanter *GCDH*-cDNA transfiziert wurden, wurden 2 h mit [³⁵S]-Methionin markiert und entweder geerntet (-) oder einem *Chase* von 24 h unterzogen. Anschließend wurden Wildtyp-GCDH und GCDH-Mutanten immunpräzipitiert, über SDS-PAGE aufgetrennt und durch Fluorographie sichtbar gemacht.

Um die Stabilität der p.Arg402Trp-Mutante genauer zu bestimmen, wurden transfizierte BHK-Zellen für 2 h mit [³⁵S]-Methionin markiert und für kurze Zeiten (2-24 h) einem *Chase* unterzogen. Nach densitometrischer Auswertung des

Fluorogramms (Abb. 8 A) war von der Wildtyp-GCDH nach 24 h noch 65 % des ursprünglich synthetisierten Polypeptids nachweisbar. Die Stabilität der mutanten GCDH p.Arg402Trp war jedoch drastisch reduziert. Hier war schon nach 2 h nur noch 70 % des Proteins nachweisbar. Die Halblebenszeit der Mutante wurde auf etwa 4 h kalkuliert (Abb. 8 B). Die Halblebenszeit der Wildtyp-GCDH konnte nicht experimentell nachgewiesen werden, da die transfizierten BHK-Zellen nach spätestens 24 h *Chase* geerntet werden mussten. Wenn die Kurve der t¹/₂ von Wildtyp-GCDH auf 50 % extrapoliert wird, ergibt sich eine Halblebenszeit von ca. 34,5 h.



Abb. 8: Halblebenszeit von Wildtyp-GCDH und p.Arg402Trp-Mutante. Transfizierte BHK-Zellen wurden 2 h mit [³⁵S]-Methionin markiert und entweder geerntet (-) oder einem *Chase* für die angegebenen Zeiten unterzogen. Die BHK-Zellen, die die Arg402Trp-Mutante exprimierten, wurden einem *Chase* von 2, 4, 8 und 24 h unterzogen. Anschließend wurde Wildtyp- und mutierte GCDH immunpräzipitiert, über SDS-PAGE aufgetrennt und durch Fluorographie sichtbar gemacht (A). Bei der densitometrischen Auswertung wurden die Intensitäten der Banden nach dem *Pulse* gleich 100 % gesetzt. Der Wert, bei welchem 50 % des Proteins abgebaut wurde, repräsentiert die Halblebenszeit des Proteins (B).

4.1.5 Intrazelluläre Lokalisierung der GCDH

Die mutierte GCDH p.Arg402Trp ist instabil und wird schnell abgebaut (4.1.3, 4.1.4). Um Aussagen zu erhalten, ob der Abbau der p.Arg402Trp-Mutante vor oder nach Import in das Mitochondrium stattfindet, wurde die Lokalisierung der Wildtyp- und mutanter GCDH durch Doppel-Immunfluoreszenz-Mikroskopie untersucht (Abb. 9). Wildtyp-GCDH kolokalisierte komplett mit dem mitochondrialen Marker MnSOD, ebenso wie die p.Arg402Trp-Mutante. Dies wurde durch die Tatsache bestätigt, dass das mutierte Protein vom Vorläuferprotein zur reifen Form prozessiert wird (4.1.4), was nur im Mitochondrium selbst geschehen kann.

Diese Daten lassen vermuten, dass die mutierte GCDH p.Arg402Trp noch in die Mitochondrien importiert werden kann, dort aber einem erhöhten Abbau unterliegt.



Abb. 9: Lokalisierung der p.Arg402Trp-Mutante. Wildtyp- und GCDH Arg402Trp exprimierende BHK-Zellen wurden fixiert und GCDH (grün) mittels eines anti-myc Antikörpers und der mitochondriale Marker MnSOD (rot) durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie sichtbar gemacht. Eine Kolokalisierung ist rechts in gelb dargestellt. Die Ausschnitte stellen eine vierfache Vergrößerung der markierten Ausschnitte dar. Bei der p.Arg402Trp-Mutante ist unten rechts eine nicht transfizierte Zelle zu sehen.

4.1.6 Dimerisierung der GCDH-Mutanten

Im Mitochondrium lagern sich die Monomere der GCDH zu einem enzymatisch aktiven Tetramer-Komplex zusammen (Tanaka *et al.*, 1990, Härtel *et al.*, 1993).

Da die p.Met263Val-Mutation weder die Faltung, noch die Expression oder die Stabilität des Proteins beeinträchtigt, wurde untersucht, ob durch sie die Dimerisierung bzw. Tetramerisierung verhindert wird. Durch Zugabe des chemischen *Crosslinkers* BS³ können Proteine, die freie reaktive Amine in einem Abstand von etwa 11,4 Å besitzen, kovalent miteinander verbunden werden.

Durch die Zugabe von BS³ zu einem Zellhomogenat, einer Auftrennung durch SDS-PAGE und anschließender anti-myc Western-Blot-Analyse konnten die Multimere nachgewiesen werden. Mit Ausnahme der p.Arg402Trp-Mutante, deren Expression zu schwach war, konnten alle anderen GCDH-Proteine (Wildtyp, p.Arg138Gly, p.Met263Val und p.Glu414Lys) Dimere (86 kDa), Trimere (129 kDa) und Tetramere (172 kDa) bilden (Abb. 10). Nach Quervernetzung der Wildtyp- und p.Glu414Lys GCDH waren zwei weitere Proteinbanden bei ca. 110 kDa und 190 kDa sichtbar, die durch Interaktion mit zwei anderen Polypeptiden entstehen.

Die Mutationen verhindern also nicht die Multimerisierung der Proteine.



Abb. 10: Multimerisierung der GCDH und ihrer Mutanten. Homogenate von transfizierten BHK-Zellen wurden in An- (+) und Abwesenheit (-) des *Crosslinker* BS³ inkubiert. Nach Auftrennung durch SDS-PAGE und anschließender anti-GCDH Western-Blot-Analyse konnten bei allen Proteinen Multimere nachgewiesen werden. Die Expression der Mutante p.Arg402Trp war zu niedrig, um die Di-, Tri- und Tetramer-Komplexe nachzuweisen. Die Identität der mit * und ** markierten Polypeptide ist unbekannt.

4.2 Verteilung von 3-Hydroxyglutarsäure unter basalen und pathophysiologischen Bedingungen

Bis heute ist nicht bekannt, welcher GA1-Metabolit neurotoxisch wirkt. Es wird angenommen, dass 3-Hydroxyglutarsäure für die Symptome verantwortlich ist, da Glutarsäure auch bei anderen Krankheiten (z.B. GA2, GA3) entsteht (Knerr *et al.*, 2002).

Da bei GA1 spezifisch das Striatum zerstört wird, sollte untersucht werden, ob 3OHGA vom Hirn selber produziert wird oder ob zirkulierende 3OHGA, die in anderen Organen, vor allem in der Leber, entsteht, über die Blut-Hirn-Schranke in das Hirn gelangen kann und dort neurotoxisch wirkt.

4.2.1 Verteilung von [³H]-3-Hydroxyglutarsäure in 42 und 100 Tage alten *Gcdh*-defizienten Mäusen unter basalen Bedingungen

Die Blut-Hirn-Schranke ist eine Barriere zwischen Blutkreislauf und dem Gewebe des Hirns. Sie besteht aus Endothelzellen, an die sich Pericyten anlagern. Umschlossen werden die Endothelzellen und Pericyten von Astrocyten. Die Zwischenräume zwischen den Endothelzellen werden durch *Tight Junctions* verschlossen. Die Aufgabe der Blut-Hirn-Schranke ist es die Konzentration an Ionen, wie Na⁺, K⁺ und Ca²⁺, im Hirn zu kontrollieren, die Aufnahme von wichtigen Nährstoffen zu ermöglichen, sowie zu verhindern, dass toxische Substanzen in das Hirn eindringen können (Hawkins and Davis, 2005).

Um zu überprüfen, ob 3OHGA in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und in welchen Organen sich zirkulierende 3OHGA anreichert, wurden 42 und 100 Tage alten Wildtyp- und *Gcdh*-defizienten Mäusen [³H]-3OHGA intravenös injiziert. Kot und Urin wurden stündlich gesammelt und 6 h nach Injektion wurden die Tiere perfundiert und die Verteilung radioaktivmarkierter 3OHGA in den Organen (Hirn, Lunge, Gallenblase, Leber, Milz, Nieren, Magen, Darm), Kot, Urin und Blut gemessen.

Die 42 bzw. 100 Tage alten Mäuse schieden zwischen 88 und 99 % der injizierten [³H]-3OHGA mit dem Urin aus. Um die restliche Radioaktivität in den Organen besser vergleichen zu können, wurde die Radioaktivität, die im Urin

gefunden wurde nicht berücksichtigt. Die relative Verteilung injizierter [³H]-3OHGA war im Blut und allen untersuchten Organen nicht wesentlich verändert, mit Ausnahme der im Kot wiedergefundenen Radioaktivität. Wildtyp-Tiere schieden im Durchschnitt ca. 15 % mehr Radioaktivität über den Kot aus als *Gcdh*-defiziente Mäuse (Abb. 11).



Abb. 11: Verteilung von intravenös injizierter [³**H**]-**3OHGA in 100 Tage alten Mäusen.** Die Radioaktivität in den Organen, Blut und Kot wurde als Prozent der wiedergefundenen Radioaktivität 6 Stunden nach Injektion angegeben. Die Radioaktivität, die über den Urin ausgeschieden wurde, wurde nicht berücksichtigt. Die Balken repräsentieren den Median ± Range. Es wurden jeweils 2 Tiere untersucht. Organe = Hirn, Lunge, Gallenblase, Leber, Milz, Nieren, Magen, Darm.

Bei 42 Tage alten Tieren hingegen wurde in *Gcdh*-defizienten Mäusen nur ca. 16 % der Radioaktivität in den Organen wiedergefunden, während die Wiederfindung bei Wildtyp-Mäusen bei 25 % lag. Im Hirn *Gcdh*-defizienter Mäuse konnten sogar nur ca. 3 %, gegenüber 6 % in Wildtyp-Mäusen, nachgewiesen werden. Dafür wurde im Kot dieser Mäuse ca. 9 % der [³H]-3OHGA gemessen, wohingegen die relative Radioaktivität im Kot bei Wildtyp-Tieren nur ca. 1 % ausmachte (Abb. 12).



Abb. 12: Verteilung von intravenös injizierter [³H]-3OHGA in 42 Tage alten Mäusen. Die Radioaktivität in den Organen, Blut und Kot wurde als Prozent der wiedergefundenen Radioaktivität 6 Stunden nach Injektion angegeben. Die Radioaktivität, die über den Urin ausgeschieden wurde, wurde nicht berücksichtigt. Die Balken repräsentieren den Median \pm Range. Es wurden 2 (Wildtyp) bzw. 4 (*Gcdh*-defizient) Tiere untersucht. [#] p = 0,06.

Zusammenfassend zeigen die Experimente, dass sowohl bei 42 als auch bei 100 Tage alten *Gcdh*-defizienten Mäusen nicht mehr [³H]-3OHGA aus der Zirkulation in das Hirn übertreten kann. Bei den 42 Tage alten Tieren, war sogar weniger Radioaktivität gemessen worden, was daran liegen könnte, dass diese Mäuse endogenes (nicht radioaktives) 3OHGA produzieren und es somit zu einer Verdrängung der radioaktiven [³H]-3OHGA kommt.

Bei 42 Tage alten *Gcdh*-defizienten Mäuse kann außerdem ein signifikanter Anteil der [³H]-3OHGA über den Kot ausgeschieden werden.

4.2.2 Hochproteindiät-induzierte metabolische Krise

Gcdh-defiziente Mäuse zeigen zwar biochemische und histopathologische Merkmale, die bei GA1-Patienten beschrieben werden (erhöhte GA- und 3OHGA-Konzentrationen in Körperflüssigkeiten, Vakuolisierung des Hirns), entwickeln aber keine metabolische Krise (Koeller *et al.*, 2002). Im Jahr 2006 konnten Zinnanti *et al.* jedoch zeigen, dass sich eine enzephalopatische Krise

bei den Mäusen manifestierte, wenn diesen eine Hochproteindiät (HPD) als Futter gegeben wurde. Die Mäuse hatten erhöhte Konzentrationen von GA und 3OHGA in allen Körperflüssigkeiten und Geweben, striatale Verletzungen, einen Verlust an Neuronen und Bewegungsstörungen. In Abhängigkeit vom Alter (28 und 56 Tage) verstarben *Gcdh*-defiziente Mäuse innerhalb von 2-8 Tagen nach HPD (Zinnanti *et al.*, 2006). Unter unseren Versuchbedingungen zeigten 42 Tage alte Wildtyp-Mäuse keine Reaktion auf die Diät, mit Ausnahme einer erhöhten Wasseraufnahme (Stellmer, 2007b). Nach 6 Tagen unter HPD lebten noch 100 % der Mäuse. Bei den *Gcdh*-defizienten Tieren jedoch waren am 3. Tag unter HPD schon 50 % der Tiere gestorben und am 5. Tag waren alle Tiere in der Versuchsreihe tot (Tab. 3).

Die 100 Tage alten *Gcdh*-defizienten Mäuse kamen mit wenigen Ausnahmen gar nicht in die Krise.

Maus	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6.Tag
Wildtyp	100	100	100	100	100	100
<i>Gcdh</i> - defizient	100	91	45	9	-	-

Tab. 3: Überlebensrate [%] von Gcdh-defizienten Mäusen unter Hochproteindiät (n=11)

4.2.2.1 Histologische und immunhistologische Untersuchungen

Um die Auswirkungen der HPD auf die Mäuse genauer zu untersuchen, wurden makroskopische, histologische und immunhistologische Untersuchungen durchgeführt.

42 Tage alte Wildtyp- bzw. *Gcdh*-defiziente Mäuse wurden mit HPD gefüttert. Nach 4 Tagen wurden die Mäuse getötet und die Hirne makroskopisch untersucht. Bei *Gcdh*-defizienten Mäusen waren deutliche subarachnoidale Einblutungen zu sehen, die bei Wildtyp-Mäusen nicht auftraten (Abb. 13 A-F). Diese Einblutungen waren auch in einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) zu sehen, bei der das Hämatoxylin alle sauren Bereiche einer Zelle, wie z.B. den Zellkern, blau anfärbt und das Eosin alle basischen Bereiche, wie z.B. das Zytoplasma, rötlich anfärbt. Deutlich waren die Erythrozyten zu erkennen, die bei der Einblutung unter der Arrachnoidea akkumulierten. Jedoch waren die Einblutungen auf den subarachnoidalen Raum begrenzt (Abb. 13 G, H).



Abb. 13: Einblutungen in das Hirn von *Gcdh*-defizienten Mäusen. Die Abbildung zeigt makroskopische Bilder von Hirnen einer Wildtyp-Maus (A-C) und einer *Gcdh*-defizienten Maus (D-F) unter HPD. A, D : Craniale Sicht; B, E: Caudale Sicht; C, F: Median-sagittal geschnittene Hirne aus medialer Sicht. In den Hirnen der *Gcdh*-defizienten Maus sind subarachnoidale Einblutungen zu erkennen. G, H: HE-gefärbte Schnitte vom Hirn einer *Gcdh*-defizienten Maus am 4. Tag nach HPD, die subarachnoidale Einblutungen zeigen (G, Pfeil). Die Erythrozyten weisen keine Anzeichen von Abbau auf, was auf eine frische Blutung hindeutet (H, Balken: 50 μ m).

Nach HE-Färbungen von Hirnschnitten einer 42 Tage alten *Gcdh*-defizienten Maus waren unter Standarddiät Vakuolen im Striatum, Hippocampus sowie im Cortex zu erkennen (Abb. 14 A-F). Bei *Gcdh*-defizienten Mäusen erhöhte sich die Zahl der Vakuolen nach 4 Tagen HPD noch. Die Anzahl der Vakuolen wurde quantitativ bestimmt. Im Cortex von *Gcdh*-defizienten Mäusen war die Zahl der Vakuolen um das sechsfache, im Hippocampus um das zweifache und im Striatum um das dreifache angestiegen, gegenüber Mäusen, die Standardfutter bekamen (Abb. 14 G).



Abb. 14: Vakuolisierung bei *Gcdh*-defizienten Mäusen. Hirnschnitte von 42 Tage alten *Gcdh*-defizienten Mäusen unter Standarddiät (A, C, E) oder unter HPD (B, D, F) wurden HE-gefärbt. Im Cortex (A, B), Hippocampus (C, D) und Striatum (E, F) waren unter basalen Bedingungen Vakuolen sichtbar, deren Zahl unter einer HPD-induzierten metabolischen Krise noch anstieg. Balken: 25 µm. G: Quantifizierung der Anzahl der Vakuolen pro Gesichtsfeld (283 x 214 µm) in HE-gefärbten Hirnschnitten zeigte eine signifikante Erhöhung in der Anzahl der Vakuolen in Hirnen von *Gcdh*-defizienten Mäusen unter HPD. Für jede Gruppe wurden 2 Tiere untersucht und 5 Gesichtsfelder wurden für jedes Tier und jede Region gezählt. Die Signifikanz wurde mit einem zweiseitigen t-Test für ungepaarte Stichproben bestimmt. *p<0,05; **p<0,001.

Neurodegenerative Erkrankungen werden häufig von Gliose (Vermehrung von Gliazellen) begleitet. 42 Tage alte Wildtyp- und *Gcdh*-defiziente Mäuse wurden nach 4 Tagen HPD perfundiert und Hirnschnitte immunhistochemisch mit Antikörpern gegen das <u>Glial fibrillary acidic protein</u> (GFAP) angefärbt. GFAP ist ein Astrocyten-Marker und dient zum Nachweis einer Gliose. Bei Wildtyp- und *Gcdh*-defizienten Mäusen konnten Astrocyten angefärbt werden, ohne dass ein Unterschied zwischen dem Wildtyp-Tier und dem *Gcdh*-defizienten Mäusen keine vermehrte Gliose nachweisbar.



Abb. 15: GFAP-spezifische Immunhistochemie. Hirnschnitte von 42 Tage alten Wildtyp- und *Gcdh*-defizienten Mäusen unter HPD wurden mit einem GFAP-spezifischen Antikörper gefärbt (rot). Die Ausschnitte stellen eine zweifache Vergrößerung der eingezeichneten Bereiche dar.

Bei der Sezierung der Mäuse fiel auf, dass der Darm *Gcdh*-defizienter Mäuse nach 4 Tagen HPD, sehr dunkel war. Bei einer genaueren Untersuchung konnte makroskopisch Blut im Darm festgestellt werden (Abb. 16 A, B). Die histologische Untersuchung des Darms zeigte jedoch keine Auffälligkeiten. Es waren keine Einblutungen zu sehen (Abb. 16 C-E) (Vergleiche Abb. 13 G, H).



Abb. 16:Untersuchungen zu Einblutungen in den Darm von Gcdh-defizienten Mäusen unter HPD. Gcdh-defiziente Mäuse wurden mit einer Standarddiät bzw. mit einer HPD gefüttert. Nach 4 Tagen HPD waren makroskopisch Einblutungen (A und B unten) in den Darm der Mäuse unter HPD zu sehen. In HE-Färbungen vom Darm von Wildtyp-Mäusen unter HPD (C), Gcdh-defizienten Mäusen unter Standarddiät (D) bzw. unter HPD (E) konnten jedoch keine Einblutungen in Form von Erythrozyten nachgewiesen werden. Balken: 50µm.

4.2.2.2 Verteilung von [³H]-3-Hydroxyglutarsäure in 42 Tage alten *Gcdh*defizienten Mäusen unter Hochproteindiät

Da bei den 100 Tage alten Tieren unter basalen Bedingungen keine Unterschiede in der Verteilung von [³H]-3OHGA zu sehen waren, und da bei 100 Tage alten Tieren nur schlecht eine metabolische Krise induzierbar war, wurde die Verteilung von [³H]-3OHGA nur an 42 Tage alten Tieren unter Hochproteindiät untersucht.

42 Tage alte Wildtyp- und *Gcdh*-defiziente Mäuse wurden mit einer Hochproteindiät gefüttert. Als Kontrolle dienten Wildtyp- und *Gcdh*-defiziente Mäuse unter einer Standarddiät. Wenn *Gcdh*-defiziente Mäuse unter HPD nach 4 Tagen Anzeichen einer Krise aufwiesen (Hypothermie, gekrümmte Haltung, Gewichtsabnahme, motorische Probleme) wurde den Mäusen [³H]-3OHGA injiziert. Über 6 Stunden wurde stündlich Urin und Kot gesammelt. Anschließend wurden die Mäuse perfundiert und die Radioaktivität in Organen, Blut, Kot und Urin gemessen.

Zwischen Wildtyp-Mäusen ohne und mit HPD war kein Unterschied in der Verteilung von [³H]-3OHGA zu erkennen, außer dass Mäuse unter HPD mehr Radioaktivität über den Kot ausschieden (Abb. 17). Bei *Gcdh*-defizienten Mäusen unter HPD konnte beobachtet werden, dass der relative Anteil der

Radioaktivität in der Zirkulation niedriger war als bei Mäusen unter Standarddiät. Dafür wurden aber fast 40 % der Radioaktivität in den Nieren wiedergefunden und die Leber der Gcdh-defizienten Mäuse unter HPD wies fünfmal mehr Radioaktivität auf als die der Mäuse unter Standarddiät. Über den Urin schieden die HPD-behandelten Gcdh-defizienten Mäuse jedoch genauso viel Radioaktivität aus, wie symptomlose Gcdh-defiziente Mäuse unter Standarddiät. Die [³H]-3OHGA akkumulierte also im Nierengewebe von Gcdhdefizienten Mäusen unter HPD. Außerdem schieden die Gcdh-defizienten Mäuse, die in einer HPD-induzierten metabolischen Krise sind, fast keine Radioaktivität über den Kot aus. Dies beruht aber auch auf der Tatsache, dass diese Mäuse in der Endphase generell keinen Kot mehr ausschieden. Im Darm Gcdh-defizienter Mäuse unter HPD fand sich viel Kot, im Gegensatz zu Gcdhdefizienten Mäusen unter Standarddiät. Dies könnte auf eine Darmmotilitätsstörung hindeuten. Daher wurde die Radioaktivität im Darm, Magen und Kot summiert und verglichen. Auch hierbei zeigte sich, dass die Tiere, die unter HPD standen, ca. 15 % weniger Radioaktivität im Darm/Magen/Kot aufwiesen als Gcdh-defiziente Mäuse unter Standarddiät. Der Schwankungsbereich der relativen Radioaktivität in Darm/Magen/Kot bei Gcdh-defizienten Mäusen unter HPD war sehr groß.

Die Aufnahme von [³H]-3OHGA in das Hirn von *Gcdh*-defizienten Mäusen unter HPD war niedriger als die Aufnahme ins Hirn von Mäusen unter Standarddiät (Abb. 17).



Abb. 17: Verteilung von intravenös injizierter [³H]-3OHGA in 42 Tage alten Mäusen. Wildtyp- und *Gcdh*-defizienten Mäusen wurden nach 4 Tagen ohne und mit HPD [³H]-3OHGA (1 x 10⁷ cpm) injiziert. Nach 6 h wurden die Mäuse perfundiert und die Radioaktivität in Urin, Organen und im Darm/Magen/Kot gemessen. Angegeben sind die Prozente der wiedergefundenen Radioaktivität. Die Radioaktivität, die über den Urin ausgeschieden wurde, wurde nicht berücksichtigt. Die Balken repräsentieren den Median ± Range. Es wurden jeweils 3 Tiere untersucht. Die Signifikanzen wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U Test berechnet. *p≤0,05.

Ein anderer Ansatz die Blut-Hirn-Schranken-Integrität zu untersuchen, war die Injektion von fluoreszent-markierten Dextranen in 42 und 100 Tage alten Wildtyp- und *Gcdh*-defizienten Mäusen mit und ohne HPD. 2 Stunden nach Injektion wurden die Tiere getötet und perfundiert. Von den Hirnen wurden Gefrierschnitte angefertigt und an einem konfokalen Mikroskop untersucht. In keinem der Tiere konnten Dextrane im Hirngewebe nachgewiesen werden. Dies unterstützt die vorherigen Ergebnisse, dass die Blut-Hirn-Schranke der *Gcdh*defizienten Mäuse auch während einer metabolischen Krise intakt ist.

4.3 Untersuchungen zu spezifischen Transportern bei Gcdh-Defizienz

Bei GA1 liegt ein Defekt im *GCDH*-Gen vor. Hierdurch wird Glutaryl-CoA nicht mehr vollständig abgebaut und es entstehen potenziell toxische Metabolite (GA,

3OHGA). Obwohl die Identität und die Lokalisierung der Enzyme, die für die Bildung der Dicarboxylate verantwortlich sind, nicht bekannt sind, kann angenommen werden, dass die Metabolite im Mitochondrium gebildet werden. Bei GA1-Patienten werden sie jedoch in allen Körperflüssigkeiten nachgewiesen (Liesert *et al.*, 1999). Es muss also Transporter geben, die die polaren Metabolite GA und 3OHGA aus dem Mitochondrium, durch die Zelle ins Blut und von dort aus über verschiedene endotheliale und Zellmembranen in andere Organe transportieren.

4.3.1 DNA-Microarray

Die fraktionellen Exkretionen von GA und 3OHGA bei Gcdh-defizienten Mäusen liegen bei 2 bzw. 1,9 in Relation zur Exkretion von Kreatinin. Dies bedeutet, dass GA und 3OHGA aktiv in den Urin sezerniert werden (Mühlhausen et al., 2008). Die Transporter, die für die Sekretion verantwortlich sind, waren zu Beginn dieser Arbeit noch nicht bekannt. Da diese bei GA1 aufgrund der hohen Konzentration von GA und 30HGA eventuell in ihrer Expression verändert sind, wurden DNA-Microarray-Analysen von Nierengewebe 42 Tage alter Wildtypund Gcdh-defizienter Mäuse durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die mRNA-Expressionen verschiedener Transporter verändert waren (17 waren hochreguliert und 14 herunterreguliert, (Stellmer et al., 2007a)). So waren z.B. die Expressionen des Organische Anionen Transporter 2 (OAT2, Slc22a7) oder des Natrium-abhängigen Dicarboxylat-Transporter 3 (NaC3, Slc13a3) erhöht, die des Harnstoff-Transporter 2 (Slc14a2) hingegen erniedrigt (Stellmer et al., 2007a). In Oocyten-Experimenten konnte bestätigt werden, dass NaC3 sowohl GA als auch 3OHGA transportiert. NaC3 ist somit der erste identifizierte Transporter von 3OHGA (Stellmer et al., 2007a).

Da bei GA1-Patienten aber vor allem das Hirn betroffen ist, sollte untersucht werden, ob die Expression von NaC3 im Hirn auch verändert ist und wie NaC3-vermittelte Transportprozesse bei *Gcdh*-Defizienz verändert sind.

4.3.2 Expression von Transportern in primär isolierten Hirnzellen

Zur Untersuchung der mRNA-Expression verschiedener Transporter im Hirn, wurden aus neugeborenen (P0) Wildtyp- und *Gcdh*-defizienten Mäusen Astrocyten (3.3.2.2) und Neurone (3.3.2.1) isoliert und die RNA aus differenzierten Zellen (Astrocyten: ca. 7 Tage; Neurone: ca. 10 Tage) gewonnen. Mit der anschließend synthetisierten cDNA wurden die mRNA-Mengen exprimierter Transporter mittels Real-Time PCR quantifiziert.

4.3.2.1 Natrium-abhängiger Dicarboxylat-Transporter 3 (NaC3)

NaC3 ist ein Natrium-abhängiger Dicarboxylat-Transporter, der bei Menschen in der Niere, Leber, Pankreas, Plazenta und im Hirn exprimiert wird (Markovich and Murer, 2004). In GA1-Patienten ist das Hirn das am stärksten betroffenen Organ. Da NaC3 die Dicarboxylate 3OHGA und GA, mit unterschiedlichen Affinitäten, transportiert (Stellmer *et al.*, 2007a), wurde seine Expression in primären Hirnzellen (Astrocyten und Neurone), sowie in einer immortalisierten Astrocyten-Zelllinie mittels Real-Time PCR untersucht. NaC3 wurde in allen primär kultivierten Zellen exprimiert (Abb. 18). In *Gcdh*-defizienten Astrocyten war die Expression um das zweifache gegenüber den Wildtyp-Astrocyten erhöht. In Wildtyp- und *Gcdh*-defizienten Neuronen war die NaC3 mRNA dreifach höher als in den Wildtyp-Astrocyten. Zwischen Wildtyp- und *Gcdh*-defizienten Neuronen konnte kein signifikanter Unterschied in der relativen mRNA-Expression von NaC3 beobachtet werden. In der immortalisierten Astrocyten-Zelllinie konnte keine NaC3-Expression nachgewiesen werden. Alle ermittelten Werte sind signifikant.


Abb. 18: Relative mRNA-Expression von NaC3 in primären Astrocyten, Neuronen und immortalisierten Astrocyten. Die RNA von primären Astrocyten (7 Tage in Kultur) und Neuronen (10 Tage in Kultur), sowie von einer immortalisierten Astrocyten-Zelllinie wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die relative mRNA-Expression von NaC3 wurde mittels Real-Time PCR in Triplikaten bestimmt und auf die mRNA-Expression von *Gapdh* normalisiert. Die Analysen geben den Median \pm SD aus drei unabhängigen Zellisolationen wieder. Die relative mRNA-Expression der Astrocyten aus Wildtyp-Mäusen wurde gleich 1 gesetzt. ** p<0,001.

4.3.2.2 Organische Anionen Transporter 1 (OAT1)

Der Organische Anionen Transporter 1 (OAT1) wird bei Menschen in den Nieren, Skelettmuskeln, Plazenta und Hirn exprimiert (Zhou and You, 2007). Um die Expression des OAT1 in primär kultivierten Wildtyp- und *Gcdh*-defizienten Astrocyten und Neuronen zu untersuchen, wurden Real-Time PCR-Bestimmungen durchgeführt. Es konnte jedoch keine OAT1 mRNA nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Weder in primär isolierten Astrocyten noch in Neuronen ist OAT1 exprimiert. Als Positivkontrolle diente mRNA aus der Niere einer Wildtyp-Maus, in der OAT1 stark exprimiert ist (B. Kortmann, UKE, unveröffentliche Ergebnisse). Hier konnte eine hohe mRNA-Expression von OAT1 nachgewiesen werden.

4.3.2.3 Organische Anionen Transporter 2 (OAT2)

OAT2 mRNA wird bei der Maus in der Leber, Niere, Lunge und sich entwickelnden Knochen exprimiert (Pavlova *et al.*, 2000). Für das Hirn ist beschrieben, dass in neugeborenen Mäusen OAT2 mRNA im Metencephalon (Hinterhirn) exprimiert wird (Pavlova *et al.*, 2000).

In den primären Astrocyten und Neuronen konnte eine schwache mRNA-Expression des OAT2 nachgewiesen werden (Abb. 19). Es bestand aber kein Unterschied in der relativen mRNA-Expression von OAT2 zwischen Wildtypund *Gcdh*-defizienten Astrocyten. In *Gcdh*-defizienten Neuronen war die OAT2 mRNA-Konzentration 30 % niedriger als in Wildtyp-Neuronen (n = 3). Jedoch war die Varianz hier relativ groß, so dass weitere Real-Time PCRs durchgeführt werden müssen. In Wildtyp- und *Gcdh*-defizienten Neuronen war die Expression von OAT2 vierfach bzw. dreifach signifikant höher als in Wildtyp-Astrocyten. In der immortalisierten Astrocyten-Zelllinie konnte keine OAT2 mRNA-Expression nachgewiesen werden.



Abb. 19: Relative mRNA-Expression von OAT2 in primären Astrocyten und Neuronen. Die RNA von primären Astrocyten (7 Tage in Kultur) und Neuronen (10 Tage in Kultur), sowie von einer immortalisierten Astrocyten-Zelllinie wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die relative mRNA-Expression von OAT2 wurde mittels Real-Time PCR in Triplikaten bestimmt und auf die mRNA-Expression von *Gapdh* normalisiert. Die Analysen geben den Median ± SD aus drei unabhängigen Zellisolationen wieder. Die relative mRNA-Expression der Wildtyp-Astrocyten wurde gleich 1 gesetzt. ** p<0,001.

4.3.3 [¹⁴C]-Succinat Aufnahme-Studien

Da Astrocyten Neurone mit Citratzyklus-Intermediaten wie z.B. Succinat oder α-Ketoglutarat versorgen (Shank and Campbell, 1984, Westergaard *et al.*, 1994a, Westergaard *et al.*, 1994b) und es sich bei diesen auch um Dicarboxysäuren handelt, können diese Intermediate auch über den NaC3 transportiert werden um den ATP-Bedarf der Neurone zu decken.

Die in *Gcdh*-defizienten Mäusen generierten Dicarboxylat-Metabolite 3OHGA und GA könnten theoretisch mit den Substraten des NaC3-Transporters konkurrieren. Es sollte deshalb untersucht werden, ob die NaC3-vermittelte Aufnahme von [¹⁴C]-Succinat in primären Astrocyten und Neuronen von Wildtyp- und *Gcdh*-defizienten Mäusen durch GA und/oder 3OHGA beeinflusst wird.

4.3.3.1 [¹⁴C]-Succinat Aufnahme in Astrocyten

Primär isolierte Wildtyp- und *Gcdh*-defiziente Astrocyten, sowie eine immortalisierte Astrocyten-Zelllinie wurden mit [¹⁴C]-Succinat für 20 min inkubiert und die in die Zellen aufgenommene Radioaktivität gemessen. Die Spezifität der Aufnahme von [¹⁴C]-Succinat wurde durch Zugabe von 2 mM nicht-markiertem Succinat zum Inkubationsmedium gezeigt und führte zu einer Hemmung der Aufnahme um 93 %. Wurde dem [¹⁴C]-Succinat Medium GA oder 3OHGA (jeweils 2 mM) zugesetzt, wurde die Aufnahme des Substrates um 90 bzw. 43 % in Astrocyten aus Wildtyp-Mäusen gehemmt (Abb. 20). Die Aufnahme von [¹⁴C]-Succinat in kultivierte Astrocyten aus *Gcdh*-defizienten Mäusen wurde durch 2 mM Succinat, GA oder 3OHGA um 94, 93 bzw. 54 % inhibiert. Die spezifische Aufnahmerate von [¹⁴C]-Succinat war in der immortalisierten Astrocyten. Die Aufnahme von [¹⁴C]-Succinat war jedoch nicht mit einem molaren Überschuss an Succinat, GA oder 3OHGA hemmbar.



Abb. 20: [¹⁴C]-Succinat Aufnahme von Wildtyp-, *Gcdh*-defizienten und immortalisierten Astrocyten. Primär isolierte Wildtyp- und *Gcdh*-defiziente Astrocyten, sowie eine immortalisierte Astrocyten-Zelllinie wurden für 20 min mit [¹⁴C]-Succinat inkubiert und anschließend die in die Zellen aufgenommene Radioaktivität gemessen und gleich 100 % gesetzt. Der Einfluss von 2 mM Succinat, GA und 3OHGA auf die Aufnahme ist dargestellt. Die Aufnahme von [¹⁴C]-Succinat ist in den hier verwendeten kultivierten Astrocyten komplett abhängig von der Anwesenheit von Natrium im Medium. ** p<0,001.

Um zu zeigen, dass die [¹⁴C]-Succinat Aufnahme Natrium-abhängig ist, wurde die Aufnahme des Substrates in Abwesenheit von Natrium im Inkubationsmedium durchgeführt. Unter dieser Bedingung wurden in Wildtyp-Astrocyten nur noch 13 % und in *Gcdh*-defizienten Astrocyten nur noch 4 % des [¹⁴C]-Succinats aufgenommen.

Die Aufnahme von Succinat ist in Wildtyp- und *Gcdh*-defizienten Astrocyten also Natrium-abhängig und wird durch die Anwesenheit von GA und 3OHGA gehemmt.

Mittels der *Two-electrode voltage clamp method* an humanen NaC3exprimierenden Oocyten wurden die K_M -Werte von sechs Dicarboxylat-Verbindungen ermittelt (Tab. 4) (Hagos *et al.*, 2008).

Succinat hat mit 25 μ M den niedrigsten K_M-Wert gefolgt von GA mit 40 μ M, α -Ketoglutarat mit 72 μ M, 2-L-OHGA mit 164 μ M, 2-D-OHGA mit 267 μ M und 3OHGA mit 930 μ M.

Substanz	K _M [μM]	
Succinat	25	
GA	40	
30HGA	930	
α-Ketoglutarat	72	
2-D-OHGA	267	
2-L-OHGA	164	

Tab. 4: K_M-Werte für verschiedene Substrate des NaC3

Anschließend wurde die NaC3-abhängige Aufnahme von [¹⁴C]-Succinat in kultivierte Astrocyten aus Wildtyp- und *Gcdh*-defizienten Mäusen in An- und Abwesenheit von 25 μ M Succinat, 40 μ M GA, 930 μ M 3OHGA, 72 μ M α -Ketoglutarat, 267 μ M 2-D-OHGA und 164 μ M 2-L-OHGA bestimmt. Mit Ausnahme von 3OHGA und α -Ketoglutarat inhibierten unter diesen Bedingungen die anderen Dicarboxylate die Aufnahme von [¹⁴C]-Succinat um etwa 50 % (Abb. 21). In Anwesenheit von 930 μ M 3OHGA oder 72 μ M α -Ketoglutarat lag die Hemmung der Aufnahme von [¹⁴C]-Succinat in Wildtyp- und *Gcdh*-defizienten Astrocyten zwischen 0-23 %.

Es konnten keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und *Gcdh*-defizienten Astrocyten in der Effizienz der Hemmung der Dicarboxylate auf die Aufnahme von [¹⁴C]-Succinat beobachtet werden.



Abb. 21: Inhibition der [¹⁴C]-Succinat Aufnahme in Wildtyp- und Gcdh-defiziente Astrocyten. Primär kultivierte Astrocyten aus Wildtyp- und Gcdh-defizienten Mäusen wurden für 20 min mit [¹⁴C]-Succinat in An- und Abwesenheit der angegebenen Dicarboxylate inkubiert. Die relative Aufnahme gegenüber den Kontrollansätzen ohne Zusatz von Dicarboxylaten ist angegeben. ** p<0,001.

4.3.3.2 [¹⁴C]-Succinat Aufnahme in kultivierte Neurone

Aus neugeborenen (P0) Wildtyp- und *Gcdh*-defizienten Mäusen wurden Neurone isoliert. Nach dem Ausreifen der Neurone (Tag 10 in Kultur) wurden [¹⁴C]-Succinat Aufnahme-Experimente in An- oder Abwesenheit von 2 mM Succinat, GA oder 3OHGA durchgeführt.

Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Aufnahme zwischen Astrocyten und Neuronen aus Wildtyp- und *Gcdh*-defizienten Mäusen beobachtet werden.

Die Aufnahme von [¹⁴C]-Succinat konnte durch Zugabe von 2 mM Succinat, GA und 3OHGA durchschnittlich um 89, 94 und 54 % in Neuronen aus Wildtyp-Mäusen gehemmt werden (Abb. 22). In *Gcdh*-defizienten Neuronen inhibierten Succinat, GA und 3OHGA die Aufnahme des [¹⁴C]-Succinats um 85, 93 und 42 %.



Abb. 22: [¹⁴C]-Succinat Aufnahme in Wildtyp- und Gcdh-defiziente Neurone. Primär kultivierte Wildtyp- und Gcdh-defiziente Neurone wurden für 20 min mit [¹⁴C]-Succinat in Anund Abwesenheit von 2 mM Succinat, GA und 3OHGA inkubiert und anschließend die in die Zellen aufgenommene Radioaktivität gemessen und gleich 100 % gesetzt. ** p<0,001.

4.3.4 [¹⁴C]-Succinat Efflux-Studien

NaC3 ist ein bidirektionaler Transporter, das heißt, dass er Substanzen Natrium-abhängig aus der Zelle heraus, aber auch in die Zelle hinein transportieren kann. Um zu überprüfen, ob der Efflux von [¹⁴C]-Succinat aus *Gcdh*defizienten Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen verändert ist, wurden primär kultivierte Hirnzellen mit [¹⁴C]-Succinat vorinkubiert und anschließend die Freisetzung der Radioaktivität in das Kulturmedium zeitabhängig überprüft.

4.3.4.1 Efflux aus Astrocyten

Primär kultivierte Wildtyp- und *Gcdh*-defiziente Astrocyten wurden für 20 min mit [¹⁴C]-Succinat vorbeladen. Anschließend wurden die Zellen in nicht-radioaktivem Puffer inkubiert. Alle 2,5 min wurde bei einem Zellkulturansatz der Puffer abgenommen und die Radioaktivität in den Zellen und im Puffer gemessen (Abb. 23). Die Messpunkte geben die relative Verteilung der Radioaktivität wider, die in den Zellen verblieb und die, die in den Extrazellularraum abgegeben wurde. Bereits nach 2,5 min Inkubationszeit in nicht-radioaktivem Medium waren in Wildtyp- und *Gcdh*-defizienten Astrocyten

30 % der Radioaktivität aus den Zellen in den Extrazellularraum transportiert worden. Bei den Wildtyp-Astrocyten waren nach 8 min 50 % der Radioaktivität in den Zellen und 50 % extrazellular zu finden. Bei den *Gcdh*-defizienten Astrocyten waren erst nach 19,5 min 50 % der Radioaktivität aus den Zellen in den Extrazellularraum transportiert worden. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass der Efflux von [¹⁴C]-Succinat aus *Gcdh*-defizienten Astrocyten verlangsamt ist.



Abb. 23: Efflux von [¹⁴C]-Succinat aus Wildtyp- und Gcdh-defizienten Astrocyten. Primär kultivierte Wildtyp- (blau) und *Gcdh*-defiziente (rot) Astrocyten wurden für 20 min mit [¹⁴C]-Succinat vorbeladen, anschließend wurden die Zellen in nicht-radioaktivem Puffer inkubiert und alle 2,5 min geerntet. Die Radioaktivität in den Zellen und im Puffer wurde gemessen und in % zur gesamten wiedergefundenen Radioaktivität angegeben.

4.3.4.2 Efflux aus Neuronen

Primär kultivierte Wildtyp- und *Gcdh*-defiziente Neurone wurden mit [¹⁴C]-Succinat für 20 min vorbeladen, anschließend wurden die Zellen in nichtradioaktivem Puffer inkubiert. Alle 2,5 min wurde von einem Zellkulturansatz der Puffer abgenommen und die Zellen lysiert. Die Radioaktivität in den Zellen und im Puffer wurde gemessen.

Abb. 24 gibt die [¹⁴C]-Effluxrate aus Neuronen wieder. Nach 2,5 min Inkubationszeit in nicht-radioaktivem Puffer hatten die *Gcdh*-defizienten Neurone schon 28 % der Radioaktivität in den Extrazellularraum abgegeben, bei den Wildtyp-Neuronen waren es hingegen nur 17 %. Nach 27,5 min waren bei den Wildtyp-Neuronen 50 % der Radioaktivität in den Zellen und 50 % im Puffer zu finden. Bei den *Gcdh*-defizienten Neuronen war dieser Punkt schon nach 12,5 min erreicht.

Die Effluxrate für [¹⁴C]-Succinat ist damit in *Gcdh*-defizienten Neuronen höher als in Wildtyp-Neuronen. Das heißt, dass *Gcdh*-defiziente Neurone, im Gegensatz zu *Gcdh*-defizienten Astrocyten, Dicarboxylate schneller in den Extrazellularraum abgeben können, als Wildtyp-Neurone.



Abb. 24: Efflux von [¹⁴C]-Succinat aus Wildtyp- und Gcdh-defizienten Neuronen. Primär isolierte Wildtyp- (blau) und Gcdh-defiziente (rot) Neurone wurden für 20 min mit [¹⁴C]-Succinat vorbeladen, anschließend wurden die Zellen in nicht-radioaktivem Puffer für die angegebenen Zeiten inkubiert. Die Radioaktivität in den Zellen und im extrazellularen Puffer wurde gemessen und der relative Anteil in % dargestellt.

5 Diskussion

5.1 Untersuchungen von mutanter GCDH

Bis heute sind über 150 Mutationen im GCDH-Gen bekannt (Goodman et al., 1998, Schwartz et al., 1998, Busquets et al., 2000, Zschocke et al., 2000), die ein breites Spektrum an Symptomen hervorrufen können. Diese reichen von sehr leichten neurologischen Schäden, die ein normale Leben zulassen, bis zu schwersten Dystonien, bei denen die Patienten nicht mehr in der Lage sind zu stehen, gehen oder zu sprechen (Busquets et al., 2000). Es konnte jedoch bislang keine Korrelation zwischen einer Mutation und dem Verlauf der Krankheit festgestellt werden (Christensen et al., 2004). So gibt es z.B. bei den Old Order Amish in Pennsylvania ((Morton et al., 1991) oder den Island Lake Indianern in Kanada (Haworth et al., 1991) Patienten mit der gleichen Mutation jedoch unterschiedlichen Symptomen. Einige Patienten entwickeln schwere dystonische Bewegungsstörungen, andere hingegen zeigen nur leichte neurologische Veränderungen (Amir et al., 1989, Morton et al., 1991). Auch zwischen der gemessenen enzymatischen Restaktivität der GCDH in E.coli und Patientenfibroblasten und dem Schweregrad der Krankheit gibt es keine Korrelation. Es gibt Patienten, bei denen die Mutation zu einem trunkierten GCDH-Protein führt, das vor der katalytischen Base Glu414 abbricht. Diese Patienten, die homozygot für die Mutation sind, können GA1-typische Symptome aufweisen wie z.B. dyston-dyskinetische Bewegungsstörungen, es gibt aber auch Patienten die trotz dieser schweren Mutation keine neurologischen Schäden zeigen (Anikster et al., 1996). Andererseits gibt es Patienten, mit homozygoten Mutationen, mit einer GCDH-Restaktivität von 30 % gegenüber Kontrollzellen, die klinisch jedoch schwer betroffen sind (Biery et al., 1996, Mühlhausen et al., 2003). Bei einigen Mutationen in der GCDH wurde eine Korrelation zur Ausscheidung von GA festgestellt. So konnten Christensen et al. (1997) zeigen, dass Patienten, die heterozygot für die Mutation Arg227Pro sind, sehr geringe bis keine Mengen an GA über den Urin ausscheiden. Dasselbe gilt für Patienten, die heterozygot für die Mutation Val400Met sind (Busquets et al., 2000).

GCDH katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Glutaryl-CoA zu Crotonyl-CoA. Im ersten Schritt der Katalyse übernimmt die katalytische Base Glu414 das α -Proton vom Glutaryl-CoA, gefolgt von einer Übertragung des β -Wasserstoffs auf das FAD. Im zweiten Schritt wird das entstandene Glutaconyl-CoA zu Crotonyl-CoA decarboxyliert (Gomes *et al.*, 1981). Hierbei spielt der Arg138-Rest eine besondere Rolle und bestimmt die Orientierung der γ -Carboxyl-Gruppe zur Decarboxylierung und stabilisiert das transiente Crotonyl-CoA Anion (Fu *et al.*, 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurden vier Mutationen, die bei GA1-Patienten identifiziert wurden, eingehender untersucht. Die p.Arg138Gly Mutation wurde 1998 von Goodman et al. beschrieben. Der Arg138-Rest ist Teil des aktiven Zentrums der GCDH, das von folgenden Aminosäuren gebildet wird: Glu131, Arg138, Ser139, Val143, Phe177, Leu179, Ser186, Pro188, Thr214, Phe287, Leu290, Asn291, Arg294, Ile297, Phe322, Gln330, Lys335, Pro364, Tyr413, Glu414, Gly415, Asp418, Ile419, Ile423, Arg426, Ala433, Phe434, Thr435 (Fu et al., 2004). Die zweite hier näher untersuchte Mutation, p.Met263Val, wurde von Mühlhausen et al. (2003) beschrieben. Der Patient zeigte schwere dystondyskinetische Bewegungsstörungen nach einer katabolen Krise im Alter von 9 Monaten. Bei der Mutation p.Arg402Trp handelt es sich um die häufigste Mutation bei Kaukasiern. Durch die Diversität an Mutationen beträgt ihre Allel-Häufigkeit ca. 20 % (Goodman and Frerman, 2001). Biery et al. (1996) spekulierten, dass Arg402 an der Tetramerisierung der GCDH-Monomere beteiligt sein könnte. Die vierte Mutation p.Glu414Lys (Biery et al., 1996) ist wie Arg138 Teil des aktiven Zentrums der GCDH. Bei Glu414 handelt es sich um die katalytische Base (Fu et al., 2004).

5.1.1 Enzymaktivitäten mutanter GCDH

Bisher ist nicht bekannt, wie sich die Mutationen p.Arg138Gly und p.Glu414Lys auf die enzymatischen GCDH-Aktivitäten in Patientenfibroblasten, die homozygot für die jeweilige Mutation sind, auswirken. Nach Expression mutanter GCDH, mit den Mutationen Arg138Gln bzw. Glu414Gln, in *E.coli*, wurden Restaktivitäten von 0,1 % bzw. 4,5 % (Tab. 1) gegenüber der exprimierten Wildtyp-GCDH gemessen (Biery et al., 1996, Goodman et al., 1998). Die in der Literatur beschriebenen GCDH-Aktivitätsmessungen wurden an in E.coli exprimierten Proteinen ermittelt. Soweit überprüft wurde, decken sich diese Restaktivitäten jedoch nicht mit in Patientenfibroblasten ermittelten Restaktivitäten. So weist GCDH mit der Mutation Arg402Trp in E.coli eine Restaktivität von 3 % auf (Tab. 1) (Biery et al., 1996), wohingegen in Patientenfibroblasten, die diese Mutation homozygot tragen, nur eine Aktivität von 0,5 % bezogen auf die Kontrollzellen messbar war (Schwartz et al., 1998). Die Mutation p.Arg421Val hatte nach Expression in E.coli sogar eine Restaktivität von 40 % (Biery et al., 1996); in Patientenfibroblasten konnte dagegen keine Restaktivität nachgewiesen werden (Christensen et al., 2004). Einige Autoren, die Restaktivitäten in *E.coli* gemessen haben, kommen selber zu der Schlussfolgerung, dass die Expression von Proteinen in E.coli und Patientenfibroblasten zu unterschiedlich und damit die Differenzen in den Restaktivitäten zu erklären sind (Biery et al., 1996, Goodman et al., 1998). Deshalb war ein Ziel dieser Arbeit, ein eukaryotisches Expressionssystem unabhängig von Patientenfibroblasten aufzubauen, in dem die Enzymaktivitäten, sowie die Synthese, der Abbau und die Struktur mutanter GCDH-Proteine untersucht werden kann.

Die Mutationen p.Arg138Gly, p.Met263Val, p.Arg402Trp und p.Glu414Lys wurden jeweils in die cDNA der *GCDH* eingeführt. Die mutante GCDH, sowie die Wildtyp-GCDH wurden in BHK-Zellen transient exprimiert und die Enzym-Aktivität im Zellextrakt bestimmt. Die GCDH-Mutationen p.Arg138Gly und p.Glu414Lys haben immer noch eine Aktivität von 2 % im Verhältnis zum Wildtyp-Protein (Tab. 2), obwohl in beiden Fällen Aminosäuren des aktiven Zentrums ausgetauscht wurden, die als essentiell für die Funktion der GCDH beschrieben wurden (Fu *et al.*, 2004).

Die spezifische Aktivität der mutanten GCDH p.Arg402Trp beträgt in überexprimierenden BHK-Zellen 1,6 % (Tab. 2) von Wildtyp-GCDH exprimierenden Zellen. Die mutante GCDH p.Met263Val zeigt in überexprimierenden BHK-Zellen noch eine Restaktivität von 10,3 % (Tab. 2).

Bei allen vier untersuchten Mutationen konnte eine geringere Restaktivität der mutanten GCDH im Bezug auf das Wildtyp-Protein nachgewiesen werden. Diese Erniedrigung könnte auf eine geringere Synthese oder eine schnellere Abbaurate, sowie eine nicht korrekte Faltung des Proteins zurückzuführen sein. Da die aktive Form der GCDH eine Homotetramer ist, könnte die Störung der Multimerisierung mutanter GCDH-Monomere zum Verlust der enzymatischen Aktivität beitragen.

5.1.2 Expression und Stabilität der mutanten GCDH

Die vorliegenden Daten zeigen, dass die *steady-state* Konzentration der mutanten GCDH p.Arg402Trp in transfizierten BHK-Zellen geringer als die der Wildtyp-GCDH oder anderer mutanten GCDH-Proteine war (Abb. 6). Die niedrigen Spiegel an GCDH p.Arg402Trp können entweder durch eine reduzierte Synthese oder eine erhöhte Abbaurate erklärt werden. *Pulse-Chase*-Experimente mit anschließen-der Immunpräzipitation bewiesen, dass die Syntheserate der p.Arg402Trp-Mutante vergleichbar mit der von Wildtyp-GCDH ist (Abb. 8). Die Ergebnisse zeigen außerdem, dass die p.Arg402Trp-Mutante schneller abgebaut wird. Ihre Halblebenszeit beträgt lediglich 4 Stunden, wohingegen 50 % der Wildtyp-GCDH erst nach 34,5 Stunden abgebaut war. Alle anderen mutanten GCDH-Proteine weisen ähnliche Halblebenszeiten wie die Wildtyp-GCDH auf.

Mitochondrien enthalten ein eigenes Genom. Beim Menschen besteht es aus 16.569 Basenpaaren und kodiert für 13 Proteine, 22 tRNAs und zwei rRNAs (Santamaria *et al.*, 2007). Alle anderen Gene, die Komponenten des Mitochondriums kodieren, sind im Zellkern lokalisiert. Die entsprechend kodierten Proteine werden im Zytoplasma an Ribosomen synthetisiert und mittels eines mitochondrialen Lokalisierungssignals zum und in das Mitochondrium transportiert (Mihara and Omura, 1996). Das Lokalisierungssignal der GCDH ist im 44 Aminosäuren-umfassenden Präpeptid enthalten und wird nach Translokation in das Mitochondrium durch die mitochondriale Prozessierungspeptidase (MPP) abgespalten, wodurch das reife Protein aus 394 Aminosäuren entsteht (Goodman *et al.*, 1995). Western-Blot-Analysen und *Pulse-Chase*-Experimente zeigten, dass die mutante GCDH im Zytoplasma an Ribosomen synthetisiert und anschließend in das Mitochondrium transportiert

wird, könnte der Abbau der p.Arg402Trp GCDH sowohl im Zytoplasma als auch in der mitochondrialen Matrix stattfinden. Durch indirekte Immunfluoreszenz-Analyse konnte jedoch eine Kolokalisierung mit dem mitochondrialem Marker MnSOD (Abb. 9) gezeigt werden. Die Mutante p.Arg402Trp wird also in das Mitochondrium transloziert. Außerdem demonstrierten *Pulse-Chase*-Experimente, dass sowohl Vorläufer- als auch reife Formen des p.Arg402Trp präzipitierbar waren, also der MPP in der mitochondrialen Matrix als Substrat dienten. Der Abbau des mutierten Proteins erfolgt somit im Mitochondrium. Welche Protease für den schnellen Abbau verantwortlich ist, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Die GCDH liegt funktionell als Homotetramer vor (Lenich and Goodman, 1986). Biery *et al.* (1996) spekulierten, dass Arg402 in einer Domäne liegt, die an der Multimerisierung des Proteins beteiligt ist. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit weder bestätigt noch widerlegt werden, da die Expression zu gering war um tetramere, mutante GCDH-Komplexe nach Quervernetzung durch den *Crosslinker* BS³ nachweisen zu können. Die GCDH-Mutanten p.Arg138Gly, p.Met263Val und p.Glu414Lys haben keine Auswirkungen auf die Multimerisierung (Abb. 10).

Die Kristallstruktur der reifen GCDH wurde von Fu *et al.* (2004) veröffentlicht. Mit diesen Daten wurden *in silico* Strukturanalysen der Wildtyp- und der GCDH-Mutanten durchgeführt. Bei keiner dieser vier Mutationen konnte eine veränderte Sekundär- bzw. Tertiärstruktur beobachtet werden (Abb. 5).

Die mutanten GCDH p.Arg138Gly und p.Glu414Lys verändern die Struktur des aktiven Zentrums des Enzyms. Dies erklärt den Verlust der enzymatischen Aktivität dieser Proteine und belegt, dass es sich bei diesen Mutationen um pathogene Mutationen handelt.

Der Arg402-Rest ist Bestandteil einer α-Helix. Der Austausch von Arg402 zu Trp führt dazu, dass das mutierte Protein instabil ist und im Mitochondrium abgebaut wird. Instabile mutierte Proteine sind auch für andere Krankheiten beschrieben (De Lucca *et al.*, 1998). Der erhöhte Abbau der p.Arg402Trp-

Mutante kann nicht auf eine veränderte Struktur des mutierten Proteins zurückgeführt werden.

Der Met263-Rest ist Bestandteil einer β-Faltblattstrutkur. Auch diese Aminosäure befindet sich nicht in der Nähe des aktiven Zentrums. Das mutierte Protein weist eine korrekte Sekundär- und Tertiärstruktur auf, es ist stabil in der Zelle und kann sich zu Tetramer-Komplexen zusammenlagern. In Patientenfibroblasten mit der homozygoten Mutation Met263Val, weist das mutierte Protein eine Restaktivität von 30 % gegenüber der Wildtyp-GCDH auf (Mühlhausen *et al.*, 2003). In transient transfizierten BHK-Zellen konnte für die GCDH p.Met263Val nur eine Restaktivität von 10 % nachgewiesen werden.

Bisher haben alle in der Literatur eingehender untersuchten Mutationen Auswirkungen auf das katalytische Zentrum (Rao *et al.*, 2007) oder auf die Tetramerisierung. So konnte für eine Reihe von Mutationen (Ala421Val, Thr429Met, Ala433Val, Ala433Glu) durch Größenausschlusschromatographie gezeigt werden, dass die mutanten GCDH-Monomere nicht mehr in der Lage sind Tetramere zu bilden (Biery *et al.*, 1996, Westover *et al.*, 2003).

Warum die Mutation p.Met263Val jedoch zu einem schweren Verlauf der Krankheit führt, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden und bedarf noch weiterer Untersuchungen. So sollte die intramitochondriale Lokalisierung (Matrix oder Intermembranraum) des Proteins noch genauer untersucht werden. Außerdem lässt die Lokalisierung des Met263 an der Oberfläche der GCDH vermuten, dass diese Aminosäure eventuell an funktionellen Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt ist.

5.2 Diät-induzierte metabolische Krise

Die *Gcdh*-defiziente Maus scheidet unter basalen Bedingungen erhöhte Mengen an GA und 3OHGA mit dem Urin aus. Die Hirn-Konzentrationen beider Metabolite sind erhöht. Im Hirn sind Vakuolen, aber keine Gliose nachweisbar (Koeller *et al.*, 2002). Durch Verfütterung einer Hochproteindiät (HPD) konnte in *Gcdh*-defizienten Mäusen eine metabolische Krise induziert werden (Zinnanti *et al.*, 2006), woran junge Tiere (28 bzw. 56 Tage) innerhalb von 2-8 Tagen verstarben. Das HPD-induzierte Krisenmodell wurde unter den Bedingungen der Forschungslabore des Universitätsklinikums etabliert und für Tiere im Alter von 42 und 100 Tagen standardisiert. In der Initialphase wurden Mäuse gleichen Geschlechts in metabolischen Käfigen gehalten und nach 48 Stunden Adaptation an die Käfig-Bedingungen mit der HPD begonnen. Die Trink-, Urinund Kotmenge, sowie das Körpergewicht der Mäuse wurden täglich gemessen. Dabei wurden Wildtyp- und *Gcdh*-defiziente Mäuse mit und ohne HPD parallel untersucht. Unter diesen Bedingungen wurden die 42 Tage alten *Gcdh*defizienten Mäuse unter HPD zwischen dem 2. und 3. Tag hypothermisch und ließen in ihrer motorischen Aktivität nach. Dies verstärkte sich am folgenden Tag; außerdem kamen noch Lähmungen der hinteren Extremitäten hinzu. Zwischen dem 3. und 5. Tag unter HPD starben die *Gcdh*-defizienten Mäuse, nicht aber die Wildtyp- oder heterozygoten Mäuse (Tab. 3).

In der Studie von Zinnanti *et al.* (2006) wurden außerdem 28 Tage alte *Gcdh*defiziente Mäuse mit einer Hochlysindiät (HLD) ernährt, die bei 75 % der Mäuse nach 3 bis 12 Tagen zum Tode führte. Die überlebenden Mäuse zeigten entweder keine Symptome oder sie wurden hypothermisch, erholten sich anschließend aber wieder. In symptomatischen *Gcdh*-defizienten Mäusen konnte im Serum eine zehnfach und im Hirn eine fünffach gesteigerte GA- und 3OHGA-Konzentration nachgewiesen werden. Außerdem waren im Cortex und Striatum eine starke Vakuolisierung, Neuronenverlust, Gliose, sowie subarachnoidale Einblutungen und Störungen der Blut-Hirn-Schranke im Bereich des Striatums festgestellt worden (Zinnanti *et al.*, 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurden Gcdh-defiziente Mäuse mit der HPD in eine metabolische Krise gebracht. Wie unter HLD konnte in eigenen Untersuchungen an 42 Tage alten Gcdh-defizienten Mäusen subarachnoidale Einblutungen (Abb. 13) und eine stärkere Vakuolisierung (Abb. 14) im Hirn nachgewiesen werden. Jedoch entwickelte sich in einem Zeitraum von 4 Tagen bei den Gcdh-defizienten Mäusen unter HPD keine Gliose (Abb. 15). Es ist anzunehmen, dass es bei Gcdh-defizienten Mäusen unter HPD zu einem Neuronenverlust kommt, wie bei Gcdh-defizienten Mäusen unter HLD (Zinnanti Jedoch müssen entsprechende Untersuchungen et al., 2006). noch durchgeführt werden. Gliose kommt häufig bei neurodegenerativen Erkrankungen vor, wie z.B. Alzheimer, Multiple Sklerose oder Neuronale Ceroidlipofuszinose (Masters et al., 2006, Pohl et al., 2007, Traboulsee, 2007). Bei diesen Krankheiten wird der Platz abgestorbener Neurone durch Gliazellen eingenommen (Pekny and Nilsson, 2005). Eine Gliose kann also durch eine vermehrte Anzahl an Gliazellen mittels Immunhistochemie für das "<u>G</u>lial <u>fibrillary a</u>cidic <u>protein</u>" (GFAP) diagnostiziert werden. GFAP ist Teil von Intermediärfilamenten in Astrocyten und Teil des Cytoskeletts (Quinlan *et al.*, 2007).

Eine weitere Beobachtung bei *Gcdh*-defizienten Mäusen unter HPD war, dass das Darmlumen der Tiere voll Kot und Blut war (Abb. 16). Außerdem schieden die Tiere fast keinen Kot mehr aus. Dies könnte auf eine Störung der Darmperistaltik zurückzuführen sein. Eine durch Flüssigkeitsmangel induzierte Obstipation (Verstopfung) wäre eine mögliche Erklärung, da sich in Vorexperimenten zeigte, dass die *Gcdh*-defizienten Mäuse unter HPD zwar ebensoviel Wasser aufnehmen wie Wildtyp- und *Gcdh*-defiziente Mäuse unter Standarddiät, aber deutlich mehr Urin ausscheiden (Stellmer, 2007b). Eine gestörte Peristaltik des Darms könnte mit Hilfe eines Ultraschallgerätes oder einer Röntgen-Untersuchung der Magen-Darm-Passage überprüft werden. Diese Untersuchungen sind an Mäusen jedoch nicht etabliert. Histochemisch konnte am Darm HPD-behandelter *Gcdh*-defizienter Mäuse, im Gegensatz zu den makroskopischen Beobachtungen, keine Einblutungen nachgewiesen werden (Abb. 16). Eine Erklärung wäre, dass das Blut aus dem Magen stammt, was aber im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht wurde.

Des Weiteren konnten im Serum von *Gcdh*-defizienten Mäusen unter HPD eine 1,3-fach höhere Konzentration von GA und eine 1,5-fach höhere Konzentration von 3OHGA, im Vergleich zu *Gcdh*-defizienten Mäusen unter Standarddiät gemessen werden. Im Urin waren die Konzentrationen von GA und 3OHGA um das 1,5- bzw. 1,6-fache erhöht. Die Zusammenfassung der hier beschriebenen Befunde für *Gcdh*-defiziente Mäuse unter HPD wurden veröffentlicht (Keyser *et al.*, 2008).

5.2.1 Blut-Hirn-Schranken-Permeabilität unter HPD

Bisher ist nicht klar, was die Neurodegeneration bei GA1 auslöst. Es wurde über exzitotoxische Effekte von GA und 3OHGA auf primäre Neuronen und Gliazellen berichtet (Ullrich *et al.*, 1999, Kölker *et al.*, 2004). Aber auch

zytotoxische Wirkungen von Glutaconsäure und Chinolinat, das beim Abbau von Tryptophan über den Kynurenin-Weg entsteht, wurden diskutiert (Schwarcz *et al.*, 1983). Da Glutaconsäure nicht bei allen GA1-Patienten gefunden wurde, GA nicht nur bei GA1, sondern auch bei der GA2 und GA3 erhöht ist (Knerr *et al.*, 2002) und 3OHGA der einzige spezifische GA1-Metabolit ist, wurde in dieser Arbeit der Fokus auf 3OHGA als mögliche toxische Substanz gelegt.

Aminosäure-Abbau findet vor allem in der Leber statt. Daher wird in diesem Organ am meisten 30HGA bei den GA1-Patienten produziert. Jedoch ist das vorwiegend betroffene Organ bei diesen Patienten das Hirn. Damit stellt sich die Frage, ob 30HGA, die die potenziell zytotoxischen Effekte im Hirn auslöst, vom Hirn selbst produziert wird oder ob sie von der Leber und anderen Organen in das Blut abgegeben wird und über die Zirkulation in das Hirn gelangt. Da es sich bei 30HGA um eine polare, hydrophile Substanz handelt, kann es die Blut-Hirn-Schranke (BHS) nicht ohne ein zusätzliches Transportsystem passieren. Die BHS trennt das Hirn von der Zirkulation. Sie besteht aus Endothelzellen, die von Pericyten stabilisiert werden. Astrocyten umgeben diese beiden Zelltypen (Hawkins and Davis, 2005). Die BHS verdankt ihre Impermeabilität den Endothelzellen. Diese unterscheiden sich von Endothelzellen in anderen Geweben und Organen dadurch, dass sie eine verlangsamte Endozytose aufweisen. Dies führt dazu, dass der transzelluläre Transport von Proteinen und Substanzen eingeschränkt ist (Rubin and Staddon, 1999). Ein weiterer Unterschied sind die Tight Junctions. Diese liegen zwischen den Endothelzellen, bestehen unter anderem aus Occludin, Zonula Occludens-1 (ZO-1), ZO-2 und Claudinen und verhindern den parazellulären Transport von niedrig molekularen Substanzen und Proteinen. In den verschiedenen Geweben ist die Zusammensetzung der Tight Junctions unterschiedlich. So konnte in den Endothelzellen des Hirns eine erhöhte Expression von Occludin (Hirase et al., 1997) oder auch des ZO-1 (Furuse et al., 1994) beobachtet werden. Im Darm sind die Tight Junctions durchlässiger für Ionen, wie z.B. Natrium; im Hirn verhindern sie fast komplett den parazellulären Transport. Außer den Tight Junctions tragen auch noch die nachgeschalteten Adherens Junctions zur Impermeabilität der Blut-Hirn-Schranke bei. Die Blut-Hirn-Schranke können nur kleine und lipophile Moleküle wie z.B. Kohlendioxid oder Ethanol ungehindert passieren.

Beobachtungen bei Patienten und in vitro Befunde deuten daraufhin, dass bei GA1 Endothelfunktionen gestört sein könnten. Neben den bei GA1-Patienten beobachteten subduralen Hämatomen (Drigo et al., 1993, Osaka et al., 1993, Hoffmann et al., 1996, Woelfle et al., 1996), konnten Mühlhausen et al. (2006) zeigen, dass 30HGA, die Zell-Zell-Kontakte von Endothelzellen beeinträchtigt und zu einer erniedrigten Expression von VE-Cadherin, einem Bestandteils der Adherens Junctions, in HDMECs (humane mikrovaskuläre Endothelzellen der Haut) führt. Strauss et al. (2003b) postulierten, dass bei GA1-Patienten durch die Ausschüttung von Histamin nach einer Infektion oder durch physischen Stress, die Blut-Hirn-Schranke geschädigt wird und infolgedessen 3OHGA in das Hirn eindringen kann. Sauer et al. (2006) zeigten zwar, dass d₄-GA und d₅-30HGA nach Injektion in Wildtyp-Mäuse nicht in relevanten Mengen im Hirn zu finden war, jedoch lassen diese Versuche weder Schlussfolgerungen über Endothelbarrieren bei Gcdh-Defizienz unter basalen Bedingungen, noch unter Bedingungen kataboler Krisen zu. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb an 42 Tage alten Wildtyp- und Gcdh-defizienten Mäusen unter Standarddiät und HPD getestet, ob intravenös injizierte [³H]-3OHGA vermehrt in das Hirn gelangen kann. Innerhalb der ersten Stunde nach Injektion war ein Großteil der Urin nachweisbar. Von der Radioaktivität im verbleibenden. nicht ausgeschiedenen Radioaktivität konnte gezeigt werden, dass bei Gcdhdefizienten Mäusen weder unter Standarddiät noch unter HPD mehr [³H]-30HGA im Hirn nachweisbar war, sondern im Gegenteil weniger, als bei Wildtyp-Mäusen (Abb. 17). Dies deutet daraufhin, das die BHS intakt ist, sowohl bei Gcdh-defizienten Mäusen unter Standarddiät, wie auch bei Gcdhdefizienten Mäusen, die sich in einer Krise befinden. Die Tatsache, dass in Gcdh-defizienten Mäusen unter HPD am wenigsten [3H]-3OHGA im Hirn wiedergefunden wurde, ist damit zu erklären, dass diese Mäuse, wie auch die Gcdh-defizienten Mäuse unter Standarddiät, endogenes 30HGA produzieren. Jedoch ist bei Gcdh-defizienten Mäusen unter HPD eine 1,5-fach höhere Konzentration an 3OHGA im Serum als unter Standarddiät messbar (Tab. 5). Daher könnte auch eine kompetitive Hemmung der [³H]-3OHGA-Aufnahme durch erhöhte zirkulierende Konzentrationen von 3OHGA für die insgesamt erniedrigte Aufnahme verantwortlich sein. Diese Erklärung geht aber davon aus, dass 30HGA über einen spezifischen Transporter in das Hirn transportiert wird. Im Zusammenhang dazu bestünde noch die alternative Erklärung, dass die Expression dieses potenziellen Transporters unter Bedingungen der HPDinduzierten metabolischen Krise erniedrigt und deshalb weniger [³H]-3OHGA im Hirn nachweisbar war.

	GA		30HGA	
	<i>Gcdh</i> -defizient unter Standarddiät	<i>Gcdh</i> - defizient unter HPD	<i>Gcdh</i> -defizient unter Standarddiät	<i>Gcdh-</i> defizient unter HPD
Plasma (µmol/l)	255 ± 180	338 ± 204	7,2 ± 2,1	10,5 ± 1,8
Urin (mmol/mol Kreatinin)	33.926 ± 6.056	50.934 ± 9.927	898 ± 126	1.414 ± 168

 Tab. 5: GA- und 3OHGA-Konzentration in 42 Tage alten Gcdh-defizienten Mäusen unter

 Standarddiät und HPD

Eine weitere Untermauerung der Annahme, dass die BHS intakt ist, lieferte das Experiment, in dem Mäusen fluoreszent-markierte Dextrane (3 kDa, 10 kDa, 70 kDa) injiziert wurden. Keines der Dextrane war im Hirngewebe *Gcdh*-defizienter oder Wildtyp-Mäuse nachzuweisen. Dem Labor stand jedoch kein Mausmodell mit einer defekten BHS zur Verfügung, welches als Positivkontrolle für die Versuchsserien hätte dienen können.

5.2.2 Ausscheidung von 3OHGA

Ausgehend von Ergebnissen eines DNA-Microarrays aus Nierengewebe 42 Tage alter Wildtyp- und *Gcdh*-defizienter Mäuse, identifizierten Stellmer *et al.* (2007) den ersten Transporter für 3OHGA. Es handelt sich dabei um den Natrium-abhängigen Dicarboxylat-Transporter 3 (NaC3). Dieser Transporter wird vor allem in der Niere, aber auch in der Leber, im Pankreas und im Hirn exprimiert. In der Niere ist NaC3 in der basolateralen Membran proximaler Tubuluszellen lokalisiert und transportiert Dicarboxylate in die Zelle. Stellmer *et al.* (2007) konnten zeigen, dass NaC3 GA mit hoher Affinität (K_M = 40 μ M) und 3OHGA mit niedriger Affinität (K_M = 980 μ M) transportiert und dass die Expression von NaC3 in den Nieren von Gcdh-defizienten Mäusen erhöht ist. Ein anderer Dicarboxylat-Transporter ist der Organische Anionen Transporter 1 (OAT1). OAT1 ist ebenfalls in Nieren Gcdh-defizienter Mäuse erhöht. Dieser Transporter ist wie NaC3 in der basolateralen Membran von proximalen Tubuluszellen lokalisiert. Der OAT1-abhängige Transport von para-Aminohippursäure (PAH) kann durch GA und 30HGA mit hoher Affinität (K_i = 98 µM) gehemmt werden (Hagos et al., 2008). Damit sind zwei Transporter bekannt, bei denen die mRNA-Expression in den Nieren von Gcdh-defizienten Mäusen erhöht ist. Eine fraktionelle Sekretion von 3OHGA und GA in den Urin setzt also eine NaC3/OAT1-vermittelte Aufnahme der Metabolite über die basolaterale Plasmamembran proximaler Tubuluszellen und eine Transportervermittelte Abgabe in den Urin über die apikale Membran voraus. Basierend auf diesem Transportermodell proximaler Tubuluszellen könnte die erhöhte Akkumulation von [³H]-3OHGA im Nierengewebe HPD-behandelter Gcdhdefizienter Mäuse (Abb. 17) wie folgt erklärt werden:

- Die erhöhte mRNA-Expression von NaC3/OAT1 führt zu einer gesteigerten Anzahl von Transportern in der basolateralen Membran der Tubuluszellen, die eine erhöhte Aufnahme von [³H]-3OHGA bedingen. Gleichzeitig bleibt die Expression bzw. die Transportrate des Transporters an der apikalen Membran unverändert.
- Der apikale Transporter in proximalen Tubuluszellen ist in seiner Expression oder Transportrate reduziert, was zur intrazellulären Akkumulation von[³H]-3OHGA beiträgt.
- In den proximalen Tubuluszellen akkumuliert sowohl mehr des kurzzeitig applizierten [³H]-3OHGA, wie auch größere Mengen an endogen produzierten 3OHGA, die an der apikalen Membran um die Transporterabhängige Sekretion in den Urin konkurrieren.

OAT4 ist ein Dicarboxylat-Transporter, der in der apikalen Membran von proximalen Tubuluszellen lokalisiert ist. OAT4 fungiert als Antiporter. Es konnte gezeigt werden, dass der OAT4-vermittelte Transport von Östronsulfat durch 3OHGA und GA nicht *cis*-inhibierbar ist. Jedoch lässt sich eine *trans*-Stimulation der Aufnahme von Östronsulfat durch 3OHGA und GA beobachten (Hagos *et al.*, 2008). Da OAT4 bei Mäusen jedoch nicht vorkommt, könnte

diese Funktion OAT2 übernehmen. Es ist beschrieben worden, dass OAT2 beim Menschen in der basolateralen Membran (Enomoto *et al.*, 2002), bei der Maus jedoch in der apikalen Membran (Kobayashi *et al.*, 2005) von proximalen Tubuluszellen lokalisiert ist. In vorläufigen Untersuchungen konnte in den Nieren von *Gcdh*-defizienten weiblichen Mäusen unter HPD, jedoch eine geringere OAT2 mRNA-Expression beobachtet werden als in *Gcdh*-defizienten weiblichen Mäusen unter Standarddiät (B. Kortman, UKE, unveröffentlichte Ergebnisse).

Diese Ergebnisse unterstützen die oben genannten Überlegungen, dass der apikale Transporter in seiner Expression erniedrigt ist und so eine Akkumulation des injizierten [³H]-3OHGA im Nierengewebe bedingt.

Die bei GA1 entstehenden Metabolite sind im Urin nachweisbar. Die Ausscheidung von GA und 3OHGA mit dem Urin, sowie die Umwandlung von Glutaryl-CoA in Glutarylcarnitin, war nach bisheriger Meinung die einzige Möglichkeit diese Säuren zu entfernen. Es konnte zudem gezeigt werden, dass 3OHGA auch über den Kot aus dem Körper entfernt werden kann (Keyser *et al.*, 2008). In *Gcdh*-defizienten Mäusen unter Standarddiät war nach Injektion von [³H]-3OHGA im Darm/Magen/Kot fast doppelt soviel Radioaktivität wiederzufinden wie bei Wildtyp-Mäusen unter Standarddiät. Bei *Gcdh*-defizienten Mäusen, die sich in einer Krise befinden, ist im Darm/Magen/Kot viermal weniger Radioaktivität als in symptomlosen *Gcdh*-defizienten Mäusen (Abb. 17). Diese Tiere können 3OHGA also nicht mehr über den Kot aus dem Körper entfernen. Ob sich dadurch die stationäre Konzentration von 3OHGA in der Zirkulation oder im Gewebe vergrößert und sich damit die Toxizität der Metabolite erhöht, bleibt offen.

In *Gcdh*-defizienten Mäusen unter HPD konnte eine erhöhte Radioaktivität in der Leber nachgewiesen werden (Abb. 17). Zusammen mit der erniedrigten Ausscheidung von [³H]-3OHGA über den Kot, lassen sich diese Ergebnisse ähnlich erklären, wie die Akkumulation von [³H]-3OHGA in den Nieren *Gcdh*-defizienter Mäuse unter HPD, nämlich a) durch eine erhöhte basolaterale Aufnahme von [³H]-3OHGA, b) durch eine erniedrigte Abgabe des Metaboliten über den apikalen Transporter in die Gallenflüssigkeit oder c) durch Konkurrenz

des injizierten [³H]-3OHGA mit dem endogen produzierten 3OHGA um den Transport über die apikale Membran.

5.3 Transporter in Astrocyten und Neuronen von *Gcdh*defizienten Mäusen

Gliazellen dienen der Stabilisierung der Neurone, der elektrischen Isolierung der Axone und der Versorgung der Neurone. Letztere Aufgabe übernehmen Astrocyten. Zum einen nehmen sie überschüssiges Glutamat schnell auf (Schousboe *et al.*, 1977, Erecinska and Silver, 1990), konvertieren dieses mit Hilfe der Glutaminsynthase zu Glutamin, sodass es für die Weiternutzung durch Neurone wieder an den Intrazellularraum abgegeben werden kann. Glutamatergene Neurone benötigen Glutamin zur Synthese der Neuro-transmitter Glutamat und GABA (Shank and Aprison, 1981a, Shank and Aprison, 1988). Da die Neurone das Enzym Glutaminsynthase nicht exprimieren, sind sie hierbei ganz auf die Astrocyten angewiesen (Norenberg and Martinez-Hernandez, 1979). Zum anderen wandeln Astrocyten Glukose in Lactat um, das wiederum an Neurone abgegeben werden kann (Tsacopoulos and Magistretti, 1996, Magistretti *et al.*, 1999, Pellerin and Magistretti, 2003). Auch aus diesem Substrat bilden glutamatergene Neurone Glutamat (Schousboe *et al.*, 1997).

Der Citratzyklus ist der Mittelpunkt des Stoffwechsels einer Zelle. Acetyl-Gruppen oder Dicarboxylate können in diesen Zyklus eingeschleust werden. Außerdem dienen die Citratzyklus-Intermediate als Vorläufer für die Fettsäure-, aber auch für die Aminosäuresynthese und –oxidation. Die für diese Prozesse aus dem Zyklus entfernten Intermediate, müssen für dessen Aufrechterhaltung ständig nachgeliefert werden. Diese Aufgabe wird durch die Pyruvat Carboxylase reguliert. Die Pyruvat Carboxylase carboxyliert Pyruvat zu Oxalacetat, einem Intermediat des Citratzyklus. Neurone exprimieren die Pyruvat Carboxylase nicht (Yu *et al.*, 1983, Shank *et al.*, 1985, Cesar and Hamprecht, 1995) und sind somit auf die Zufuhr von Citratzyklus-Intermediaten von außen angewiesen. Astrocyten versorgen die Neurone mit Citratzyklus-Intermediaten (Shank and Campbell, 1984, Westergaard *et al.*, 1994a, Westergaard *et al.*, 1994b), indem sie Dicarboxylate wie z.B. Succinat, Malat oder α-Ketoglutarat in den Interzellularraum abgeben. Diese Intermediate werden in der Folge von Neuronen aufgenommen und in den Citratzyklus eingeschleust (Shank and Campbell, 1981b, Shank and Campbell, 1984, Hertz and Peng, 1992, Shank and Bennett, 1993).

Da es sich bei den Metaboliten GA und 3OHGA um Dicarboxylate handelt, könnten sie den Transport von Citratzyklus-Intermediaten zwischen Astrocyten und Neuronen hemmen, wodurch die Neurone nicht mehr ausreichend mit Intermediaten versorgt werden würden und es dadurch möglicherweise zu dem bei GA1-Patienten beobachteten Neuronenverlust kommen kann.

Des Weiteren könnte, wie für die Nieren *Gcdh*-defizienter Mäuse gezeigt, die Expression von Dicarboxylat-Transportern im Hirn verändert sein.

5.3.1 Expression von OAT1, OAT2 und NaC3

OAT1 transportiert organische Anionen, wie z.B. Citrat oder *para*-Aminohippursäure, im Austausch gegen Dicarboxylate. Ob OAT1 aber im Hirn exprimiert wird, ist nicht klar. So konnten einige Arbeitsgruppen eine geringe Expression von OAT1 mRNA im Hirn von Menschen, Ratten und Mäusen nachweisen (Sekine *et al.*, 1997, Cihlar *et al.*, 1999, Hosoyamada *et al.*, 1999, Race *et al.*, 1999, Pavlova *et al.*, 2000), andere jedoch nicht (Sweet *et al.*, 1997, Kobayashi *et al.*, 2002).

In der vorliegenden Arbeit konnte keine OAT1 mRNA-Expression in primären Astrocyten und Neuronen von Wildtyp- und *Gcdh*-defizienten Mäusen nachgewiesen werden. Pavlova *et al.* (2000) berichten über eine entwicklungsabhängige Expression von OAT1 mRNA im Maushirn. In Embryonen konnte OAT1 mRNA im Plexus choroideus, im Epithel der Ventrikel und in der Dura mater nachgewiesen werden. Postnatal wird OAT1 nur noch in der Dura mater exprimiert (Pavlova *et al.*, 2000). Die Isolierung der in dieser Arbeit verwendeten primären Zellen erfolgt am Tag der Geburt und die Messungen an den Zellen wurden nach 10 Tagen Kultivierung *in vitro* durchgeführt. Außerdem wurden bei der Isolierung der Zellen die Hirnhäute entfernt, zu denen die Dura mater gehört. Das könnte erklären weshalb bei den Untersuchungen keine mRNA-Expression von OAT1 nachgewiesen werden konnte. OAT2 ist ebenfalls ein Transporter für organische Anionen. Über die Fähigkeit von OAT2 Dicarboxylate wie α -Ketoglutarat zu binden und zu transportieren liegen gegensätzliche Befunde vor (Morita et al., 2001, Sun et al., 2001). In primären Astrocyten und Neuronen aus Wildtyp- und Gcdh-defizienten neugeborenen Mäusen war eine Expression von OAT2 mRNA messbar (Abb. 19). In Neuronen wurde dreimal mehr OAT2 mRNA nachgewiesen als in Astrocyten. Jedoch war die Expression in beiden Zelltypen sehr schwach, so dass sich hier die Frage nach der physiologischen Bedeutung stellt. Pavlova et al. (2000) konnten OAT2 mRNA nur am postnatalen Tag 5 im Metencephalon (Hinterhirn) nachweisen. Dies lässt vermuten, dass OAT2 im Hirn nur in neugeborenen Mäusen, wenn überhaupt, eine Rolle spielt. Das Hinterhirn besteht aus dem Cerebellum und dem Pons. Das Cerebellum ist unter anderem für die Planung und Feinabstimmung von Bewegungen verantwortlich. Bisher ist jedoch nichts über eine Schädigung des Cerebellums bei GA1-Patienten bekannt. Auch ist nicht klar, ob OAT2 im menschlichen Hirn zu irgendeiner Zeit überhaupt exprimiert wird. In Bezug auf die Erforschung der Gcdh-defizienten Maus, sollte deshalb in Folgeexperimenten die Expression von OAT2 im Hinterhirn genauer untersucht werden, z.B. in welcher Entwicklungsphase OAT2 exprimiert wird, in welcher Höhe die Expression stattfindet und ob OAT2 überhaupt eine Bedeutung bei der Ausbildung von GA1-spezifischen physiologische Symptomen spielen kann.

NaC3 transportiert drei Natrium-Ionen und ein Di- oder Tricarboxylat (Kekuda *et al.*, 1999, Wang *et al.*, 2000, Pajor *et al.*, 2001). Im Hirn von Ratten und Mäusen wird NaC3 von Astrocyten exprimiert. In Ratten- und Mäuseneuronen wurde hingegen keine NaC3 mRNA nachgewiesen (Fujita *et al.*, 2005, Wada *et al.*, 2006, Yodoya *et al.*, 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls Expression von NaC3 mRNA in primären Astrocyten aus Wildtyp- und *Gcdh*-defizienten Mäusen gezeigt werden (Abb. 18). Jedoch konnte in primären Neuronen auch NaC3 mRNA-Expression beobachtet werden, die sogar dreifach höher war als in Astrocyten. Diese Ergebnisse wurden in drei verschiedenen Zell-Isolationen bestätigt. Außerdem wurde eine PCR mit anderen NaC3-spezifischen Primern durchgeführt, die bestätigte, dass primäre

Neurone NaC3 mRNA exprimieren. Worauf die Abweichung zur Literatur zurückzuführen ist, ist nicht klar.

In der vorliegenden Arbeit konnte des Weiteren nachgewiesen werden, dass die primären Astrocyten aus *Gcdh*-defizienten Mäusen doppelt soviel NaC3 mRNA exprimieren wie Wildtyp-Astrocyten (Abb. 18). Schon in den Nieren *Gcdh*-defizienter Mäuse konnte eine erhöhte mRNA-Expression von NaC3 beobachtet werden (Stellmer *et al.*, 2007a). Dies führt vermutlich zu einer erhöhten Aufnahme von 3OHGA und GA aus dem Blut in proximale Tubuluszellen der Niere. Im Hirn könnte es zu einer erhöhten Aufnahme oder erhöhten Abgabe von 3OHGA und GA in bzw. aus den Astrocyten führen, da NaC3 ein bidirektionaler Transporter ist. Dementsprechend müssten die *Gcdh*-defizienten Neurone ebenfalls mehr 3OHGA und GA aufnehmen bzw. abgeben.

5.3.2 Transport von [¹⁴C]-Succinat in Astrocyten und Neuronen

Der Transport von Citratzyklus-Intermediaten über die Plasmamembran wird über Natrium-abhängige Transporter vermittelt. NaC1 hat eine niedrige Affinität zu Di- und Tricarboxylaten und wird in der Niere und im Darm exprimiert (Pajor, 1995, Pajor, 1996, Chen *et al.*, 1998). NaC2 hat eine hohe Affinität zum Tricarboxylat Citrat, transportiert aber auch die Dicarboxylate Succinat und α -Ketoglutarat (Inoue *et al.*, 2002a, Inoue *et al.*, 2002b, Inoue *et al.*, 2004) und wird vor allem in der Leber, aber auch im Hirn exprimiert (Inoue *et al.*, 2002a). NaC3 transportiert vor allem Dicarboxylate wie GA, 2-D-OHGA, 2-L-OHGA, α -Ketoglutarat und 3OHGA, aber auch Tricarboxylate (Hagos *et al.*, 2008) und wird in den Nieren, der Leber und dem Hirn exprimiert (Chen *et al.*, 1998, Kekuda *et al.*, 1999, Wang *et al.*, 2000, Pajor *et al.*, 2001).

NaC2 und NaC3 mRNA werden im Hirn, jedoch in unterschiedlichen Zelltypen exprimiert. In Ratten und Mäusen wurde NaC2 mRNA in Neuronen und NaC3 mRNA in Astrocyten nachgewiesen (Fujita *et al.*, 2005, Wada *et al.*, 2006, Yodoya *et al.*, 2006). Auch auf Proteinebene konnte diese zelltypabhängige Expression bestätigt werden. Die bei GA1 entstehenden Metabolite GA und 30HGA können über den NaC3 transportiert werden (Stellmer *et al.*, 2007a). Ob sie den Transport von Citratzyklus-Intermediaten in Astrocyten und Neuronen beeinflussen, wurde an primären Zellen aus Wildtyp- und Gcdh-

defizienten Mäusen untersucht. Da NaC3 ein bidirektionaler Transporter ist, wurde der Einfluss von GA und 3OHGA auf die Aufnahme des NaC3-Substrates [¹⁴C]-Succinat gemessen. Tatsächlich inhibiert 2 mM GA die Aufnahme von [¹⁴C]-Succinat um 90 %, in Astrocyten ebenso wie in Neuronen, während 30HGA in gleicher Konzentration die Aufnahme von [¹⁴C]-Succinat in beiden Zelltypen nur um ca. 50 % inhibiert (Abb. 20, Abb. 22). Zwischen Wildtyp- und Gcdh-defizienten Zellen konnte in dieser Versuchsreihe kein Unterschied beobachtet werden. Überraschend war, dass die [¹⁴C]-Succinat Aufnahmerate in Astrocyten und Neuronen gleich war. Diese Beobachtung steht nicht im Einklang mit der Literatur. Hier wird beschrieben, dass in Rattenund Mausneuronen keine NaC3 sondern nur NaC2 mRNA nachweisbar war (Fujita et al., 2005, Wada et al., 2006, Yodoya et al., 2006). Da NaC2 eine niedrigere Affinität zu Dicarboxylaten hat als NaC3, sollten neuronale Zellen weniger Dicarboxylate als die NaC3-exprimierenden Astrocyten aufnehmen. Unter unseren Bedingungen war aber NaC3 mRNA in primären Neuronen nachweisbar, bei denen die relative Menge sogar dreifach über der in Astrocytenkulturen lag (Abb. 18). Ausgehend von diesen Werten würden wir eine erhöhte Aufnahme von [¹⁴C]-Succinat in die Neurone erwarten. Dies ist jedoch nicht der Fall. Eine mögliche Erklärung ist, dass nur die NaC3 mRNA-Expression nicht aber das NaC3-Protein erhöht war. Ähnliche Regulationsmechanismen sind vom Transferrin-Rezeptor bekannt, dessen mRNA-Synthese gleich bleibend ist. Bei erhöhten Spiegeln des Eisen-Ligandens wird die Transferrin mRNA abgebaut. Wenig Eisen in der Zelle stabilisiert die mRNA (Graham et al., 2007). Eine andere Möglichkeit wäre, dass in den Neuronen auch die mRNA äquivalent in NaC3-Protein translatiert wird, jedoch die Zahl des NaC3 in der Plasmamembran unverändert ist. So ist vom Glukose-Transporter 4 (GLUT4) bekannt, dass im basalen Zustand die Mehrheit der Transporter in intrazellulären Membranen lokalisiert ist und es nur nach Stimulation mit Insulin zu einer Umverteilung von GLUT4 an die Plasmamembran kommt (Rea and James, 1997, Pessin et al., 1999). Aus Mangel an geeigneten anti-Maus NaC3-Antikörpern konnte diese Erklärungsmöglichkeit hier nicht untersucht werden.

In Oocyten-Experimenten wurden die K_M -Werte von sechs Dicarboxylaten für NaC3 ermittelt (Tab. 4). Succinat hat den niedrigsten K_M -Wert, das bedeutet es

hat die höchste Affinität zu NaC3, gefolgt von GA, α -Ketoglutarat, 2-D-OHGA und 2-L-OHGA. 3OHGA hatte die niedrigste Affinität für NaC3 (Hagos *et al.*, 2008). Unter der Annahme, dass die K_M-Werte den K_i-Werten ähneln, wurde danach getestet, ob bei den entsprechenden Konzentrationen der K_M-Werte der Dicarboxylate sich die Aufnahme von [¹⁴C]-Succinat in Astrocyten um 50 % hemmen ließ. Mit Ausnahme von 3OHGA und α -Ketoglutarat wurden die Befunde der Oocyten-Experimente bestätigt. Während aber für 3OHGA ein K_i-Wert von etwa 2 mM bestimmt wurde (Abb. 21), war aus der Einzelkonzentrationsmessung von α -Ketoglutarat kein entsprechender K_i-Wert ableitbar. Warum dieser große Unterschied in den K_M-Werten zwischen Oocyten und Astrocyten beobachtet wurde, ist möglicherweise damit erklärbar, dass das Oocyten-Expressionssystem nur ein künstliches Modell ist, das nicht der komplexen Regulierbarkeit der NaC3-Transporteraktivität in Mausastrocyten entspricht.

Es konnten keine Unterschiede in der Aufnahme von [¹⁴C]-Succinat zwischen Wildtyp- und Gcdh-defizienten Zellen beobachtet werden. Wenn jedoch der zeitliche Efflux untersucht wird, kann man Differenzen erkennen. Astrocyten aus Wildtyp- und Gcdh-defizienten Mäusen wurden vorbeladen mit [¹⁴C]-Succinat und der Ausstrom dieses Dicarboxylats zeitabhängig gemessen. Es war zu beobachten, dass nach 8 min die Astrocyten aus den Wildtyp-Mäusen 50 % des ¹⁴C]-Succinats wieder in das Medium abgegeben hatten. Bei den Astrocyten aus Gcdh-defizienten Mäusen ist dieser Zeitpunkt erst nach 19,5 min erreicht (Abb. 23). Das bedeutet, dass Astrocyten aus Gcdh-defizienten Mäusen langsamer Citratzyklus-Intermediate abgeben können als Astrocyten aus Wildtyp-Mäusen. Gcdh-defiziente Astrocyten produzieren endogen 30HGA und GA, die mit Citratzyklus-Intermediaten ([¹⁴C]-Succinat) um Bindungsstellen am NaC3 konkurrieren, so dass weniger Intermediate aus den Astrocyten in den Interzellularraum transportiert werden können. Da auch Gcdh-defiziente Neurone endogen 3OHGA und GA produzieren, wurde bei diesen Zellen ebenfalls erwartet, dass der Ausstrom von [¹⁴C]-Succinat langsamer verläuft, als in den Wildtyp-Neuronen. Das Gegenteil ist jedoch der Fall. Neurone aus *Gcdh*-defizienten Mäusen geben schneller [¹⁴C]-Succinat in das Medium ab als Neurone aus Wildtyp-Mäusen (Abb. 24). Wenn Astrocyten aus Gcdhdefizienten Mäusen weniger Intermediate zur Verfügung stellen, könnte als Kompensationsmechanismus die Synthese und Expression von Dicarboxylat-Transportern an der Plasmamembran der Neurone erhöht werden. Ähnliche Kompensationsmechanismen sind für LDL-Rezeptoren in Zellen beschrieben, die in LDL-freiem Medium kultiviert wurden (Horton et al., 1993). Da NaC2, ebenso wie NaC3 ein bidirektionaler Transporter ist, würde sich dies auch mit einem erhöhten Ausstrom von Dicarboxylaten aus Gcdh-defizienten Neuronen bemerkbar machen. Jedoch würde eine gesteigerte Anzahl an Transportern nicht nur mehr Dicarboxylate aus der Zelle transportieren, sondern auch in die Zelle hinein. Dies sollte dann zu einer erhöhten Aufnahmerate von [¹⁴C]-Succinat in Gcdh-defizienten Neuronen gegenüber Wildtyp-Neuronen führen, was aber nicht beobachtet wurde. Die Aufnahme von [¹⁴C]-Succinat in Wildtypund Gcdh-defiziente Neurone war nach 20 min nicht signifikant verändert. Ob nach dieser Zeit möglicherweise schon eine Sättigung, d.h. ein Gleichgewicht zwischen Aufnahme und Efflux von [¹⁴C]-Succinat in Wildtyp- und Gcdhdefiziente Neurone erreicht war und deshalb kein Unterschied in der Aufnahme mehr nachgewiesen werden konnte, muss in weiteren zeitabhängigen Aufnahme-Experimenten untersucht werden. In der Literatur ist jedoch eine lineare Aufnahme von [¹⁴C]-Succinat in Rattenastrocyten und Mausneuronen bis zu 30 min beschrieben worden (Wada et al., 2006, Yodoya et al., 2006).

Auf der anderen Seite könnten die von *Gcdh*-defizienten Neuronen endogen produzierten Dicarboxylate 3OHGA und GA eine *trans*-inhibitorische Wirkung auf die Transporter haben. Hierdurch hätten die Zellen zwar mehr NaC3-Transporter an der Plasmamembran, der Einstrom von [¹⁴C]-Succinat über diese Transporter würde aber von den intrazellulären Dicarboxylaten gehemmt werden und damit die Aufnahme von [¹⁴C]-Succinat gleich bleiben. Eine *cis*-inhibitorische Wirkung von 3OHGA auf den Organische Kationen Transporter 2 (OCT2) wurde bereits nachgewiesen (Stellmer *et al.*, 2007a).

Schließlich könnten auch die erhöhten Konzentrationen von GA und 3OHGA in *Gcdh*-defizienten Neuronen selber zu einer erhöhten Expression von Transportern an der Plasmamembran führen, die im Unterschied zu NaC2 und NaC3 nur unidirektional die potenziell zytotoxischen Metabolite GA und 3OHGA aus der Zelle entfernen.

93

In *in vitro* Experimenten an Cortexschnitt-Kulturen, konnte eine Inhibition des Atmungsketten-Komplexes II durch GA und 3OHGA nachgewiesen werden (Ullrich *et al.*, 1999). Jedoch waren die eingesetzten Konzentrationen mit 4 bzw. 2 mM unphysiologisch hoch. Bei dem Atmungsketten-Komplex II handelt es sich um die Succinat-Dehydrogenase. Dieses Enzym katalysiert im Citratzyklus die Oxidation von Succinat zu Fumarat.

Es bleibt zu prüfen, ob auch die endogen produzierten Mengen an 3OHGA und GA ausreichen, um in *Gcdh*-defizienten Astrocyten oder Neuronen den Atmungsketten-Komplex II zu inhibieren und nachhaltig die Aufnahme oder den Efflux von [¹⁴C]-Succinat zu beeinflussen.

Zum jetzigen Zeitpunkt erlauben die Ergebnisse keine vollständige Erklärung, ob

- a) die unterschiedliche Expression von Natrium-abhängigen Dicarboxylat-Transportern in Astrocyten und Neuronen aus Wildtyp- und Gcdhdefizienten Mäusen,
- b) die endogen produzierte GA und 3OHGA in Gcdh-defizienten Zellen oder
- c) sekundär regulierte Enzymaktivitäten, wie die der Succinat-Dehydrogenase, bzw. regulierte Umverteilung von Transportern von intrazellularen Membranen an die Plasmamembran,

zu einem signifikant verändertem Austausch von Citratzyklus-Intermediaten zwischen *Gcdh*-defizienten Astrocyten und Neuronen beitragen und pathophysiologisch relevant sind.

Weiterführende experimentelle Arbeiten sollten zunächst durch siRNAvermittelte Herunterregulation bzw. durch Überexpression von Transportern die Rolle von spezifischen Dicarboxylat-Transportern an kultivierten Astrocyten und Neuronen klären. *In vivo* könnten ähnliche Erkenntnisse aus Verpaarung von konditionellen Knockout-Mäusen für Natrium-abhängige Dicarboxylat-Transporter bzw. OATs in z.B. Astrocyten, mit *Gcdh*-defizienten Mäusen erwartet werden. Alternativ könnten *in vitro* Mischkulturversuche von Astrocyten und Neuronen der direkten Verfolgung des Austausches von Citratzyklus-Intermediaten dienen.

6 Literaturverzeichnis

- Amir N, Elpeleg ON, Shalev RS and Christensen E (1989): Glutaric aciduria type I: enzymatic and neuroradiologic investigations of two kindreds. J Pediatr; 114 (6), 983-9.
- Anikster Y, Shaag A, Joseph A, Mandel H, Ben-Zeev B, Christensen E and Elpeleg ON (1996): Glutaric aciduria type I in the Arab and Jewish communities in Israel. *Am J Hum Genet*; **59** (5), 1012-8.
- Baric I, Wagner L, Feyh P, Liesert M, Buckel W and Hoffmann GF (1999): Sensitivity and specificity of free and total glutaric acid and 3hydroxyglutaric acid measurements by stable-isotope dilution assays for the diagnosis of glutaric aciduria type I. *J Inherit Metab Dis;* **22** (8), 867-81.
- Besrat A, Polan CE and Henderson LM (1969): Mammalian metabolism of glutaric acid. *J Biol Chem*; **244** (6), 1461-7.
- Biery BJ, Stein DE, Morton DH and Goodman SI (1996): Gene structure and mutations of glutaryl-coenzyme A dehydrogenase: impaired association of enzyme subunits that is due to an A421V substitution causes glutaric acidemia type I in the Amish. *Am J Hum Genet;* **59** (5), 1006-11.
- Bittigau P and Ikonomidou C (1997): Glutamate in neurologic diseases. *J Child Neurol;* **12** (8), 471-85.
- Bjugstad KB, Goodman SI and Freed CR (2000): Age at symptom onset predicts severity of motor impairment and clinical outcome of glutaric acidemia type 1. *J Pediatr;* **137** (5), 681-6.
- Bolender N, Sickmann A, Wagner R, Meisinger C and Pfanner N (2008): Multiple pathways for sorting mitochondrial precursor proteins. *EMBO Rep;* **9** (1), 42-9.
- Brismar J and Ozand PT (1995): CT and MR of the brain in glutaric acidemia type I: a review of 59 published cases and a report of 5 new patients. *AJNR Am J Neuroradiol;* **16** (4), 675-83.
- Busquets C, Merinero B, Christensen E, Gelpi JL, Campistol J, Pineda M, Fernandez-Alvarez E, Prats JM, Sans A, Arteaga R, Marti M, Campos J, Martinez-Pardo M, Martinez-Bermejo A, Ruiz-Falco ML, Vaquerizo J, Orozco M, Ugarte M, Coll MJ and Ribes A (2000): Glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency in Spain: evidence of two groups of patients, genetically, and biochemically distinct. *Pediatr Res;* 48 (3), 315-22.
- Cardullo RA, Agrawal S, Flores C, Zamecnik PC and Wolf DE (1988): Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **85** (23), 8790-4.
- Cesar M and Hamprecht B (1995): Immunocytochemical examination of neural rat and mouse primary cultures using monoclonal antibodies raised against pyruvate carboxylase. *J Neurochem;* **64** (5), 2312-8.
- Chen XZ, Shayakul C, Berger UV, Tian W and Hediger MA (1998): Characterization of a rat Na+-dicarboxylate cotransporter. *J Biol Chem*; **273** (33), 20972-81.
- Chow CW, Haan EA, Goodman SI, Anderson RM, Evans WA, Kleinschmidt-DeMasters BK, Wise G, McGill JJ and Danks DM (1988):

Neuropathology in glutaric acidaemia type 1. *Acta Neuropathol;* **76** (6), 590-4.

- Christensen E (1983): Improved assay of glutaryl-CoA dehydrogenase in cultured cells and liver: application to glutaric aciduria type I. *Clin Chim Acta;* **129** (1), 91-7.
- Christensen E, Ribes A, Merinero B and Zschocke J (2004): Correlation of genotype and phenotype in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis;* **27** (6), 861-8.
- Cihlar T, Lin DC, Pritchard JB, Fuller MD, Mendel DB and Sweet DH (1999): The antiviral nucleotide analogs cidofovir and adefovir are novel substrates for human and rat renal organic anion transporter 1. *Mol Pharmacol;* **56** (3), 570-80.
- Das AM, Lucke T and Ullrich K (2003): Glutaric aciduria I: creatine supplementation restores creatinephosphate levels in mixed cortex cells from rat incubated with 3-hydroxyglutarate. *Mol Genet Metab;* **78** (2), 108-11.
- De Lucca M, Perez B, Desviat LR and Ugarte M (1998): Molecular basis of phenylketonuria in Venezuela: presence of two novel null mutations. *Hum Mutat;* **11** (5), 354-9.
- Drigo P, Burlina AB and Battistella PA (1993): Subdural hematoma and glutaric aciduria type 1. *Brain Dev;* **15** (6), 460-1.
- Durkin JP, Tremblay R, Buchan A, Blosser J, Chakravarthy B, Mealing G, Morley P and Song D (1996): An early loss in membrane protein kinase C activity precedes the excitatory amino acid-induced death of primary cortical neurons. *J Neurochem*; **66** (3), 951-62.
- Enomoto A, Takeda M, Shimoda M, Narikawa S, Kobayashi Y, Yamamoto T, Sekine T, Cha SH, Niwa T and Endou H (2002): Interaction of human organic anion transporters 2 and 4 with organic anion transport inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther;* **301** (3), 797-802.
- Erecinska M and Silver IA (1990): Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Prog Neurobiol;* **35** (4), 245-96.
- Fu Z, Wang M, Paschke R, Rao KS, Frerman FE and Kim JJ (2004): Crystal structures of human glutaryl-CoA dehydrogenase with and without an alternate substrate: structural bases of dehydrogenation and decarboxylation reactions. *Biochemistry*; **43** (30), 9674-84.
- Fujita T, Katsukawa H, Yodoya E, Wada M, Shimada A, Okada N, Yamamoto A and Ganapathy V (2005): Transport characteristics of N-acetyl-Laspartate in rat astrocytes: involvement of sodium-coupled high-affinity carboxylate transporter NaC3/NaDC3-mediated transport system. J Neurochem; 93 (3), 706-14.
- Funk CB, Prasad AN, Frosk P, Sauer S, Kölker S, Greenberg CR and Del Bigio MR (2005): Neuropathological, biochemical and molecular findings in a glutaric acidemia type 1 cohort. *Brain;* **128** (Pt 4), 711-22.
- Furuse M, Itoh M, Hirase T, Nagafuchi A, Yonemura S and Tsukita S (1994): Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J Cell Biol*; **127** (6 Pt 1), 1617-26.
- Gomes B, Fendrich G and Abeles RH (1981): Mechanism of action of glutaryl-CoA and butyryl-CoA dehydrogenases. Purification of glutaryl-CoA dehydrogenase. *Biochemistry;* **20** (6), 1481-90.

- Goodman SI, Norenberg MD, Shikes RH, Breslich DJ and Moe PG (1977): Glutaric aciduria: biochemical and morphologic considerations. *J Pediatr;* **90** (5), 746-50.
- Goodman SI, Kratz LE, DiGiulio KA, Biery BJ, Goodman KE, Isaya G and Frerman FE (1995): Cloning of glutaryl-CoA dehydrogenase cDNA, and expression of wild type and mutant enzymes in Escherichia coli. *Hum Mol Genet;* **4** (9), 1493-8.
- Goodman SI, Stein DE, Schlesinger S, Christensen E, Schwartz M, Greenberg CR and Elpeleg ON (1998): Glutaryl-CoA dehydrogenase mutations in glutaric acidemia (type I): review and report of thirty novel mutations. *Hum Mutat;* **12** (3), 141-4.
- Goodman SI and Frerman FE (2001): Organic acidemias due to defects in lysine oxidation: 2-ketoadipic acidemia and glutaric acidemia. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW and Vogelstein B. McGraw-Hill Inc., New York, 2195-2204.
- Graham RM, Chua AC, Herbison CE, Olynyk JK and Trinder D (2007): Liver iron transport. *World J Gastroenterol;* **13** (35), 4725-36.
- Greenberg CR, Duncan AM, Gregory CA, Singal R and Goodman SI (1994): Assignment of human glutaryl-CoA dehydrogenase gene (GCDH) to the short arm of chromosome 19 (19p13.2) by in situ hybridization and somatic cell hybrid analysis. *Genomics;* **21** (1), 289-90.
- Greenberg CR, Reimer D, Singal R, Triggs-Raine B, Chudley AE, Dilling LA, Philipps S, Haworth JC, Seargeant LE and Goodman SI (1995): A G-to-T transversion at the +5 position of intron 1 in the glutaryl CoA dehydrogenase gene is associated with the Island Lake variant of glutaric acidemia type I. *Hum Mol Genet;* **4** (3), 493-5.
- Hagos Y, Krick W, Braulke T, Mühlhausen C, Burckhardt G and Burckhardt BC (2008): Organic anion transporters OAT1 and OAT4 mediate the high affinity transport of glutarate derivatives accumulating in patients with glutaric acidurias. *Pflugers Arch.;* DOI: 10.1007/s00424-008-0489-2.
- Härtel U, Eckel E, Koch J, Fuchs G, Linder D and Buckel W (1993): Purification of glutaryl-CoA dehydrogenase from Pseudomonas sp., an enzyme involved in the anaerobic degradation of benzoate. *Arch Microbiol;* **159** (2), 174-81.
- Hawkins BT and Davis TP (2005): The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev;* **57** (2), 173-85.
- Haworth JC, Booth FA, Chudley AE, deGroot GW, Dilling LA, Goodman SI, Greenberg CR, Mallory CJ, McClarty BM, Seshia SS and et al. (1991):
 Phenotypic variability in glutaric aciduria type I: Report of fourteen cases in five Canadian Indian kindreds. *J Pediatr;* **118** (1), 52-8.
- Hertz L and Peng L (1992): Energy metabolism at the cellular level of the CNS. *Can J Physiol Pharmacol;* **70 Suppl** S145-57.
- Heyes MP (1987): Hypothesis: a role for quinolinic acid in the neuropathology of glutaric aciduria type I. *Can J Neurol Sci;* **14** (3 Suppl), 441-3.
- Hirase T, Staddon JM, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Itoh M, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S and Rubin LL (1997): Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. J Cell Sci; 110 (Pt 14) 1603-13.

- Hoffmann GF, Gibson KM, Trefz FK, Nyhan WL, Bremer HJ and Rating D (1994): Neurological manifestations of organic acid disorders. *Eur J Pediatr;* **153** (7 Suppl 1), S94-100.
- Hoffmann GF, Athanassopoulos S, Burlina AB, Duran M, de Klerk JB, Lehnert W, Leonard JV, Monavari AA, Müller E, Muntau AC, Naughten ER, Plecko-Starting B, Superti-Furga A, Zschocke J and Christensen E (1996): Clinical course, early diagnosis, treatment, and prevention of disease in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Neuropediatrics*; 27 (3), 115-23.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R and Gelfand DH (1991): Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 88 (16), 7276-80.
- Horton JD, Cuthbert JA and Spady DK (1993): Dietary fatty acids regulate hepatic low density lipoprotein (LDL) transport by altering LDL receptor protein and mRNA levels. *J Clin Invest;* **92** (2), 743-9.
- Hosoyamada M, Sekine T, Kanai Y and Endou H (1999): Molecular cloning and functional expression of a multispecific organic anion transporter from human kidney. *Am J Physiol;* **276** (1 Pt 2), F122-8.
- Inoue K, Zhuang L and Ganapathy V (2002a): Human Na+ -coupled citrate transporter: primary structure, genomic organization, and transport function. *Biochem Biophys Res Commun;* **299** (3), 465-71.
- Inoue K, Zhuang L, Maddox DM, Smith SB and Ganapathy V (2002b): Structure, function, and expression pattern of a novel sodium-coupled citrate transporter (NaCT) cloned from mammalian brain. *J Biol Chem*; **277** (42), 39469-76.
- Inoue K, Fei YJ, Zhuang L, Gopal E, Miyauchi S and Ganapathy V (2004): Functional features and genomic organization of mouse NaCT, a sodium-coupled transporter for tricarboxylic acid cycle intermediates. *Biochem J*; **378** (Pt 3), 949-57.
- Kekuda R, Wang H, Huang W, Pajor AM, Leibach FH, Devoe LD, Prasad PD and Ganapathy V (1999): Primary structure and functional characteristics of a mammalian sodium-coupled high affinity dicarboxylate transporter. J Biol Chem; 274 (6), 3422-9.
- Keyser B, Glatzel M, Stellmer F, Kortmann B, Lukacs Z, Kölker S, Sauer SW, Muschol N, Herdering W, Thiem J, Goodman SI, Koeller DM, Ullrich K, Braulke T and Mühlhausen C (2008): Transport and distribution of 3hydroxyglutaric acid before and during induced encephalopathic crises in a mouse model of glutaric aciduria type 1. *Biochim Biophys Acta;* DOI: 10.1016/j.bbadis.2008.02.008.
- Knerr I, Zschocke J, Trautmann U, Dorland L, de Koning TJ, Muller P, Christensen E, Trefz FK, Wundisch GF, Rascher W and Hoffmann GF (2002): Glutaric aciduria type III: a distinctive non-disease? J Inherit Metab Dis; 25 (6), 483-90.
- Kobayashi Y, Hirokawa N, Ohshiro N, Sekine T, Sasaki T, Tokuyama S, Endou H and Yamamoto T (2002): Differential gene expression of organic anion transporters in male and female rats. *Biochem Biophys Res Commun;* 290 (1), 482-7.

- Kobayashi Y, Shibusawa A, Saito H, Ohshiro N, Ohbayashi M, Kohyama N and Yamamoto T (2005): Isolation and functional characterization of a novel organic solute carrier protein, hOSCP1. *J Biol Chem*; **280** (37), 32332-9.
- Koeller DM, Woontner M, Crnic LS, Kleinschmidt-DeMasters B, Stephens J, Hunt EL and Goodman SI (2002): Biochemical, pathologic and behavioral analysis of a mouse model of glutaric acidemia type I. *Hum Mol Genet;* **11** (4), 347-57.
- Kölker S, Ahlemeyer B, Krieglstein J and Hoffmann GF (2000): Maturationdependent neurotoxicity of 3-hydroxyglutaric and glutaric acids in vitro: a new pathophysiologic approach to glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatr Res;* **47** (4 Pt 1), 495-503.
- Kölker S, Koeller DM, Sauer S, Horster F, Schwab MA, Hoffmann GF, Ullrich K and Okun JG (2004): Excitotoxicity and bioenergetics in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis*; **27** (6), 805-12.
- Kölker S, Garbade SF, Greenberg CR, Leonard JV, Saudubray JM, Ribes A, Kalkanoglu HS, Lund AM, Merinero B, Wajner M, Troncoso M, Williams M, Walter JH, Campistol J, Marti-Herrero M, Caswill M, Burlina AB, Lagler F, Maier EM, Schwahn B, Tokatli A, Dursun A, Coskun T, Chalmers RA, Koeller DM, Zschocke J, Christensen E, Burgard P and Hoffmann GF (2006): Natural history, outcome, and treatment efficacy in children and adults with glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatr Res;* **59** (6), 840-7.
- Kölker S, Christensen E, Leonard JV, Greenberg CR, Burlina AB, Burlina AP, Dixon M, Duran M, Goodman SI, Koeller DM, Müller E, Naughten ER, Neumaier-Probst E, Okun JG, Kyllerman M, Surtees RA, Wilcken B, Hoffmann GF and Burgard P (2007): Guideline for the diagnosis and management of glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency (glutaric aciduria type I). J Inherit Metab Dis; 30 (1), 5-22.
- Kuban KC and Gilles FH (1985): Human telencephalic angiogenesis. Ann Neurol; **17** (6), 539-48.
- Land JM, Goulder P, Johnson A and Hockaday J (1992): Glutaric aciduria type 1 an atypical presentation together with some observations upon treatment and the possible cause of cerebral damage. *Neuropediatrics;* **23** (6), 322-6.
- Leibel RL, Shih VE, Goodman SI, Bauman ML, McCabe ER, Zwerdling RG, Bergman I and Costello C (1980): Glutaric acidemia: a metabolic disorder causing progressive choreoathetosis. *Neurology*; **30** (11), 1163-8.
- Lenich AC and Goodman SI (1986): The purification and characterization of glutaryl-coenzyme A dehydrogenase from porcine and human liver. *J Biol Chem*; **261** (9), 4090-6.
- Liesert M, Zschocke J, Hoffmann GF, Muhlhauser N and Buckel W (1999): Biochemistry of glutaric aciduria type I: activities of in vitro expressed wild-type and mutant cDNA encoding human glutaryl-CoA dehydrogenase. *J Inherit Metab Dis;* **22** (3), 256-8.
- Lindner M, Kölker S, Schulze A, Christensen E, Greenberg CR and Hoffmann GF (2004): Neonatal screening for glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis;* **27** (6), 851-9.

- Livak KJ and Schmittgen TD (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods;* **25** (4), 402-8.
- Magistretti PJ, Pellerin L, Rothman DL and Shulman RG (1999): Energy on demand. *Science*; **283** (5401), 496-7.
- Markovich D and Murer H (2004): The SLC13 gene family of sodium sulphate/carboxylate cotransporters. *Pflugers Arch;* **447** (5), 594-602.
- Masters CL, Cappai R, Barnham KJ and Villemagne VL (2006): Molecular mechanisms for Alzheimer's disease: implications for neuroimaging and therapeutics. *J Neurochem;* **97** (6), 1700-25.
- Meyburg J, Schulze A, Kohlmüller D, Linderkamp O and Mayatepek E (2001): Postnatal changes in neonatal acylcarnitine profile. *Pediatr Res;* **49** (1), 125-9.
- Mihara K and Omura T (1996): Cytoplasmic chaperones in precursor targeting to mitochondria: the role of MSF and hsp 70. *Trends Cell Biol;* **6** (3), 104-8.
- Morita N, Kusuhara H, Sekine T, Endou H and Sugiyama Y (2001): Functional characterization of rat organic anion transporter 2 in LLC-PK1 cells. *J Pharmacol Exp Ther;* **298** (3), 1179-84.
- Morton DH, Bennett MJ, Seargeant LE, Nichter CA and Kelley RI (1991): Glutaric aciduria type I: a common cause of episodic encephalopathy and spastic paralysis in the Amish of Lancaster County, Pennsylvania. *Am J Med Genet;* **41** (1), 89-95.
- Mühlhausen C, Christensen E, Schwartz M, Muschol N, Ullrich K and Lukacs Z (2003): Severe phenotype despite high residual glutaryl-CoA dehydrogenase activity: a novel mutation in a Turkish patient with glutaric aciduria type I. *J Inherit Metab Dis;* **26** (7), 713-4.
- Mühlhausen C, Ott N, Chalajour F, Tilki D, Freudenberg F, Shahhossini M, Thiem J, Ullrich K, Braulke T and Ergün S (2006): Endothelial effects of 3-hydroxyglutaric acid: implications for glutaric aciduria type I. *Pediatr Res;* **59** (2), 196-202.
- Mühlhausen C, Burckhardt BC, Hagos Y, Burckhardt G, Keyser B, Lukacs Z, Ullrich K and Braulke T (2008): Membrane translocation of glutaric acid and its derivatives. *J Inherit Metab Dis;* DOI: 10.2007/s10545-008-0825x.
- Norenberg MD and Martinez-Hernandez A (1979): Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res;* **161** (2), 303-10.
- Olney JW (1993): Role of excitotoxins in developmental neuropathology. *APMIS Suppl;* **40** 103-12.
- Osaka H, Kimura S, Nezu A, Yamazaki S, Saitoh K and Yamaguchi S (1993): Chronic subdural hematoma, as an initial manifestation of glutaric aciduria type-1. *Brain Dev;* **15** (2), 125-7.
- Pajor AM (1995): Sequence and functional characterization of a renal sodium/dicarboxylate cotransporter. *J Biol Chem;* **270** (11), 5779-85.
- Pajor AM (1996): Molecular cloning and functional expression of a sodiumdicarboxylate cotransporter from human kidney. *Am J Physiol;* **270** (4 Pt 2), F642-8.
- Pajor AM, Gangula R and Yao X (2001): Cloning and functional characterization of a high-affinity Na(+)/dicarboxylate cotransporter from mouse brain. *Am J Physiol Cell Physiol;* **280** (5), C1215-23.
- Pavlova A, Sakurai H, Leclercq B, Beier DR, Yu AS and Nigam SK (2000): Developmentally regulated expression of organic ion transporters NKT (OAT1), OCT1, NLT (OAT2), and Roct. *Am J Physiol Renal Physiol*; **278** (4), F635-43.
- Peirson SN, Butler JN and Foster RG (2003): Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Res;* **31** (14), e73.
- Pekny M and Nilsson M (2005): Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia;* **50** (4), 427-34.
- Pellerin L and Magistretti PJ (2003): How to balance the brain energy budget while spending glucose differently. *J Physiol*; **546** (Pt 2), 325.
- Pessin JE, Thurmond DC, Elmendorf JS, Coker KJ and Okada S (1999): Molecular basis of insulin-stimulated GLUT4 vesicle trafficking. Location! Location! Location! *J Biol Chem*; **274** (5), 2593-6.
- Pohl S, Mitchison HM, Kohlschütter A, van Diggelen O, Braulke T and Storch S (2007): Increased expression of lysosomal acid phosphatase in CLN3-defective cells and mouse brain tissue. *J Neurochem;* **103** (6), 2177-88.
- Quinlan RA, Brenner M, Goldman JE and Messing A (2007): GFAP and its role in Alexander disease. *Exp Cell Res;* **313** (10), 2077-87.
- Race JE, Grassl SM, Williams WJ and Holtzman EJ (1999): Molecular cloning and characterization of two novel human renal organic anion transporters (hOAT1 and hOAT3). *Biochem Biophys Res Commun;* **255** (2), 508-14.
- Rao KS, Fu Z, Albro M, Narayanan B, Baddam S, Lee HJ, Kim JJ and Frerman FE (2007): The effect of a Glu370Asp mutation in glutaryl-CoA dehydrogenase on proton transfer to the dienolate intermediate. *Biochemistry*; **46** (50), 14468-77.
- Rea S and James DE (1997): Moving GLUT4: the biogenesis and trafficking of GLUT4 storage vesicles. *Diabetes;* **46** (11), 1667-77.
- Rubin LL and Staddon JM (1999): The cell biology of the blood-brain barrier. Annu Rev Neurosci; **22** 11-28.
- Santamaria M, Lanave C, Vicario S and Saccone C (2007): Variability of the mitochondrial genome in mammals at the inter-species/intra-species boundary. *Biol Chem;* **388** (9), 943-6.
- Schagger H and von Jagow G (1987): Tricine-sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem;* **166** (2), 368-79.
- Schousboe A, Svenneby G and Hertz L (1977): Uptake and metabolism of glutamate in astrocytes cultured from dissociated mouse brain hemispheres. *J Neurochem*; **29** (6), 999-1005.
- Schousboe A, Westergaard N, Waagepetersen HS, Larsson OM, Bakken IJ and Sonnewald U (1997): Trafficking between glia and neurons of TCA cycle intermediates and related metabolites. *Glia;* **21** (1), 99-105.
- Schwarcz R, Whetsell WO, Jr. and Mangano RM (1983): Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science*; **219** (4582), 316-8.
- Schwartz M, Christensen E, Superti-Furga A and Brandt NJ (1998): The human glutaryl-CoA dehydrogenase gene: report of intronic sequences and of

13 novel mutations causing glutaric aciduria type I. *Hum Genet;* **102** (4), 452-8.

- Sekine T, Watanabe N, Hosoyamada M, Kanai Y and Endou H (1997): Expression cloning and characterization of a novel multispecific organic anion transporter. *J Biol Chem*; **272** (30), 18526-9.
- Shank RP and Aprison MH (1981a): Present status and significance of the glutamine cycle in neural tissues. *Life Sci;* **28** (8), 837-42.
- Shank RP and Campbell GL (1981b): Avid Na+-dependent, high-affinity uptake of alpha-ketoglutarate by nerve terminal enriched material from mouse cerebellum. *Life Sci;* **28** (8), 843-50.
- Shank RP and Campbell GL (1984): Alpha-ketoglutarate and malate uptake and metabolism by synaptosomes: further evidence for an astrocyte-to-neuron metabolic shuttle. *J Neurochem;* **42** (4), 1153-61.
- Shank RP, Bennett GS, Freytag SO and Campbell GL (1985): Pyruvate carboxylase: an astrocyte-specific enzyme implicated in the replenishment of amino acid neurotransmitter pools. *Brain Res;* **329** (1-2), 364-7.
- Shank RP and Aprison MH (1988): Glutamate as a neurotransmitter. In: *Glutamate and Glutamine in Mammals*, Kvamme E. CRC Press, Boca Raton, 3-20.
- Shank RP and Bennett DJ (1993): 2-Oxoglutarate transport: a potential mechanism for regulating glutamate and tricarboxylic acid cycle intermediates in neurons. *Neurochem Res;* **18** (4), 401-10.
- Soffer D, Amir N, Elpeleg ON, Gomori JM, Shalev RS and Gottschalk-Sabag S (1992): Striatal degeneration and spongy myelinopathy in glutaric acidemia. *J Neurol Sci*; **107** (2), 199-204.
- Stellmer F, Keyser B, Burckhardt BC, Koepsell H, Streichert T, Glatzel M, Jabs S, Thiem J, Herdering W, Koeller DM, Goodman SI, Lukacs Z, Ullrich K, Burckhardt G, Braulke T and Mühlhausen C (2007a): 3-Hydroxyglutaric acid is transported via the sodium-dependent dicarboxylate transporter NaDC3. J Mol Med; 85 (7), 763-70.
- Stellmer F (2007b): Identifizierung von 3-Hydroxyglutarsäure-Transportern und Analyse pathologischer Nierenveränderungen am Mausmodell der Glutarazidurie Typ 1. *Faculty of Medicine*, University of Hamburg.
- Strauss KA, Puffenberger EG, Robinson DL and Morton DH (2003a): Type I glutaric aciduria, part 1: natural history of 77 patients. *Am J Med Genet C Semin Med Genet;* **121** (1), 38-52.
- Strauss KA and Morton DH (2003b): Type I glutaric aciduria, part 2: a model of acute striatal necrosis. *Am J Med Genet C Semin Med Genet;* **121** (1), 53-70.
- Sun W, Wu RR, van Poelje PD and Erion MD (2001): Isolation of a family of organic anion transporters from human liver and kidney. *Biochem Biophys Res Commun;* **283** (2), 417-22.
- Sweet DH, Wolff NA and Pritchard JB (1997): Expression cloning and characterization of ROAT1. The basolateral organic anion transporter in rat kidney. *J Biol Chem*; **272** (48), 30088-95.
- Tanaka K, Matsubara Y, Indo Y, Naito E, Kraus J and Ozasa H (1990): The acyl-CoA dehydrogenase family: homology and divergence of primary sequence of four acyl-CoA dehydrogenases, and consideration of their functional significance. *Prog Clin Biol Res;* **321** 577-98.

- Tang NL, Hui J, Law LK, Lam YY, Chan KY, Yeung WL, Chan AY, Cheung KL and Fok TF (2000): Recurrent and novel mutations of GCDH gene in Chinese glutaric acidemia type I families. *Hum Mutat;* **16** (5), 446.
- Thulasiraman V, Yang CF and Frydman J (1999): In vivo newly translated polypeptides are sequestered in a protected folding environment. *EMBO J*; **18** (1), 85-95.
- Traboulsee A (2007): MRI relapses have significant pathologic and clinical implications in multiple sclerosis. *J Neurol Sci;* **256 Suppl 1** S19-22.
- Tsacopoulos M and Magistretti PJ (1996): Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci;* **16** (3), 877-85.
- Ullrich K, Flott-Rahmel B, Schluff P, Musshoff U, Das A, Lucke T, Steinfeld R, Christensen E, Jakobs C, Ludolph A, Neu A and Roper R (1999): Glutaric aciduria type I: pathomechanisms of neurodegeneration. *J Inherit Metab Dis;* **22** (4), 392-403.
- Varadkar S and Surtees R (2004): Glutaric aciduria type I and kynurenine pathway metabolites: a modified hypothesis. *J Inherit Metab Dis;* **27** (6), 835-42.
- Wada M, Shimada A and Fujita T (2006): Functional characterization of Na+ coupled citrate transporter NaC2/NaCT expressed in primary cultures of neurons from mouse cerebral cortex. *Brain Res;* **1081** (1), 92-100.
- Wang H, Fei YJ, Kekuda R, Yang-Feng TL, Devoe LD, Leibach FH, Prasad PD and Ganapathy V (2000): Structure, function, and genomic organization of human Na(+)-dependent high-affinity dicarboxylate transporter. Am J Physiol Cell Physiol; 278 (5), C1019-30.
- Westergaard N, Sonnewald U and Schousboe A (1994a): Release of alphaketoglutarate, malate and succinate from cultured astrocytes: possible role in amino acid neurotransmitter homeostasis. *Neurosci Lett;* **176** (1), 105-9.
- Westergaard N, Sonnewald U, Unsgard G, Peng L, Hertz L and Schousboe A (1994b): Uptake, release, and metabolism of citrate in neurons and astrocytes in primary cultures. *J Neurochem;* **62** (5), 1727-33.
- Westover JB, Goodman SI and Frerman FE (2003): Pathogenic mutations in the carboxyl-terminal domain of glutaryl-CoA dehydrogenase: effects on catalytic activity and the stability of the tetramer. *Mol Genet Metab;* **79** (4), 245-56.
- Woelfle J, Kreft B, Emons D and Haverkamp F (1996): Subdural hemorrhage as an initial sign of glutaric aciduria type 1: a diagnostic pitfall. *Pediatr Radiol;* **26** (11), 779-81.
- Yodoya E, Wada M, Shimada A, Katsukawa H, Okada N, Yamamoto A, Ganapathy V and Fujita T (2006): Functional and molecular identification of sodium-coupled dicarboxylate transporters in rat primary cultured cerebrocortical astrocytes and neurons. *J Neurochem*; **97** (1), 162-73.
- Yu AC, Drejer J, Hertz L and Schousboe A (1983): Pyruvate carboxylase activity in primary cultures of astrocytes and neurons. *J Neurochem;* **41** (5), 1484-7.
- Zhou F and You G (2007): Molecular insights into the structure-function relationship of organic anion transporters OATs. *Pharm Res;* **24** (1), 28-36.

- Zinnanti WJ, Lazovic J, Wolpert EB, Antonetti DA, Smith MB, Connor JR, Woontner M, Goodman SI and Cheng KC (2006): A diet-induced mouse model for glutaric aciduria type I. *Brain;* **129** (Pt 4), 899-910.
- Zschocke J, Quak E, Guldberg P and Hoffmann GF (2000): Mutation analysis in glutaric aciduria type I. *J Med Genet;* **37** (3), 177-81.

7 Abkürzungsverzeichnis

2-D-OHGA	2-D-Hydroxyglutarsäure	
2-L-OHGA	2-L-Hydroxyglutarsäure	
30HGA	3-Hydroxyglutarsäure	
APS	Ammoniumpersulfat	
AraC Hydrochlorid	Cytarabin	
ATP	Adenosintriphosphat	
ВНК	Zelllinie aus Hamster-Nieren (Baby hamster kidney)	
BHS	Blut-Hirn-Schranke	
bp	Basenpaare	
BS ³	Bis(sulfosuccinimidyl)suberat	
BSA	Bovine serum albumine	
cDNA	complementary DNA	
CoA	Coenzym A	
cpm	counts per minute	
СуЗ	Carbocyanin	
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol	
DEPC	Diethylpyrocarbonat	
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium	
DMS	Dimethyl-Suberimidat	
DMSO	Dimethylsulfoxid	
DNA	Desoxyribonucleinacid	
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat	
DTT	1,4-Dithiothreitol	
E.coli	Escherichia coli	
ECL	enhanced chemoluminescence	
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid	
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid	
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat	
FKS	Fötales Kälberserum	
GA	Glutarsäure	
GA1	Glutarazidurie Typ 1	

GA2	Glutarazidurie Typ 2	
GA3	Glutarazidurie Typ 3	
GABA	γ-Aminobuttersäure	
GCDH	Glutaryl-Coenzym A Dehydrogenase	
GFAP	Glial fibrillary acidic protein	
GLUT	Glukosetransporter	
HBSS	Hank's gepufferte Salzlösung	
HDMEC	humane mikrovaskuläre Endothelzellen der Haut (human dermal microvascular endothelial cell)	
HE	Hämatoxylin-Eosin	
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N´-2- ethansulfonsäure	
HLD	Hochlysindiät	
HPD	Hochproteindiät	
HRP	Horseradish peroxydase	
IE	Internationale Einheit	
IFA	indirekte Immunfluoreszenz-Analyse	
lg	Immunglobulin	
IMM	Immunomix	
IPP	Immunpräzipitation	
kb	Kilo Basen	
kDa	Kilo Dalton	
LDL	low density lipoprotein	
MnSOD	Mangansuperoxiddismutase	
MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure	
MPP	Mitochondriale Prozessierungspeptidase	
mRNA	messenger RNA	
NaC	Natrium-abhängiger Dicarboxylat-Transporter	
NMDA	N-Metyl-D-Aspartat	
OAT	Organische Anionen Transporter	
OCT	Organische Kationen Transporter	
OD	Optische Dichte	
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	
PBS	Phosphate-buffered saline	
PCR	Polymerase chain reaction	

PPO	2,5-Diphenyloxazol
RNA	Ribonucleinacid
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium Dodecylsulphate
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	N,N,N',N',-Tetra-methyl-ethylendiamin
Tfb	Transfection buffer
TIM	translocase of the inner mitochondrial membrane
ТОМ	translocase of the outer mitochondrial membrane
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
UV	ultraviolett
WB	Western-Blot
ZO	Zonula Occludens
MEM	minimum essential medium
α	anti

Aminosäuren

In der Arbeit wurden folgende Abkürzungen für Aminosäuren verwendet:

Alanin	Ala
Arginin	Arg
Asparagin	Asn
Asparaginsäure	Asp
Glutamin	Gln
Glutaminsäure	Glu
Glycin	Gly
Isoleucin	lle
Leucin	Leu
Lysin	Lys
Lysin Methionin	Lys Met
Lysin Methionin Phenylalanin	Lys Met Phe
Lysin Methionin Phenylalanin Prolin	Lys Met Phe Pro
Lysin Methionin Phenylalanin Prolin Serin	Lys Met Phe Pro Ser
Lysin Methionin Phenylalanin Prolin Serin Threonin	Lys Met Phe Pro Ser Thr
Lysin Methionin Phenylalanin Prolin Serin Threonin Tryptophan	Lys Met Phe Pro Ser Thr Trp
Lysin Methionin Phenylalanin Prolin Serin Threonin Tryptophan Tyrosin	Lys Met Phe Pro Ser Thr Trp Tyr

8 Anhang

Primer und Sonden

Für die Real-time PCR wurden vorgefertigte *Taq*Man[®]-Primer und -Sonden von der Firma Applied Biosystems verwendet. Die Oligonukleotidsequenzen sind nicht erhältlich.

Gen	Protein	TaqMan [®] -Gene Expression Assay
Gapdh	Gapdh	Mm99999915_g1
Slc13a3	NaC3	Mm00475280_m1
Slc22a6	Oat1	Mm00456258_m1
Slc22a7	Oat2	Mm00460672_m1

Zur Genotypisierung von *Gcdh*-defizienten Mäusen mittels PCR wurden die folgenden Primer von der Firma MWG Biotech synthetisiert:

Primer	Sequenz
GA1-wt-for	5'- CTT CCG TAA CTA CTG GCA GGA GCG G -3'
GA1-wt-rev	5'- AGC TCT CGG GTC AGA AGC CCA TAG G -3'
GA1-ko-wt	5'- TTA GGC CTA GTG TGC TGG TCC CGG A -3'
GA1-ko-rev	5'- TCT GGT GCC GGA AAC CAG GCA AAG C -3'

Zur Klonierung der Wildtyp-GCDH und der *GCDH*-Mutanten und zur Sequenzierung wurden folgende Primer von der Firma MWG Biotech synthetisiert:

Primer	Sequenz
GCDH-for	5'- CAC CAT GGC CCT GAG AGG CGT CTC C -3'
GCDH-myc-rev	5'- TCA CAG ATC CTC TTC TGA GAT GAG TTT TTG TTC CTT GCT GGC CGT GAA -3'
GCDH-mature-for	5'- CAC CAT GCG TCC CGA GTT TGA CTG -3'
GCDH-Seq	5'- AAA GGA TAT GGC TGT GCT GGG GTT T -3'
Arg138Gly-for	5'- GGT GGA CAG TGG CTA CGG GTC GGC GAT GAG TGT CC -3'
Arg138Gly-rev	5'- GGA CAC TCA TCG CCG ACC CGT AGC CAC TGT CCA CC -3'
Met263Val-for	5'- GGG CCT CAG CCA CAG GCG TGA TCA TCA TGG ACG G -3'
Met263Val-rev	5'- CCG TCC ATG ATG ATC ACG CCT GTG GCT GAG GCC C -3'
Arg402Trp-for	5'- CGA GTA TCA CGT GAT CTG GCA CGC CAT GAA CCT GGA GG -3'
Arg402Trp-rev	5'- CCT CCA GGT TCA TGG CGT GCC AGA TCA CGT GAT ACT CG -3'
Glu414Lys-for	5'- GGC CGT GAA CAC CTA CAA AGG TAC ACA TGA CAT TCA CGC CC -3'
Glu414Lys-rev	5'- GGG CGT GAA TGT CAT GTG TAC CTT TGT AGG TGT TCA CGG CC -3'

9 Publikationen und Tagungsbeiträge

Publikationen

Stellmer F, **Keyser B**, Burckhardt BC, Koepsell H, Streichert T, Glatzel M, Jabs S, Thiem J, Herdering W, Koeller DM, Goodman SI, Lukacs Z, Ullrich K, Burckhardt G, Braulke T and Mühlhausen C (2007a): 3-Hydroxyglutaric acid is transported via the sodium-dependent dicarboxylate transporter NaDC3. *J Mol Med*; **85** (7), 763-70.

Keyser B, Glatzel M, Stellmer F, Kortmann B, Lukacs Z, Kölker S, Sauer SW, Muschol N, Herdering W, Thiem J, Goodman SI, Koeller DM, Ullrich K, Braulke T and Mühlhausen C (2008): Transport and distribution of 3-hydroxyglutaric acid before and during induced encephalopathic crises in a mouse model of glutaric aciduria type 1. *Biochim Biophys Acta;* DOI: 10.1016/j.bbadis.2008.02.008.

Mühlhausen C, Burckhardt BC, Hagos Y, Burckhardt G, **Keyser B**, Lukacs Z, Ullrich K and Braulke T (2008): Membrane translocation of glutaric acid and its derivatives. *J Inherit Metab Dis;* DOI: 10.2007/s10545-008-0825-x.

Tagungsbeiträge

Keyser B, Stellmer F, Ullrich K, Braulke T, Mühlhausen C (2006): Effects of 3hydroxyglutaric acid on brain microvascular permeability in a GA1 mouse model (Poster). 29. Jahrestagung der DGZ in Braunschweig (*Eur J Cell Biol;* **85** Suppl.1, 66).

Keyser B, Stellmer F, Kortmann B, Ullrich K, Braulke T, Mühlhausen C (2007): 3-Hydroxyglutaric acid impairs the supply of succinate from astrocytes to neurons (Poster). The 43rd Annual Symposium of SSIEM in Hamburg (*J Inherit Metab Dis;* **30** Suppl.1, 37).

Mühlhausen C, Stellmer F, **Keyser B**, Burckhardt BC, Burckhardt G, Koepsell H, Koeller DM, Goodman SI, Ullrich K, Braulke T (2007): 3-Hydroxyglutaric acid is transported via the sodium-dependent Dicarboxylate transporter NaC3 (Poster). The 43rd Annual Symposium of SSIEM in Hamburg (*J Inherit Metab Dis;* **30** Suppl.1, 39).

Keyser B (2007): Intracerebral transport of 3-hydroxyglutaric acid (Vortrag). Internationaler GA1-Workshop in Hamburg.

Danksagung

Ein besonderer Dank geht an Thomas Braulke und Chris Mühlhausen für die hervorragende Betreuung und Unterstützung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Wiese danke ich für die Begutachtung der Arbeit.

Ich danke Herrn Prof. Thiem und Herrn Dr. Herdering für die Synthese und Bereitstellung der 3OHGA bzw. der radioaktiv-markierten 3OHGA, Herrn Prof. Glatzel für die histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen, Herrn Prof. Christensen für die Aktivitätsmessungen der GCDH, sowie Herrn Dr. Dickmanns und Herrn Dr. Schmidt für die 3D-Strukturanalyse der GCDH.

Ich möchte mich beim Graduiertenkolleg 336 und ganz speziell bei Herrn Prof. Seitz für die Finanzierung dieser Arbeit bedanken.

Ein großer Dank geht auch an die Tierpfleger, speziell Anita, Rebekka und Gudrun, für die Betreuung der Mäuse und für die nette, problemlose und unkomplizierte Zusammenarbeit.

Bei Franziska Stellmer, Bastian Kortmann und Brit Hofmann möchte ich mich für den Austausch über mehr oder weniger schöne Ergebnisse, für den abwechselnden Wochenenddienst und für die Assistenz und Anwesenheit bei unschönen Aufgaben bedanken.

Ich danke außerdem Alvero, Angela, Anne-Hélène, Annika, Arne, Bettsi, Giovanna, Guille, Inke, Katrin, Monica, Sandra, Stephan und Stephanie für die Aufheiterung und Ratschläge nach Freitag-Blots und die gute Zusammenarbeit.

Ein großer Dank geht auch an Jörg Zimmermann, der Tag und Nacht geduldig meine Fragen beantwortet hat. Außerdem möchte ich Christina Ehlers, Susann Schirmer und Marcel Krepstakies für Rat und Tat danken.

Zum Schluss möchte ich mich bei meinen Eltern und Geschwistern für die große Unterstützung und für einfach Alles bedanken!