Biochemische Analyse und Proteinwechselwirkungen der humanen Glutaryl-CoA-Dehydrogenase

Dissertation zur Erlangung des Grades Doktor der Naturwissenschaften des Fachbereiches Biologie, an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg

> vorgelegt von Dipl.-Biologin

Jessica Lamp

aus Lohne

Hamburg 2011

Genehmigt vom Fachbereich Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg auf Antrag von Priv. Doz. Dr. C. MÜHLHAUSEN Weiterer Gutachter der Dissertation: Priv. Doz. Dr. R. LORBIECKE Tag der Disputation: 19. August 2011

Hamburg, den 04. August 2011

A, Leun, U

Professor Dr. Axel Temming Leiter des Fachbereichs Biologie

1.Gutachter: PD Dr. med. Chris Mühlhausen2.Gutachter: PD Dr. rer. nat. René Lorbiecke

Für meine Familie

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis		IV
1.	Einleitung	1
1.1	Glutarazidurie Typ 1	1
1.2	Glutaryl-Coenzym-A-Dehydrogenase	
1.2.1	Metabolismus der Aminosäuren Lysin, Hydroxylysin und Tryptophan	5
1.2.2	Mutationen der humanen Glutaryl-Coenzym-A-Dehydrogenase	6
1.3	Mausmodell der GA1	
1.4	Pathophysiologische Mechanismen der GA1	9
1.4.1	Exzitotoxizität	9
1.4.2	Reduzierter Energiemetabolismus	11
2.	Zielsetzung	13
3.	Material und Methoden	15
3.1	Material	
3.1.1	Chemikalien	15
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	17
3.1.3	Arbeitsgeräte	
3.1.4	Kits und Assays	19
3.1.5	Enzyme	20
3.1.6	Plasmide und Vektoren	20
3.1.7	Bakterienstämme	20
3.1.8	Maus- und Zelllinien	21
3.1.9	Medien und Zusätze	21
3.1.9.1	Medien zur Anzucht von Bakterien	
3.1.9.2	Medien und Zusätze für die Zellkultur	
3.1.10	Antikörper	22
3.1.10.1	Primäre Antikörper	
3.1.10.2	Sekundäre und fluoreszenzmarkierte Antikörper	
3.1.11	Software	22
3.2	Molekularbiologische Methoden	
3.2.1	Isolierung von genomischer DNA	23
3.2.2	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	23
3.2.3	Ligation von DNA-Fragmenten	24
3.2.3.1	Präparation chemisch-kompetenter E. coli Zellen	
3.2.4	Transformation von Bakterien	24

3.2.5	Isolierung von Plasmid-DNA	25
3.2.6	DNA-Sequenzierung	25
3.2.7	Agarose-Gelelektrophorese	25
3.2.8	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	26
3.2.9	DNA-Amplifizierung mittels Polymerase-Ketten-Reaktion	26
3.2.10	Quick Change Mutagenese	26
3.2.11	RNA-Isolierung	26
3.2.12	Quantitative Real-time PCR	27
3.3	Zellbiologische Methoden	28
3.3.1	Kultivierung von Zelllinien	28
3.3.2	Trypsinieren von Zelllinien	28
3.3.3	Gefrierkonservierung und Revitalisierung von Zellen	28
3.3.4	Transfektion von Zellen	29
3.3.5	Isolierung und Kultivierung primärer Zellen	30
3.3.5.1	Isolierung primärer Astrozyten	30
3.3.5.2	Isolierung primärer neuronaler Zellen	31
3.3.6	Indirekte Immunfluoreszens-Analyse (IFA)	32
3.3.7	[¹⁴ C]-Succinat Aufnahme in primäre Zellen	33
3.3.8	[¹⁴ C]-Succinat Efflux aus primären Zellen	33
3.3.9	BS ³ -Quervernetzung	34
3.4	Biochemische Methoden	34
3.4.1	Proteinkonzentrationsbestimmung	34
3.4.2	Herstellung von Zell-Homogenaten	34
3.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	35
3.4.4	Tris/Tricin-Gele	36
3.4.5	Western Blot Analyse	36
3.4.6	Färbung von Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie-Lösung	38
3.4.7	Affinitätschromatographische Aufreinigung von Fusionsproteinen	38
3.4.7.1	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen aus E. coli	38
3.4.7.2	Aufreinigung von His-Fusionsproteinen aus E. coli	39
3.4.7.3	Protein-Liganden-Affinitätschromatographie mittels Affi-Gel 10	40
3.4.8	Dialyse von Proteinlösungen	40
3.4.9	Mitochondrien-Isolierung aus Schweineleber	41
3.4.10	Fraktionierung mitochondrialer Matrix-Proteine	42
3.4.11	"Pull-Down"-Experimente	43
3.4.12	Koimmunpräzipitation	43
3.4.13	"Protein-Fragment-Complementation-Assay" (PCA)	44
3.4.14	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie	44

4.	Ergebnisse		
4.1	Einfluss von GA und 3OHGA auf den Transport von Intermediaten des		
	Tricarbonsäurezyklus (TCA)	47	
4.1.1	Kultivierung von primären Astrozyten und Neuronen	47	
4.1.2	Einfluss von GA und 3OHGA auf die [¹⁴ C]-Succinat Aufnahme in Astrozyten und 1	Neurone48	
4.1.3	Einfluss von GA und 3OHGA auf den [¹⁴ C]-Succinat-Efflux aus Astrozyten und Ne	euronen50	
4.1.4	Expression von GA- und 3OHGA-Transportern in Astrozyten und Neuronen	52	
4.2	Analyse ausgewählter GCDH-Mutationen	55	
4.2.1	3D-Strukturanalyse	56	
4.2.2	Expressionsanalyse und Protein-Aktivitätsmessung	58	
4.2.3	Untersuchung zur homo- und heteromeren Protein-Komplexbildung	60	
4.3	Identifizierung von GCDH-Interaktionspartnern	62	
4.3.1	Das Elektron-Transfer Flavoprotein (ETF)	62	
4.3.1.1	"Pull-Down" mit GCDH und ETF	62	
4.3.1.2	"Protein-Fragment Complementation Assay" mit GCDH und ETF	64	
4.3.1.3	Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie der GCDH-ETF-Interaktion	67	
4.3.2	Wirkung von GCDH-Oberflächenmutationen auf die Interaktion mit ETF	70	
4.3.2.1	"Pull-Down" von GCDH-Mutanten und ETF	70	
4.3.2.2	Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie der Wechselwirkung von GCDH-Mutanten mit		
	ETF		
4.3.3	Identifizierung weiterer GCDH-Bindungspartner	75	
4.3.4	Protein-Komplexbildung von GCDH mit DLST	77	
4.3.4.1	"Protein-Fragment-Complementation-Assay" mit GCDH und DLST	79	
4.3.4.2	Koimmunpräzipitation von GCDH und DLST	80	
5.	Diskussion	82	
5.1	Untersuchungen zum Finfluss von GA und 30HGA auf den Transport von TG	`A₋7vkhs-	
3.1	Intermediaton	A-Lykius-	
5 2	Analyse von CCDH Oberflöchenmutationen		
5.2	Identifiziorung von CCDH Intereltionsportnorm		
5.5	identifizierung von GCDH-interaktionspartnern		
6.	Zusammenfassung	101	
7.	Literatur	103	
8.	Anhang	111	
Publik	ation und Tagungsbeiträge		
Danks	agung		

Abkürzungsverzeichnis

3-NPA	"3-nitropropionic acid"
30HGA	3-Hydroxyglutarsäure
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BHK	"Baby hamster kidney"
bp	Basenpaare
BS ³	Bis(sulfosuccinimidyl)suberat
BSA	"Bovine serum albumine"
cDNA	"complementary DNA"
CoA	Coenzym A
cpm	"Counts per minute"
СТ	"Cycle of threshold"
DAPI	4´,6-Diamidino-2-phenylindol
DLST	Dihydrolipoamid-Succinyltransferase
DMEM	"Dulbecco´s Modified Eagle Medium"
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	"Desoxyribonucleic acid"
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
ECL	"Enhanced chemoluminescence"
EDTA	"Ethylen diamine tetraacetic acid"
ETF	Elektronen-Transfer Flavoprotein
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FKS	Fötales Kälberserum
GA	Glutarsäure
GA1	Glutarazidurie Typ 1
GABA	"Gamma-aminobutyric acid"
GCDH	Glutaryl-Coenzym-A-Dehydrogenase
GFAP	"Glial fibrillary acidic protein"
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HBSS	Hank's gepufferte Salzlösung

HeLa	humane Zelllinie eines Zervixkarzinoms (von Patientin Henrietta Lacks)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N´-2-ethansulfonsäure
HLD	Hochlysindiät
HPD	Hochproteindiät
HPLC	"High performance liquid chromatography"
HRP	"Horseradish peroxydase"
IFA	Indirekte Immunfluoreszenzanalyse
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
ka	Assoziationskonstante
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
k _d	Dissoziationskonstante
K _D	Dissoziationsgleichgewichtskonstante
LC3	"Microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta"
MCAD	Multiple-Acyl-CoA-Dehydrogenase-Defizienz
MCFD2	"Multiple coagulation factor deficiency protein 2"
MEM	"Minimum essential medium"
MnSOD	Mangansuperoxiddismutase
MPP	Mitochondriale Prozessierungspeptidase
mRNA	"Messenger RNA"
MS	Massenspektroskopie
NaC	Na ⁺ -abhängiger Dicarboxylat-Transporter
NeuN	"Neuronal nuclear protein"
Ni-NTA	"Nickel-Nitrilotriacetic acid"
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
OAT	Organischer Anion Transporter
OGDC	"Oxoglutarate dehydrogenase complex"
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAM	"Presequence Translocase-Associated Motor"
PBS	"Phosphate-buffered saline"
PCA	"Protein-Fragment Complementation Assay"
PCR	"Polymerase chain reaction"
PFA	Paraformaldehyd
RNA	"Ribonuclein acid"
ROS	"Reactive oxygen species"
rpm	"Rounds per minute"
RT	Raumtemperatur
SD	"Standard deviation"
SDS	"Sodium Dodecylsulphate"

SPR	"Surface Plasmon Resonance"
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	"Tricarbon acid"
TIM	"Translocase of the inner mitochondrial membrane"
TOM	"Translocase of the outer mitochondrial membrane"
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
YFP	"Yellow Fluorescent Protein"

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	Ile
Leucin	Leu
Lysin	Lys
Methionin	Met
Phenylalanin	Phe
Prolin	Pro
Serin	Ser
Threonin	Thr
Tryptophan	Trp
Tyrosin	Tyr
Valin	Val

Die in dieser Arbeit angegebene Nummerierung der Aminosäuren der GCDH, ETF und MCAD beziehen sich immer auf das Vorläuferprotein und nicht auf die reife Form.

1. Einleitung

1.1 Glutarazidurie Typ 1

Die Glutarazidurie Typ 1 (GA1, OMIM 231670) ist eine angeborene neurometabolische Erkrankung, die erstmals 1975 von Goodman beschrieben wurde (Goodman et al. 1975). Die Krankheit wird durch den Defekt des mitochondrialen Matrixproteins Glutaryl-Coenzym-A-Dehydrogenase (GCDH, EC 1.3.99.7) hervorgerufen. GCDH stellt ein Schlüsselenzym im finalen Abbauweg der Aminosäuren Lysin, Hydroxylysin und Tryptophan dar und führt bei Aktivitätsverlust zur Anhäufung der pathologischen Stoffwechselprodukte Glutarylcarnitin, Glutarsäure (GA) und 3-Hydroxyglutarsäure (30HGA) in Körperflüssigkeiten und Geweben betroffener Patienten. 30HGA gilt dabei als der für GA1 spezifische Metabolit, da es andere Stoffwechselerkrankungen, wie z.B. die Multiple-Acyl-CoA-Dehydrogenase-Defizienz (MCAD) gibt, die mit einer erhöhten Glutarsäure-Ausscheidung einhergehen können (Gordon 2006). Die Inzidenz der Krankheit liegt bei 1:100.000 Neugeborenen, tritt aber in genetisch isolierten Populationen, wie z.B. der "Old Order Amish Community" (Pennsylvania, USA) mit einer Inzidenz von 1:400 deutlich häufiger auf (Goodman 2001; Lindner et al. 2004).

Neugeborene mit GA1 sind mit Ausnahme einer möglichen Makrocephalie klinisch zunächst unauffällig. Bleibt die Krankheit unerkannt und unbehandelt, kommt es bei 75-90 % der Patienten im Rahmen kataboler Situationen wie z.B. fieberhaften Infekten, Diarrhoe oder Impfungen zu einer sogenannten encephalopatischen Krise (Baric et al. 2003; Kölker et al. 2006). Diese encephalopatischen Krisen treten fast ausschließlich in einem Altersfenster von Geburt bis zum 36. Lebensmonat auf und führen, neben der weiteren Akkumulation von GA und 3OHGA in Körperflüssigkeiten der Patienten, zu einem irreversiblen Untergang von neuronalen Zellen des Corpus Striatum innerhalb weniger Stunden (Strauss et al. 2003b; Kölker et al. 2006). Das Corpus Striatum ist das Eingangskerngebiet der Basalganglien und unterteilt sich in Putamen und Nukleus caudatus. Es stellt die zentrale Schaltstelle des extrapyramidal-motorischen Systems dar und leitet eingehende kortikale, motorische Impulse nach Verarbeitung an den Thalamus weiter. In Folge der Destruktion dieses Gehirnteils kommt es bei Patienten zu einer dyston-dyskinetischen Bewegungsstörung mit variabler klinischer Ausprägung. In bildmorphologischen Untersuchungen konnte der Beginn der Destruktion beim Putamen und medial fortschreitend mit dem Nukleus caudatus beobachtet werden (Strauss et al. 2003b; Harting et al. 2009). Bei der bedingten Dystonie kommt es durch den Verlust der koordinierten reziproken Hemmung von agonistisch und antagonistisch wirkenden Muskelgruppen zu unwillkürlichen Muskelkontraktionen (Abb. 1.1) bis hin zum völligen Verlust der Willkürmotorik (Goodman 2001; Strauss et al. 2003a).



Abb. 1.1: Patienten mit Glutarazidurie Typ 1 nach einer encephalopatischen Krise Betroffene Kinder zeigen nach der akuten encephalopatischen Krise eine dyston-dyskinetsiche Bewegungsstörung in Form von Verkrampfungen der Körpergliedmaßen. In Bild A deutlich am Durchstrecken des Beines und der Verkrampfung der Hände und in Bild B durch das Abspreizen des kleinen Zehs und der verkrampften Handhaltung zu sehen.

Im Gegensatz zu den ausgeprägten körperlichen Veränderungen bleiben die intellektuellen Fähigkeiten der Kinder weitgehend erhalten. Nach Abschluss des 36. Lebensmonats treten encephalopatische Krisen nur noch sehr selten auf (Kölker et al. 2006). GA1-Patienten die keine encephalopatische Krise ausbilden, zeigen dennoch neuroradiologische Veränderungen, die dabei aber nicht mit offensichtlichen Symptomen einhergehen. Über 90 % zeigen Erweiterungen der äußeren Liquorräume im Bereich der Sylvischen Fissur (Furche des Gehirns, die den Scheitel- vom Schläfenlappen trennt) und rostral der Frontallappen; wenige zeigen zudem chronische Subduralergüsse. Eine weitere extrastriatale Veränderung zeigt sich bei 50 % der betroffenen Patienten in Form einer verzögerten Myelinisierung der weißen Substanz (Hoffmann et al. 1996; Strauss et al. 2003a; Twomey et al. 2003; Harting et al. 2009).

Da die dystone Bewegungsstörung bei GA1-Patienten nur schwer behandelbar und nicht therapierbar ist, ist eine frühzeitige Erkennung und Behandlung der Krankheit vor Eintreten einer encephalopathischen Krise von großer Bedeutung. Seit 2006 wird in Deutschland flächendeckend das "erweiterte Neugeborenen-Screening" (NBS) eingesetzt. Die über Tandem-Massenspektroskopie (MS/MS) detektierbare Erhöhung von Glutarylcarnitin im Urin weist auf das Vorliegen einer GA1 hin. Zur Konfirmationsdiagnostik werden im Anschluss die spezifischen Metabolite GA und Urin über Gaschromatographie anschließender **3OHGA** im mit massenspektrometrischer Analyse (GC/MS) nachgewiesen und quantifiziert (Kölker et al. 2007). Bei erhöhten Konzentrationen der Metabolite folgt die Sequenzierung des kodierenden GCDH-Gens und die Bestimmung der GCDH-Enzymaktivität in Fibroblasten (Kölker et al. 2011). Die prophylaktische Behandlung von GA1-Patienten basiert derzeit auf einer eiweißarmen Diät bei gleichzeitiger Gabe spezieller Lysin- und Tryptophan-armer Aminosäure-Mischungen. Das Prinzip der Diät besteht in der reduzierenden Bildung der schädigenden Metabolite im Körper und damit auch einer verringerten Konzentration dieser Metabolite im Gehirn (Kölker et al. 2011). Zusätzlich zur Diät erhalten Patienten Carnitin, um einen Mangel durch Verlust von Carnitin, das durch Konjugation mit GA und 30HGA als Glutaryl-Carnitin und 3-Hydroxy-Glutarylcarnitin über den Urin ausgeschieden wird, auszugleichen und parallel den Körper von den akkumulierenden Metaboliten GA und 3OHGA zu entgiften (Mühlhausen et al. 2004; Kölker et al. 2011). Trotz prophylaktischer Maßnahmen und eines intensivierten Notfallmanagements in katabolen Situationen gelingt es nur bei 80-90 % der Patienten, den Ausbruch einer encephalopatischen Krise zu verhindern. Neue effektive Ansätze für alternative Therapien der Erkrankung müssen daher entwickelt werden.

1.2 Glutaryl-Coenzym-A-Dehydrogenase

Das Protein kodierende humane *GCDH*-Gen ist auf Chromosom 19p13.2 lokalisiert, enthält 11 Exone und umfasst 7 Kilobasen (Greenberg et al. 1994). Das *GCDH*-Genprodukt wird als 48 kDa Vorläuferprotein bestehend aus 438 Aminosäuren im Zytoplasma synthetisiert.



Abb. 1.2: Import von mitochondrialen Vorläuferproteinen

Der Import von mitochondrialen Vorläuferproteinen in die mitochondriale Matrix findet über Erkennung und Weiterleitung der N-terminalen Signalsequenz über den TOM-Komplex, TIM23-Komplex und den Motorkomplex PAM statt. Dabei wird das zuvor entfaltete Vorläuferprotein zunächst von Tom20 und Tom22 gebunden und an das integrale Membranprotein Tom40, das den eigentlichen Kanal zur Translokation über die äußere Mitochondrienmembran bildet, weitergeleitet. Nach Eintritt in den Intermembranraum wird das Vorläufer-Protein an Proteine des TIM23-Komplexes gekoppelt und über die innere Membran weitergeleitet. Tim50 fungiert dabei als Rezeptor. Tim23 bildet den Kanal für die Translokation in die mitochondriale Matrix und ist für die Bildung des benötigten Membranpotentials ($\Delta\Psi$) zudem transient an Komplexe der Atmungskette gebunden. Tim17 stellt die Verknüpfung zum Motorkomplex PAM her, der für die Bereitstellung der benötigten Energie in Form von ATP verantwortlich ist. Nach erfolgter Translokation von GCDH in die mitochondriale Matrix wird die Signalsequenz durch die mitochondriale Prozessierungspeptidase (MPP) abgespalten und die reife GCDH-Form ausgebildet.

Die N-terminalen 44 Aminosäuren dienen als Signalsequenz für die Translokation des Proteins ins Mitochondrium (Abb. 1.2). Die Signalsequenz bildet dabei eine positiv geladene, amphipathische α -Helix mit hydrophober Oberfläche, die von Proteinen des TOM-Komplexes ("<u>T</u>ranslocase of the <u>Outer Membrane"</u>), TIM23-Komplexes ("<u>T</u>ranslocase of the <u>Inner Membrane"</u>) und des Motorkomplexes PAM ("<u>P</u>resequence Translocase-<u>A</u>ssociated <u>M</u>otor") erkannt, gebunden und über die mitochondrialen

Membranen in die Matrix transloziert werden kann (Abb. 1.2) (Chacinska et al. 2009). Nach erfolgter Translokation der Vorläufer-GCDH wird die Signalsequenz durch die <u>mitochondriale Prozessierungspeptidase</u>, MPP, abgespalten und die reife GCDH-Form ausgebildet. Das funktionale reife 44 kDa GCDH-Protein liegt als Homotetramer mit je einem Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) pro Monomer vor (Fu et al. 2004). Neben der homotetrameren Struktur konnte in Quervernetzungsexperimenten gezeigt werden, dass das GCDH-Protein zudem heteromere Komplexe mit bislang unidentifizierten Proteinen eingehen kann (Keyser et al. 2008b). Die biologische Signifikanz möglicher Interaktionspartner auf die Struktur, Funktion und Regulation des GCDH-Proteins ist jedoch unklar.

1.2.1 Metabolismus der Aminosäuren Lysin, Hydroxylysin und Tryptophan

GCDH stellt eines von vielen Schlüsselenzymen am Abbauweg der Aminosäuren Lysin, Hydroxylysin, und Tryptophan dar. Lysin und Tryptophan sind essentielle, proteinogene Aminosäuren, die im Mitochondrium zu Acetyl-CoA abgebaut werden, das anschließend in den Tricarbonsäurezyklus (TCA-Zyklus) einfließen kann (Abb. 1.3). Der Stoffwechsel der Aminosäuren dient dabei der Energiegewinnung und Bereitstellung von Zwischenprodukten für die Biosynthese von Proteinen, Nukleinsäuren und anderen Stoffklassen. Die über die Nahrung aufgenommenen Aminosäuren Lysin und Tryptophan werden hierfür zunächst über Transportsysteme (Y+-System für die Translokation von Lysin und L-Transportsysteme für Tryptophan) in die Zellen aufgenommen und anschließend über voneinander unabhängige Stoffwechselwege zu α-Ketoadipinsäure degradiert (Strauss et al. 2003b). Die α-Ketoadipinsäure wird ins Mitochondrium transportiert und vom a-Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex (OGDC) unter Verwendung von freiem Coenzym A (CoA) zu Glutaryl-CoA umgesetzt. Die anschließende oxidative Decarboxylierung von Glutaryl-CoA zu Crotonyl-CoA, das über weitere Enzyme zu Acteyl-CoA abgebaut werden kann, wird von GCDH katalysiert. Das an GCDH gebundene FAD fungiert dabei als Elektronenakzeptor und leitet diese an das Elektronen-Transfer-Flavoprotein (ETF) und die dazugehörige Dehydrogenase (ETF-DH) weiter. Der Elektronentransport setzt sich von hier über das Ubichinon des Komplexes II der Atmungskette zur oxidativen Phosphorylierung von Adenosindiphosphat (ADP) zu Adenosintriphosphat (ATP) fort. Durch Mutationen hervorgerufene Aktivitätsverluste der GCDH führen zur Beeinträchtigung des Aminosäure-Stoffwechsels und somit zur Akkumulation von Glutaryl-CoA. Glutaryl-CoA wird über noch nicht geklärte Stoffwechselwege zu den toxischen Metaboliten GA, 3OHGA und Glutarylcarnitin umgebaut (Liesert et al. 1999).



Abb. 1.3: Schematische Übersicht des Abbaus von Lysin, Hydroxylysin und Tryptophan Der Abbau der essentiellen Aminosäuren Lysin, Hydroxylysin und Tryptophan zur Energiegewinnung und Bereitstellung von Zwischenprodukten für die Biosynthese setzt sich aus einer Stoffwechselkette zusammen, an der mehrere Enzyme beteiligt sind. α-KA: α-Ketoadipinsäure; OGDC: α-Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex; GCDH: Glutaryl-Coenzym-A-Dehydrogenase; ETF: Elektronen-Transfer-Flavoprotein; ETF-DH: Elektronen-Transfer-Flavoprotein-Dehydrogenase; CI-CIV: Komplexe der Atmungskette; GA: Glutarsäure; GC: Glutarylcarnitin; 3OHGA: 3-Hydroxyglutarsäure.

1.2.2 Mutationen der humanen Glutaryl-Coenzym-A-Dehydrogenase

Bislang sind bei GA1-Patienten mehr als 150 pathogene Mutationen des *GCDH*-Gens beschrieben worden, die gleichmäßig auf dem Gen verteilt vorkommen (Christensen et al. 2004). Bei den meisten Mutationen handelt es sich um "Missense"-Mutationen, die durch Austausch von Aminosäuren zu einer konformativen Änderung des GCDH-Proteins führen können. Neben "Missense"-Mutationen kommen auch IntronMutationen vor, die ein fehlerhaftes Spleißen der prä-mRNA bewirken (Greenberg et al. 1995). Die meisten der bislang identifizierten Mutationen führen zum kompletten Verlust der enzymatischen GCDH-Aktivität (Christensen et al. 2004).

Um molekulare Konsequenzen von Mutationen besser einschätzen zu können, kann es hilfreich sein, Veränderungen der Proteine auf struktureller Ebene zu untersuchen. Fu und Kollegen konnten 2004 das GCDH-Protein kristallisieren und somit die 3D-Struktur ermitteln (Fu et al. 2004). Die monomere GCDH-Struktur besteht aus drei Domänen: 1.) eine aus 6 α -Helices bestehende aminoterminalen Domäne (Arg45 bis Glu172), 2.) eine mittlere β -Faltblattdomäne (Leu173 bis Pro278) und 3.) eine aus 4 α -Helices bestehende carboxyterminalen Domäne (Gly279 bis Lys438) (Busquets et al. 2000; Fu et al. 2004). Die Lokalisation des FAD-Moleküls konnte zwischen der β -Faltblattdomäne und der carboxyterminalen Domäne vorhergesagt werden.

Für Aminosäuren der carboxyterminalen Domäne wird postuliert, dass sie an der Oligomerisierung des GCDH-Proteins, sowie an der Bildung des aktiven Zentrums des Proteins beteiligt sind (Busquets et al. 2000; Westover et al. 2003; Fu et al. 2004). Mutationen in diesem Bereich gehen daher meistens mit einem kompletten Verlust der enzymatischen GCDH-Aktivität einher (Westover et al. 2003). Ein Verlust der Enzymaktivität korreliert dabei mit einer hohen Ausscheidung der Metabolite GA und 30HGA im Urin (> 100 mmol GA/mol Kreatinin). Die am häufigsten auftretende Mutation in Europa, p.Arg402Trp, kann zu diesen Mutationen gezählt werden (Christensen et al. 2004). Patienten mit hoher Metabolit-Ausscheidung werden als sogenannte "high excretors" bezeichnet. Die zweite Gruppe wird von den "low excretors" gebildet, die weniger bis gar kein GA und 3OHGA in den Urin ausscheiden (< 100 mmol GA/mol Kreatinin) und durch eine hohe enzymatische Restaktivität gekennzeichnet sind (Pineda et al. 1998; Busquets et al. 2000; Mühlhausen et al. 2003). Nur wenige pathogene Mutationen mit einer Restaktivität von über 5-10 % sind bislang bekannt. Der erste Patient mit hoher enzymatischer Restaktivität (20-30 %) war "compound" heterozygot für die Mutationen p.Arg227Pro und p.Val400Met (Pineda et al. 1998; Christensen et al. 2004). Die einzige bekannte homozygote Mutation, p.Met263Val, mit einer in Patientenfibroblasten gemessenen Restaktivität von 30 %, ist in der β-Faltblattdomäne des GCDH-Proteins lokalisiert. Der Aminosäurerest Met263 liegt an der Oberfläche des Proteins und sein Austausch zu Val führt neben der hohen

GCDH-Restaktivität zu einem veränderten Oligomerisierungsverhalten mit heteromeren Proteinen (Keyser et al. 2008b). Es wird postuliert, dass die Aminosäure Met263 an der Interaktion mit GCDH-Bindungspartnern beteiligt ist. Die Mutation p.Met263Val wurde bei einem Mädchen mit konsanguinen Eltern türkischer Abstammung identifiziert und führt, trotz der hohen GCDH-Restaktivität in Fibroblasten, zu einem schweren klinischen Verlauf der GA1 (Mühlhausen et al. 2003). Während GCDH-Enzymaktivität und biochemischer Phänotyp (Ausscheidung von GA und 3OHGA) in Zusammenhang stehen, konnte bislang noch keine Korrelation zwischen dem Genotyp und dem klinischen Phänotyp der Krankheit hergestellt werden (Christensen et al. 2004). Ein weiteres Beispiel für die fehlende Korrelation zwischen Genotyp und klinischem Phänotyp wird an Patienten in Bevölkerungsgruppen deutlich, bei denen eine bestimmte Mutation mit hoher Häufigkeit auftritt, wie z.B. die Mutation p.Ala421Val in der "Old Order Amish Community" in Pennsylvania, USA. Obwohl die Patienten die gleiche Mutation aufweisen, ist der klinische Verlauf der Krankheit sehr variabel und äußert sich sowohl durch milde als auch schwere neurologischen Defizite (Morton et al. 1991; Biery et al. 1996; Goodman et al. 1998). Die fehlende Korrelation zwischen GCDH-Genotyp und Phänotyp lässt vermuten, dass bisher unbekannte, regulatorische Faktoren ("modifier genes") bzw. weitere Mutationen in anderen Genen zusätzliche Einflüsse auf den Phänotyp haben.

1.3 Mausmodell der GA1

Zum besseren Verständnis von Pathomechanismen, die der GA1 zu Grunde liegen, sowie für die Entwicklung rationaler Therapien, ist ein Tiermodell der GA1 notwendig. Das murine *Gcdh*-Gen ist auf Chromosom 8 lokalisiert und das kodierende Protein ist zu 87 % mit der Aminosäuresequenz des humanen Proteins identisch (Koeller et al. 1995). Im Jahre 2002 wurde von der Arbeitsgruppe von Steven Goodman eine Gcdhdefiziente Maus (Gcdh^{-/-}-Maus) generiert und beschrieben (Koeller et al. 2002). Über homologe Rekombination wurde durch Einfügen eines β -Galaktosidase-Reportergens in das murine *Gcdh*-Gen das Leseraster unterbrochen und die ersten 7 Exone des murinen *Gcdh*-Gens deletiert. Die Deletion hat den kompletten Verlust der Gcdh-Aktivität zur Folge. Biochemisch zeigen Gcdh^{-/-}-Mäuse, ähnlich den GA1-Patienten, hohe Konzentrationen von GA und 30HGA im Urin, sowie im Gehirngewebe (Koeller et al. 2002). Pathologisch sind bei Gcdh^{-/-}-Mäusen eine erhöhte Zahl an Vakuolen in kortikalen Neuronen, eine diffuse spongiforme Myelinopathie im Kortex und Striatum, sowie nebenbefundlich signifikant vergrößerte Nieren zu beobachten (Koeller et al. 2002; Stellmer et al. 2007). Verhaltensbiologisch waren bis auf diskrete motorische Defizite bei Gcdh^{-/-}-Mäusen im Rotarod-Test keine Unterschiede im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen festzustellen. Zudem bilden Gcdh^{-/-}Mäuse weder unter basalen Bedingungen noch durch induzierte Stressfaktoren (Injektion von Interferon, Hungerzustand) eine encephalopathische Krise aus. Erst 2006 konnten Zinannti und Kollegen durch Applikation einer Hochproteindiät (HPD) bzw. Hochlysindiät (HLD) eine metabolische Krise bei den Gcdh^{-/-}Mäusen induzieren (Zinnanti et al. 2006). Die induzierte Krise war bei 28 und 56 Tage alten Mäusen mit einer hohen Sterberate innerhalb von 7-8 Tagen nach Applikation der HPD verbunden. HPD-behandelte Gcdh^{-/-}-Mäuse zeigen eine stärkere Vakuolisierung von Kortex und Striatum als unter basalen Bedingungen, sowie neuronale Degeneration und Gliose. Gcdh^{-/-}-Mäuse stellen deshalb ein gutes Modell zur Untersuchung von GA1-Pathomechanismen dar.

1.4 Pathophysiologische Mechanismen der GA1

Die pathophysiologischen Mechanismen, die der GA1 zugrunde liegen und zur Neurodegeneration führen, sind bislang noch nicht geklärt. Es wird jedoch postuliert, dass die akkumulierenden Dicarboxylate GA und 3OHGA zytotoxische Wirkung haben und maßgeblich an den neurodegenerativen Veränderungen der Krankheit beteiligt sind.

1.4.1 Exzitotoxizität

Aufgrund von Untersuchungen an hippocampalen und striatalen Schnittkulturen der Ratte (Ullrich et al. 1999; Latini et al. 2005), sowie an neuronalen Zellen aus Hühnerembryonen (Kölker et al. 2001) wurde lange Zeit ein 3OHGA-induzierter, NMDA-(N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptor-abhängiger neurotoxischer Mechanismus im Sinne einer Exzitotoxizität postuliert. Unter Exzitotoxizität versteht man die Schädigung der neuronalen Zellen durch übermäßige Aktivierung von glutamatergen Rezeptoren, zu denen auch der ionotrope NMDA-Rezeptor zählt (Olney et al. 1969; Olney 1990; Lynch et al. 2002). Der NMDA-Rezeptor wird ligandenabhängig über den Agonisten Glutamat und spannungsabhängig über eine Blockade mit Mg²⁺-Ionen im Rezeptorkanal reguliert. Durch erhöhte Glutamatkonzentrationen im synaptischen Spalt

oder durch zellulären Energiemangel, der als sekundäre Folge eine Depolarisation der Zelle bewirkt und die Blockade der Mg²⁺-Ionen lösen kann, können NMDA-Rezeptoren dauerhaft aktiviert werden. Dabei kommt es zu einem überhöhten Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle und in Folge zum Anschwellen der Zelle, sowie zur postsynaptischen Vakuolisierung, die auch in Neuronen von GA1-Patienten beschrieben wurden (Goodman et al. 1977). Ein weiterer Effekt erhöhter Ca²⁺-Konzentrationen ist die Inhibierung der ATP-Synthase, die Aktivierung der NO-Synthase und eine erhöhte Bildung von ROS (reaktive Sauerstoffspezies), die letztendlich zur Apoptose der Zellen führen können (Lipton et al. 1993; Olney 1993). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von GA und 30HGA mit Glutamat wurde postuliert, dass erhöhte Konzentrationen der Metabolite im Gehirn zur dauerhaften Erregung der NMDA-Rezeptoren beitragen. Patch-Clamp-Untersuchungen an HEK293-Zellen zeigten eine schwache, direkte Bindung von 30HGA an NMDA-Rezeptoren (Kölker et al. 2002a). Dagegen schlossen Studien an Froschoocyten eine Aktivierung von NMDA-Rezeptoren über eine direkte Bindung von GA und 30HGA aus (Ullrich et al. 1999; Lund et al. 2004). Es wurde eine indirekte Aktivierung der NMDA-Rezeptoren durch zellulären Energiemangel postuliert. Reduzierte Konzentrationen der wichtigen energiereichen Substrate Kreatinphosphat und ATP in Schnittkulturen des Rattenhirns, nach Inkubation mit 30HGA unterstützen dabei diese These (Ullrich et al. 1999).

Die beschriebenen *in vitro* Experimente wurden jedoch alle an Zellen mit intakter GCDH und unter Zugabe von hohen GA- und 3OHGA-Konzentrationen (bis zu 10 mM) durchgeführt, sodass die physiologische Relevanz der Experimente fraglich ist, da die gemessene Konzentration der Metabolite im Gehirn von Gcdh^{-/-}-Mäusen lediglich ca. 0,5 mM GA und 0,038 mM 3OHGA entspricht (Koeller et al. 2002). Darüber hinaus führte die Behandlung mit 3OHGA oder GA nur in 40 % der kultivierten Zellen zur Apoptose, was in anderen Studien nicht reproduziert werden konnte (Freudenberg et al. 2004; Lund et al. 2004). Die neuronale Degeneration im Striatum bei GA1-Patienten lässt sich somit durch Exzitotoxizität alleine nicht erklären.

Zudem muss es auch weitere NMDA-unabhängige pathophysiologische Mechanismen geben, da 3OHGA *in vitro* ebenfalls die Integrität von Endothelzellen beeinträchtigt und zu einer erniedrigten Expression von VE-Cadherin, einem Bestandteil der "Adherens

Junctions", führen kann (Mühlhausen et al. 2006). Die assoziierte Erweiterung der Blutgefäße kann Einblutungen bedingen, die die subduralen Hämatome, die bei einigen Patienten beobachtet werden, erklären könnte (Mühlhausen et al. 2006). Diese *in vitro* Effekte von 3OHGA beeinflussen jedoch nicht die Impermeabilität der Blut-Hirnschranke (BHS) *in vivo*, wie durch Injektion von [³H]-markierter 3OHGA in Gcdh^{-/-}-Mäusen während der induzierten encephalopatischen Krise gezeigt werden konnte. Die neurotoxischen Wirkungen werden daher von endogen im Hirn synthetisierten GA und 3OHGA vermittelt (Mühlhausen et al. 2006; Sauer et al. 2006; Keyser et al. 2008a).

1.4.2 Reduzierter Energiemetabolismus

Als weiterer möglicher Pathomechanismus, der der neuronalen Degeneration bei GA1 zugrunde liegen könnte, wird ein zellulärer Mangel an energiereichen Verbindungen postuliert. Die Hypothese beruht hauptsächlich auf Befunden reduzierter Konzentrationen von Kreatinphosphat und ATP in kultivierten Hirnschnitten, die mit 30HGA inkubiert wurden, sowie auf einer signifikanten Reduktion des ATP-Spiegels im Cortex von Gcdh^{-/-}-Mäusen während Diät-induzierter metabolischer Krisen (Ullrich et al. 1999; Zinnanti et al. 2006; Zinnanti et al. 2007).

Zellulärer Energiemangel könnte in Folge mitochondrialer Dysfunktion auf Störungen in der Atmungskette, der β -Oxidation von Fettsäuren oder auf Störungen des Tricarbonsäure-(TCA)-Zyklus zurückgeführt werden. Enzymatische Aktivitätsuntersuchungen an Gewebehomogenaten von Wildtyp- und Gcdh^{-/-}-Mäusen zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede in den Komplexen I-V der Atmungskette und ebenfalls keine Unterschiede in der β -Oxidation von Fettsäuren (Sauer et al. 2005). Es konnte jedoch eine Inhibierung des α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes (OGDC), sowie eine leichte Inhibierung des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes (PDHc) und der Citratsynthase, die alle Komponenten des TCA-Zyklus darstellen, durch Glutaryl-CoA nachgewiesen werden (Sauer et al. 2005).

Neuronale Zellen benötigen neben der eigentlichen ATP-Synthese, TCA-Zyklus-Intermediate, insbesondere α -Ketoglutarat, für die Synthese der Neurotransmitter Glutamat und GABA (γ -Aminobuttersäure). Entnahme und Nachschub von Intermediaten des TCA-Zyklus unterliegen dabei einem dynamischen Gleichgewicht, sodass abgezogene Substrate, wie α -Ketoglutarat, wieder nachsynthetisiert oder substituiert werden müssen (Anaplerose). Dies geschieht in den meisten Zelltypen über die Pyruvatcarboxylase, die Pyruvat zu Oxalacetat umsetzt, das in den TCA-Zyklus zurückfließt. Neurone weisen jedoch im Vergleich zu Astrozyten nur eine geringe Pyruvatcarboxylase-Aktivität auf (Hassel et al. 2000). Zur Aufrechterhaltung des Energiemetabolismus und der Synthese von Neurotransmittern sind neuronale Zellen daher auf eine konstante Versorgung von TCA-Zyklus-Intermediaten durch Astrozyten (anaplerotischer Transfer) angewiesen (Hertz et al. 2007; Jitrapakdee et al. 2008). Über die Transporter, die am anaplerotischen Transfer der Dicarbonsäuren beteiligt sind, ist bislang nur wenig bekannt. Für die Aufnahme von TCA-Zyklus-Intermediaten in Neurone und Astrozyten wird die Beteiligung der Na⁺-abhängigen Dicarboxylat-Transporter NaC2 und NaC3 postuliert (Pajor et al. 2001; Yodoya et al. 2006). Messungen der Glutamat-, GABA- und Glutamin-Konzentrationen in Hirngewebe von Gcdh^{-/-}-Mäusen während induzierter metabolischer Krisen zeigten, dass die Konzentrationen von Glutamat und GABA gegenüber der Wildtyp-Maus um die Hälfte reduziert vorlagen. Glutamin, das vornehmlich von Gliazellen gebildet wird, war um 24 % reduziert (Zinnanti et al. 2007). Die Daten deuten auf eine Störung des Energiemetabolismus, insbesondere der neuronalen Zellen in Gcdh^{-/-}-Mäusen hin. Der NaC3-Transporter kann ebenfalls die Dicarboxylate GA und 3OHGA in Tubuluszellen der Niere mit hoher Affinität transportieren. Es wurde daher postuliert, dass hohe GAund 3OHGA-Konzentrationen im Gehirn, während metabolischer Krisen über kompetitive Inhibition die Versorgung neuronaler Zellen mit TCA-Zyklus-Intermediaten stören können (Mühlhausen et al. 2008).

2. Zielsetzung

Die Glutarazidurie Typ1 (GA1) ist eine angeborene, neurodegenerative Stoffwechselkrankheit, die durch Mutationen im mitochondrialen Matrixprotein Glutaryl-Coenzym-A-Dehydrogenase (GCDH) hervorgerufen wird. GCDH ist am Katabolismus der Aminosäuren Lysin, Hydroxylysin und Tryptophan beteiligt. Durch Mutationen hervorgerufene Enzymdefekte der GCDH bewirken eine Anhäufung der Metabolite Glutarsäure (GA) und 3-Hydroxyglutarsäure (3OHGA) in Körperflüssigkeiten und Geweben der GA1-Patienten. Im Rahmen kataboler Situationen können betroffene Patienten encephalopatische Krisen ausbilden, in deren Folge es zu einem irreversiblen Untergang von Neuronen im Striatum kommt. Die Pathomechanismen, die der spezifischen neuronalen Degeneration zu Grunde liegen, sind noch unklar. Es wird postuliert, dass GA und 30HGA zur Störung des Energiehaushaltes neuronaler Zellen beitragen. GA und 30HGA werden über Na⁺abhängige Dicarboxylat- (NaC) oder organische Anion-Transporter (OAT) transportiert. Für NaC-Transporter ist ebenfalls bekannt, dass sie am anaplerotischen Transfer von Intermediaten des Tricarbonsäurezyklus (TCA) zwischen Astrozyten und Neuronen beteiligt sind.

Anhand kultivierter Astrozyten und Neurone aus Wildtyp- und GCDH-defizienten Mäusen sollte im ersten Teil der Arbeit geklärt werden, ob die Metabolite GA und 3OHGA mit dem Transporter-abhängigen anaplerotischen Transfer von TCA-Zyklus-Intermediaten interferieren und somit zu einer Störung des TCA-Zyklus und in Folge zu einem Energiemangel in neuronalen Zellen beitragen.

Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit der Analyse ausgewählter Mutationen, die an der Oberfläche des GCDH-Proteins lokalisiert sind. Bislang sind mehr als 150 verschiedene pathogene Mutationen bekannt, wobei bislang keine Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp der Krankheit hergestellt werden konnte. Ein Beispiel hierfür ist die an der Oberfläche lokalisierte Mutation p.Met263Val, die eine hohe enzymatische Restaktivität von 30 % aufweist aber einen schweren Krankheitsverlauf bei einem betroffenen Patienten auslöste. In Voruntersuchungen zeigte die Mutation im Vergleich zum Wildtyp-Protein reduzierte heteromere Komplexbildungen mit unbekannten

Proteinen. Die Analyse weiterer Oberflächenmutationen in räumlicher Nähe von Met263 in Bezug auf Synthese, Enzymaktivität, strukturelle Proteinveränderungen und Interaktion mit anderen Proteinen soll zur Klärung der Regulation der GCDH-Aktivität beitragen. Insbesondere soll die Wechselwirkung von Wildtyp- und mutanter GCDH mit den Untereinheiten αETF und βETF des Elektronen-Transfer-Flavoproteins durch verschiedene *in vitro* und *in vivo* Verfahren untersucht werden.

Desweiteren sollen mit Hilfe einer GCDH-Affinitätschromatographie mit anschließender massenspektrometrischer Analyse neue Interaktionspartner der GCDH identifiziert und analysiert werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

¹⁴C]-Succinat

3.1.1 Chemikalien

3-Hydroxyglutarsäure (30HGA) 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS) Affi-Gel 10 Acrylamid Agar Agarose Ammoniumperoxodisulfat (APS) Ampicillin Beta-Mercaptoethanol Bromphenolblau BS^3 BSA (bovine serum albumin) Calciumchlorid (CaCl₂) Carbenicillin Chloramphenicol Chloroform Coomassie blue Diethylpyrokarbonat (DEPC) Digitonin Dimethylsulfoxid (DMSO) Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄) Diphenyloxazol (PPO) Dithiotreitol (DTT) DNA-Standard, 1 kb-Ladder DNA-Standard, 100 bp-Ladder dNTP-Set (ultrapure) Essigsäure Ethanol

Movarek Biochemicals, Brea California, USA Synthetisiert von Prof. J. Thiem, Institut für org. Chemie, Hamburg Roth, Karlsruhe Roth, Karlsruhe Bio-Rad, München Roth, Karlsruhe Roth, Karlsruhe Invitrogen, Karlsruhe Roth, Karlsruhe Serva, Heidelberg Sigma-Aldrich, München Bio-Rad, München Pierce, Bonn Serva, Heidelberg Merck, Darmstadt Roth, Karlsruhe Roth, Karlsruhe Sigma-Aldrich, München Serva, Heidelberg Sigma-Aldrich, München Sigma-Aldrich, München Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Roth, Karlsruhe Sigma-Aldrich, München Invitrogen, Karlsruhe Invitrogen, Karlsruhe Amersham, Freiburg Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt

Ethidiumbromid Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Formaldehyd Glukose Glutarsäure (GA) Glutathion-Agarose Glycerin Glycin Hefeextrakt Imidazol Isopropanol Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) Kalium-Acetat Kaliumchlorid (KCl) Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄) Kanamycin Lubrol Luminol Magnesiumchlorid (MgCl₂) Magnesiumsulfat (MgSO₄) Mannitol Methanol Milchpulver Mowiol N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES) Natrium-Acetat Natriumchlorid (NaCl) Natriumdihydrogenphosphat (NaH₂PO₄) Natriumdodecylsulfat (SDS) Natriumhydrogencarbonat(NaHCO₃) Natriumhydroxid (NaOH) Ni-NTA-Agarose Nonidet 40 Paraformaldehyd (PFA) p-Cumarinsäure p-Formaldehyd Poly-L-Lysin

Sigma-Aldrich, München Roth, Karlsruhe Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich, München Sigma-Aldrich, München Sigma-Aldrich, München Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich, München Roth. Karlsruhe Merck, Darmstadt Roth. Karlsruhe Roth, Karlsruhe Sigma-Aldrich, München J.T. Baker, Griesheim Merck. Darmstadt Roth. Karlsruhe MP Biomedicals, Solon, USA Roth, Karlsruhe Sigma-Aldrich, München Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich, München Merck, Darmstadt Roth, Karlsruhe Hoechst, Frankfurt a.M. Roth. Karlsruhe Roth, Karlsruhe Merck, Darmstadt Roth, Karlsruhe Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich, München Merck. Darmstadt Roth, Karlsruhe Invitrogen, Karlsruhe Roche, Mannheim Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich, München Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich, München

Protein G Sepharose RainbowTM-coloured Protein-Standard Rinderserumalbumin (BSA) Saccharose Salzsäure (HCl) Saponin Succinat Tissue-Solubilizer (SolvableTM) Tricin TriReagent® Tris Triton X-100 Tween-20 Wasserstoffperoxid (H₂O₂)

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Cellophanfolie Dialyseschlauch (Visking 8/32) Deckgläser Einmalküvetten Einwegmaterial für Zellkultur Einweg-Schaber Filmkassetten Filterschwämme Gel-Glasplatten Gewebekulturflaschen, -schalen Immersionsöl 518 C Kanülen Kryoröhrchen Linsenpapier MN 10 B Mobitec-Säulen (2,5 ml, 5 ml) Objektträger ProtranTM Nitrocellulosemembran Pipettenspitzen Reaktionsgefäße Röntgenfilme Sensor Chip CM5 Skalpelle Spritzen

GE Healthcare, München Amersham, Freiburg Serva, Heidelberg J.T. Baker, Griesheim Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich, München Sigma-Aldrich, München Sigma-Aldrich, München Sigma-Aldrich, München Sigma-Aldrich, München Sigma-Aldrich, München Merck, Darmstadt

Pütz Folien. TaunussteinD Roth, Karlsruhe Glaswarenfabrik Karl Heckt KG Plastibrand, Wertheim BD Falcon, Heidelberg Sarstedt, Nümbrecht Rego, Augsburg Amersham Amersham Sarstedt, Nümbrecht Zeiss, Oberkochen Becton Dickinson GmbH, Heidelberg Nunc, Wiesbaden Zeiss, Oberkochen Mobitec, Göttingen Engelbrecht, Kassel Whatman GmbH. Dassel Sarstedt, Nümbrecht Sarstedt, Nümbrecht Kodak, Stuttgart GE Healthcare, München Braun, Melsungen Braun, Melsungen

Sterilfilter	VWR, Darmstadt
Stripes/Deckel für Real-Time PCR	Applied Biosystems, Darmstadt
Szintillationsröhrchen	Perkin-Elmer, Waltham ,USA
Teflonkämme	Hoefer, Holliston, USA
UV-Küvetten	Eppendorf, Hamburg
Whatman-Papier	Whatman GmbH, Dassel

3.1.3 Arbeitsgeräte

Gerät	Тур	Firma
Absaugpumpe	Miniport	SMT
Autoklav	3850 EL	Systec, Wettenberg
BIAcore	3000	GE Healthcare, München
Blockthermostat	Rotilabo H250	Roth, Karlsruhe
	TM130-6	HLC, Bovenden
β–Szintillations-Counter	β–Counter LS3801	Beckman Counter, Krefeld
Chemi Doc XRS	Imager	Bio-Rad, München
Douncer	5 ml Volumen	Wheaton, USA
Drehrad	Rotator	Neolab, Heidelberg
Eismaschine	AF 10	Scotsman, Herborn
Elektrophoresekammer	Agagel Midi Wide	Biometra, Göttingen
	SE600	Hoefer, Holliston, USA
Entwicklermaschine	Curix 60	Agfa, Leverkusen
Geltrockner	GelAir Dryer	Bio-Rad, München
Horizontalschüttler	Rocky	Fröbel Labortechnik,
Inkubationsschrank	CO ² -Inkubator	Sanyo, Bad Nenndorf
	Gasboy C20A	Labotect, Wiesbaden
	Innova CO-170	New Brunswick Scientific,
Inkubationsschüttler	Innova 4230	New Brunswick Scientific,
Kryo-Einfriergerät	Nalgene [™] Cryo 1°C	Nalgene, Roskilde, Dänemark
Magnetrührer	MSH-basic	IKA-Werke, Staufen
Mikroskope	Leica DM IRE2	Leica, Wetzlar
	Axiovert 25	Zeiss, Göttingen
Mikrowelle	Promicro	Whirlpool, Stuttgart
pH-Meter	MP220	Mettler Toledo, Giessen
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten		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 TM	Stratagene, USA
	Mastercycler, Gradient	Eppendorf, Hamburg
Transferkammer	TE62 & TE22	Hoefer, Holliston, USA
Ultraschallgerät	Sonopuls HD60	Bandelin Electronic
		GmbH & Co KG, Berlin
Ultra Turrax	Dremel®	BioSpec Products, USA
UV-Transilluminator	Darkroom Evo III	Raytest, Straubenhardt
Vortex	Genie 2	Scientific Industries,
Waagen	AC100	Mettler Toledo, Giessen
	BP2100 S	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	C 10	Schütt Labortechnik,
Zentrifugen	Centrifuge 5418	Eppendorf, Hamburg
	Speed Vac®	Savant
	Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
	Centrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg
	Minifuge RF	Heraeus, Hanau
	MC6 Centrifuge	Sarstedt, Nümbrecht
	Sorvall Discovery M120	Kendro Laboratory Products,

3.1.4 Kits und Assays

Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München
Gene Jet TM RNA Purification Kit	Thermo Scientific, St Leon-Rot
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystem, Darmstadt
pcDNA TM Gateway [®] Directional TOPO	Invitrogen, Karslruhe
Expression Kit	
QIAquick® gel Extraction Kit (50)	QIAGEN, Hilden
QIAplasmid® Midi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAplasmid® Mini Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick® PCR Purification Kit (50)	QIAGEN, Hilden
RNeasy® Mini Kit (250)	QIAGEN, Hilden
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Amsterdam Niederlande
TaqMan [®] Gene Expression Assay	Applied Biosystem, Darmstadt

3.1.5 Enzyme

DNase I	Sigma-Aldrich, München
Papain	Sigma-Aldrich, München
Pfu-Turbo TM -Polymerase	Stratagene, USA
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich, München
Proteinase K	Merck, Darmstadt
FastDigest [®] Restriktionsenzyme	Thermo Scientific, St Leon-Rot
Taq-DNA-Polymerase	Amersham, Freiburg

3.1.6 Plasmide und Vektoren

pcDNA3.1/V5-His-TOPO pcDNA3.1D/V5-His-TOPO pcDNA6.2/V5/GW/D-TOPO pET-28a(+) pGEX-4T-2 pcDNA3.1-LC3-GFP pcDNA3-MCFD2-YFP1 pcDNA3-MCFD2-YFP2 pcDNA6.2-pGCDH pcDNA6.2-pGCDH-myc pCRII-alpha-ETF pCRII-beta-ETF pGroESL Invitrogen, Karlsruhe Invitrogen, Karlsruhe Invitrogen, Karlsruhe Merck, Darmstadt GE Healthcare, München Galiciotti G., eigene Arbeitsgruppe Hauri H., Basel Hauri H., Basel Keyser B., eigene Arbeitsgruppe Keyser B., eigene Arbeitsgruppe Bross P., Århus Bross P., Århus Gersting S., München

3.1.7 Bakterienstämme

Escherichia coli		
TOP 10F	Rifr, F', proAB, laclqz_M15, Tn10, Tetr	Invitrogen, Karslruhe
BL21	B F ⁻ dcm ompT hsdS ($r_B^- m_B^-$) gal	Merck, Darmstadt
BL 21 (DE3)	B F ⁻ dcm ompT hsdS ($r_B^- m_B^-$) gal λ (DE3)	Merck, Darmstadt

3.1.8 Maus- und Zelllinien

GAC57Bl6	Prof. D.M. Koeller, Portland, USA
GA129SVJ	Prof. D.M. Koeller, Portland, USA
GAexp	Gezüchtet in der Tierhaltung des UKE^*
C57B16/J10	Charles River, Köln
Baby hamster kidney cells (BHK)	Prof. von Figura, Göttingen
Menschliche Cervixkarzinomzellen (HeLa)	ATCC, Rockville, USA
Primäre Astrozyten	Eigene Herstellung
Primäre Neurone	Eigene Herstellung
* Durch Kreuzung heterozygoter Tiere der Mau	slinie GAC57Bl6 und GA129SVJ, erhält

man die für die Versuche verwendeten GAexp-Tiere in der F₁-Generation ("Hybridvigour"-Kreuzungsverfahren)

3.1.9 Medien und Zusätze

3.1.9.1 Medien zur Anzucht von Bakterien

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium):	10 g/l Bacto-Trypton;
	5 g/l Bacto-Hefeextrakt;
	8 g/l NaCl;
	pH= 7,2 mit NaOH

Vor Gebrauch erfolgte die Zugabe von Antibiotikum (100 μ g/ml Carbenicillin; 50 μ g/ml Kanamycin, 30 μ g/ml Chloramphenicol). Für die Herstellung von Festmedien erfolgte die Zugabe von 15 g/L Agar.

3.1.9.2 Medien und Zusätze für die Zellkultur

Cytarabin-Hydrochlorid (AraC)	Sigma-Aldrich, München
B27-Supplement	Invitrogen, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	GIBCO/BRL, Eggenstein
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA, Österreich
Glutamat	Sigma-Aldrich, München
GlutaMax TM	GIBCO/BRL, Eggenstein
jetPEI TM Transfektions-Reagenz	PEQLAB, Erlangen
Lipofectamin TM 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Minimum Essential Medium (MEM)	GIBCO/BRL, Eggenstein
Neurobasalmedium A	GIBCO/BRL, Eggenstein
Optimem [®] -1 + GlutaMax TM	GIBCO/BRL, Eggenstein
Phosphate Buffered Saline (PBS (10X; 100mM))	GIBCO/BRL, Eggenstein

Penicillin/Streptomycin Pferdeserum Trypsin/EDTA

3.1.10 Antikörper

3.1.10.1 Primäre Antikörper

GIBCO/BRL, Eggenstein GIBCO/BRL, Eggenstein GIBCO/BRL, Eggenstein

Name/Antigen	Spezies	Anwendung	Referenz
α DLST	Maus	WB 1:500	Sigma-Aldrich, München
α ETFalpha	Kaninchen	WB 1:1000	Sigma-Aldrich, München
α ETFbeta	Kaninchen	WB 1:1000	Abcam, Cambridge, UK
α GCDH	Kaninchen	WB 1:5000	Dr. M. Woontner, Denver, USA
		IF 1:500	
α GFAP	Kaninchen	IF 1:250	Dako, Glostrup, Dänemark
α GFP	Maus	WB 1:1000	Roche, Mannheim
α His	Maus	WB 1:500	Dianova, Hamburg
αLC3	Kaninchen	WB 1:200	Abgent, San Diego, USA
α MNSOD	Kaninchen	WB 1:1000	Upstate, USA
α NeuN	Maus	IF 1:50	Millipore, Schwalbach

3.1.10.2 Sekundäre und fluoreszenzmarkierte Antikörper

Name/Antigen	Anwendung	Referenz	
Ziege α Kaninchen IgG HRP	WB 1:5000	Dianova, Hamburg	_
Ziege α Maus	WB 1:2000	Dianova, Hamburg	
Ziege α Kaninchen Alexa Fluor 488	IF 1:400	Invitrogen, Karlsruhe	
Ziege α Maus Alexa Fluor 546	IF 1:400	Invitrogen, Karlsruhe	

3.1.11 Software

Software:

Adobe Photoshop 7.0	Adobe Systems, München
Biacore 3000 BIAevaluation 4.1	GE Healthcare, München
Biacore 3000 Control Software 4.1	GE Healthcare, München
Clone Manager 9	Sci-Ed, Cary, USA
Leica Confocal Software 2.61	Leica, Wetzlar
Microsoft Office Standard Edition 2007	Microsoft, Redmond, USA
Quantity One 2.61	Bio-Rad, München
MxPro 4.6.1	Stratagene, Amsterdam, Niederlande

Online-Programme/Datenbanken:

BLAST	http:www.ncbi.nlm.nih.ov/blast/Blast.cgi
MASCOT	http://www.matrixscience.com
NCBI Datenbanken	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Pymol	http://www.pymol.org/

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Isolierung von genomischer DNA

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

Genomische DNA wurde zur Genotypisierung der Mäuse aus Schwanzspitzen-Biopsien isoliert. Die Schwanzspitzen wurden hierfür mit 500 μ l Lysispuffer, 15 μ l SDS (10 %) und 20 μ l Proteinase K-Stocklösung (10 mg/ml in Lysispuffer) versetzt und ü.N. bei 56 °C unter Schütteln inkubiert. Unverdaute Reste (z.B. Haare) wurden für 5 min bei 14.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch vorsichtiges Schwenken mit 500 μ l Isopropanol vermischt. Dies führte zum Ausfällen der DNA, die sich nach erneutem Zentrifugieren für 5 min bei 14.000 rpm als weißes Pellet festsetzte. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen und das Pellet zweimal mit 500 μ l Ethanol (70 %) und anschließendem Zentrifugieren für 15 min bei 37 °C zum Trocknen in den Brutschrank gestellt und danach in 100 μ l dH₂O für 1 h bei 37 °C unter Schütteln gelöst.

3.2.2 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Jede Restriktionsendonuklease besitzt ihre spezifische Erkennungsstelle (Sequenz) auf einem DNA-Strang, den sie genau dort durchtrennt. Die DNA-Restriktionsspaltung dient sowohl als Vorbereitung von Vektoren und cDNA-Fragmenten zur anschließenden Ligation als auch zur Kontrollanalyse bereits klonierter Konstrukte. In dieser Arbeit wurden zur Spaltung von DNA "Fast Digest"-Restriktionsenzyme (Fermentas) verwendet. Gemäß den Angaben des Herstellers wurde 1 μ l Enzym eingesetzt, um 1 μ g DNA in 5 min bei 37 °C im "Fast Digest"-Puffer zu schneiden.

3.2.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Mit Restriktionsenzymen geschnittene DNA-Fragmente können mit Hilfe des Enzyms Ligase über eine Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-Hydroxylgruppe des einen und der 5'-Phosphatgruppe des anderen DNA-Fragments verknüpft werden. Mit dieser Methode werden z.B. gezielt cDNA-Fragmente in Vektoren integriert. Hierfür wurden 100 ng Vektor und ein 3- bis 5-facher Überschuss an cDNA eingesetzt und bei 4 °C ü.N. mit der T4-Ligase inkubiert.

Ligationsansatz:

100 ng Vektor-DNA
x μl DNA-Fragment (3-5 molarer Überschuss)
1 μl 10 x T4-Ligase-Puffer
1 μl T4-DNA-Ligase
mit dH₂O auf 10μl auffüllen

3.2.3.1 Präparation chemisch-kompetenter E. coli Zellen

CaCl ₂ -Lösung:	60 mM CaCl ₂
	15 % Glycerol
	10 mM Pipes
	2 M NaOH pH 7,0

5 ml einer *E. coli* Übernachtkultur wurden in 500 ml LB-Medium bei 37 °C unter Schütteln (220 rpm) bis zu einer Dichte OD₆₀₀ von 0,35 angezüchtet. Die Bakterienkultur wurde für 10 min auf Eis abgekühlt und anschließend bei 4 °C für 15 min und 3.000 rpm zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 20 ml eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert und erneut unter gleichen Bedingungen wie zuvor zentrifugiert. Nach wiederholtem Resuspendieren in 6 ml eiskalter CaCl₂-Lösung, wurde die Bakteriensuspension in 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

3.2.4 Transformation von Bakterien

Für die Transformation von DNA wurden 100 μ l chemisch kompetente *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut und mit 2-5 μ l des Ligationsansatzes vermischt. Es erfolgte eine Inkubation für 20–30 min auf Eis mit anschließendem Hitzeschock bei 42 °C für 1 min. Die Bakteriensuspension wurde mit 250 μ l LB-Medium versetzt und für 1 h bei 37 °C im Brutschrank unter Schütteln (220 rpm) inkubiert. Danach wurden 50-100 μ l des Transformationsansatzes auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und ü.N. bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden einzelne Kolonien gepickt und in 5 ml LB-Medium mit Antibiotikum angeimpft. Die Vorkultur konnte zur Plasmidisolierung mit anschließender Kontrollrestriktion und Sequenzierung sowie zur Herstellung von Glycerinkulturen verwendet werden.

3.2.5 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde entweder das "GeneJetTM Plasmid Miniprep Kit" (bis 20 μ g DNA) oder das "QIAfilter Plasmid Midi Kit" (bis zu 100 μ g DNA) nach Herstellerangaben verwendet.

3.2.6 DNA-Sequenzierung

DNA-Proben wurden von der Firma "Seqlab" (Sequence Laboratories, Göttingen) sequenziert.

Sequenzierungs-Ansatz:	0,6 µg Plasmid
	20 pmol Primer
	mit dH ₂ O auf 7 μ l auffüllen

3.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer:	40 mM Tris-Base
	20 mM Essigsäure
	2 mM EDTA
DNA-Ladepuffer:	40 % Saccharose
	1 mM EDTA
	0,25 % Bromphenolblau

Die Agarosegelelektrophorese wurde in horizontalen Elektrophoresekammern durchgeführt. Für die Trennung der DNA-Fragmente wurden Gele verwendet, für die 0,8-1,5 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer aufgekocht wurde. Nach Abkühlen auf ca. 55 °C wurde die Agaroselösung mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 0,5 μ g/ml). Der TAE-Puffer wurde ebenfalls als Laufpuffer verwendet, mit dem die Gele in den Kammern überschichtet wurden. Die elektrophoretische Auftrennung fand bei 100-120 V statt. Die Detektion der DNA-Fragmente erfolgte unter UV-Licht.

3.2.8 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das "MinElute Gel Extraction Kit" eingesetzt. Die entsprechenden Banden wurden aus dem Agarosegel geschnitten und nach Angaben des Herstellers bearbeitet.

3.2.9 DNA-Amplifizierung mittels Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) beruht auf einen immer wiederkehrenden Zyklus aus drei Schritten: der Denaturierung des DNA-Doppelstranges, der Hybridisierung von Oligonukleotid-Primern an komplementäre DNA-Abschnitte und der Synthese des DNA-Stranges mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase. Die Dauer der DNA-Synthese variierte in Abhängigkeit von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments. Die Hybridisierungstemperatur wurde je nach Spezifität der Primer ausgewählt (Abschnitt 8). Als "DNA-Template" diente genomische DNA aus Schwanzspitzen oder Plasmid-DNA. Die Amplifikation erfolgte in einem Thermocycler unter Mitführung einer Negativ-Kontrolle ohne "Template".

Ansatz Taq-PCR:

50 ng "DNA-Template" 2 μl dNTP-Mix (10 mM) je 2,5 μl 3´und 5´Primer (10 μM) 5 μl 10 x PCR Reaktionspuffer 1 μl Taq-Polymerase (5 U/μl) mit dH₂O auf 50 μl auffüllen

3.2.10 Quick Change Mutagenese

Die in dieser Arbeit beschriebenen *GCDH*-Mutationen wurden mittels "Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit" nach Angaben des Herstellers in die cDNA humaner GCDH eingebracht. Eine Tabelle der erstellten Mutanten, sowie die hierfür verwendeten Primer befinden sich im Anhang (Abschnitt 8).

3.2.11 RNA-Isolierung

Zur RNA-Isolierung wurden 6 cm-Kulturschalen mit eukaryontischen Zellen einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 1 ml "TriReagent" für 5 min bei RT inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen abgeschabt und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 200 µl Chloroform unter 15-sekündigem Vortexen vermischt. Es erfolgte eine weitere
Inkubation bei RT für 5 min mit anschließender Zentrifugation für 15 min bei 14.000 rpm und 4 °C. Hierbei bildeten sich zwei farblose Phasen, die durch eine weißliche Interphase getrennt wurden. Die obere, RNA-enthaltende Phase wurde vorsichtig abgenommen, ohne dabei die Interphase zu berühren und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe eines Volumens Ethanol (70 %) wurde eine Säule aus dem "GeneJetTM RNA Purification Kit" mit dem Gemisch beladen, die Säule nach Herstellerangaben gewaschen und die RNA eluiert. Die Quantität der RNA wurde photometrisch und die Qualität durch Auftrennung im Agarosegel überprüft.

3.2.12 Quantitative Real-time PCR

Für die quantitative Real-time PCR wurde zunächst RNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Für die cDNA-Synthese wurde das "High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit" nach Angaben des Herstellers verwendet.

Die Real-time PCR ist eine PCR-Methode, bei der während der exponentiellen Phase der PCR die Menge der amplifizierten cDNA-Produkte in Echtzeit gemessen werden kann. Die Messung der Produktzunahme erfolgt hierbei störungsfrei anhand von Fluoreszenzsignalen. In dieser Arbeit wurden für die Real-time PCR der "TagMan[®] Gene Expression Assay" mit speziellen "TaqMan"-Sonden verwendet (Abschnitt 8). Diese Oligonukleotide sind 5'-terminal mit einem Reporterfluorophor und 3'-terminal mit einem Quencher markiert. Während der Verlängerung eines Primers trifft die "Taq"-DNA-Polymerase auf die Sonde, die durch die endonukleolytische Aktivität des Enzyms hydrolysiert wird, sodass das Reporterfluorophor räumlich vom Quencher getrennt wird und nach Anregung fluorometrisch gemessen werden kann. Die gemessene Fluoreszenz bleibt während der ersten PCR-Zyklen zunächst aufgrund der zu gering amplifizierten Produktmengen unverändert. In der exponentiellen Phase wird dann der sogenannte "cycle of threshold" (Ct-Wert) ermittelt. Dieser definiert den Zyklus der PCR, bei dem erstmals ein exponentieller Anstieg des PCR-Produktes auftritt. Die weitere Auswertung der relativen RNA-Quantifizierung erfolgte nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode (Livak et al. 2001), bei der die Differenz zwischen dem Ct-Wert des zu untersuchenden Gens und einem Kontrollgen (*Gapdh* oder β -Actin) gebildet wurde. Die relative Expression 2-MACT wurde aus dem Vergleich von Wildtyp- und Gcdh-defizienten Zellen ermittelt.

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

Für die Auswertung wurde die relative Expression der Kontrollzellen gleich 1 gesetzt.

Die Real-time PCR erfolgte in 20 μ l Ansätzen mit Triplikaten. Die Fluoreszenzen wurden mit dem Fluoreszenzdetektor MX3000PTM quantifiziert.

Ansatz Real-time PCR: $10 \ \mu l \ TaqMan^{\mbox{\ensuremath{\mathbb{B}}}} 2 \ x \ Universal \ PCR \ Master \ Mix$ $7 \ \mu l \ dH_2O$ $1 \ \mu l \ TaqMan^{\mbox{\ensuremath{\mathbb{R}}}} \ Gene \ Expression \ Assay$ $2 \ \mu l \ cDNA$ PCR: $95 \ ^{\circ}C \ 10 \ min$ $95 \ ^{\circ}C \ 30 \ sec$ $60 \ ^{\circ}C \ 1 \ min$ $40 \ Zyklen$

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Kultivierung von Zelllinien

Die Zellen wurden in wassergesättigter Atmosphäre unter 5 % CO_2 bei 37 °C kultiviert. Alle drei Tage wurden die Zellen passagiert. Verwendete Medien und Lösungen wurden auf 37 °C vorgewärmt. Für die Kultivierung von BHK- und HeLa-Zellen wurde DMEM + GlutaMaxTM + 10 % FKS und Penicillin/Streptomycin verwendet.

3.3.2 Trypsinieren von Zelllinien

Da das im Medium enthaltene FKS die Wirkung von Trypsin inhibiert, wurden konfluente Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend für 5 min mit 0,05 % (w/v) Trypsin-EDTA-Lösung bei 37 °C bis zum Ablösen der adhärenten Zellen inkubiert. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von FKS-haltigem Medium gestoppt. Die Zellen wurden durch mehrfaches Auf- und Absaugen mit der Pipette vereinzelt und in der gewünschten Dichte ausgesät.

3.3.3 Gefrierkonservierung und Revitalisierung von Zellen

Zur Kryoasservierung wurden trypsinierte Zellen in FKS-haltigem Medium aufgenommen und für 5 min bei 3.300 rpm sedimentiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 3 ml (bei einer 6 cm-Kulturschale) Einfriermedium (DMEM + 10 % DMSO + 10 % FKS) aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden bei -80 °C in einem "NalgeneTMCryo 1 °C Freezing Container" eingefroren und nach 24 h in flüssigen Stickstoff überführt.

Zur Revitalisierung wurden die Kryoröhrchen für 1 min bei RT angewärmt und die Zellsuspension in 5 ml kaltem Medium aufgenommen. Die Zellen wurden für 5 min bei 3.300 rpm sedimentiert und der Überstand abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml warmen Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel, um abgestorbene Zellen und DMSO-Reste zu entfernen.

3.3.4 Transfektion von Zellen

Zur Transfektion adhärenter Zellen wurde das jetPEITM Transfektionsreagenz nach Herstellerangaben verwendet. Für die Transfektion wurden Zellen bis zu einer Konfluenz von 80 – 90 % kultiviert und je nach Größe der Kulturschale mit einer definierten Menge an vektorieller DNA transfiziert.

Tab. 3.1: Übersicht des Verhältnisses von zu transfizierender DNA und jetPEITM, bezogen auf die Größe der verwendeten Kulturschalen

Kulturschale	DNA	jetPEI TM
10 cm	10 µg	20 µ1
6 cm	5,0 µg	10 µ1
12-well	2,0 µg	4 µl
24-well	1,0 µg	2 µ1

3.3.5 Isolierung und Kultivierung primärer Zellen

3.3.5.1 Isolierung primärer Astrozyten

Hank's gepufferte Salzlösung (HBSS):	1 mM MgCl ₂
	5,5 mM Glukose
	137 mM NaCl
	5,4 mM KCl
	0,4 mM KH ₂ PO ₄
	2,7 mM NaH ₂ PO ₄ *2 H ₂ O
	4,2 mM NaHCO ₃
	0,8 mM MgSO ₄
	1,7 mM CaCl
Astrozytäre Zellen-Medium:	DMEM
	10 % FKS
	0,6 % Glucose
	25 mM NaHCO ₃
	200 nM Glutamin
	50 U/ml Penicillin

Zellkulturplatten wurden mit Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) beschichtet und bis zur Verwendung bei RT inkubiert. Vor dem Aussäen der Zellen wurden die Platten noch einmal mit PBS gewaschen.

50 µg/ml Streptomycin

Für die Kultivierung von primären Astrozyten wurden aus neugeborenen Mäusen (P0-P2) Hirne herauspräpariert und die Hirnhäute in kaltem HBSS entfernt. Anschließend wurden die Hirne in kleine Stücke geschnitten, in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und 3 x mit eiskaltem HBSS gewaschen. Die Hirnstücke wurden in 5 ml angewärmtes Medium aufgenommen und mit Hilfe einer Pasteur-Pipette homogenisiert. Die Zellsuspension wurde durch unterschiedliche Filtermembranen (Porengröße 180 μ m, 140 μ m und 30 μ m) in der Reihenfolge abnehmender Porengröße filtriert. Anschließend wurden die Zellen gezählt und mit einer Dichte von 1 x 10⁵ Zellen/cm² ausplattiert. Nach 24 h fand der erste Mediumwechsel statt, weitere Medienwechsel folgten im Abstand von 2-3 Tagen. Die sich anschließenden Experimente wurden nach 7 Tagen Kultivierung durchgeführt.

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 TM 20 U/ml Penicillin 20 μg/ml Streptomycin 10 μM AraC
Neurobasalmedium 3:	2 % B27 0,5 mM GlutaMax TM 20 U/ml Penicillin 20 μg/ml Streptomycin

3.3.5.2 Isolierung primärer neuronaler Zellen

Zellkulturplatten wurden mit Poly-L-Lysin (0,5 mg/ml) beschichtet und bis zur Verwendung bei RT inkubiert. Vor dem Aussäen der Zellen wurden die Platten noch einmal mit PBS gewaschen.

Für die Kultivierung primärer Neurone wurden aus neugeborenen Mäusen (P0-P1) Hirne herauspräpariert und von den Cortice-Hälften die Hirnhäute in kaltem HBSS entfernt. Anschließend wurden die Cortices in 5 ml Papain-Lösung für 30 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. 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. Für 3,5 cm-Kulturschalen wurden 2,4 x 10⁶ Zellen und für 12-well Kulturschalen 4 x 10⁵ Zellen ausplattiert. 2-3 h später wurde das Medium gegen Neurobasalmedium 1 ausgetauscht. Nach weiteren 3 Tagen wurde die Hälfte des Mediums abgenommen und gegen Neurobasalmedium 2 ersetzt. Nach weiteren 3-4 Tagen wurde wieder die Hälfte des Mediums abgenommen und die gleiche Menge Neurobasalmedium 3 zugegeben. Nach 10 Tagen waren die Neurone ausdifferenziert und die Experimente wurden durchgeführt.

3.3.6 Indirekte Immunfluoreszens-Analyse (IFA)

Für die IFA wurden Zellen auf sterilen Deckgläschen, die zuvor mit Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) inkubiert worden waren, in 12-well-Zellkulturschalen ausplattiert.

Tab. 3.2: Übersicht der optimalen Zelldichte der unterschiedlichen Zelltypen für die IFA

Zellart	Zelldichte
ВНК	5 x 10 ⁴
HeLa	5 x 10 ⁴
primäre Neurone	2 x 10 ⁵
primäre Astrozyten	3,8 x 10 ⁵

Nach dem Anwachsen der Zellen wurden sie 3 x mit PBS gewaschen, mit 500 µl 4 % PFA für 15 min bei RT fixiert und erneut 3 x mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Permeabilisierung der Zellen mit 0,1 % Triton-X-100 in PBS für 5 min. Durch Inkubation der Zellen in PBS mit 2 % BSA für 1 h wurden unspezifische Antikörperbindungsstellen blockiert. Die Deckgläschen wurden auf einen Streifen Parafilm gelegt und mit 200 µl Antikörperlösung in der entsprechenden Verdünnung in PBS mit 2 % BSA entweder für 2 h bei RT, oder ü.N. bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen 3 x mit PBS gewaschen. Die Bindung der fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Sekundärantikörper erfolgte in PBS mit 2 % BSA für 1 h bei RT unter Lichtausschluss. Danach wurden die Zellen wieder 2 x mit PBS gewaschen und mit einer DAPI-Lösung (Verdünnung 1:1000) für 5 min inkubiert. Nach letztmaligem Waschen mit 3 x PBS und 1 x mit dH₂O wurden die Deckgläser mit Eindeckmedium (Mowiol) auf einem Objektträger fixiert und ü.N. bei RT getrocknet. Die fluoreszenzmarkierten Zellen wurden am Laser-Scan-Mikroskop (Vergrößerung: 63x, Leica DMIRE2) untersucht. Bei Doppel-Immunfluoreszenzanalysen erfolgte nach Einzelaufnahme der Fluoreszenz-Signale eine Überlagerung der digitalen Bilder (Adobe Photoshop Software).

3.3.7 [¹⁴C]-Succinat Aufnahme in primäre Zellen

Transportpuffer:	25 mM HEPES / Tris pH 7,4
	140 mM NaCl
	5,4 mM KCl
	1,8 mM CaCl ₂
	0,8 mM MgSO ₄
	5 mM Glukose
Aufnahme-Puffer:	300 µl Transportpuffer
	0,1 µCi ¹⁴ C-Succinat
	2 mM entsprechende Substanz

Für die [¹⁴C]-Succinat-Aufnahme wurden primäre Astrozyten oder Neurone in 12-well-Zellkulturschalen ausplattiert. Nach einmaligem Waschen der Zellen mit Transportpuffer, wurden diese für 10 min mit dem Aufnahme-Puffer bei 37 °C und 5 % CO₂ unter Schwenken inkubiert. Der Aufnahme-Puffer wurde anschließend entfernt und 3 x gründlich mit Transportpuffer gewaschen. Die Zellen wurden in 300 µl 0,2 M NaOH lysiert, wovon 50 µl für die Bestimmung der Proteinkonzentration und die restlichen 250 µl nach Zugabe von 2 ml Szintillationsflüssigkeit zur Messung der Radioaktivität in einem β-Szintillations-Counter eingesetzt wurden.

3.3.8 [¹⁴C]-Succinat Efflux aus primären Zellen

Astrozyten und Neurone wurden wie zuvor unter Punkt 3.3.7 beschrieben in 12-well-Zellkulturschalen kultiviert und für 20 min mit dem Aufnahme-Puffer inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 1 x mit Transportpuffer gewaschen und für bestimmte Efflux-Zeiten (von 0–30 min) in 300 µl Transportpuffer erneut bei 37 °C und 5 % CO₂ unter Schwenken inkubiert. Danach wurde der Transportpuffer gegen 300 µl 0,2 M NaOH-Lösung ausgetauscht, um die Zellen zu lysieren. Die Radioaktivität wurde sowohl im Zelllysat als auch im Transportpuffer in einem β-Szintillations-Counter in Abhängigkeit zur Proteinkonzentration bestimmt.

3.3.9 BS³-Quervernetzung

Bindungspuffer:	100 mM HEPES pH: 7,6
	120 mM NaCl
	1,8 mM MgSO ₄
	5 mM KCl
	8 mM Glukose
	0,25% (w/v) Saponin
	1 % (w/v) Triton X 100
Stop-Lösung:	1 M Tris pH 7,4

BHK-Zellen wurden auf 6 cm-Kulturschalen ausgesät und transfiziert. Nach 3-maligem Waschen der Zellen mit PBS wurden diese in 1 ml PBS abgeschabt und für 10 min bei 4 °C und 2.300 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 μ l Bindungspuffer resuspendiert und für 10 min inkubiert. Nach erneuter 4-minütiger Zentrifugation bei 3.300 rpm wurde der Überstand auf zwei Reaktionsgefäße aufgeteilt, wovon die eine Hälfte mit 200 μ M des "Crosslinkers" BS³ versetzt wurde. BS³ ist ein homobifunktionaler "Crosslinker", der über reaktive *N*-hydroxysulfosuccinimid-(NHS)-Ester primäre Aminogruppen von Proteinen in einem Abstand von 11,4 Å miteinander verbindet. Die Vernetzung wurde nach 30 min Inkubation auf Eis mit Zugabe von 10 μ l der Stop-Lösung beendet und die Proben in einer SDS-PAGE aufgetrennt und über Western Blot analysiert.

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Proteinkonzentrationen wurden mit dem "Bio-Rad Protein Assay" bestimmt. Für die Proteinbestimmung wurden 5-10 μ l Proteinprobe eingesetzt und mit dH₂O auf 800 μ l aufgefüllt. Anschließend wurde zu jeder Probe 200 μ l "Bio-Rad" Reagenz hinzugegeben. Die Extinktion der Proben wurde photometrisch bei 595 nm erfasst und die Proteinkonzentration mit Hilfe einer BSA-Eichgeraden (0-20 μ g) ermittelt.

3.4.2 Herstellung von Zell-Homogenaten

Transient transfizierte BHK- oder HeLa-Zellen wurden 24 h nach Transfektion 3 x mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml PBS abgeschabt und durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 3.300 rpm und 4 °C pelletiert. Die Zellen wurden 10 min auf Eis lysiert (Lyse in: PBS + 0,2 % Triton X-100 + 1 x Protease-Inhibitor-Cocktail) und anschließend Zellkerne und Membranreste für 10 min bei 13.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Anschließend wurde vom Überstand die Proteinkonzentration bestimmt (Punkt 3.4.1).

Sammelgel:	4 % Acrylamid 0,1 M Tris/HCl (pH 6,8) 0,1 % SDS 0,1 % APS 0,1 % TEMED
Trenngel:	10 % Acrylamid 0,375 M Tris/HCl (pH 8.8) 0,1 % SDS 0,016 % APS 0,08 % TEMED
Solubilisierungspuffer (2x)	250 mM Tris/HCl (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

3.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAG

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte nach ihrer Größe mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).

Die Auftrennung in großen Gelen erfolgte bei RT und 55 mA/Gel für ca. 2 h. Proteine in Mini-Gelen wurden zunächst bis zum Erreichen der Lauffront des Trenngels bei 85 V und anschließend für weitere 45 min bei 180 V aufgetrennt.

3.4.4	Tris/Tricin-Gele

Sammelgel:	4 % Acrylamid
	0,7 M Tris/HCl (pH 8,45)
	0,3 % SDS
	0,04 % APS
	0,16 % TEMED
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/HCl (pH 6,8)
	1 % SDS
	10 % Glycerin
	Coomassie® Blue R
Anodenpuffer:	200 mM Tris/HCl, pH 8,9
Kathodenpuffer:	100 mM Tris-Base
	100 mM Tricin
	0,1 % SDS

Um eine besonders hohe elektrophoretische Auftrennung von Proteinen zu erreichen, wurden Tris-Tricin-Gele (Schagger et al. 1987) verwendet.

3.4.5 Western Blot Analyse

Transferpuffer:	25 mM Tris
	192 mM Glycin
	20 % Methanol
Blockpuffer:	1 x PBS
	0,2 % Tween 20
	5 % Milchpulver
Waschpuffer:	1 x PBS
	0,1 % Tween 20

"Enhanced Chemilumineszenz" (ECL): Lösung 1:

Lobulg I.	2,7 11101 Euliinioi
	0,44 mM p-Cumarinsäure
	100 mM Tris/HCl (pH 8,5)
Lösung 2:	10 µl 30 % H ₂ O ₂
	0,1 mM Tris/HCl (pH 8,5)

2.7 mM Luminol

Zur Immundetektion von Proteinen wurden die Proben nach ihrer Auftrennung durch SDS-PAGE im Western-Blot-Verfahren auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Der Transfer von Proteinen aus großen Gelen wurde für 2 h bei 900 mA, der von Mini-Gelen für 1 h bei 400 mA in einer Elektroblot-Apparatur mit Transferpuffer durchgeführt. Nach dem Transfer wurde die Nitrocellulose-Membran unter kontinuierlicher Bewegung auf einer Wippe inkubiert. Zunächst wurden unspezifische Antigenbindungsstellen für 1 h in Blockpuffer gesättigt. Dann folgte eine Inkubation mit einem entsprechenden Primärantikörper (verdünnt in Blockpuffer) ü.N. bei 4° C oder bei RT für 2 h. Anschließend wurde die Membran 3×10 min mit Waschpuffer gespült. Es folgten eine 1-stündige Inkubation mit HRP-konjugiertem Sekundärantikörper (verdünnt in Blockpuffer) und ein weiterer Waschschritt für 3×10 min. Die verwendeten Primärantikörper und ihre Verdünnungen sind in Abschnitt 3.1.5 angegeben.

Zur Detektion der Banden wurden je 5 ml der 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 entweder ein Röntgenfilm aufgelegt, der nach geeigneter Expositionszeit entwickelt wurde, oder die Signale wurden mit einer ChemiDoc-Kamera detektiert.

Durch "Strippen" der Nitrocellulose-Membran können die gebundenen Antikörperkomplexe von der Membran entfernt werden und der Blot kann für die Immundetektion eines weiteren Proteins eingesetzt werden. Zum Strippen wurde die Membran 2 x 5 min mit dH₂O gewaschen, dann 5 min mit 0,2 M NaOH inkubiert und anschließend nochmals 2 x 5 min mit dH₂O gewaschen. Nach dieser Behandlung konnte die Membran beginnend mit der Blockierung zur weiteren Immundetektion eingesetzt werden.

Coomassie-Färbelösung:	0,25 % Coomassie [®] Blau R		
	45 % Ethanol		
	10 % Essigsäure		
	45 % dH ₂ O		
Coomassie-Entfärbelösung:	50 % Methanol		
	10 % Essigsäure		
	40 % dH ₂ O		

3.4.6 Färbung von Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie-Lösung

Zur Detektion aufgereinigter Proteine (Punkt 3.4.7) wurden die aufgetrennten Proteinbanden im Polyacrylamidgel in Coomassie-Färbelösung für mindestens 30 min bei RT unter leichtem Schütteln gefärbt. Zum Auswaschen überschüssiger Farbe wurde das Gel mehrmals für etwa 30 min in der Entfärbelösung geschwenkt, wobei diese wiederholt ausgetauscht wurde. Zur Digitalisierung wurden die Gele eingescannt.

3.4.7 Affinitätschromatographische Aufreinigung von Fusionsproteinen

GST-Lysispuffer:PBS1 % Triton X10020 μg/ml DNase2 mg/ml Lysozym1 x Protease-Inhibitor-CocktailGST-Elutionspuffer 1:50 mM Tris-HCl (pH 8,0)10 mM reduziertes GlutathionGST-Elutionspuffer 2:50 mM Tris-HCl (pH 8,0)50 mM reduziertes Glutathion

3.4.7.1 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen aus E. coli

Die GST-Fusionskonstrukte im Vektor pGEX4T_2 wurden in den *E. coli* Stamm BL21 transformiert. Einzelne Kolonien wurden in 6 ml LB-Medium mit Ampicillin ü.N. angeimpft. Die weitere Kultivierung erfolgte in 400 ml Medium bei 37 °C bis zu einer OD600 von 0,5-0,6. Die Expression der GST-Fusionsproteine wurde durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert und die Kultur für weitere 3-4 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen für 15 min bei 4.000 rpm pelletiert und in 10 ml eiskaltem GST-Lysispuffer resuspendiert. Der anschließende Zellaufschluss erfolgte durch 2 x 3 Ultraschallpulse im Eisbad von je 30 sek, wobei nach den ersten drei Pulsen die

Proben für 30 min auf Eis gelagert wurden. Nach Zentrifugation (15 min, 7.300 rpm, 4°C) wurde der Überstand mit den löslichen Proteinen ü.N. unter leichtem Rotieren mit 200 μ l Glutathion-Agarose bei 4 °C inkubiert. Die Agarose mit den über GST-Glutathion gebundenen Proteinen wurde bei 3.300 rpm für 5 min sedimentiert. Anschließend folgten drei Waschschritte für 5 min bei RT auf dem Drehrad mit jeweils 5 ml Lysispuffer, um unspezifische Protein-Bindungen zu verhindern. Die Elution der GST-Fusionsproteine erfolgte für 15 min auf dem Drehrad bei RT mit 2 x 500 μ l GST-Elutionspuffer 1 und 1 x 500 μ l GST-Elutionspuffer 2. Zwischen jedem Wasch- und entsprechenden Volumina wieder aufgenommen. Die Reinheit der Protein-Aufreinigung wurde in einer SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung kontrolliert.

3.4.7.2	Aufreinigung von	His-Fusionsp	proteinen aus	5 E.	coli
---------	------------------	---------------------	---------------	------	------

His-Lysispuffer:	50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH7,8 500 mM NaCl 10 mM Imidazol 2 mg/ml Lysozym 20 μg/ml DNase 1 % TritonX100 1 x Protease-Inhibitor-Cocktail
His-Waschpuffer:	50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 7,8 500 mM NaCl 40 mM Imidazol
His-Elutionspuffer:	50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 7,8 500 mM NaCl 500 mM Imidazol 1 x Protease-Inhibitor-Cocktail

Die His-Fusionskonstrukte im Vektor pET28a(+) wurden in den *E. coli* Stamm BL21(DE3) transformiert. Die Kultivierung wurde wie unter Punkt 3.4.7.1 beschrieben durchgeführt, mit Ausnahme des verwendeten Antibiotikums (hier Kanamycin). Danach wurden die Zellen für 15 min bei 7.000 rpm pelletiert und in 10 ml eiskaltem His-Lysispuffer resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte auch wie unter Punkt 3.4.7.1 beschrieben. Der Überstand mit den löslichen Proteinen wurde mit 200 μ l Ni-NTA-Agarose für 3–4 h unter leichtem Rotieren bei 4 °C inkubiert und auf eine Mobitec-

Säule überführt. Nach 3-maligem Waschen der Säule mit 5 ml His-Waschpuffer wurden die His-Fusionsproteine mit 3 x 1 ml His-Elutionspuffer von der Säule gelöst und die Reinheit mittels SDS-PAGE und anschließender Comassie-Färbung überprüft.

3.4.7.3 Protein-Liganden-Affinitätschromatographie mittels Affi-Gel 10

Waschpuffer:	50 mM Hepes, pH 7,5
	120 mM NaCl
	5 mM KCl
Elutionspuffer:	50 mM Hepes, pH 7,5
	5 mM KCl
	250 mM (E1), 500 mM (E2), 750 mM (E3)
	1 M (E4) oder 1,5 M (E5) NaCl

Affi-Gel 10 besitzt N-Hydroxy-succinimide-(NHS)-Ester an einem 10 Atome langen "Spacer"-Arm. NHS-Ester können Proteine über ihre freien Aminogruppen kovalent binden. Für die Präparation einer GCDH-Affinitätsmatrix wurde 2 mg des aufgereinigten GCDH-His Fusionsproteins (Punkt 3.4.7.2) mit 2 ml Affi-Gel 10 nach Herstellerangaben immobilisiert. Noch verbleibende reaktive Gruppen wurden mit 3 ml Waschpuffer + 800 µl 1 M Ethanolamin für 1 h bei 4 °C auf dem Drehrad blockiert. Anschließend wurde die Matrix mit 3 x 6 ml Waschpuffer gespült und mit 1 mg/ml mitochondrialen Matrixproteinen (Punkt 3.4.10) ü.N. bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschritt mit 3 x 6 ml Waschpuffer, um unspezifisch gebundene Proteine vom Liganden (GCDH) zu entfernen. Spezifische Bindungspartner wurden mit 5 x 1 ml Elutionspuffer (E1-E5) mit steigender NaCl-Konzentration von der GCDH-Affinitätsmatrix getrennt und die einzelnen mittels Elutionsfraktionen nach Kontrolle SDS-PAGE vereinigt und zur massenspektrometrischen Analyse gegeben. Die Analyse wurde im Rahmen einer Kooperation mit der klinischen Chemie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf von Prof. Dr. rer. nat. Hartmut Schlüter durchgeführt.

3.4.8 Dialyse von Proteinlösungen

Die Dialyse diente dem Austausch der Pufferzusammensetzung einer Proteinlösung. Verwendet wurde ein Dialyseschlauch mit einer Ausschlussgröße von 14 kDa, so dass Pufferbestandteile die Dialysemembran ungehindert passieren konnten und das Protein im Dialyseschlauch verblieb. Vor Gebrauch wurde der Dialyseschlauch für 10 min in dH_2O gewässert und anschließend die Proteinlösung mit Hilfe von Dialyseklammern im Schlauch eingeschlossen. Die Dialyse erfolgte bei 4°C unter Rühren gegen das 100fache Volumen der Probe für mindestens 3h. Der Dialysepuffer wurde dabei stündlich gegen frischen Puffer ausgetauscht.

3.4.9 Mitochondrien-Isolierung aus Schweineleber

Kochsalzlösung:	0,9 % Kochsalz
Isolierungspuffer:	10 mM HEPES, pH 7,4
	0,2 M Mannitol
	50 mM Sucrose
	10 mM KCl
	1 mM Na ₂ EDTA
	mit H ₂ O auf 500 ml auffüllen
	vor Gebrauch 1-2 Tage bei 4 °C aufbewahren
Sucrose-Lösung:	0,25 M Sucrose

Die Isolierung von Mitochondrien aus Schweineleber fand nach der Methode von (Graham 2001) statt. Die im Weiteren beschriebenen Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt und alle verwendeten Lösungen wurden vor Gebrauch ebenfalls auf 4 °C vorgekühlt. Die aus einem Schwein präparierte Leber (freundlicherweise von der Abt. für experimentelle Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf zur Verfügung gestellt) wurde zunächst mit 0,9 % Kochsalzlösung mehrmals zum Säubern von Blutresten gewaschen. Anschließend wurde das Nassgewicht der Leber bestimmt und 25 g in ca. 2 x 2 x 2 cm große Stücke geschnitten. Die Leberstücke wurden in 2 x 70 ml Isolierungspuffer gewaschen und zunächst mittels Ultra-Turrax zerkleinert. Es folgten weitere 20 Hübe mit einem "Tight"-Stempel eines 7 ml-"Douncers". Das Homogenat wurde durch Zentrifugation bei 3.300 rpm für 10 min von Zellkernen befreit und der entstehende Überstand anschließend für weitere 10 min bei 10.000 rpm von Lipiden befreit. Die blassrosa gefärbte Lipidschicht überdeckte dabei die bräunliche Mitochondrienschicht und musste vorsichtig und vollständig entfernt werden. Nach Entfernung wurde das Mitochondrien-Pellet in 20 ml Isolierungspuffer erneut mit 3-4 Hüben im Douncer homogenisiert und dann auf das Anfangsvolumen von 70 ml mit Isolierungspuffer aufgefüllt, um ein letzes Mal bei 10.000 rpm für 10 min zentrifugiert zu werden. Das Pellet mit den Mitochondrien wurde in 10 ml Sucrose-Lösung aufgenommen und die Proteinkonzentration der Mitochondrien-Lösung mittels Bradford bestimmt.

3.4.10 Fraktionierung mitochondrialer Matrix-Proteine

Digitonin-Lösung:	6 mg/ml Digitonin in 0,25 M Sucrose
Lubrol-Lösung:	0,5 mg Lubrol / ml Mitochondrien-Lösung
Sucrose-Lösung:	0.25 M Sucrose in 10 mM Tris/HCl, pH 7,4
Sucrosegradient:	4,5 ml 51,3 % Sucrose 3 ml 37,4 % Sucrose 3 ml 23,2 % Sucrose in 20 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 7,4

Um die löslichen Matrix-Proteine von den unlöslichen Membranproteinen der äußeren und inneren Mitochondrienmembran zu isolieren, wurde eine Mitochondrien-Fraktionierung der unter Punkt 3.4.9 isolierten Mitochondrien durchgeführt (Benga et al. 1979). Hierfür wurden 40 mg/ml isolierte Mitochondrien mit gleichem Volumen Digitonin-Lösung versetzt und auf dem Drehrad bei 4 °C für 20 min inkubiert. Digitonin wirkt hierbei als nichtionisches Detergenz, das die äußere und innere Mitochondrienmembran permeabilisiert. Nach Zentrifugation bei 10.000 rpm für 15 min lagern sich im Pellet die innere Membran mit den Matrix-Proteinen und im Überstand die äußere Membran mit Proteinen der Intermembran-Fraktion an. Das Pellet wurde in 1 ml Sucroselösung resuspendiert und auf einen diskontinuierlichen Sucrosegradienten gegeben. Nach Zentrifugation bei 100.000 g für 60 min bilden sich von oben nach unten betrachtet 5 Fraktionen. Fraktion 3 enthält dabei Reste der äußeren Membran, Fraktion 4 Teile der inneren Membran und Fraktion 5, die gleichzeitig das Sediment darstellt, enthält die Matrixproteine mit den restlichen Teilen der inneren Membran. Um die Matrix-Proteine von der restlichen inneren Membran zu befreien, wurde Fraktion 5 wieder in 1 ml Sucroselösung resuspendiert und mit 0,5 mg/ml des Tensids Lubrol für 15 min auf dem Drehrad inkubiert. Es folgte ein letzter Zentrifugationsschritt bei 100.000 g für 30 min mit anschließender Konzentrationsbestimmung der mitochondrialen Matrix-Proteine im Überstand.

3.4.11 "Pull-Down"-Experimente

Lysispuffer:

50 mM NaH₂PO₄, pH 7,8 500 mM NaCl 10 mM Imidazol

Beim "*Pull-Down*"-Experiment handelt es sich um eine in *vitro*-Methode, bei der Protein-Protein-Interaktionen analysiert werden können. Das sogenannte "Bait"-Protein wurde hierfür aus Zellüberständen über einen His-Tag an Ni-NTA-Agarose immobilisiert (Punkt 3.4.7.2). Für die Immobilisierung wurden pro Säule 6 mg Totalprotein aus dem Zellüberstand pro 200 µl Ni-NTA-Agarose bei 4°C, ü.N. auf dem Drehrad miteinander inkubiert. Zeitgleich wurde die vektorielle cDNA des sogenannten "Prey"-Proteins für insgesamt 24 h in BHK-Zellen transfiziert (Punkt 3.3.4). 300 µg des BHK-Zelllysates wurden anschließend zu dem immobilisierten "Bait" gegeben. Nach Inkubation für 2 h bei 4 °C auf dem Drehrad wurde die Agarose mit 10-fachem Volumen Lysispuffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine auszuwaschen. Anschließend wurde die Agarose in 1 x Solubilisierungspuffer aufgenommen, für 5 min bei 95 °C aufgekocht und der Überstand in einer SDS-PAGE aufgetragen und im Western-Blot analysiert.

3.4.12 Koimmunpräzipitation

Lysispuffer:	10 mM Tris/HCl pH 7,5
	150 mM NaCl
	0,5 mM EDTA
	0,5 % NP40
	1 mM PMSF (frisch dazugeben)
	1 x Protease Inhibitor Cocktail (frisch dazugeben)
Waschpuffer:	Lysispuffer ohne 0,5 % NP40

Bei der Koimmunpräzipitation handelt es sich um eine weitere Methode, Protein-Protein-Wechselwirkungen zu untersuchen. BHK-Zellen einer 10 cm Kulturschale wurden hierfür für 24 h mit dem "Bait"- und dem "Prey"-Protein kotransfiziert. Das "Bait"-Protein ist dabei erneut mit einem His-Tag fusioniert und kann zusammen mit dem interagierenden "Prey"-Protein über die Bindung an Ni-NTA-Agarose immobilisiert werden. Transfizierte Zellen wurden hierfür in 500 µl Lysispuffer resuspendiert und für 10 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Zeitgleich wurde 100 μ l Ni-NTA Agarose mit 3 x 500 μ l Lysispuffer äquilibriert und anschließend mit dem Überstand des Zelllysates für 4 h bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch dreimaliges Waschen mit 500 μ l Waschpuffer und einmaliges Waschen mit 1 ml Lysispuffer entfernt. Die Agarose wurde anschließend in 100 μ l 1 x Solubilisierungspuffer aufgenommen und für 10 min bei 95 °C inkubiert. Die Proteine wurden dabei durch Denaturierung von der Agarose gelöst und der mögliche Interaktionspartner "Prey" konnte mittels Western Blot detektiert werden.

3.4.13 "Protein-Fragment-Complementation-Assay" (PCA)

Ein "Protein-Fragment-Complementation-Assay", kurz PCA, ist eine biochemische Methode zur Detektion von *in vivo* Protein-Protein-Interaktionen. Die cDNA des "yellow" fluoreszierenden Proteins (kurz YFP) wurde hierfür, wie schon bei (Nyfeler et al. 2007), beschrieben in zwei Fragmente (YFP1 und YFP2) unterteilt und jeweils C-terminal an das "Bait"- bzw. an das "Prey"-Protein fusioniert. Als Expressionsvektor diente pcDNA3.1. Für die anschließende Transfektion wurden BHK-Zellen im 12 well Format verwendet (Punkt 3.3.4). Bei Interaktion von "Bait" und "Prey" kommen die YFP-Fragmente in räumliche Nähe, sodass die Interaktion nach Anregung mit einer Exzitationswellenlänge von 514 nm durch ein gelbes Fluoreszenssignal detektiert werden kann.

3.4.14 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie

Analyten-Puffer:	100 mM NaCl, pH 7,8
	50 mM NaH ₂ PO ₄
	5 mM DTT
	0,01 % Surfactant
	β -Mercaptoethanol (1:10.000)

Zur Messung von Protein-Protein-Interaktionen und Quantifizierung der Bindungsaffinität wurde der BIAcore 3000 Biosensor verwendet, der das Prinzip der Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR) nutzt. Bei SPR-Messungen auf biosensorischer Ebene wird die Interaktion eines an der Sensoroberfläche immobilisierten Reaktionspartners (= Ligand) mit einem sich in Lösung befindlichen Bindungspartner (= Analyt), der in einem kontinuierlichen Fluss über die Sensoroberfläche am Liganden vorbeigeleitet wird, untersucht. Die Detektion der Interaktion beruht auf einer Veränderung in der Massenzu- oder abnahme von Makromolekülen auf der Oberfläche des Sensorchips, die zur Ablenkung eines Lichtstrahls führt. Die Ablenkung korreliert unter anderem mit dem Refraktionsindex des Mediums, welches auf die Oberfläche des Sensorchips trifft. Der Refraktionsindex ist wiederum abhängig von der Konzentration gelöster Moleküle im Medium, die sich durch Interaktionen zwischen Ligand und Analyt verändert. Von der Detektionseinheit werden die Winkeländerungen in Abhängigkeit von der Zeit registriert und in das so genannte Resonanzsignal überführt, welches anschließend in einem Sensogramm dargestellt wird (Abb. 3.1). Das Resonanzsignal wird dabei durch Resonanzeinheiten (RU) angegeben, wobei eine Winkeländerung von 1000 RU einer Zunahme von 1 ng Protein pro Quadratmillimeter Chipoberfläche entspricht.



Abb. 3.1: Schematische Darstellung des Messprinzips des Biosensors Bindet ein Analyt an einen immobilisierten Liganden, ändert sich der Refraktionsindex an der Chipoberfläche, und das vom Lichtstrahl reflektierte Licht verändert seine Position. Die Winkeländerung wird im Sensogramm als Resonanzsignal dargestellt. Abbildung aus dem BIAcore Handbuch.

Ein Sensogramm wird in vier Phasen dargestellt (Abb 3.2): a) Die Phase vor einer Interaktion, bei der nur Laufpuffer über die Chipoberfläche fließt und eine stabile Basislinie besteht; b) die Assoziationsphase, bei der nach Injektion einer definierten Menge des Analyten, Interaktionen mit dem Liganden durch Steigung des Resonanzsignals gemessen werden können; c) die Dissoziationsphase, die mit dem Beenden der Injektion startet und bei der die Dissoziation des Protein-Komplexes durch Fall des Resonanzsignals gemessen wird; d) die Regenerationsphase, bei der die Ausgangs-Basislinie durch Injektion einer Regenerationslösung wiederhergestellt wird.



Abb 3.2: Schematische Darstellung des Sensogramm-Verlaufes

Für die Immobilisierung des Liganden wurde in dieser Arbeit ein CM5-Sensorchip verwendet. Dieser besteht aus einem Glasträger, der mit einer Goldschicht überzogen ist, an der kovalent eine Dextranoberfläche gebunden vorliegt. Die Aktivierung des Sensorchips erfolgte für 5 min bei einer Flussgeschwindigkeit von 10 µl/min mit N-Hydroxysuccinimid (NHS) und N-ethyl-N´-(dimethyl-amino-propyl)-carbodiimid (EDC). Die anschließende Kopplung der Liganden fand bei einer Flussgeschwindigkeit von 5 µl/min für 6 min statt. Der für die Kopplung verwendete Puffer (10 mM Na-Acetat) lag dabei mit seinem pH-Wert weit unterhalb des isoelektrischen Punktes des Liganden. Verbleibende mögliche Bindungsstellen wurden mit 1 M Ethanolamin für 4 min bei 30 µl/min blockiert. Die Analyten wurden im Analyten-Puffer mit unterschiedlichen Konzentrationen (1, 2, 4, 8 und 16 µM) gelöst und anschließend jeweils für 1 min bei einer Flussgeschwindigkeit von 30 µl/min injiziert. Zwischen jeder Injektion wurde für die Regeneration der Basislinie bei gleichbleibender Flussgeschwindigkeit 5-10 mM NaOH für 5 sek injiziert.

Die Berechnung der Assoziations- (k_a) , Dissoziations- (k_d) und Gleichgewichtskonstante (K_D) erfolgte durch die Evaluierungssoftware Biacore 3000 BIAevaluation 4.1 nach Angaben des Herstellers.

Das Sensogramm ist in vier Phasen gegliedert. Basislinie (a), Assoziation (b), Dissoziation (c) und Regeneration (d). Abbildung aus dem BIAcore Handbuch.

4. Ergebnisse

4.1 Einfluss von GA und 3OHGA auf den Transport von Intermediaten des Tricarbonsäurezyklus (TCA)

Obwohl die Krankheit Glutarazidurie Typ 1 (GA1) erstmals 1975 von Goodman beschrieben wurde (Goodman et al. 1975), sind die Pathomechanismen die der neuronalen Degeneration des Striatums zu Grunde liegen, noch nicht geklärt. Es wird postuliert, dass die bei GA1-Patienten akkumulierenden Metabolite Glutarsäure (GA) und 3-Hydroxyglutarsäure (3OHGA) maßgeblich am Untergang der neuronalen Zellen beteiligt sind. Über Studien an Transporter-überexprimierenden Froschoocyten konnte nachgewiesen werden, dass GA und 3OHGA mit unterschiedlichen Affinitäten über die organischen Anionen-Transporter OAT1 und OAT4, sowie über den Na⁺-abhängigen Dicarboxylat-Transporter NaC3 transportiert werden können (Mühlhausen et al. 2008). Die Transporter OAT1 und NaC3 werden auch im Gehirn exprimiert. NaC3 ist im Gehirn unter anderem am anaplerotischen Transfer von Tricarbonsäure-(TCA)-Zyklus-Intermediaten zwischen Astrozyten und Neuronen beteiligt und vermittelt die Aufnahme der Intermediate aus dem Extrazellularraum in neuronale Zellen (Pajor et al. 2001; Yodoya et al. 2006). Neuronale Zellen sind auf diesen Transfer der Intermediate für die Bildung von ATP und der Synthese von Neurotransmittern angewiesen. Im ersten Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob der anaplerotische Transfer zwischen astrozytären und neuronalen Zellen in Gegenwart der Dicarboxylate GA und 3OHGA beeinträchtigt ist.

4.1.1 Kultivierung von primären Astrozyten und Neuronen

Die Untersuchungen erfolgten an primär kultivierten Zellen von Gcdh-defizienten (Gcdh^{-/-}) Mäusen im Vergleich zu Zellen von Wildtyp-Mäusen. Astrozyten und Neurone waren nach 7 bzw. 10 Tagen in Kultur ausdifferenziert und wurden daraufhin für die weiteren Untersuchungen eingesetzt. Die Reinheit der Zellpräparationen wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie und spezifischen astrozytären und neuronalen Markern überprüft.



Abb. 4.1: Reinheit der kultivierten Astrozyten und Neurone Primäre Astrozyten (oben) und primäre Neurone (unten), isoliert aus neugeborenen Wildtyp-Mäusen (P0-P1), wurden für 7 bzw. 10 Tage auf Deckgläschen kultiviert und anschließend fixiert, permeabilisiert und mit GFAP (grün) und NeuN (rot) inkubiert. Zellkerne wurden mit DAPI (Blau) angefärbt.

GFAP (Glial fibrillary acidic protein) ist ein Bestandteil von Intermediärfilamenten im Zytoplasma und wurde als spezifischer Marker für Astrozyten eingesetzt. NeuN (Neuronal nuclear protein), ein DNA-bindendes neuronales Kernprotein, wurde als Marker für Neurone ausgewählt. Für die Quantifizierung der Reinheit der kultivierten Zellen wurde eine DAPI-Färbung durchgeführt und die Zellzahl ermittelt. Die immunfluoreszenzmikroskopische Auszählung der Zellen ergab, dass in kultivierten Astrozyten 80-90 % der Zellen GFAP-positiv waren, während nur sehr wenige NeuN-positive Zellen nachweisbar waren (Abb. 4.1). In den primären neuronalen Kulturen waren hingegen 90-95 % der Zellen NeuN-positiv und nur 5-10 % der Zellen GFAP-positiv (Abb. 4.1). Vergleichbare Ergebnisse wurden in kultivierten Zellen aus Gcdh^{-/-}-Mäusen erzielt (nicht gezeigt).

4.1.2 Einfluss von GA und 3OHGA auf die [¹⁴C]-Succinat Aufnahme in Astrozyten und Neurone

Succinat ist neben anderen Substraten wie Citrat, α -Ketoglutarat, Fumarat und Malat eines der wichtigen Intermediate zur Bildung von ATP im TCA-Zyklus. Daher wurde [¹⁴C]-markiertes Succinat für die Untersuchungen zum Einfluss von GA und 3OHGA auf verschiedene Prozesse des anaplerotischen Transfers von TCA-Zyklus-Intermediaten an kultivierten Astrozyten und Neuronen, eingesetzt. Für die Aufnahmestudien von [¹⁴C]-Succinat in An- und Abwesenheit verschiedener Effektoren, wurden kultivierte Astrozyten und Neurone aus Wildtyp- und Gcdh ^{-/-}-Mäusen für 10 min mit 0,1 μCi [¹⁴C]-Succinat in Na⁺-haltigem Puffer inkubiert und anschließend die in die Zellen aufgenommene Radioaktivität quantifiziert. Die Internalisierungszeit von 10 min wurde aufgrund einer zeitabhängigen Aufnahmestudie von [¹⁴C]-Succinat in astrozytäre Wildtyp-Zellen, die eine Sättigungskurve ergab, ausgewählt (Lamp et al. 2011). Eine Sättigung der [¹⁴C]-Succinat-Aufnahme konnte nach 30 min Inkubationszeit detektiert werden. Der Inkubationszeitpunkt von 10 min lag in der linearen Phase der Sättigungskurve.

Die Aufnahme von [¹⁴C]-Succinat in Zellen, denen keine Effektoren (Succinat, GA oder 3OHGA) zugesetzt wurden, dienten als Kontrollen. Die aufgenommene Radioaktivität wurde als 100 % referenziert. Zur Kontrolle der Spezifität der Aufnahme von [¹⁴C]-Succinat wurde unmarkiertes Succinat im molaren Überschuss (2 mM) zum Na+haltigen Transportpuffer zugefügt. Durch Zugabe von jeweils 2 mM GA und 30HGA sollte ein möglicher inhibitorischer Effekt der Metabolite auf die [¹⁴C]-Succinat-Aufnahme untersucht werden. Es zeigte sich, dass in Anwesenheit des unmarkierten Succinates nur noch 8-10 % [¹⁴C]-Succinat der Kontrolle in die Astrozyten und nur 2-6 % [¹⁴C]-Succinat in die Neurone internalisiert werden konnte (Abb. 4.2). Dies zeigt dass der beteiligte Transporter durch Substratüberschuss kompetitiv inhibiert werden konnte und verdeutlicht die Spezifität des [¹⁴C]-Succinat-Transportes. Auch die Anwesenheit der Dicarboxylate GA und 3OHGA resultierten in einer stark reduzierten Aufnahme von $[^{14}C]$ -Succinat, sowohl in Astrozyten als auch in Neuronen. Die relative Aufnahme von [¹⁴C]-Succinat in Anwesenheit von GA entsprach in Astrozyten 14-20 % und in neuronalen Zellen 3-6 % der gemessenen Radioaktivität im Vergleich zur Kontrolle. 3OHGA inhibiert die Aufnahme von [14C]-Succinat in Astrozyten und Neurone um 46-50 % bzw. 56-58 % (Abb. 4.2). Die inhibitorische Wirkung der jeweiligen Dicarboxylate auf die [¹⁴C]-Succinat-Aufnahme unterschied sich nicht zwischen Wildtyp- und Gcdh^{-/-}-Zellen. Auch zwischen Astrozyten und Neuronen bestanden keine signifikanten Unterschiede, bezüglich der Menge an aufgenommenen ¹⁴C]-Succinat.



Abb. 4.2: [¹⁴C]-Succinat-Aufnahme in primäre Astrozyten und Neurone Primär kultivierte Astrozyten (A) und Neurone (B) aus Wildtyp- (dunkel gefärbte Balken) und Gcdh^{-/-}-Mäusen (hell gefärbte Balken) wurden mit [¹⁴C]-Succinat in Abwesenheit (Kontrolle) und in Anwesenheit von je 2 mM Succinat, GA oder 3OHGA für 10 min inkubiert. Die Analysen geben den Mittelwert \pm SD aus drei unabhängigen Zellisolationen wider. Signifikanzen wurden mittels Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von einem Scheffè-Test ermittelt, *p<0,05 und **p<0,001; n.s.: nicht signifikant.

Es konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von [¹⁴C]-Succinat durch GA und 30HGA in Astrozyten als auch in Neuronen inhibiert wird.

4.1.3 Einfluss von GA und 3OHGA auf den [¹⁴C]-Succinat-Efflux aus Astrozyten und Neuronen

Zur Untersuchung des Einflusses von GA und 3OHGA auf den Efflux von TCA-Zyklus-Intermediaten wurden Astrozyten und Neurone aus Wildtyp- und Gcdh^{-/-}-Mäusen kultiviert und zunächst für 20 min mit 0,1 µCi [¹⁴C]-Succinat in Na⁺-haltigem Transportpuffer vorbeladen. Anschließend wurden die Zellen gründlich gewaschen und für definierte Efflux-Zeiten (von 0-30 min) mit Transportpuffer ohne Radioaktivität weiter inkubiert. Die während der jeweiligen Efflux-Zeit aus der Zelle ins Medium abgegebene Radioaktivität und die in den Zellen verbleibende Radioaktivität wurden gemessen und beide in Relation zueinander gesetzt. Zum Zeitpunkt von 0 min befand sich das gesamte internalisierte [¹⁴C]-Succinat noch in den Zellen, sodass die Radioaktivität in den Zellen 100 % und die Radioaktivität im Medium 0% gesetzt wurde. Mit zunehmender Inkubationszeit nimmt die Radioaktivität in den Zellen kontinuierlich ab während die Radioaktivität im Medium bis zum Erreichen eines Gleichgewichts zunimmt. Die t½-Effluxzeit beschreibt dabei den Zeitpunkt, bei dem 50 % der ursprünglich internalisierten [¹⁴C]-Succinat-Radioaktivität im Medium messbar ist.



Abb. 4.3: [¹⁴C]-Succinat-Efflux aus primären Astrozyten und Neuronen Primäre Astrozyten, präpariert aus Wildtyp- (A) und Gcdh^{-/-}-Mäusen (B) wurden für 20 min mit [¹⁴C]-Succinat inkubiert. Nach Entfernen des radioaktiven Mediums wurden die Zellen entweder direkt geerntet (t = 0 min) oder mit unmarkiertem Medium für definierte Zeiten weiter inkubiert. Primäre Neurone wurden ebenfalls aus Wildtyp- (C) und Gcdh^{-/-}-Mäusen (D) isoliert und wie die Astrozyten behandelt. Die Radioaktivität wurde in den Zellen (\blacksquare , Wildtyp; \Box , Gcdh^{-/-}) und im Medium (\bigcirc , Wildtyp; \bigcirc , Gcdh^{-/-}) gemessen und der relative Anteil in % dargestellt. Für die Auswertung wurden 4 Experimente (Zeitpunkt 1, 2, 3 und 4 min) bzw. 6 Experimente (Zeitpunkt 0 und 5-30 min) mit unabhängigen Zellpräparationen durchgeführt. Die Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert ± Standardabweichung. Die t½-Effluxzeit beschreibt den Zeitpunkt, bei dem 50 % des initialen [¹⁴C]-Succinates ins Medium transloziert vorliegt.

Die t¹/₂-Effluxzeit in Astrozyten aus Wildtyp-Mäusen betrug 5,6 ± 2,6 min (Abb. 4.3 A). In Astrozyten aus Gcdh^{-/-}-Mäusen war die Ausscheidung von [¹⁴C]-Succinat ins Medium hingegen signifikant verzögert, sodass erst nach 25,2 ± 8,6 min 50 % der initialen Radioaktivität im Medium gemessen werden konnte (Abb. 4.3 B). Ein deutlicher Unterschied zwischen astrozytären Zellen aus Wildtyp- und Gcdh^{-/-}-Mäusen bestand auch in der Menge der verbleibenden Radioaktivität in den Zellen nach Abschluss der 30-minütigen Inkubationszeit. In Wildtyp-Zellen konnte nur noch 20-25 % der initial aufgenommenen Radioaktivität gemessen werden, während noch 40 % des zuvor aufgenommenen [¹⁴C]-Succinates in Gcdh^{-/-}-Zellen verblieb (Abb. 4.3 A und B). Efflux-Studien an primär neuronalen Zellen aus Wildtyp- und Gcdh^{-/-}-Mäusen

zeigten keine signifikanten Unterschiede bezogen auf die t½-Effluxzeit und der in den Zellen verbliebenen Mengen an [¹⁴C]-Succinat. Die berechnete t½-Effluxzeit lag für neuronale Zellen aus Wildtyp-Mäusen bei 13,5 ± 9 min (Abb. 4.3 C) und für neuronalen Zellen aus Gcdh^{-/-}-Mäusen bei 12,6 ± 2,7 min (Abb. 4.3 D) In beiden Zelltypen konnte nach 30 min Inkubation noch 40 % der Anfangsradioaktivität an [¹⁴C]-Succinat in den Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4.3 C und D). Vergleicht man die berechnete t½-Effluxzeit in Astrozyten mit der in Neuronen zeigt sich, dass der Succinat-Efflux aus neuronalen Zellen langsamer im Vergleich zu Wildtyp-astrozytären Zellen verläuft, aber schneller im Vergleich zu Gcdh^{-/-}-astrozytären Zellen.

Parallel durchgeführte HPLC-Analysen der nach 30 min ins Medium abgegebenen Radioaktivität zeigten, dass davon in Astrozyten 80-91 % und in Neurone 67-82 % als radioaktiv markiertes Succinat vorlagen. Der Rest konnte in Form von radioaktiv markierten, metabolisierten Komponenten wie z.B. Glutamat und Fumarat detektiert werden (Lamp et al. 2011).

Zusammenfassend zeigten die Daten, dass das TCA-Zyklus-Intermediat Succinat aus Gcdh-defizienten Astrozyten langsamer und in geringerer Menge in das Medium abgegeben wird als aus Wildtyp-Astrozyten und -Neuronen.

4.1.4 Expression von GA- und 3OHGA-Transportern in Astrozyten und Neuronen

Um Hinweise auf Transporter zu erlangen, die am Efflux und Influx der TCA-Intermediate beteiligt sind, wurden Expressionsanalysen auf mRNA-Ebene durchgeführt. Dabei wurden insbesondere Transporter, die auch GA und 3OHGA transportieren können, berücksichtigt. Bereits bekannte Transporter für GA und 3OHGA, die auch im Gehirn exprimiert werden, sind der Na⁺-abhängige Dicarboxylat-Transporter NaC3 und die organischen Anionen-Transporter OAT1 und OAT4 (Mühlhausen et al. 2008). Da in Mäusen keine homologe Form des humanen OAT4-Transporters vorkommt und die Expression bislang nur in immortalisierten kapillaren Endothelzellen des humanen Gehirns detektiert werden konnte (Kusch-Poddar et al. 2005), wurde dieser Transporter nicht untersucht. Für die Expressionsanalysen von NaC3 und OAT1 mittels quantitativer Real-time PCR wurde RNA aus kultivierten Astrozyten und Neuronen von Wildtyp- und Gcdh^{-/-}-Mäusen untersucht. NaC3 ist ein unidirektionaler Transporter, der Dicarboxylate abhängig vom einwärts gerichteten Na⁺-Gradienten in die Zelle transportiert und stellt somit einen möglichen Transporter für die Aufnahme von TCA-Zyklus-Intermediaten dar. Die relative Expression von NaC3 in den unterschiedlichen Zelltypen wurde auf die NaC3-Expression in Astrozyten aus Widltyp-Mäusen bezogen. Es zeigte sich, dass die Expressionsspiegel an NaC3-Transportern in Wildtyp-Zellen von Astrozyten und Neuronen, sowie in Gcdh^{-/-}-astrozytären Zellen vergleichbar waren. Dagegen war die Expression von NaC3 in neuronalen Zellen aus Gcdh^{-/-}-Mäusen um das 4,2-fache im Vergleich zu neuronalen Zellen aus Wildtyp-Mäusen hochreguliert (Abb. 4.4).



Abb. 4.4: Relative mRNA-Expression von NaC3 in primären Astrozyten und Neuronen RNA aus Astrozyten und Neuronen aus Wildtyp- und Gcdh^{-/-}-Mäusen wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die relative mRNA-Expression von NaC3 wurde mittels quantitativer RT-PCR in Triplikaten aus insgesamt 6 unabhängigen Zellpräparationen ermittelt. Der mRNA-Spiegel von Aktin wurde als Referenz eingesetzt und die relative Expression in Wildtyp-Astrozyten gleich 1 gesetzt. p<0,05 und *p<0,001.

OAT1 ist ein Antiporter, der bei Aufnahme organischer Anionen in die Zelle gleichzeitig Dicarboxylate hinausschleusen kann. OAT1 stellt somit einen potentiellen Kandidaten für die Vermittlung des Efflux von TCA-Zyklus-Intermediaten aus Astrozyten dar. Die Auswertung der quantitativen Real-time-PCR bezüglich der Expression von OAT1 zeigte jedoch, dass der Transporter in Astrozyten nicht exprimiert wurde. In neuronalen Wildtyp- und Gcdh^{-/-}-Zellen wurde OAT1 im Vergleich zu Nierenzellen und Gesamtzellextrakten aus Kortex und Hirnstamm nur sehr schwach exprimiert (Tab. 4.1). Die Expression von OAT1 wurde aufgrund der geringen Expression in Astrozyten und Neuronen in Form des Δ CT-Wertes angegeben. Der CT-Wert ("cycle of treshold") definiert den Zyklus der PCR, bei dem erstmals ein

exponentieller Anstieg des PCR-Produktes auftritt. Je kleiner der CT-Wert, desto eher kann der Schwellenwert zum exponentiellen Anstieg erreicht werden und desto mehr Kopien entstehen in den Polymerisierungszyklen. Der CT-Wert korreliert dabei mit der Menge der cDNA des zu amplifizierenden Produktes (hier OAT1). Je mehr verfügbare cDNA vorhanden ist, desto kleiner der CT-Wert. Für die weitere Auswertung und Vergleichbarkeit der einzelnen Proben wurde die Differenz zwischen dem CT-Wert von OAT1 und dem Kontrollgen β -Aktin gebildet (Δ CT-Wert). Die umgeschriebene cDNA aus Wildtyp- und Gcdh^{-/-}-astrozytären Zellen zeigte dabei keine messbare OAT1-Amplifikatmenge. Der Δ CT-Wert in neuronalen Wildtyp- und Gcdh^{-/-}-Zellen war mit 21,7 bzw. 19,0 sehr hoch, was auf eine geringe Expression von OAT1 in diesen Zellen hinweist. In Nierengewebe, wo OAT1 in der basolateralen Membran von Tubuluszellen vorkommt, war der Δ CT-Wert wie zu erwarten mit 2,0 sehr niedrig und diente zusammen mit den Zellextrakten aus Kortex und Hirnstamm als Positiv-Kontrolle für die quantitative Real-time PCR von OAT1.

RNA wurde aus Astrozyten und Neuronen aus Wildtyp-Mäusen und Gcdh^{-/-}-Mäusen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Als Kontrolle diente umgeschriebene RNA aus Nierengewebe und Gesamtzellextrakten aus Kortex und Hirnstamm, präpariert aus Wildtyp-Mäusen. Die Expression von OAT1 wurde mittels quantitativer RT-PCR in Triplikaten aus insgesamt 3 unabhängigen Zellpräparationen ermittelt und aufgrund der zu geringen Expression von OAT1 in Astrozyten und Neuronen in Form von Δ CT-Werten aufgelistet. Als Referenzgen wurde Aktin verwendet.

Gewebe / Zellen (Genotyp)	∆ CT-Wert
astrozytäre Zellen (Wildtyp)	_ ^b
astrozytäre Zellen (Gcdh-/-)	_ ^b
neuronale Zellen (Wildtyp)	$21,7 \pm 0,6$
neuronale Zellen (Gcdh ^{-/-})	$19,0\pm0,6$
Niere (Wildtyp)	$2,0 \pm 0,9$
Kortex (Wildtyp)	$11,4 \pm 0,2$
Hirnstamm (Wildtyp)	$10,8 \pm 1,1$

^bAufgrund fehlender OATI-cDNA in Astrozyten aus Gcdh^{-/-} und Wildtyp-Mäusen, konnte kein CT-Wert und somit auch kein Δ CT-Wert ermittelt werden.

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass 1.) in Gegenwart von GA und 30HGA die Aufnahme von [¹⁴C]-Succinat in neuronale Zellen inhibiert ist, und 2.) der Efflux von [¹⁴C]-Succinat aus Gcdh-defizienten-Astrozyten im Vergleich zu Wildtyp-Zellen stark verzögert verläuft. Expressionsanalysen zeigten, dass 3.) die Expression des NaC3-Transporters in Gcdh-defizienten neuronalen Zellen im Vergleich zu Wildtyp-

Zellen stark erhöht ist und 4.) OAT1 in Astrozyten nicht exprimiert wird, sodass OAT1 als Kandidat für die Vermittlung des Efflux von Succinat aus Astrozyten nicht in Frage kommt.

4.2 Analyse ausgewählter GCDH-Mutationen

Mehr als 150 krankheitsverursachende Mutationen im *GCDH*-Gen sind bekannt, wobei bislang keine Korrelation zwischen dem Genotyp und dem klinischen Phänotyp der Krankheit festgestellt werden konnte (Goodman et al. 1998; Schwartz et al. 1998; Busquets et al. 2000). Die meisten Mutationen führen zu einem vollständigen Verlust der enzymatischen GCDH-Aktivität, gemessen in Patientenfibroblasten (Christensen et al. 2004). Es sind nur wenige Mutationen bekannt, die mit einer GCDH-Restaktivität von über 10 % assoziiert sind. Eine dieser Ausnahmen stellt die Mutation p.Met263Val dar. In Fibroblasten des Patienten konnte eine GCDH-Restaktivität von 30 % nachgewiesen werden (Mühlhausen et al. 2003). Warum trotz des milden biochemischen Phänotyps, ein schwerwiegender klinischer Verlauf bei dem Patienten beobachtet wurde, ist unklar und bedarf weiterer Analysen.

Die mutierte Aminosäure Met263 ist an der Oberfläche des GCDH-Proteins lokalisiert. In Quervernetzungsexperimenten war ein verändertes heteromeres Oligomerisierungsder Mutation p.Met263Val gegenüber dem GCDH-Wildtyp-Protein muster nachweisbar. Dies führte zur Vermutung, dass der Aminosäurerest Met263 an der Bindung von bisher unidentifizierten Proteinen beteiligt sein könnte (Keyser et al. 2008b). Zur genaueren Analyse der angenommenen Protein-Protein-Interaktion sollten im zweiten Teil der Arbeit Mutationen die räumlich in der Nähe des Aminosäurerestes Met263 lokalisiert sind, in die GCDH-DNA eingefügt und für weitere Analysen in BHK-Zellen überexprimiert werden (Abb. 4.5 A). Folgende Punkt-Mutationen, die zu einem Aminosäureaustausch führen, wurden in die cDNA der humanen GCDH, die Cterminal mit einem myc-Tag fusioniert war, in den Vektor pcDNA6.2 eingefügt: p.Pro182Ala, p.Thr211Ala, p.Pro248Leu, p.Asn392Asp und p.Asn392Ala. Für die Erstellung der Mutanten wurde die cDNA der "precursor" GCDH-Form, in der das Transportsignal für die Translokation des Proteins ins Mitochondrium am N-Terminus vorliegt, verwendet (Abb. 4.5). Der Aminosäurerest Asn392 liegt nur in der dimeren GCDH-Form in räumlicher Nähe zu Met263. Neben der Aktivität und Expression der

GCDH-Mutanten wurde auch die homo- und heteromere Protein-Wechselwirkung untersucht.



Abb. 4.5: Übersicht ausgewählter GCDH-Oberflächenmutationen

(A) Oberflächenpräsentation der für die Punktmutationen ausgewählten Aminosäuren, anhand der GCDH-3D-Struktur. Kohlenstoffe des GCDH-Cofaktors FAD (orange) und des Glutaryl-CoAs (blau) sind in "Stick"-Form dargestellt und befinden sich im aktiven Zentrum. Betrachtet wird die monomere Form des GCDH-Proteins. Asn392 liegt nur bei Betrachtung der dimeren Form in räumlicher Nähe zum Met263 des korrespondierenden zweiten GCDH-Proteins. (B) Schematische Darstellung des GCDH-Vorläuferproteins mit insgesamt 438 Aminosäuren. Die ersten 44 Aminosäuren (blau) dienen als Transportsignal für die Translokation der GCDH ins Mitochondrium und werden unter Bildung der reifen Form abgespalten. Die Positionen der mutierten Aminosäuren sind gekennzeichnet, wobei sich die Nummerierungen auf das GCDH-Vorläuferprotein beziehen.

Zwei der ausgewählten Mutationen, p.Pro248Leu und p.Asn392Asp, wurden wie p.Met263Val in Patienten als pathogene Mutationen beschrieben. Bei der Mutation p.Pro248Leu handelt es sich um eine Mutation, die mit einer hohen Häufigkeit in türkischen Patienten auftritt (Zschocke et al. 2000).

4.2.1 3D-Strukturanalyse

Um Einsicht in die Rolle der jeweiligen Mutationen auf struktureller Ebene zu bekommen, wurden mit Hilfe der bekannten Kristallstruktur des GCDH-Proteins (Fu et al. 2004) und der Software PYMOL die Veränderungen der Oberflächenstruktur und des Oberflächenpotentials durch Einfügen der Mutationen im Vergleich zum Wildtyp-Protein *in silico* berechnet und im 3D-Modell dargestellt (Abb.4.6).



Mit dem Programm PYMOL wurde die 3D-Struktur der Mutationen im GCDH-Protein dargestellt. Die einzelnen substituierten Aminosäurereste werden durch gestrichelte Kreise gekennzeichnet. Gelb: Schwefel enthaltende Aminosäuren (Methionin und Cystein); Blau: positives Oberflächenpotential; Rot: negatives Oberflächenpotential; Weiß: neutrales Oberflächenpotential.

Die Substitutionen der an der Oberfläche des GCDH-Proteins lokalisierten Aminosäurereste zeigten in allen fünf Fällen im Vergleich zum Wildtyp-Protein keine Auswirkungen auf die Sekundär- bzw. Tertiärstruktur des GCDH-Proteins. Die Substitution des unpolaren Aminosäurerestes Pro182 mit der ebenfalls unpolaren Aminosäure Ala führte zu keinen signifikanten Änderungen des Oberflächenpotentials. Hingegen zeigte der Austausch der polaren Aminosäure Thr an Position 211 durch Ala erwartungsgemäß eine Änderung des neutralen Oberflächenpotentials zu einem negativen Potential. Die Mutation p.Pro248Leu führte zur Substitution eines kleinen, heterozyklischen und unpolaren Aminosäurerestes mit einem ausgestreckten, aliphatischen, ebenfalls unpolaren Aminosäurerestes. Dementsprechend wurde keine Änderung des Oberflächenpotentials, sondern nur eine Erweiterung der Oberflächenstruktur beobachtet. Die Substitution des polaren Aminosäurerestes Asn392 unpolaren Aminosäurerest Ala bewirkte eine Neutralisierung des mit dem Oberflächenpotentials. Hingegen führt der Austausch von Asn392 mit der ebenfalls polaren, aber sauren Aminosäure Asp zu einer Verschiebung in Richtung negativen Oberflächenpotentials.

4.2.2 Expressionsanalyse und Protein-Aktivitätsmessung

Da "Missense"-Mutationen neben strukturellen Veränderungen auch die Stabilität des Proteins beeinflussen können, wurden im Weiteren Expressionsanalysen der einzelnen GCDH-Mutanten durchgeführt. Hierfür wurden BHK-Zellen mit der cDNA des Widltyp-Proteins und der mutanten GCDH im eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA6.2 transient transfiziert. Nach Proteinexpression von 24h wurden die Zellextrakte über GCDH-spezifischen Western Blot analysiert.





Für die Expressionsanalyse wurden BHK-Zellen jeweils mit cDNA von Wildtyp-GCDH oder der GCDH-Mutanten transfiziert. Nach 24 h wurden Zellextrakte präpariert und Aliqouts mit gleichen Proteinmengen (100 μ g) durch SDS-PAGE (10 % Acrylamid) aufgetrennt und über einen GCDH-spezifischen Western Blot analysiert. Die densitometrisch ermittelten Intensitäten der GCDH-Formen wurden auf die Ladekontrolle MnSOD normalisiert und als 100 % der Wildtyp-Expression ausgedrückt. Untransfizierte Zellen dienten als Spezifitätsnachweis des Antikörpers.

Sowohl die Wildtyp-GCDH als auch die mutanten GCDH-Proteine konnten als Monomer (44 kDa) detektiert werden (Abb. 4.7). Für die Quantifizierung der Expression wurden die Signalintensitäten auf die des GCDH-Wildtyps bezogen und die einzelnen Intensitäten auf das mitochondriale Matrixprotein MnSOD, das als Ladekontrolle fungierte, normalisiert. Die Expression aller Mutanten war im Vergleich zur Wildtyp-GCDH vermindert, was entweder auf eine reduzierte Synthese der mutanten GCDH oder auf ihren verstärkten Abbau durch Proteasen hindeutet. Am stärksten war die Expression der Mutanten p.Met263Val und p.Pro248Leu mit 31 bzw. 21 % reduziert. Die Mutationen p.Pro182Ala und p.Thr211Ala führten zu einem relativen Expressionsverlust von 17 und 38 % gegenüber der Wildtyp-GCDH. Die Substitution der Aminosäure Asn392 durch Asp oder Ala führte in beiden Fällen zu einer Herabsetzung der Expression von 40-50 % im Vergleich zum Wildtyp-Protein. In untransfizierten Zellextrakten war keine GCDH-Expression nachweisbar.

Um den Effekt der Mutationen auf die enzymatische Aktivität des Proteins zu bestimmen, wurden die einzelnen Mutanten und das Wildtyp-GCDH-Protein erneut in BHK-Zellen überexprimiert und die enzymatische GCDH-Aktivität in den Zellen gemessen (Dr. Ernst Christensen, Kopenhagen (Christensen 1983)). Untransfizierte Zellen dienten als Kontrolle der endogenen GCDH-Aktivität in BHK-Zellen. Der Aktivitätstest basiert auf der Umsetzung von radioaktiv markiertem Glutaryl-CoA ([1,5-¹⁴C]-Glutaryl-CoA) zu Crotonyl-CoA, bei der ¹⁴CO₂ freigesetzt wird und quantifiziert werden kann.

GCDH Variante	Aktivität (% vom Wildtyp)
Wildtyp	100 ^a
Untransfiziert	0 ^b
p.Met263Val	14,9
p.Pro182Ala	52,7
p.Thr211Ala	75,5
p.Pro248Leu	9,6
p.Asn392Asp	0
p.Asn392Ala	0

 Tab. 4.2: Enzym-Aktivitätsmessung von Wildtyp- und mutanter GCDH

^aDie GCDH-Aktivität von Wildtyp-GCDH-exprimierenden BHK-Zellen betrug 21.95 μ mol ¹⁴CO₂/h/g Protein. ^bDie endogene GCDH-Aktivität in untransfizierten Zellen betrug 2,27 μ mol ¹⁴CO₂/h/g Protein und wurde von den Wildtyp- und Mutanten-Messwerten abgezogen.

Die gemessenen GCDH-Aktivitäten wurden, nach Abzug der in den untransfizierten Kontrollzellen bestimmten endogenen GCDH-Aktivität, auf die Wildtyp-Aktivität (100 %) bezogen. Die Restaktivität der Mutation p.Met263Val entsprach mit 14,9 % der Größenordnung der in Fibroblasten von Patienten gemessenen Werte und war mit vorausgehenden Studien (Keyser et al. 2008b) vergleichbar. Die Mutationen p.Pro182Ala und p.Thr211Ala zeigten sehr hohe enzymatische Restaktivitäten von 52,7 bzw. 75,5 % im Vergleich zum Wildtyp-Protein. Die Mutation p.Pro248Leu, die wie p.Met263Val schon zu einer geringeren Expression führte, war mit einer enzymatischen Restaktivität von 10 % gegenüber der Wildtyp-Kontrolle assoziiert. Die beiden Mutationen des Asn392-Restes führten zur vollständigen enzymatischen Inaktivierung des GCDH-Proteins.

4.2.3 Untersuchung zur homo- und heteromeren Protein-Komplexbildung

In vorausgehenden Arbeiten konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass GCDH-Monomere nicht nur Homotetramere bilden können, sondern auch heteromere Proteinkomplexe mit bisher unidentifizierten Interaktionspartnern (Keyser et al. 2008b). Diese heteromeren Komplexe waren bei der Mutante p.Met263Val im Vergleich zum Wildtyp-GCDH stark vermindert, sodass der an der Oberfläche des GCDH-Proteins gelegene Aminosäurerest Met263 möglicherweise an der Interaktion der GCDH mit anderen Proteinen beteiligt ist. Um die postulierte Protein-Protein-Interaktionsstelle weiter zu charakterisieren, wurden die hier erstellten GCDH-Mutanten, die in räumlicher Nähe zu Met263 lokalisiert sind, durch Quervernetzungsexperimente analysiert. Für die Quervernetzung von Proteinen wurde der chemische "Crosslinker" BS³ eingesetzt, der freie Aminogruppen im Abstand von 11,4 Å kovalent miteinander verbindet. Die resultierenden Proteinkomplexe weisen somit auf die räumliche Nachbarschaft der Einzelkomponenten hin und können Aufschluss über die Struktur von Multiproteinkomplexen geben.



Abb. 4.8: Protein-Komplexbildung von Wildtyp- und mutanter GCDH BHK-Zellextrakte mit überexprimiertem GCDH-Wildtyp-Protein und den sechs GCDH-Mutanten wurden in An- und Abwesenheit von 200 µM des chemischen "Crosslinkers" BS³ inkubiert. Die Protein-Lysate (100 µg) wurden anschließend mit einem Tris-Tricin-Gel (10 % Acrylamid) aufgetrennt und über einen GCDH-spezifischen Western Blot analysiert. ◀ heteromere GCDH-Komplexe; * mono-, ** di- und *** tetramere GCDH-Form.

Für die Quervernetzungsexperimente wurden Extrakte von BHK-Zellen, die für 24 h das Wildtyp- und die mutanten GCDH-Proteine überexprimierten, in An- und

Abwesenheit von 200 μ M BS³ inkubiert und mittels GCDH-spezifischen Western Blot analysiert. Als spezifische Kontrolle des Antikörpers dienten untransfizierte Zellen. Neben dem 44 kDa GCDH-Monomer, sollten auch die zu erwartenden homomeren GCDH-Dimere (88 kDa) bzw. Tetramere (176 kDa) und die zuvor beim GCDH-Wildtyp beobachteten heteromeren 100, 140 und 200 kDa Proteinkomplexe nach Inkubation mit BS³ nachgewiesen werden (Abb. 4.8, (Keyser et al. 2008b)).

Die Substitution der Aminosäuren Pro182 und Thr211 durch Ala führte in den Quervernetzungsexperimenten zu keinen Veränderungen des Oligomerisierungsmusters im Vergleich zum Wildtyp-Protein. Sowohl die Homo-Oligomerisierungsformen als auch die heteromeren 100, 140 und 200 kDa Komplexe konnten bei beiden Mutanten im Western Blot detektiert werden (Abb. 4.8A) Bei der Mutation p.Pro248Leu konnte hingegen nach Inkubation mit BS³ nur noch die schwach exprimierte monomere GCDH-Form beobachtet werden. Die tetramere GCDH-Form, in der das Protein funktional vorliegt, und die heteromeren Protein-Komplexe konnten nicht beobachtet werden (Abb. 4.8A). Der Austausch der Aminosäure Asn392 zu Asp oder Ala zeigte ebenso wie die Mutation p.Met263Val im Vergleich zu GCDH-Wildtyp ein verändertes Bandenmuster nach Quervernetzung. Die dimere GCDH-Struktur konnte in allen drei Fällen gebildet werden, jedoch nicht der funktionale tetramere GCDH-Komplex. Von den drei heteromeren Komplexbanden, die vom Wildtyp-GCDH gebildet werden, konnte bei der Mutation p.Asn392Asp keine, bei p.Asn392Ala die 100 kDa und 140 kDa Bande und bei der Mutation p.Met263Val nur die 100 kDa Bande detektiert werden (Abb. 4.8B).

Da die Substitution weiterer Aminosäurereste in räumlicher Nähe zu Met263 ebenfalls eine Reduktion der heteromeren Komplexbildung verursacht, wird die Relevanz der Oberflächenregion um Met263 als mögliche Bindungsstelle für GCDH-Interaktionspartner unterstrichen.

4.3 Identifizierung von GCDH-Interaktionspartnern

Im Abschnitt 4.2 konnte gezeigt werden, dass einige der ausgewählten GCDH-Mutationen mit relativ hohen Enzym-Restaktivitäten und strukturellen Veränderungen der Proteinoberfläche, wie p.Met263Val, die Tetramerisierung und die heteromere Komplexbildung mit bislang nicht identifizierten Bindungspartnern verhindern oder beeinträchtigen. Im Weiteren wurde untersucht, welche Proteine als mögliche Interaktionspartner für das GCDH-Protein in Frage kommen.

4.3.1 Das Elektron-Transfer Flavoprotein (ETF)

Bei der katalytischen Umsetzung von Glutaryl-CoA zu Crotonyl-CoA fungiert das Elektron-Transfer-Flavoprotein (ETF) als Elektronenakzeptor für GCDH (Abb. 1.3). Aufgrund dieser funktionalen Nähe kann ETF daher als ein möglicher Interaktionspartner von GCDH angesehen werden. ETF setzt sich aus zwei Untereinheiten α ETF (36 kDa) und β ETF (28 kDa), sowie einem FAD-Molekül zusammen und transferiert entgegengenommene Elektronen über das FAD-Molekül zum Ubichinon in der Atmungskette (Watmough et al. 2010). Im folgenden Abschnitt werden *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen zum Nachweis der Interaktion zwischen ETF und GCDH vorgestellt.

4.3.1.1 "Pull-Down" mit GCDH und ETF

Beim "Pull-Down" Experiment handelt es sich um eine *in vitro*-Methode, mit der die Interaktion zwischen einem in *E. coli* überexprimierten Fusionsprotein ("Bait") und einem möglichen Interaktionspartner aus Zelllysaten ("Prey") analysiert werden kann. Als "Bait" wurden die Untereinheiten von α ETF und β ETF als C-terminale (His)₆-Fusionsproteine verwendet. Die entsprechenden cDNAs wurden hierfür in den Vektor pET28a(+) kloniert, in *E. coli* überexprimiert und über den His-Tag an Ni-NTA-Agarose immobilisiert. Anschließend wurden die vorbereiteten Säulen mit α ETF- bzw. β ETF-Matrix, mit verschiedenen BHK-Zelllysaten inkubiert (Abb. 4.9). BHK Zellen wurden hierfür mit cDNA für GCDH-myc, LC3-GFP und mit β ETF-myc transient transfiziert. Das zytosolische Protein LC3-GFP diente als Negativkontrolle und der Nachweis der direkten Interaktion zwischen α ETF und β ETF, die als Protein-Komplex agieren, diente als Positiv-Kontrolle. Pro Säule wurden 300 µg Protein aus den BHK-
Zelllysaten (gelöst in Triton X-100; Input) mit 200 μl αETF- bzw. βETF-Matrix inkubiert. Nicht-gebundenes Material wurde als Durchflussfraktion gesammelt. Anschließend wurde die Matrix mit 10-fachem Volumen Waschpuffer gespült (W1-W10) und danach direkt solubilisiert (Eluat). Aliquots der Input-, der Durchfluss- und der verschiedenen Waschfraktionen, sowie die vollständige Elutionsfraktion wurden über SDS-PAGE aufgetrennt. Die Analyse der Fraktionen erfolgte mit Western Blot und Antikörpern, die gegen die "Prey"-Proteine gerichtet waren (Abb. 4.9).





Die His-getaggten Proteine α ETF (A) und β ETF (B) wurden in *E. coli* überexprimiert und an Ni-NTA-Agarose immobilisiert. Die α ETF- bzw. β ETF-Matrix wurden anschließend mit Triton X-100 löslichen Überständen aus BHK-Zellen (300 µg) die GCDH-myc, LC3-GFP oder β ETF-myc exprimierten, inkubiert (Input 10 Vol.-%). Ungebundenes Material wurde im Durchfluss aufgefangen (10 Vol.-%). Unspezifisch gebundenes Material wurde durch Waschen der Säulen (10 x 200 µl Waschpuffer) entfernt (W2, W6, W10 jeweils 25 Vol.-%). Die Elution der Protein-Interaktionskomplexe erfolgte durch Aufkochen der α ETF- bzw. β ETF-Matrix für 5 min bei 95 °C in Solubilisierungspuffer. Die Analyse erfolgte nach Auftrennung durch SDS-PAGE (10 % Acrylamid) mittels Western Blot und Antikörper gegen GCDH, LC3 und β ETF.

In den Elutionsfraktionen mit α ETF (Abb. 4.9 A) und β ETF (Abb. 4.9 B) als "Bait" und GCDH als "Prey" konnte im GCDH-spezifischen Western Blot in beiden Fällen eine

Bande detektiert werden. Die densitometrische Auswertung des Western Blots ergab, dass 7,7 bzw. 7,4 % des gelösten GCDH-Proteins vom Input mit α ETF bzw. β ETF interagierte. Das gelöste LC3-Protein zeigte erwartungsgemäß keine Interaktion mit einem der beiden "Bait"-Proteine. Ebenfalls konnte erwartungsgemäß eine Bindung von β ETF an α ETF, mit 5,4 % der Gesamtmenge (Input) an β ETF, detektiert werden.

4.3.1.2 "Protein-Fragment Complementation Assay" mit GCDH und ETF

Zur Verifizierung der Interaktion von GCDH mit den Untereinheiten des ETF-Proteins wurde als zweite, unabhängige Methode der "Protein-Fragment-Complementation-Assay" (PCA) angewendet (Nyfeler et al. 2007). PCA ist eine zellbiologische Methode zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen *in vivo*.

Für die PCA-Methode wird die cDNA für das gelb fluoreszierende Reporter-Protein ("Yellow fluorescent Protein": YFP) in zwei Fragmente YFP1 und YFP2 getrennt. Die Fragmente wurden als Fusionsproteine mit der cDNA von GCDH oder α - bzw. β ETF in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1 kloniert. Anschließend wurden die Konstrukte in BHK-Zellen kotransfiziert. Bei erfolgreicher Protein-Interaktion zwischen GCDH und α - bzw. β ETF kommen auch die YFP-Fragmente YFP1 und YFP2 in räumliche Nähe und können sich zu einem funktionalen Protein rekonstituieren und in Form eines Fluoreszenzsignals mikroskopisch detektiert werden (Abb. 4.10).



Abb. 4.10: Schematische Darstellung des Protein-Fragment-Complementation-Assays (PCA)

In einem Vorexperiment wurden die cDNA der erstellten Fusionsproteine zunächst einzeln in BHK-Zellen transfiziert und die Expression im Western Blot überprüft (Abb. 4.11A). Das Konstrukt pcDNA3-MCFD2-YFP2 (freundlicherweise von H.P. Hauri, Biozentrum Basel, zur Verfügung gestellt) wurde als Negativkontrolle eingesetzt. Das Protein MCFD2 ("multiple coagulation factor deficiency protein 2") bildet zusammen mit dem ERGIC-53-Protein ("endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein of 53 kDa") einen "Cargo"-Rezeptor, der spezifisch Proteine vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat transportiert (Nyfeler et al. 2007).

Die YFP1-Fusionsproteine wurden im Western Blot mit Protein-spezifischen Antikörpern (GCDH- bzw. βETF-Antikörper) nachgewiesen. Zur Detektion der exprimierten YFP2-Fusionsproteine konnte aufgrund der Homologie von YFP2 zu GFP ("Green fluorescent Protein") ein anti-GFP-Antikörper eingesetzt werden. Alle zu untersuchenden Proteine konnten entsprechend ihrer Molekülmasse im Western Blot detektiert werden (Abb. 4.11 A).



Abb. 4.11: PCA zum Nachweis der Interaktion von GCDH mit aETF und BETF

(A) Expressionsanalyse der verwendeten YFP-Fusionsproteine. BHK Zellen wurden einzeln mit der cDNA der angegebenen Fusionsproteine transfiziert und Zellextrakte (30 μg) über SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt. Die Expression wurde mit Protein-spezifischen Antikörpern (GCDH und βETF) bzw. bei den YFP2-Fusionsproteinen mit dem GFP-Antikörper im Western Blot detektiert. Die Massen der jeweiligen Fusionsproteine sind darunter schematisch dargestellt. (B1-B6) Mikroskopische Aufnahme von Fluoreszenzsignalen der mit cDNAs der YFP-Fusionsproteine transfizierten BHK-Zellen. Nach Transfektion wurden die Zellen mit PFA fixiert und die Zellkerne mit DAPI angefärbt. Zellen die nur mit einem der YFP-Fragmente (GCDH-YFP1; B1) oder aber mit nicht interagierenden YFP-Fusionsproteinen (GCDH-YFP1; B2) transfiziert wurden, zeigten kein Fluoreszenzsignal.

Für die eigentliche Protein-Protein-Interaktionsstudie wurden BHK-Zellen mit den zu untersuchenden cDNAs der YFP-Fusionsproteine transfiziert bzw. kotransfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen durch Fluoreszenzmikroskopie-Analyse untersucht. BHK-Zellen, die mit GCDH-YFP1 allein oder aber mit cDNAs von GCDH-YFP1 + MCFD2-YFP2 zusammen transfiziert wurden, dienten als Negativ-Kontrolle. Das Fragment YFP1 allein sollte, wie oben beschrieben, aufgrund fehlender Funktionalität des Proteins in Abwesenheit von YFP2 kein Fluoreszenzsignal bilden. Erwartungsgemäß in GCDH-YFP1 exprimierenden und DAPI-angefärbten Zellen kein war Fluoreszenzsignal nachweisbar (Abb. 4.11 B1). Bei der zweiten Negativ-Kontrolle konnte aufgrund fehlender Protein-Protein-Interaktion zwischen der mitochondrialen GCDH und dem zytosolischen MCFD2 ebenfalls kein funktionales YFP ausgebildet und somit auch kein Fluoreszenzsignal detektiert werden (Abb. 4.11 B2). Die Kotransfektionen der Fusionsproteine GCDH-YFP1 + GCDH-YFP2 sowie αETF-YFP2 + βETF-YFP1 dienten als Positiv-Kontrolle aufgrund der Homo-Oligomerisierung der GCDH und der heteromeren Komplexbildung zwischen den ETF-Untereinheiten. In beiden Kontrollen konnten in 30-40 % der transfizierten Zellen mikroskopisch gelbe Fluoreszenzsignale, die das typische mitochondriale Netzmuster zeigten, aufgenommen werden (Abb. 4.11 B3 und B4). Nach Transfektion der BHK-Zellen mit cDNAs von GCDH-YFP1 und aETF-YFP2 bzw. BETF-YFP2 konnte durch die Proteinbindung von GCDH an die a- bzw. ßETF-Untereinheiten, YFP rekonstituiert und mikroskopisch detektiert werden (Abb. 4.11 B5 und B6). Weshalb die Interaktion zwischen GCDH-YFP1 mit aETF-YFP2 ein punktförmiges Fluoreszenzsignal und nicht wie bei GCDH-YFP1 mit βETF-YFP2 eine typische mitochondriale Färbung ergibt, bleibt zu klären.

4.3.1.3 Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie der GCDH-ETF-Interaktion

Für die Quantifizierung von Bindungsaffinitäten zwischen GCDH und ETF wurde die Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR) mit dem BIAcore 3000 Biosensor eingesetzt. Hierbei wird die Interaktion eines an der Sensoroberfläche immobilisierten Reaktionspartners (= Ligand) mit einem sich in Lösung befindlichen Bindungspartner (= Analyt), der in einem kontinuierlichen Fluss über die Sensoroberfläche am Liganden vorbeigeleitet wird, untersucht. Der BIAcore 3000 Biosensor verfügt über 4 Flusszellen, die unabhängig voneinander angesteuert werden können. Somit konnten α ETF und β ETF, sowie die Aminosäure Lysin als Negativ-Kontrolle, gemeinsam an einen CM5-Sensorchip kovalent über freie Aminogruppen gekoppelt werden. Anschließend wurde GCDH in unterschiedlichen Konzentrationen über die vier Flusszellen an den immobilisierten Proteinen vorbei geleitet und die Bindungsparameter an diese quantifiziert.

Voraussetzung für die Interaktionsmessungen mit einem Biosensor war eine hohe Reinheit der zu testenden Liganden und des Analyten. Die cDNA der Liganden αETF bzw. βETF wurde hierfür als GST-Fusionsproteine in den Vektor pGEX4T_2 kloniert und nach Überexpression in *E. coli* unter Verwendung von Glutathion-Agarose aufgereinigt. Die cDNA der GCDH wurde in den Vektor pET28a(+) kloniert und nach Überexpression in *E. coli* über einen C-terminalen His-Tag mit Ni-NTA-Agarose aufgereinigt. Für die erfolgreiche Aufreinigung der GST- und His-Fusionproteine wurde eine Kotransformation mit dem Vektor pGroESL, der die Chaperone GroEL und GroES exprimiert, durchgeführt. Die Chaperone vermitteln die korrekte Faltung der Fusionsproteine und zeigen somit stabilisierende Wirkung. Die Reinheit der rekombinanten Proteine wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung überprüft (Abb. 4.12). Alle Proteine zeigten einen hohen Reinheitsgrad, da eine spezifische Bande mit der jeweiligen Molekülmasse der Fusionsproteine nach Coomassie-Färbung detektiert werden konnte.



Abb. 4.12: Aufreinigung von GST- und His-Fusionsproteine für SPR

Die rekombinanten Proteine α ETF und β ETF wurden nach Überexpression in einer 400 ml *E. coli*-Kultur über einen GST-Tag mit Hilfe von Glutathion-Agarose aufgereinigt. GCDH wurde nach Überexpression in ebenfalls 400 ml *E. coli*-Kultur über einen His-Tag mit Hilfe von Ni-NTA-Agarose aufgereinigt. Um die Stabilität der überexprimierten Fusionsproteine zu verbessern, wurden *E. coli*-Zellen mit den Chaperonen GroEL und GroES kotransformiert. Die Reinheit der in 500 µl eluierten Proteine wurde mit SDS-PAGE (10 % Acrylamid) und anschließender Coomassie-Färbung überprüft. Aufgetragen wurden 4 Vol.-% vom Eluat. Rechts sind schematisch die Fusionsproteine mit entsprechender Molekülmasse dargestellt.

Für die SPR-Analyse wurden aETF, BETF und Lysin wie unter Punkt 3.4.14 beschrieben, an den CM5-Sensorchip immobilisiert. Die Bindungsaffinitäten von GCDH an aETF, BETF und Lysin, wurden konzentrationsabhängig ermittelt. Der Analyt GCDH wurde in Konzentrationen von $1 \mu M - 16 \mu M$ für 1 min bei einer Flussgeschwindigkeit von 30 µl/min injiziert. Nach einer kurzen Dissoziationsphase, in der nur Puffer über die Sensoroberfläche floss, wurden anschließend noch gebundene Proteinreste mit 5 - 10 mM NaOH entfernt. In Abb. 4.13 A und B sind exemplarisch die Sensogramme mit der konzentrationsabhängigen Bestimmung der Bindungsaffinität von GCDH αETF bzw. βETF nach Abzug der unspezifisch gemessenen an Resonanzeinheiten der Negativkontrolle Lysin, dargestellt. Je höher die Konzentration von GCDH, desto mehr Protein konnte an aETF oder BETF binden, was durch die Steigung des Resonanzsignals (RU) verdeutlicht wird. Bei einer GCDH-Konzentration von 16 μM wird allmählich der Sättigungsbereich erreicht. An αETF konnte insgesamt weniger GCDH im Vergleich zu ßETF binden. Da die Kopplung von aETF mit 2400 RU im Vergleich zu ßETF mit 4000 RU an die Sensoroberfläche nicht so effizient war, ist der direkte Vergleich der Absolutwerte der Sensogramme nicht möglich.



Abb. 4.13: Sensogramm der Bindung von GCDH an αETF und βETF

(A) Charakterisierung der Bindung von GCDH an α ETF. (B) Charakterisierung der Bindung von GCDH an β ETF. Die aufgereinigten Proteine α ETF und β ETF wurden jeweils mit 10 µg/ml Protein an einen CM5-Sensorchip über freie Aminogruppen immobilisiert. Als Negativ-Kontrolle wurde die Aminosäure Lysin gekoppelt. Für Bindungsstudien wurde der in Lösung befindliche Analyt (GCDH) in unterschiedlichen Konzentrationen für 60 s mit einer Flussgeschwindigkeit von 30 µl/min injiziert und die Bindung in Form von Resonanzeinheiten (RU) gemessen. Zur Normalisierung wurden die für α ETF und β ETF gemessenen Resonanzeinheiten von der Negativ-Kontrolle abgezogen und in Form eines Sensogramms dargestellt.

Mittels BIAcore 3000 BIAevaluation 4.1 Software wurde daher die Dissoziationsgleichgewichtskonstante K_D als Ausdruck der Bindungsaffinität zwischen GCDH und α - bzw. β ETF berechnet. K_D ist dabei der Quotient der Dissoziationskonstante kd und der Assoziationskonstante ka, die durch Messung der unterschiedlichen Konzentrationen des GCDH-Proteins in Form einer nicht-linearen Regression der Sensogramme von der Software berechnet wurden. Der K_D-Wert von GCDH an α - bzw. β ETF entsprach 292 bzw. 264 nM und zeigt somit eine hoch affine Bindung des GCDH-Proteins an die Untereinheiten des ETFs.

Im Abschnitt 4.3.1 konnte mit drei unabhängigen Methoden ("Pull-Down"-, PCA- und SPR-Analyse) erstmals die direkte Interaktion zwischen GCDH und den Untereinheiten des ETF-Proteins verifiziert werden. Dabei zeigte sich durch Quantifizierung der Protein-Wechselwirkungen, dass es sich sowohl bei GCDH und α ETF als auch bei GCDH und β ETF um starke Bindungen handelt.

4.3.2 Wirkung von GCDH-Oberflächenmutationen auf die Interaktion mit ETF

Die Interaktion des Wildtyp-GCDH-Proteins mit den Untereinheiten des ETFs konnte dargestellt werden. Im Weiteren sollte der Einfluss der GCDH-Mutanten p.Pro182Ala, p.Thr211Ala, p.Pro248Leu, p.Met263Val, p.Asn392Asp und p.Asn392Ala (Abb. 4.5) auf die Interaktion mit α - bzw. β ETF durch "Pull-Down"- und SPR-Analyse untersucht werden.

4.3.2.1 "Pull-Down" von GCDH-Mutanten und ETF

Wie in Abschnitt 4.3.1.1 beschrieben wurden Ni-NTA-Säulen mit immobilisiertem α bzw. βETF vorbereitet. Die Säulen wurden anschließend mit Triton X-100 löslichen Extrakten aus BHK-Zellen, die mutante GCDH überexprimieren, inkubiert. GCDH-Wildtyp-Extrakte dienten als Bindungskontrolle und Extrakte aus untransfizierten Zellen als Negativ-Kontrolle. Nach mehrmaligem Waschen der Säulen wurden die an αbzw. BETF gebundenen Proteine durch Aufkochen der Ni-NTA-Agarose in Solubilierungspuffer gelöst und durch SDS-PAGE mit anschließendem GCDHspezifischen Western Blot detektiert (Abb. 4.14 A und B). Die GCDH-Banden wurden densitometrisch quantifiziert und der prozentuale Anteil der gebundenen Mutanten, bezogen auf den Input, berechnet (Abb. 4.14 C). Demnach lagen insgesamt 40 ± 14 % des eingesetzten GCDH Wildtyp-Proteins an aETF gebunden vor, während es bei ßETF nur 24 \pm 15 % der eingesetzten GCDH waren. Unterschiede im prozentualen Anteil des gebundenen Materials im Vergleich zum Wildtyp zeigten sich in Bezug auf die Bindung an aETF bei den Mutanten p.Pro248Leu, p.Asn392Asp und p.Met263Val. Die hier durchschnittlich gebundenen Anteile lagen mit 6 \pm 2 % (p.Pro248Leu), 19 \pm 27 % (p.Asn392Asp) und 21 ± 5 % (p.Met263Val) unterhalb des gebundenen Anteils von GCDH-Wildtyp an αETF. Allerdings unterlagen einige "Pull-Down"-Experimente (z.B. p.Thr211Ala, p.Asn392Asp) großen Schwankungen. Bei den übrigen Mutanten zeigte sich kein Unterschied im Bindungsverhalten an aETF im Vergleich zum GCDH-Wildtyp.



Abb. 4.14: "Pull-Down"-Analyse von α - bzw. β ETF mit GCDH-Mutanten Jeweils acht Säulen mit immobilisierter α ETF- (A) bzw. β ETF-Matrix (B) wurden mit 300 µg Triton X100 löslichen Proteinextrakten aus BHK-Zellen, die die angegebenen GCDH-Mutanten exprimieren, inkubiert. Untransfizierte Zellen dienten als Negativ-Kontrolle. Nach mehrmaligem Waschen der Säulen wurden die an α - bzw. β ETF gebundenen GCDH-Mutanten durch Aufkochen der Ni-NTA-Agarose in 300 µl Solubilisierungspuffer gelöst. Jeweils 1/6 des Inputs (I: 50 µl) und des Eluates (E: 50 µl) wurden für die SDS-PAGE (10 % Acrylamid) aufgetragen. Die über GCDH spezifischen Western Blot detektierten Banden wurden densitometrisch quantifiziert (C). Für die densitometrische Auswertung wurden 3 unabhängige "Pull-Down"-Experimente ausgewertet. Mittelwert ± SD.

In Bezug auf die Bindung an β ETF zeigten die Mutationen p.Thr211Ala und p.Met263Val eine verminderte Bindung im Vergleich zu GCDH-Wildtyp. Mit 5 ± 4 % (p.Thr211Ala) bzw. 15 ± 5 % (p.Met263Val) lag der gebundene Proteinanteil unter dem Anteil des GCDH-Wildtyps. Ebenfalls auffällig in Bezug auf die β ETF-Bindung war

die Substitution von Asn392 zu Ala, die im Vergleich zum Wildtyp-Protein mit 45 \pm 11 % einen erhöhten Anteil gebundenen Proteins aufwies. Der Anteil an β ETF-gebundenem Protein war bei den übrigen Mutanten mit GCDH-Wildtyp vergleichbar.

4.3.2.2 Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie der Wechselwirkung von GCDH-Mutanten mit ETF

Wie im Abschnitt 4.3.1.3 für das Wildtyp-Protein beschrieben, sollten auch die Bindungsaffinitäten ausgewählter, GCDH-Mutanten mit den Untereinheiten des ETF-Proteins ermittelt werden. Die mutanten GCDH-Proteine sollten wie zuvor GCDH-Wildtyp als Analyten über den mit α ETF, β ETF und Lysin gekoppelten CM5-Sensorchip in unterschiedlichen Konzentrationen (1 μ M – 16 μ M) an den immobilisierten Liganden vorbeigeleitet und die Bindung an diese quantifiziert werden. Die mutanten Formen p.Met263Val, p.Pro248Leu und p.Asn392Asp, die aufgrund der Quervernetzungsexperimente ausgewählt wurden, wurden in den Vektor pET28a(+) kloniert und nach Überexpression in *E. coli* über einen C-terminalen His-Tag mit Ni-NTA-Agarose aufgereinigt. Die Reinheit der rekombinanten Proteine wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung überprüft (Abb. 4.15).



Abb. 4.15: Aufreinigung mutanter GCDH für SPR

Die mutanten GCDH wurden nach Überexpression in einer 400 ml *E. coli*-Kultur über einen His-Tag mit Hilfe von Ni-NTA-Agarose aufgereinigt. Um die Stabilität der überexprimierten Fusionsproteine zu verbessern, wurden *E. coli*-Zellen mit den Chaperonen GroEL und GroES kotransformiert. Die Reinheit der in 500 µl eluierten Proteine wurde mit SDS-PAGE (10 % Acrylamid) und anschließender Coomassie-Färbung überprüft. Aufgetragen wurden 4 Vol.-% vom Eluat. Rechts sind schematisch die Fusionsproteine mit entsprechender Molekülmasse dargestellt.

Die Mutante p.Pro248Leu zeigte nach Coomassie-Färbung einen hohen Reinheitsgrad da nur eine spezifische Bande mit der kalkulierten molaren Masse von 43 kDa nachgewiesen wurde. Die Mutanten p.Met263Val und p.Asn392Asp zeigten neben der spezifischen 43 kDa Proteinbande eine zweite Bande bei ca. 60 kDa, die dem kotransfomierten Chaperon GroEL zugeordnet wurde (Abb. 4.15).



Abb. 4.16: Sensogramm der Bindung von mutanter GCDH an aETF und β ETF Für Bindungsstudien wurden die in Lösung befindlichen Analyten (mutante und Wildtyp-GCDH) in unterschiedlichen Konzentrationen für 60 s mit einer Flussgeschwindigkeit von 30 µl/min injiziert und die Bindung in Form von Resonanzeinheiten (RU) gemessen. Hier als Übersicht dargestellt, die jeweiligen Sensogramme bei einer Konzentration der Analyten von 16 µM. (A) Vergleich der Bindung von GCDH-WT und mutanter Formen an aETF. (B) Vergleich der Bindung von GCDH-WT und mutanter Formen an β ETF. WT: Wildtyp-GCDH; M1: p.Pro248Leu; M2: p.Met263Val; M3: p.Asn392Asp.

Die konzentrationsabhängig ermittelten Sensogramme der GCDH-Mutanten zur Quantifizierung der Bindungsaffinität an α ETF bzw. β ETF unterschieden sich nicht signifikant von den Sensogrammen des GCDH-Wildtyps (siehe Abb. 4.13). Zur Veranschaulichung der Unterschiede zwischen mutanter GCDH und GCDH-Wildtyp wurde in Abb. 4.16 A und B die Bindung sowohl an α ETF als auch an β ETF für die Analyt-Konzentration von 16 μ M zusammenfassend dargestellt. Es zeigte sich, dass α ETF und β ETF das GCDH-Wildtyp-Protein in geringeren Mengen als die Mutanten binden, was sich durch reduzierte Resonanzsignale (RU) widerspiegelt. Zum direkten Vergleich wurden die Dissoziationsgleichgewichtskonstanten K_D der einzelnen Mutanten in Bezug auf α - bzw. β ETF berechnet (Tab. 4.3).

	αETF	βETF
Wildtyp	292 nM	264 nM
p.Pro248Leu	259 nM	89 nM
p.Met263Val	369 nM	262 nM
p.Asn392Asp	313 nM	0,8 nM

Tab. 4.3: Übersicht der K_D-Werte für die Bindung von GCDH an αETF bzw. βETF

Es zeigte sich, dass die Bindungsaffinität von GCDH-Wildtyp an aETF mit denen der Mutanten vergleichbar war. Die einzigen Unterschiede in den Bindungsaffinitäten im Vergleich zum Wildtyp wurden für die GCDH-Mutanten p.Pro248Leu und p.Asn392Asp an ßETF gemessen, die niedrigere K_D-Werte aufwiesen. Da die nichtzugehörigen Sensogramme stark lineare Regression der vom eigentlichen Kurvenverlauf abwich (Daten nicht gezeigt) sollten die Werte mit Vorsicht behandelt werden. Insgesamt konnten mit dem BIAcore 3000 Biosensor die zuvor durch "Pull-Down"-Experimente (Abschnitt 4.3.2.1) gemessenen Unterschiede in der Bindungsstärke einzelner GCDH-Mutanten im Vergleich zu GCDH-Wildtyp, nicht bestätigt werden.

Im Abschnitt 4.3.2 wurde eine mögliche Beteiligung ausgewählter Aminosäurereste des GCDH-Proteins an der Bindung von α ETF bzw. β ETF überprüft. Die "Pull-Down"-Experimente ließen aufgrund reduzierter Bindungen der GCDH-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp-Protein, auf eine Beteiligung der Aminosäurereste Pro248, Met263 und eventuell Asn392 an der Bindung von α ETF schließen. Für die Bindung von β ETF scheinen die Aminosäurereste Thr211, sowie Met263 wichtig zu sein. In den SPR-Analysen zeigte jedoch keine der untersuchten GCDH-Mutanten reduzierte Bindungsaffinitäten an α ETF bzw. β ETF im Vergleich zu GCDH-Wildtyp.

4.3.3 Identifizierung weiterer GCDH-Bindungspartner

Für die Identifizierung weiterer GCDH-Interaktionspartner wurde das GCDH-Wildtyp Protein, wie zuvor schon für die BIAcore-Studien (Abschnitt 4.3.1.3) über Ni-NTA-Agarose aufgereinigt. Anschließend wurde das GCDH-Protein, wie in Abschnitt 3.4.7.3 beschrieben, kovalent an eine Affi-Gel 10 Matrix gekoppelt und mit isolierten mitochondrialen Matrixproteinen aus Schweineleber (Abschnitt 3.4.9 und 3.4.10) inkubiert. Mögliche gebundene GCDH-Interaktionspartner wurden nach mehrmaligem Waschen der Matrix mit steigenden NaCl-Konzentrationen (0,25–1,5 M) eluiert, dialysiert und die einzelnen Elutionsfraktionen im Silbergel überprüft (nicht gezeigt). Da im Silbergel kein Unterschied im Bandenmuster (ca. 12 Polypeptidbanden zwischen 15 und 70 kDa) zwischen den einzelnen Elutionsfraktionen zu sehen war, wurden diese gepoolt und zur massenspektrometrischen Analyse gegeben (Proteom- und MS-Facility, UKE, Prof. Schlüter). Nach Auswertung der erhaltenen Daten mit dem Programm Mascot (http://www.matrixscience.com) und der Datenbank SwissProt konnten insgesamt 19 Peptide mit einer Länge von 8 bis 37 Aminosäuren definiert werden, von denen 6 mitochondriale Matrixproteine darstellten (Tab. 4.4).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Dihydrolipoamide-Succinyltransferase (DLST) für weiterführende Interaktions-Analysen aus der Liste ausgewählt. DLST (50 kDa) ist eines von drei Enzymen des α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes (OGDC), der neben der Katalyse von α -Ketoglutarat zu Succinyl-CoA im TCA-Zyklus auch am Metabolismus von Lysin und Tryptophan beteiligt ist. OGDC katalysiert hier den Schritt von α -Ketoadipat zu Glutaryl-CoA, das anschließend durch GCDH zu Crotonyl-CoA weiter umgesetzt wird (Abb. 1.3).

Protein	UniProt Nummer	Anzahl und Sequenz identifizierten Bentide	Mowse [*] Score
Aldahad	022024		47
Aldenya- Dehvdrogenase	Q2XQV4		47
Denyurogenuse			
		GYKLSGSGR.E	
ATP-Synthase	P00829	R.TIAMDGTEGLVR.G	79
β-Untereinheit		R.IMNVIGEPIDER.E	
		K.AHGGYSVFAGVGERTR.E	
		R.AIAELGIYPAVDPLDSTSR.I	
Carbamoylphosphat	Q8WN73	K.AADTIGYPVMIR.S	186
- Synthetase 1		R.SAYALGGLGSGICPNK.A	
		K.IAPSFAVESIEDALK.A	
		K.VLGTSVESIMATEDR.Q	
Catalase	O62839	K.LNILTAGPR.G	125
		K.LNILTAGPR.G	
		K.DAQLFIQKK.A	
		K.NFSDVHPDYGAR.I	
		R.FSTVAGESGSADTVR.D	
		R.FNSANEDNVTQVR.T	
		R.AAQKPDILTTGSGNPIGDK.L	
Dihydrolipoamide-	Q9N0F1	R.GLVVPVIR.N	96
Succinyltransferase		R.TTAVCKDDVITVK.T	
		R.NVETMNYADIER.T	
Glutamat-	P00366	K.YNLGLDLR.T	64
Dehydrogenase		K.MVEGFFDR.G	
		R.TAAYVNAIEK.V	
		R.DDGSWEVIEGYR.A	
		K.IIAEGANGPTTPEADK.I	
		K.HGGTIPIVPTAEFQDR.I	

Tab. 4.4: Massenspektrometrische Analyse und Identifizierung potentieller GCDH-Interaktionspartner

^{*} Der Mowse-Score entspricht -10xLog(P), wobei P die Wahrscheinlichkeit beschreibt, dass es sich bei der gefundenen Peptidübereinstimmung um ein zufälliges Ereignis handelt. Scores >28 sind als signifikant anzusehen (p<0,05).

Zur Analyse von GCDH-DLST-Wechselwirkungen wurden zunächst mitochondriale Matrixproteine mit der GCDH-Affinitäts-Matrix inkubiert, gewaschen und gebundene Proteine in einer Einschritt-Reaktion (1,5 M NaCl) eluiert und im Western Blot auf Anwesenheit des DLST-Proteins in der Elutionsfraktion getestet (Abb. 4.17). Als Kontrolle wurden die mitochondrialen Matrixproteine mit einer ungekoppelten Affi-Gel 10 Matrix inkubiert und wie zuvor beschrieben eluiert und ebenfalls analysiert. Im Ausgangsmaterial der mitochondrialen Matrixproteine (Input: I) stellt ein 50 kDa immunreaktives Polypeptid, welches mit der kalkulierten molaren Masse des DLST- Proteins übereinstimmt, die Hauptbande im DLST-spezifischen Western Blot dar. Weitere Proteine mit einer molaren Masse von ca. 70, 100, 130 und 150 kDa, deren Identität nicht bekannt ist, reagierten ebenfalls mit dem DLST-Antikörper. In der Elutionsfraktion der GCDH-Matrix konnten drei DLST-immunoreaktive Banden von 50, 56 und 70 kDa detektiert werden. Diese Banden waren nicht im Eluat der ungekoppelten Affi-Gel 10 Matrix nachweisbar und müssen daher als spezifisch angesehen werden. Das Ergebnis der Western Blot Analyse bestätigt somit die Identifizierung des DLST-Proteins als möglicher GCDH-Interaktionspartner mittels massenspektrometrischer Analyse.



Abb. 4.17: DLST Western Blot Analyse nach Protein-Liganden-Affinitätschromatographie An Affi-Gel 10 gekoppelte GCDH (+) bzw. ungekoppelte Affi-Gel 10 Matrix (-) wurden mit 1 mg/ml mitochondrialen Matrix-Proteinen inkubiert (I: Input, Auftrag entsprach 1/100 Vol. der eingesetzten Proteinlösung). Anschließend wurden die Säulen mit 10-fachen Volumen gewaschen und der letzte Waschschritt solubilisiert (W). Gebundene Proteine wurden mit 1 ml 1,5 M NaCl eluiert, auf ein Vol. von 50 µl ankonzentriert und anschließend solubilisiert. (E). Die Analyse der Fraktionen erfolgte über SDS-PAGE (10 % Acrylamid) mit anschließendem DLST-spezifischen Western-Blot.

4.3.4 Protein-Komplexbildung von GCDH mit DLST

DLST ist eine Komponente des α-Ketoglutaratdehydrogenase-Komplexes und kann sowohl homo- als auch heteromere Proteinkomplexe formen. Eine mögliche Protein-Komplexbildung zwischen GCDH und DLST sollte daher im Weiteren mit Quervernetzungsexperimenten unter Benutzung des "Crosslinkers" BS³ untersucht werden. Hierfür wurde die humane *DLST*-cDNA aus isolierter RNA von HeLa-Zellen amplifiziert und mit einer C-terminalen (His₆)-Sequenz in den Vektor pcDNA3.1 kloniert. BHK-Zellen wurden anschließend mit DLST-His und GCDH-Myc kotransfiziert und in die Zellextrakte in An- und Abwesenheit von BS³ inkubiert. Anschließend wurden die Zellextrakte geteilt und über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Die eine Hälfte wurde mit GCDH- und die andere Hälfte mit DLST-spezifischem Western Blots analysiert. Als Kontrolle wurden untransfizierte BHK-Zellen verwendet (Abb. 4.18). Nach Quervernetzung konnten im GCDH-spezifischen Western Blot Proteinbanden mit folgenden Molekülmassen detektiert werden: 44 kDa (Monomer), 88 kDa (Dimer) und 176 kDa (Tetramer), sowie heteromere Komplexbanden bei 102 kDa, 110 kDa, 140 kDa, 200 kDa und > 250 kDa. Unter gleichen Bedingungen waren im DLST-spezifischem Western Blot nach Inkubation mit BS³ eine 50 kDa Bande (monomeres DLST) sowie Banden der Molekülmasse von 140 kDa, 150 kDa, 200 kDa, 210 kDa und zwei Banden > 225 kDa nachweisbar. Die Banden bei 140 kDa und ca. 260 kDa, wurden mit beiden Antikörpern detektiert, was für eine Protein-Komplexbildung zwischen GCDH und DLST sprechen könnte (Abb. 4.18). Rechnerisch wäre z.B. eine Kombination des dimeren GCDH-Proteins (88 kDa) mit der monomeren DLST-Form (50 kDa) für die detektierte 140 kDa Bande, möglich.



Abb. 4.18: Nachweis der Protein-Komplexbildung von GCDH mit DLST

Extrakte aus GCDH und DLST koexprimierten BHK-Zellen wurden in An- und Abwesenheit des chemischen "Crosslinkers" BS³ inkubiert. Die Zell-Extrakte (100 μ g) wurden anschließend mit einem Tris-Tricin-Gel (10 % Acrylamid) aufgetrennt und über GCDH- oder DLST-spezifischen Western Blot analysiert. Zur Kontrolle wurden untransfizierte BHK-Zellen ebenfalls mit und ohne Crosslinker behandelt. Pfeile markieren gleiche Molekülmassen, die mit beiden Antikörpern nach Quervernetzung detektiert werden konnten.

Die Interaktion zwischen GCDH und DLST wurde mit dem PCA-System (Abschnitt 4.3.1.2) validiert. Die cDNA von DLST wurde hierfür ebenfalls C-terminal mit den YFP-Fragmenten YFP1 und YFP2 fusioniert und in den Vektor pcDNA3.1 kloniert. Die Expression von DLST-YFP1, DLST-YFP2, GCDH-YFP1, GCDH-YFP2 und des Kontrollproteins MCFD2-YFP2 wurde im Western Blot überprüft (Abb. 4.19 A). Alle zu untersuchenden Fusions-Proteine konnten mit der kalkulierten Molekülmasse nachgewiesen werden.



Abb. 4.19: PCA zum Nachweis der Interaktion von GCDH mit DLST

(A) Expressionsanalyse der verwendeten Fusionsproteine. BHK-Zellen wurden mit cDNAs der YFP-Konstrukte transfiziert und Zellextrakte (30 µg) über SDS-PAGE (10 % Acrylamid) aufgetrennt. Die anschließende Western Blot-Analyse erfolgte mit DLST- bzw. GCDH-Antikörpern, bei den YFP1-Fusionsproteinen und mit einem GFP-Antikörper bei den YFP2-Fusionsproteinen. (B) Mikroskopische Aufnahme von Fluoreszenzsignalen der mit YFP-Fusionsproteinen überexprimierten BHK-Zellen. Nach 24 h Überexpression der Fusionsproteine wurden die Zellen mit PFA fixiert und die Zellkerne mit DAPI angefärbt. Die Fluoreszenzsignale wurden anschließend mikroskopisch aufgenommen. Mit der anschließend durchgeführten PCA-Methode konnte die Interaktion von GCDH mit DLST bestätigt werden. Als Negativ-Kontrolle diente GCDH-YFP1 allein und die kotransfizierten Fusionsproteine GCDH-YFP1 + MCFD2-YFP2 (Abb. 4.19 B1 + B2), bei denen keine Fluoreszenz erwartungsgemäß detektiert werden konnte. Als Positiv-Kontrolle diente, neben der Kotransfektion von GCDH-YFP1 + GCDH-YFP2, die Kotransfektion von DLST-YFP1 + DLST-YFP2 (Abb. 4.19 B3 + B4). Beide Positiv-Kontrollen zeigten in 50 bzw. 30 % der DAPI-positiven Zellen ein gelb fluoreszierendes Signal. Auch in den mit GCDH-YFP1 + DLST-YFP2 bzw. GCDH-YFP2 + DLST-YFP1 kotransfizierten Zellen konnten mikroskopisch Fluoreszenzsignale nachgewiesen werden.

4.3.4.2 Koimmunpräzipitation von GCDH und DLST

Bei der Koimmunpräzipitation handelt es sich neben "Pull-Down" und PCA um eine weitere Methode, um Protein-Protein-Wechselwirkungen nachzuweisen. Hierbei "Prey"-Protein in werden das "Bait"und das einem eukaryontischen Expressionssystem kotransfiziert und die mögliche Interaktion in vivo nachgewiesen. Das "Bait"-Protein wird dabei nach Zellaufschluss (Input: I) über einen His-Tag an Ni-NTA-Agarose immobilisiert und zusammen mit dem interagierenden "Prey"-Protein aus dem Zellextrakt "gefischt". Ungebundene Proteine werden im Durchfluss (FT) aufgefangen und die Agarose anschließend mit 10-fachen Vol. gewaschen (W). Gebundene Protein-Komplexe werden durch Aufkochen von der Agarose gelöst (Eluat:E) und im Western Blot analysiert. DLST mit C-terminaler (His₆)-Markierung wurde als "Bait"-Protein zusammen mit den "Prey"-Proteinen GCDH-myc sowie dem cytosolischem LC3-GFP (Negativkontrolle) in HeLa-Zellen koexprimiert. Als weitere Kontrolle sollte die Interaktion zwischen DLST-His und dem endogen exprimierten GCDH in HeLa-Zellen untersucht werden. Die Zellextrakte mit den überexprimierenden Proteinen wurden mit Ni-NTA-Agarose inkubiert und die daran gebundenen DLST- und andere interagierende Proteine durch Western Blot analysiert. überexprimierenden Im Eluat der **DLST-His** HeLa-Zellen konnten nach densitometrischer Auswertung ca. 1,8 % der vorhandenen endogen exprimierten GCDH (Input) nachgewiesen werden. Dieser Anteil erhöhte sich auf 4,2 % nach Koexpression von DLST-His und GCDH-Myc in HeLa-Zellen. LC3-GFP hat erwartungsgemäß nicht an die DLST-Agarose gebunden (Abb. 4.20 A).



Abb. 4.20: Koimmunpräzipitation zum Nachweis der Interaktion von GCDH mit DLST Das DLST-His-Protein wurde allein oder zusammen mit GCDH-myc, sowie LC3-GFP in HeLa-Zellen koexprimiert und in 500 μ l Lysispuffer lysiert (Input, I: 10 Vol.-%). 400 μ l der Zellextrakte wurde anschließend mit Ni-NTA-Agarose inkubiert. Ungebundenes Material wurde im Durchfluss (FT: 12,5 Vol.-%) aufgefangen. Unspezifische Bindungen wurden durch 3-maliges Waschen der Agarose verhindert (W3: 10 Vol.-%). Die gebundenen Proteine wurden durch Aufkochen der Ni-NTA-Agarose für 5 min bei 95 °C in 100 μ l Solubilisierungspuffer eluiert (E: 100 Vol.-%). Die einzelnen Fraktionen wurden über SDS-Page (10 % Acrylamid) mit anschließendem Western Blot mit Antikörpern gegen (A) GCDH und LC3, sowie nach "Strippen" der Blotmembran mit Antikörper gegen (B) DLST getestet.

Zur Bestätigung der Expression von DLST-His und der erfolgreichen Kopplung an Ni-NTA-Agarose wurde die Blot-Membran "gestrippt" und mit DLST-Antikörper erneut analysiert. Sowohl in der Input- als auch in der Elutionsfraktion konnte DLST erwartungsgemäß detektiert werden (Abb. 4.20 B).

Durch massenspektrometrische Analyse konnte DLST neben fünf weiteren mitochondrialen Proteinen als möglicher GCDH-Interaktionspartner identifiziert und anschließend über unabhängige Methoden (chemische Quervernetzung, "Pull-Down"-Analyse und Ko-IP) verifiziert werden.

5. Diskussion

5.1 Untersuchungen zum Einfluss von GA und 3OHGA auf den Transport von TCA-Zyklus-Intermediaten

Die Glutarazidurie Typ1 (GA1) ist eine angeborene neurometabolische Erkrankung, die durch Mutationen im mitochondrialen Enzym Glutaryl-Coenzym-A-Dehydrogenase (GCDH) hervorgerufen wird. Die GCDH-Defizienz führt zu einer Akkumulation der toxischen Metabolite Glutarsäure (GA) und 3-Hydroxyglutarsäure (30HGA) in Körperflüssigkeiten und im Hirn von betroffenen Patienten. Während kataboler Zustände können GA1-Patienten encephalopatische Krisen entwickeln, in dessen Folge zum irreversiblen Untergang von Neuronen im Striatum kommt. Die es pathophysiologischen Mechanismen, die der Neurodegeneration zugrunde liegen, sind nicht geklärt. Es wurde jedoch eine Störung bislang des neuronalen Energiemetabolismus, im speziellen des TCA-Zyklus, postuliert.

Der Tricarbonsäure-Zyklus (TCA-Zyklus) stellt einen zentralen Stoffwechselweg der Zellen dar. Hier treffen Abbau- und Biosynthesewege von Kohlenhydraten, Aminosäuren, Lipiden und anderen Stoffklassen aufeinander. In neuronalen Zellen dient der TCA-Zyklus zum einen der Energiebereitstellung in Form von ATP durch den oxidativen Abbau von organischen Stoffen, wie z.B. Aminosäuren und Fettsäuren, und zum anderen der Synthese von Glutamat und GABA, den wichtigsten exzitatorischen bzw. inhibitorischen Neurotransmittern im zentralen Nervensystem. GABA wird mit Hilfe der Glutamat-Decarboxylase aus Glutamat synthetisiert. Für die Bildung von Glutamat stehen neuronalen Zellen zwei Synthesewege zur Verfügung. Beim ersten Syntheseweg wird Glutamat aus Glutamin gebildet, das von astrozytären Zellen in den Interzellularraum abgegeben wird (Glutamat-Glutamin-Zyklus) (Torgner et al. 1990). Die anschließende Aufnahme von Glutamin in die neuronalen Zellen und die Umsetzung zu Glutamat über die Glutamatsynthase reicht jedoch für die benötigte Menge an Neurotransmittern nicht aus (Hertz 1979; Torgner et al. 1990). Neuronale Zellen müssen daher Glutamat ebenfalls aus dem TCA-Zyklus-Intermediat a-Ketoglutarat mit Hilfe der Glutamatdehydrogenase synthetisieren. Entnahme und Nachschub von Intermediaten des TCA-Zyklus unterliegen dabei einem dynamischen Gleichgewicht, sodass entzogene Substrate, wie a-Ketoglutarat, wieder substituiert werden müssen (Anaplerose). Dies geschieht in den meisten Zelltypen über die Pyruvatcarboxylase, die Pyruvat zu Oxalacetat umsetzt, das in den TCA-Zyklus zurückfließt. Neuronale Zellen weisen jedoch im Vergleich zu Astrozyten nur eine geringe Pyruvatcarboxylase-Aktivität auf, sodass sie auf eine anaplerotische Versorgung mit TCA-Zyklus-Intermediaten wie Citrat, α-Ketoglutarat, Succinat und Malat von außen angewiesen sind (Schousboe et al. 1997; Hassel 2000; Hassel et al. 2000). Astrozyten sezernieren diese Dicarboxylate in den Interzellularraum, wo sie anschließend von den Neuronen wieder aufgenommen werden. Über die Transporter, die am anaplerotischen Transfer der Dicarboxylate beteiligt sind, ist bislang nur wenig bekannt. Studien bezüglich der Aufnahme von Citrat und Succinat in primäre neuronale Zellen der Ratte sowie Studien an Froschoocyten zeigten, dass die Dicarboxylate nur Na⁺-abhängig in die Zellen transloziert werden können. Die bis dato bekannten Na⁺abhängigen Dicarboxylat-Transporter NaC2 und NaC3 wurden als Kandidaten für die Aufnahme der TCA-Zyklus-Intermediate in Neurone bzw. Astrozyten postuliert (Pajor et al. 2001; Yodoya et al. 2006). Für den Transporter NaC3 ist außerdem bekannt, das er auch GA und 30HGA mit unterschiedlichen Affinitäten translozieren kann (Stellmer et al. 2007). Ziel des ersten Teils der vorliegenden Arbeit war es daher zu untersuchen, ob GA und 3OHGA den Transfer von TCA-Zyklus-Intermediaten über Membranen kultivierter Astrozyten und Neuronen beeinträchtigen. Hierfür wurde die Aufnahme und Abgabe des exemplarischen TCA-Zyklus-Intermediates [¹⁴C]-Succinat in Astrozyten und Neuronen von Wildtyp- im Vergleich zu Gcdh^{-/-}-Mäusen analysiert.

In diesen Studien konnte zum einen gezeigt werden, dass in Gegenwart von 2 mM GA bzw. 3OHGA die spezifische, Na⁺-abhängige Aufnahme von [¹⁴C]-Succinat in neuronale Zellen um 95 (GA) bzw. 50 % (3OHGA) inhibiert werden konnte (Abb. 4.2). Dabei war kein Unterschied in der inhibitorischen Wirkung in neuronalen Zellen aus Wildtyp- und Gcdh^{-/-}-Mäusen zu beobachten.

Die eingesetzte Konzentration von 2 mM entspricht im Falle von GA einer ähnlichen Konzentration, die in *post mortem* Biopsien von GA1-Patienten und in Gehirnen von Gcdh^{-/-}-Mäusen detektiert wurden (Koeller et al. 2002; Külkens et al. 2005). Im Falle von 3OHGA entspricht 2 mM einer zehnfach höheren Konzentration als der, die in

Hirnen von Gcdh^{-/-}-Mäusen und im Hirn von GA1-Patienten gemessen werden konnte (Külkens et al. 2005; Sauer et al. 2006). Da *in vitro* Experimente nicht mit den *in viv*o Bedingungen vergleichbar sind, können die Unterschiede in den 3OHGA-Konzentrationen vernachlässigt werden. Zudem ist bekannt, dass bei Eintritt von encephalopatischen Krisen die Konzentrationen von GA und 3OHGA in Körperflüssigkeiten und im Gehirn von Gcdh^{-/-}-Mäusen weiter ansteigen (Zinnanti et al. 2006; Zinnanti et al. 2007; Keyser et al. 2008a), wobei keine Daten für spezifische Konzentrationsmessungen im Gehirn von GA1-Patienten vorliegen.

Die in Gegenwart von GA im Vergleich zu 30HGA stärkere Inhibition auf die [¹⁴C]-Succinat-Aufnahme lässt darauf schließen, dass NaC3 als vermittelnder Influx-Transporter beteiligt ist. In Patch-Clamp Untersuchungen an NaC3-überexprimierenden Froschoocyten konnte gezeigt werden, dass der Transporter eine höhere Affinität für GA als für 30HGA aufweist. Die ermittelten K_M-Werte lagen dabei für GA bei 40 ± 12 μ M und für 3OHGA bei 950 ± 180 μ M (Stellmer et al. 2007; Hagos et al. 2008). Die eingesetzten Dicarboxylat-Konzentrationen von 2 mM in den hier durchgeführten Experimenten lagen somit deutlich oberhalb der gemessenen K_M-Werte für den NaC3-Transporter und erklären, warum zumindest GA den Influx von [¹⁴C]-Succinat in neuronale Zellen nahezu vollständig inhibiert. Warum eine 3OHGA-Konzentration, die dem 2,1-fachen des K_M-Wertes für den NaC3 entspricht, den Transport von [¹⁴C]-Succinat in neuronale Zellen dennoch nur um 50 % inhibiert, ist unklar. Zur Analyse der Art der Inhibition wurden die [¹⁴C]-Succinat-Aufnahmestudien in Gegenwart unterschiedlicher 30HGA-Konzentrationen durchgeführt. Es zeigte sich bei ansteigenden 30HGA-Konzentrationen von 150 µM bis 2 mM eine zunehmende Hemmung der [¹⁴C]-Succinat-Aufnahme (Lamp et al. 2011). Dies spricht für eine kompetitive Hemmung der beteiligten Transporter in Bezug auf die Aufnahme von [14C]-Succinat in Astrozyten und Neuronen durch 3OHGA. Neben NaC3 konnte auch die Beteiligung anderer Transporter, insbesondere des NaC2-Transporters (Yodoya et al. 2006), zunächst nicht ausgeschlossen werden. Neuere Daten an NaC2überexprimierenden Froschoocyten zeigten jedoch keine NaC2-abhängige Translokation von [¹⁴C]-GA und [³H]-3OHGA (Brauburger et al. 2011), was gegen eine Beteiligung von NaC2 am [¹⁴C]-Succinat-Influx in Neuronen und Astrozyten spricht.

Um zu untersuchen, ob NaC3 am Transfer von TCA-Zyklus-Intermediaten in Neurone beteiligt ist, wurden Expressionsanalysen in neuronalen Zellen aus Gcdh^{-/-} und Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Die relative Expression von NaC3 in neuronalen Gcdh^{-/-} -Zellen war dabei um das 4,2-fache im Vergleich zu Wildtyp-Zellen erhöht (Abb. 4.4). Ähnliche Unterschiede in der Expression des NaC3-Transporters wurden auch in Nierenzellen von Gcdh^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen beobachtet (Stellmer et al. 2007). Hier wurde die Hochregulation der Transporter-mRNA in Gcdh^{-/-} -Zellen auf den gesteigerten Bedarf zur Ausscheidung der akkumulierenden Metabolite GA und 3OHGA aus dem Blut über die proximalen Tubuluszellen der Niere in den Urin zurückgeführt. Die Hochregulation der NaC3-Expression in neuronalen Zellen aus Gcdh^{-/-}-Mäusen könnte als adaptive Antwort auf eine durch Inhibition des Transporters mit GA und 3OHGA reduzierte Versorgung der Zellen mit TCA-Zyklus-Intermediaten interpretiert werden. Trotz der erhöhten NaC3-Expression in neuronalen Zellen aus Gcdh^{-/-}-Mäusen war die absolute Aufnahme von [¹⁴C]-Succinat in An- und Abwesenheit von GA bzw. 30HGA jedoch in allen Ansätzen mit der Aufnahme in neuronalen Zellen aus Wildtyp-Mäusen vergleichbar. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die NaC3 mRNA-Expression von der NaC3-Proteinbiosynthese in neuronalen Gcdh^{-/-}-Zellen entkoppelt ist. Dies könnte ebenfalls ein sekundärer Effekt der gestörten Biosynthese von Proteinen aufgrund mangelnder Versorgung mit TCA-Zyklus-Intermediaten sein. Eine weitere Erklärung wäre, das eine normale NaC3-Synthese stattfindet und somit auch mehr Transporter an der Plasmamembran neuronaler Zellen aus Gcdh^{-/-}-Mäusen vorliegen, diese aber durch zusätzlich endogen gebildete Dicarboxylate GA und 3OHGA trans-inhibitorisch blockiert werden. Eine trans-inhibitorische Blockade könnte z.B. durch die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren durch GA und 3OHGA hervorgerufen werden (Ullrich et al. 1999; Kölker et al. 2001; Latini et al. 2005). Die Aktivierung der NMDA-Rezeptoren würde zur Depolarisation der Plasmamembran führen. Yodoya und Kollegen konnten experimentell belegen, dass die [¹⁴C]-Succinat-Aufnahme in Astrozyten und Neuronen unter membrandepolarisierenden Bedingungen inhibiert wird (Yodoya et al. 2006). Eine weitere trans-inhibitorische Blockade könnte durch GA vermittelt werden. Für GA wird postuliert, das es in hohen Mengen die Na⁺/K⁺-ATPase inhibiert (Kölker et al. 2002b). Die Na⁺/K⁺-ATPase katalysiert entgegen dem chemischen Konzentrations- und elektrischen Ladungsgradienten, unter

Hydrolyse von ATP, den Transport von drei Na⁺-Ionen aus der Zelle und zeitgleich zwei K⁺-Ionen in die Zelle. Die extrazelluläre Na⁺-Konzentration ist essentiell, da der NaC3-Transporter TCA-Zyklus-Intermediate nur mit dem einwärts gerichteten Na⁺-Einstrom in die Zelle transloziert. Schließlich ist es auch möglich, dass neuronale Zellen von Gcdh^{-/-}-Mäusen entsprechend der erhöhten NaC3 mRNA-Konzentration mehr NaC3 Protein synthetisieren, dieses aber nicht in die Plasmamembran integriert wird sondern in intrazellulären Membranstrukturen sequestriert. Vergleichbare Unterschiede in der intrazellulären Lokalisation sind von dem Glukose-Transporter 4 (GLUT4) bekannt, der erst nach spezifischen Reizen (Insulin) an die Plasmamembran umverteilt wird (Rea et al. 1997; Pessin et al. 1999).

Ein weiteres Ergebnis in Bezug auf die Wirkung von GA und 3OHGA auf Teilprozesse des anplerotischen Transfers von TCA-Zyklus-Intermediaten ist, dass die Abgabe von [¹⁴C]-Succinat aus Astrozyten aus Gcdh^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Astrozyten aus Wildtyp-Mäusen signifikant reduziert und verzögert ist. Dabei wurde beobachtet, dass nach 30-minütiger Inkubation 75-80 % des initialen [¹⁴C]-Succinates aus Wildtyp-Astrozyten ins Medium abgegeben wurde, hingegen nur 60 % der Radioaktivität aus astrozytären Gcdh^{-/-}-Zellen. Der Export des [¹⁴C]-Succinates aus Wildtyp-Zellen erfolgte mit einer $t_{1/2}$ -Effluxzeit von 5,6 ± 2,6 min signifikant schneller als der Export aus Gcdh^{-/-}-Zellen mit einer kalkulierten $t_{1/2}$ -Effluxzeit von 25,2 ± 8,6 min (Abb. 4.3). Der biphasische Verlauf der Graphen mit einer stark ansteigenden initialen Effluxphase in den ersten 5-10 min, der in eine zweiten Phase mit reduzierter [¹⁴C]-Succinat-Ausscheidung übergeht, deutet auf die intrazelluläre Metabolisierung des [¹⁴C]-Succinates z.B. zu Aspartat und Glutamat hin, die mit einer geringeren Affinität über die Membran transloziert werden können. Eine höhere Metabolisierungsrate in Gcdh^{-/-}astrozytären Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen, die einen reduzierten Efflux von [¹⁴C]-Succinat begründen könnte, lag jedoch nicht vor (Lamp et al. 2011).

Der reduzierte Efflux von [¹⁴C]-Succinat aus astrozytären Gcdh^{-/-}-Zellen könnte das Ergebnis einer *cis*-Inhibition des beteiligten Transporters durch Kompetition der akkumulierenden Dicarboxylate GA und 3OHGA mit Succinat um intrazelluläre Transportbindungsstellen sein. Eine *cis*-inhibitorische Wirkung von 3OHGA konnte im Falle des organischen Kationen-Transporters 2 (OCT2), der jedoch nicht am Transport

von Dicarboxylaten beteiligt ist, gezeigt werden (Stellmer et al. 2007). Eine weitere Erklärung für den reduzierten Efflux könnte eine verminderte Anzahl des beteiligten Transporters an der Plasmamembran von astrozytären Gcdh^{-/-}-Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen sein. Für die Klärung des molekularen Mechanismus, der zum reduzierten Transport von [¹⁴C]-Succinat aus astrozytäre Gcdh^{-/-}-Zellen führt, ist die Kenntnis des beteiligten Transporters unabdingbar. Für den Efflux von TCA-Zyklus-Intermediaten können Na⁺-abhängige Transporter, die Dicarboxylate nur entlang des einwärts gerichteten Na⁺-Stroms translozieren, ausgeschlossen werden. Mögliche Transporter-Kandidaten müssen folgende Kriterien aufweisen:

- eine astrozytäre Expression,
- die Fähigkeit, TCA-Zyklus-Intermediate sowie GA und 3OHGA zu transportieren
- die Na⁺-unabhängige Dicarboxylat-Translokation

Als möglicher Kandidat wurde zunächst der organische Anionen-Transporter OAT1 überprüft. Studien an OAT1-überexprimierenden HEK293-Zellen und Froschoocyten zeigten eine hohe Affinität des Transporters zu den Dicarboxylaten α -Ketoglutarat, Succinat, sowie zu GA und 3OHGA (Uwai et al. 1998; Hagos et al. 2008; Mühlhausen et al. 2008), wobei die Expression von OAT1 bislang nur im Plexus choroideus, sowie in neuronalen Zellen des Kortex und des Hippocampus nachgewiesen werden konnte (Alebouyeh et al. 2003; Bahn et al. 2005). In dieser Arbeit durchgeführte Expressionsstudien bestätigten eine schwache Expression von OAT1 in neuronalen Zellen, während in Astrozyten keine OAT1-Expression nachgewiesen werden konnte (Tab. 4.1). Eine Beteiligung von OAT1 am Transport von TCA-Zyklus-Intermediaten aus Astrozyten ist daher unwahrscheinlich.

Weiterführende experimentelle Arbeiten zur Identifizierung des Transporters könnten mit der Durchführung von vergleichenden "DNA-Microarrays" an kultivierten Astrozyten aus Wildtyp- und Gcdh^{-/-}-Mäusen beginnen. Veränderte Expressionsmuster bekannter Transporter könnten erste Hinweise auf beteiligte Transporter am Transfer von TCA-Zyklus-Intermediaten liefern. Anschließend könnte mit Hilfe von siRNA- und Überexpressionsexperimenten die Proteinexpression der jeweiligen Transporter *in vitro* modifiziert und die Effekte auf die Effluxraten von [¹⁴C]-Succinat analysiert werden.

Falls bekannt, könnten pharmakologische Verbindungen zur Inhibition identifizierter Transporter zur Validierung der Ergebnisse eingesetzt werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der Export des TCA-Zyklus-Intermediates Succinat aus Gcdh-defizienten Astrozyten verzögert ist und dass die Aufnahme von Succinat in Neurone, die mit hoher Wahrscheinlichkeit über NaC3 vermittelt wird, kompetitiv durch GA und 3OHGA, die im Extrazellularraum akkumulieren, inhibiert werden kann.





Der TCA-Zyklus dient in neuronalen Zellen sowohl der Energiebereitstellung in Form von ATP als auch der Synthese der Neurotransmitter GABA und Glutamat (Glu), sodass eine hohe Nachfrage an TCA-Zyklus-Intermediaten besteht. Neue Intermediate werden über den Abbau von Pyruvat durch die Pyruvatcarboxylase (PC) gebildet. Neuronale Zellen zeigen nur eine geringe Pyruvatcarboxylase-Aktivität und sind für die Aufrechterhaltung des Energiemetabolismus auf den Transfer von TCA-Zyklus-Intermediaten wie z.B. Succinat und α -Ketoglutarat aus astrozytären Zellen angewiesen. Die Dicarboxylate GA und 3OHGA, die im Gehirn von Gcdh^{-/-}-Mäusen akkumulieren, blockieren die am Transfer beteiligten Transporter und unterbinden die anaplerotische Versorgung der neuronalen Zellen mit TCA-Zyklus-Intermediaten. In astrocytären Zellen wird eine kompetitive *cis*-inhibitorische Wirkung durch GA und 3OHGA des bislang unbekannten Transporters postuliert. In neuronalen Zellen wird eine Inhibition des beteiligten NaC3-Transporters durch a.) eine kompetitive *cis*-inhibitorische Wirkung der im Extrazellularraum akkumulierende Dicarboxylate und b.) eine indirekte *trans*-inhibitorische Wirkung durch endogen gebildetes GA und 3OHGA, durch Inaktivierung der Na⁺/K⁺-ATPase und Aktivierung von NMDA-Rezeptoren, die zu einer Depolarisation der Zellmembran führt, postuliert.

Die vorliegenden Daten liefern die ersten experimentellen Beweise, dass durch erhöhte GA- und 3OHGA-Konzentrationen im Gehirn von Gcdh^{-/-}-Mäusen eine Störung des anaplerotischen Transfers von TCA-Zyklus-Intermediaten zwischen Astrozyten und

Neuronen vorliegt. Ein Mangel an TCA-Zyklus-Intermediaten in neuronalen Zellen könnte die ATP-Produktion und Synthese von Neurotransmittern reduzieren und letztendlich zum Zelltod führen. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen konnten Zinnanti und Kollegen im Kortex von Gcdh^{-/-}-Mäusen während Diät-induzierter encephalopatischer Krisen eine signifikante Reduktion der ATP- und GABA-Konzentration feststellen (Alebouyeh et al. 2003; Bahn et al. 2005; Zinnanti et al. 2006; Zinnanti et al. 2007).

Der gestörte Energiemetabolismus durch fehlende Bereitstellung von TCA-Zyklus-Intermediaten in neuronalen Zellen könnte einen wichtigen Pathomechanismus der neuronalen Degeneration in GA1-Patienten während encephalopatischer Krisen, wo ein hoher Bedarf an energiereichen Substraten besteht, darstellen. Vor allem neuronale Zellen des Striatums, die exzitatorisch mit Nervenzellen der Großhirnrinde (exzitatorisch glutamaterge Transmission) und inhibitorisch mit Nervenzellen des Thalamus in Verbindung stehen (inhibitorische GABA-erge Transmission) und daher eine hohe Syntheserate an Glutamat und GABA aufweisen, benötigen einen intakten, ausgeglichenen TCA-Zyklus. Sie sind daher auf einen funktionierenden anaplerotischen Transfer der TCA-Zyklus-Intermediate durch Astrozyten angewiesen (White et al. 1994). Die Störung des anaplerotischen Transfers durch GA und 3OHGA könnte erklären, warum gerade neuronale Zellen des Striatums bei GA1-Patienten degenerieren.

5.2 Analyse von GCDH-Oberflächenmutationen

Das funktionale GCDH-Protein liegt in der mitochondrialen Matrix als Homotetramer vor und bildet eine tetraedrische 3D-Struktur, bei der 30 % der Oberfläche jedes Monomers mit der Oberfläche der anderen drei Monomere in Verbindung steht. Jedes GCDH-Monomer trägt ein FAD-Molekül und kann in eine aus sechs α -Helices bestehenden aminoterminalen Domäne (Arg45 bis Glu172), einer mittleren β -Faltblatt Domäne (Leu173 bis Pro278) und einer aus vier α -Helices bestehenden carboxyterminalen Domäne (Gly279 bis Lys438) unterteilt werden (Busquets et al. 2000; Fu et al. 2004). Die wichtigsten Funktionen werden den Aminosäureresten der carboxyterminalen Domäne zugeschrieben, da sie an der Interaktion der vier Monomere sowie an der Bindung von Glutaryl-CoA und des FAD-Moleküls beteiligt sein sollen (Biery et al. 1996; Westover et al. 2003).

Mehr als 150 pathogene Mutationen des GCDH-Gens sind beschrieben worden, wobei in der Literatur bislang überwiegend Mutationen, die das katalytische Zentrum oder die Tetramerisierung des GCDH-Proteins betreffen, näher analysiert wurden. Die meisten dieser Mutationen gehen mit einem vollständigen Verlust der enzymatischen Aktivität GCDH-Proteins einher, und betroffene Patienten weisen meist hohe des Konzentrationen der Metabolite GA und 3OHGA im Urin und in Körperflüssigkeiten auf (Westover et al. 2003; Christensen et al. 2004). Nur wenige pathogene Mutationen mit einer Restaktivität des GCDH-Proteins von über 5-10 %, gemessen in Patientenfibroblasten, sind bisher beschrieben worden. Unter diesen befand sich lediglich eine Mutation, die homozygote Mutation p.Val400Met, die in der carboxyterminalen Domäne lokalisiert ist, während andere bekannte mutante GCDH-Formen mit enzymatischen Restaktivitäten von über 5-10 %, in der aminoterminalen oder mittleren Domäne des GCDH-Monomers liegen (Christensen et al. 2004). Zu diesen Mutationen gehört auch p.Met263Val, die Bestandteil der β-Faltblatt-Struktur ist und in Patientenfibroblasten eine Restaktivität von 30 % gegenüber Fibroblasten gesunder Kontrollen aufweist. Der Aminosäurerest Met263 ist an der Oberfläche des GCDH-Proteins lokalisiert und weder am aktiven Zentrum des Proteins noch an der Bildung der funktionalen, homomeren GCDH-Komplexe beteiligt (Christensen et al. 2004; Keyser et al. 2008b). Trotz der hohen enzymatischen Restaktivtät, die mit einer vergleichsweise geringen Ausscheidung von GA und 3OHGA in den Urin einhergeht, zeigt die betroffene Patientin einen schweren klinischen Verlauf der Krankheit (Mühlhausen et al. 2003). Während Genotyp und Höhe der Metabolitausscheidung (biochemischer Phänotyp) miteinander korrelieren, konnte bisher keine Korrelation zwischen dem Genotyp bzw. biochemischen Phänotyp und dem klinischen Phänotyp der GA1 hergestellt werden (Christensen et al. 2004).

In Vorarbeiten wurde in der Arbeitsgruppe die proteinchemische Auswirkung der Mutante p.Met263Val auf das GCDH-Protein in Bezug auf Synthese, Stabilität, enzymatische Aktivität, 3D-Struktur, sowie Homo- und Heteromerisierungsverhalten untersucht. Die deutlichste Auffälligkeit im Vergleich zum Wildtyp-Protein bestand dabei in der signifikant reduzierten Fähigkeit, heteromere Proteinkomplexe mit bis dato unidentifzierten Proteinen einzugehen. (Keyser et al. 2008b). Es wurde daher postuliert, dass die korrespondierende Oberflächenregion, in der der Aminosäurerest Met263 lokalisiert ist, an der Bindung mit anderen Proteinen beteiligt sein könnte, und dass diese Interaktionspartner zudem Auswirkungen auf die Aktivität des GCDH-Proteins haben könnten. Basierend auf diesen Daten wurden im zweiten Teil dieser Arbeit weitere Aminosäurereste über die 3D-Modellstruktur der GCDH ausgewählt, die räumlich in der Nähe des Met263 lokalisiert und exponiert sind, um die Region für die Protein-GCDH-Wechselwirkungen näher eingrenzen und charakterisieren zu können.

Folgende Mutationen wurden in die cDNA der Wildtyp-GCDH eingefügt und ebenfalls auf Strukturänderungen, GCDH-Enzymaktivität, Expression, sowie Homo- und Heteromerisierungsverhalten hin überprüft: p.Pro182Ala, p.Thr211Ala, p.Pro248Leu, p.Asn392Asp und p.Asn392Ala (Abb. 4.5). Alle substituierten Aminosäurereste sind ebenfalls wie p.Met263Val an der Proteinoberfläche lokalisiert und bis auf Asn392 Bestandteil der β-Faltblatt-Struktur. Asn392 gehört zur carboxy-terminalen Domäne des GCDH-Monomers und liegt nur in der dimeren Form in direkter räumlicher Nähe zum Aminosäurerest Met263 des gebundenen zweiten Monomers vor. Die hier genannten Mutationen zeigen in der in silico Berechnung der 3D-Struktur (Fu et al. 2004) keine auffälligen Veränderungen der Sekundär- und Tertiärstruktur im Vergleich zum Wildtyp-Protein (Abb. 4.5). Leichte Änderungen der Oberflächenstruktur lassen sich unter anderem mit der unterschiedlichen Hydrophobizität der substituierten Aminosäuren erklären, die zu einer Änderung des Oberflächenpotentials der GCDH führen. Räumlich sind alle mutierten Aminosäurereste vom aktiven Zentrum des GCDH-Proteins entfernt, das mitunter von der Aminosäure Glu414 gebildet wird (Fu et al. 2004). Dennoch zeigten die in BHK-Zellen überexprimierten mutanten Proteine reduzierte enzymatische Restaktivitäten im Vergleich zum Wildtyp-Protein. Erniedrigungen der enzymatischen Aktivität könnten hierbei auf eine verminderte Syntheserate, eine schnellere Abbaurate, eine gestörte homomere Komplexbildung des GCDH-Proteins, das in der aktiven Form als Tetramer vorliegt, oder aber wie bei p.Met263Val postuliert wird, auf eine reduzierte heteromere Komplexbildung mit GCDH-Interaktionspartnern zurückgeführt werden (Keyser et al. 2008b).

Die Mutationen p.Pro182Ala und p.Thr211Ala zeigten überexprimiert in BHK-Zellen mit 53 bzw. 76 % die höchsten Restaktivitäten im Vergleich zur Wildtyp-GCDH (Tab.

4.2). Da zuvor noch nie so hohe GCDH-Restaktivitäten von Mutanten gemessen werden konnten, kann daraus geschlossen werden, dass diese artifziellen, aus strukturanalytischem Gesichtspunkt ausgewählten Mutationen keine Relevanz besitzen. Unterstützt wird diese These dadurch, dass unter den bisher bekannten Mutationen bei GA1-Patienten die Aminosäuren Pro182 und Thr211 nicht betroffen sind. In den durchgeführten Quervernetzungsexperimenten zeigten die beiden Mutanten zudem als einzige der untersuchten mutanten GCDH-Proteine keine Unterschiede im Oligomerisierungsmuster im Vergleich zum Wildtyp-Protein (Abb. 4.8). Eine gestörte Funktionalität von p.Pro182Ala und p.Thr211Ala in Bezug auf fehlende GCDH-Tetramerisierung oder fehlende Interaktion mit regulatorischen Interaktionspartnern kann daher mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Diese Mutationen sind also als Modell zur Analyse der biochemischen Auswirkungen von "Missense"-Mutationen nicht geeignet.

Die Mutationen p.Pro248Leu sowie p.Met263Val zeigten überexprimiert in BHK-Zellen ebenfalls enzymatische Restaktivitäten von 10 bzw. 15 % im Vergleich zu Wildtyp-GCDH (Tab. 4.2). Diese Restaktivitäten decken sich jedoch nicht exakt mit den ermittelten Aktivitäten in Patientenfibroblasten, die für p.Pro248Leu bei 1-5 % und für p.Met263Val bei 30 % lagen (Christensen et al. 2004). Unterschiede können auf variierende Transfektionseffizienzen der in BHK-Zellen überexprimierten Mutanten im Vergleich zu den endogen synthetisierten Mutanten in Patientenfibroblasten erklärt werden. Im Widerspruch zu den relativ hohen GCDH-Restaktivtäten stand die niedrige Expressionsrate der beiden Mutanten in transfizierten BHK-Zellen (p.Pro248Leu: 21 % und p.Met263Val: 31 % im Vergleich zum GCDH-Wildtyp), sowie die fehlende Bildung von multimeren GCDH-Komplexen (p.Pro248Leu: fehlende Di- und Tetramerisierung; p.Met263Val: fehlende Tetramerisierung), im Vergleich zum Wildtyp-Protein (Abb. 4.7 und Abb. 4.8). Die niedrige Expressionsrate könnte auf einer verringerten Syntheserate oder einer erhöhten Abbaurate beruhen. Für p.Met263Val durchgeführte "Pulse-Chase"-Experimente ergaben keine verringerte Syntheserate, jedoch eine um ca. 40 % erhöhte Abbaurate (Keyser et al. 2008b). Für die Mutation p.Pro248Leu liegen keine "Pulse-Chase-Daten" vor. Das trotz fehlender Ausbildung der funktionalen tetrameren Struktur nach Quervernetzungsexperimente beide Mutationen dennoch eine relativ hohe enzymatische Restaktivität aufweisen ist am ehesten darauf zurückzuführen, dass durch Quervernetzung nur ein kleiner der Anteil Gesamtproteinmenge erfasst wird. Die Quervernetzungseffizienz eines chemischen "Crosslinkers" ist ein empirischer Prozess, der von Faktoren wie Aminosäurezusammensetzung interagierenden der Proteine (Anzahl freier Aminogruppen für BS³-vermittelte Quervernetzung), ihre pI-Werte, des pH-Wertes und der Zusammensetzung des Puffers abhängig ist. So konnten im Vergleich zu den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen bezüglich p.Met263Val in den Quervernetzungsexperimenten der Voruntersuchungen 5 % des im Western Blot ermittelten GCDH-Signals als tetramere Struktur detektiert werden (Keyser et al. 2008b). Die in vitro durchgeführten Quervernetzungsexperimente geben außerdem lediglich Hinweise auf mögliche Proteinkomplexe. Diese sollten mit weiteren Untersuchungen wie z.B. über Größenausschlusschromatographie bestätigt werden. Trotz der geringen Sensitivität chemischer "Crosslinker" war die bei p.Pro248Leu beobachtete reduzierte Bildung von heteromeren Komplexen auffällig. Da die Substitution eines weiteren Aminosäurerestes in räumlicher Nähe zu Met263 ebenfalls eine Reduktion der heteromere Komplexbildung verursacht, wird die Relevanz dieser Oberflächenregion um Met263 als mögliche Bindungsstelle für GCDH-Interaktionspartner unterstrichen.

Die Substitution des Aminosäurerestes Asn392 mit Asp resultiert ebenfalls in einer Reduktion der heteromeren Komplexbildung im Vergleich zum Wildtyp-Protein (Abb. 4.8). Diese Reduktion konnte jedoch nach Substitution von Asn392 mit der neutralen Aminosäure Ala anstelle der polaren Aminosäure Asp nicht beobachtet werden. Die Reduktion der heteromeren Komplexbildung ist hier wahrscheinlich eher auf die starke Änderung der Polarität des Aminosäurerestes Asn392 durch Asp als auf die Beteiligung dieser Region an der Bindung von GCDH-Interaktionspartnern zurückzuführen. Zudem führen beide Mutationen zu einer Inaktivierung des GCDH-Proteins, gemessen in überexprimierten BHK-Zellen (Tab. 4.2). Dies deutet, wie bei den meisten carboxy-terminal lokalisierten Aminosäurresten, auf eine Beteiligung von Asn392 an der Tetramerisierung des GCDH-Proteins hin (Goodman et al. 1998; Westover et al. 2003; Christensen et al. 2004; Fu et al. 2004). Unterstützt wird diese Annahme durch die fehlende Tetramerisierung von GCDH nach Quervernetzung von p.Asn392Asp oder p.Asn392Ala mit dem chemischen "Crosslinker" BS³.

5.3 Identifizierung von GCDH-Interaktionspartnern

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten erstmals zwei Interaktionspartner der GCDH, das Elektron-Transfer-Flavoprotein (ETF) und die Dihydrolipoamid-Succinyltransferase (DLST), identifiziert werden. Das ETF-Protein wurde aufgrund der funktionalen Nähe bei der katalytischen Umsetzung von Glutaryl-CoA zu Crotonyl-CoA, bei der ETF als Elektronenakzeptor der GCDH fungiert (Abb. 1.3), als möglicher GCDH-Interaktionspartner ausgewählt und analysiert. DLST wurde im Rahmen einer GCDH-Affinitätschromatographie mit anschließender massenspektrometrischer Analyse als möglicher GCDH-Bindungspartner ermittelt und die Protein-Protein-Wechselwirkung daraufhin ebenfalls analysiert.

Das Elektron-Transfer-Flavoprotein (ETF) wurde 1956 von Crane und Beinert identifiziert (Crane et al. 1956) und stellt ein mitochondriales, lösliches, heterodimeres Protein dar, das ein FAD-Molekül als Coenzym trägt. ETF dient in Säugetieren als Elektronenakzeptor für neun Flavoprotein-Dehydrogenasen, die alle zur Acyl-CoA-Dehydrogenase-Familie gehören und entweder der mitochondrialen an Fettsäureoxidation (z.B. MCAD), am Cholin-Stoffwechsel (z.B. Sarkosin-Dehydrogenase) oder am Aminosäureabbau (z.B. GCDH) beteiligt sind. ETF nimmt über das FAD-Molekül die Elektronen der jeweiligen Acyl-CoA-Dehydrogenasen entgegen und leitet sie an das Ubichinon des Komplexes II der Atmungskette zur Energiebereitstellung in Form von ATP weiter. Das am Ende der Stoffwechselwege entstehende Acyl-CoA wird in den TCA-Zyklus eingeschleust. Defekte des ETF-Proteins führen biochemisch zu einem multiplen Acyl-CoA-Dehydrogenase-Mangel (MAD-Mangel oder auch Glutarazidurie Typ 2), der durch erhöhte Konzentrationen an Acyl-Carnitinen in Körperflüssigkeiten betroffener Patienten charakterisiert ist (Frerman et al. 1985). Der vollständige MAD-Mangel verursacht eine schwere Erkrankung bei Neugeborenen, bei der eine Enzephalopathie mit metabolischer Azidose und schweren Hypoglykämien im Vordergrund steht (Wilson et al. 1989).

In der vorliegenden Arbeit konnte über drei unabhängige Methoden ("Pull-Down"-, PCA- und SPR-Analyse) erstmals die direkte Interaktion zwischen GCDH und den Untereinheiten des ETF-Proteins nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich durch Quantifizierung der Protein-Wechselwirkungen, dass es sich sowohl bei GCDH und αETF als auch bei GCDH und βETF um stark affine Bindungen handelt (Abb. 4.9; Abb. 4.11; Abb. 4.13). Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen mutanter GCDH-Proteine, insbesondere von p.Pro248Leu und p.Met263Val, deuten daraufhin, dass Interaktionspartner der GCDH regulatorischen Einfluss auf die GCDH-Aktivität einnehmen. Mutationen in der ETF-Bindungsstelle könnten eine gestörte Wechselwirkung zwischen GCDH und ETF bewirken. Durch die fehlende Reduktion des GCDH-Proteins mittels ETF wäre die oxidative Decarboxylierung von Glutaryl-CoA zu Crotonyl-CoA gehemmt. Die Folge wäre der Aktivitätsverlust der GCDH, die zur Akkumulation von Glutaryl-CoA und den toxischen Metaboliten GA und 3OHGA führt. Dies könnte einen Hinweis liefern, warum auch Oberflächenmutationen, wie p.Met263Val, die *in vitro* hohe GCDH-Restaktivitäten aufweisen, zu einem drastischen GA1-Krankheitsverlauf führen können (Mühlhausen et al. 2003; Christensen et al. 2004).

Im Weiteren wurde daher untersucht, ob die in dieser Arbeit analysierten Aminosäurereste, insbesondere Pro248 und Met263, an der Interaktion mit aETF und/oder ßETF beteiligt sind. Dazu wurden "Pull-Down"-Analysen, sowie zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten SPR-Analysen durchgeführt (Abb. 4.14; Tab. 4.3). Aufgrund kontroverser Ergebnisse konnte die Beteiligung der Aminosäurereste Pro248 und Met263 an der Bindung der ETF-Untereinheiten weder bestätigt noch ausgeschlossen werden und bedarf zur Verifizierung einer weiteren unabhängigen Methode. Da die durch SPR-Analyse errechneten Dissoziationsgleichgewichtskonstanten der GCDH mit aETF und BETF von 292 bzw. 264 nM auf eine starke Interaktion hindeutet, stellt die Kristallisierung des GCDH-ETF-Komplexes einen sicheren Weg zur Identifizierung der Bindungsstellen beider Polypeptide dar. Mit Hilfe der Kristallstruktur könnten die an der Bindung involvierten Aminosäurereste in silico errechnet und über weitere Mutationsanalysen bestätigt werden. Derartige Studien wurden bereits am ETF-MCAD-Komplex durchgeführt (Toogood et al. 2004; Toogood et al. 2007) und ergab, das folgende Aminosäurereste an der Interaktion von ETF mit MCAD beteiligt sind: Arg249 der aETF-Untereinheit interagierte mit Glu237 des MCAD-Proteins und der Aminosäurerest Leu195 der ßETF-Untereinheit interagierte mit einer hydrophoben Tasche bestehend aus Glu59, Leu86, Leu98, Leu100 und Ile108 des MCAD-Proteins. Toogood und Kollegen postulieren, das die β-Untereinheit des ETF-Proteins immer über eine derartige hydrophobe Tasche mit den Acyl-CoA-Dehydrogenasen in Wechselwirkung tritt (Toogood et al. 2004; Toogood et al. 2007). Aufgrund der hohen Homologie von GCDH mit MCAD und den anderen Acyl-CoA-Dehydrogenasen (Fu et al. 2004) ist es wahrscheinlich, dass ebenfalls Aminosäuren der N-terminalen Domäne des GCDH-Proteins an der Bildung dieser hydrophoben Tasche zur Bindung von β ETF beteiligt sind. Nach Sequenzabgleich des GCDH-Vorläuferproteins mit dem MCAD-Vorläuferprotein würden folgende Aminosäurereste hierfür in Frage kommen: Glu77, Val105, Val118 und Leu126 (Abb. 5.2).

	51	59	86	98 108
MCAD:	QATA	RKFAREEIIP	AAEYDKTGEYPVPL I RRAW ELGL MNTH	IIPENCGGLGLGTFDACLISE
GCDH:	RDTF	RTYCQERLMP	ILLANRNEVFHREI I SEMG ELGV LGPT	IKG-Y<mark>G</mark>CA<mark>GV</mark>SSVAYGLLAR
	70	77	103	118 126

Abb. 5.2: Sequenzabgleich der N-terminalen Aminosäuren von MCAD und GCDH

In rot sind die bei MCAD an der Bildung der hydrophoben Tasche und Interaktion mit β ETF beteiligten Aminosäuren dargestellt. Ebenfalls in rot sind die Aminosäuren von GCDH, für die eine Interaktion mit β ETF postuliert wird dargestellt. In blau sind zusätzliche konservierte Aminosäuren markiert, die nicht an der Interaktion mit ETF beteiligt sein sollen. Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf die Vorläuferform der Proteine MCAD und GCDH.

Wenn die β ETF-Bindungsstelle wie postuliert auch bei GCDH im N-terminalen Bereich lokalisiert ist, würde dies erklären, warum zumindest in den SPR-Analysen keine reduzierten Affinitäten der Mutanten p.Pro248Leu, p.Met263Val und p.Asn392Asp, die in der mittleren β -Faltblattdomäne bzw. carboxyterminalen Domäne des GCDH-Proteins lokalisiert sind an β ETF messbar waren.

Der negativ geladene Glu237-Rest, der für die Bindung des positiven Arg249-Restes von α ETF an MCAD essentiell ist, wird bei GCDH, nach Abgleich der homologen Aminosäuresequenz, durch die nicht konservierte und zudem neutrale Aminosäure Gln251 positioniert (Abb. 5.3). Es ist daher als unwahrscheinlich anzusehen, dass dieser Aminosäurerest des GCDH-Proteins an der Bindung von α ETF beteiligt ist. Da die Aminosäurereste für die Bindung von α ETF in den verschiedenen Acyl-CoA-Dehydrogenasen alle in der mittleren β -Faltblattdomäne lokalisiert, aber nicht identisch sind (Parker 2003; Toogood et al. 2007), kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Aminosäurereste Pro248 und Met263, die in unmittelbarer Nähe zum Gln251 liegen, die Interaktion mit α ETF beeinflussen (Abb. 5.3).

237 MCAD: PGIQIGRKELNMGQRCSDTRGIVF GCDH: RGLSAPRIQGKFSLRASATGMIIM 248 263

Abb. 5.3: Sequenzabgleich von MCAD und GCDH zur Prognose von Aminosäureresten, die an der Interaktion mit αETF beteiligt sind.

In rot ist die bei MCAD an der α ETF-Bindung beteiligten Aminosäure dargestellt. Ebenfalls in rot sind die korrespondierenden Aminosäuren von GCDH. In grün sind die Aminosäuren Pro248 und Met263 dargestellt und in blau die zwischen MCAD und GCDH vorliegenden, konservierten Aminosäuren markiert.

Um unabhängig von der GCDH-ETF-Kristallstruktur eine mögliche Interaktion von p.Pro182Ala, p.Thr211Ala, p.Pro248Leu, Met263Val, p.Asn392Asp und p.Asn392Ala mit den Untereinheiten des ETF-Proteins zu verifizieren, könnten die Elektronen-Transfer-Raten der Mutanten in Anwesenheit des Redoxindikators Dichlor-phenolindophenol bestimmt werden. Bei einer Beteiligung der Aminosäurereste an der Bindung von αETF bzw. βETF sollte eine Reduktion der Elektronen-Transfer-Rate der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp-Protein gemessen werden können.

Neben der Interaktion von GCDH mit den Untereinheiten des ETF-Proteins konnte in der vorliegenden Arbeit außerdem erstmals die direkte Interaktion von GCDH mit der Dihydrolipoamid-Succinyltransferase (DLST) nachgewiesen werden (Abb. 4.19 und Abb. 4.20). DLST wurde zusammen mit fünf weiteren mitochondrialen Proteinen über GCDH-Affinitätschromatographie mit anschließender massenspektrometrischer Analyse als potentieller Interaktionspartner identifiziert (Tab. 4.4). Aus der Kandidatenliste wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst DLST für weitere Untersuchungen ausgewählt. DLST katalysiert den enzymatischen Schritt, der unmittelbar der GCDH-vermittelten Reaktion im Abbauweg von Lysin und Tryptophan vorgelagert ist, und somit in direkter funktionaler Nähe zum GCDH-Protein steht (Abb. 1.3).

DLST bildet die sogenannte E2-Untereinheit des aus insgesamt drei Untereinheiten bestehenden α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes (OGDC). Dieser Multienzymkomplex ist zum einen an der oxidativen Decarboxylierung von α -Ketoadipat zu Glutaryl-CoA im Abbauweg von Lysin und Tryptophan beteiligt (Abb. 1.3), und ist zum anderen für die oxidative Decarboxylierung von α -Ketoglutarat zu Succinyl-CoA im TCA-Zyklus verantwortlich. In neuronalen Zellen fungiert der OGDC zudem als Bindeglied zwischen dem Metabolismus des Neurotransmitters Glutamat und dem TCA-Zyklus (Sheu et al. 1999; Gibson et al. 2000b; Gibson et al. 2005). OGDC ist ein Mitglied der a-Ketosäure-Dehydrogenase-Komplexe, zu denen auch der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (PDC) und der Verzweigtkettige-a-Ketosäure-Dehydrogenase-Komplex (BCKDC) zählen. Jeder der drei Komplexe besteht aus einer Substrat-spezifischen Dehydrogenase (E1-Untereinheit), einer Dihydrolipoamid-Succinyltransferase (E2-Untereinheit) und einem, bei allen drei Komplexen identischem, Flavoprotein, der Dihydrolipoyl-Dehydrogenase (E3-Untereinheit) (Reed et al. 1990). Die Komplexe sind dabei so organisiert, dass 24 identische E2-Untereinheiten den Kern und die innere katalytische Domäne bilden, an die mehrere E1und E3-Untereinheiten nicht-kovalent verknüpft sind. Die E2-Untereinheiten der einzelnen α-Ketosäure-Dehydrogenase-Komplexe sind nicht identisch, weisen aber durch zahlreiche konservierte Aminosäuren eine hohe Homologie auf. Die zusätzlichen DLST-immunreaktiven Banden mit einer molaren Masse von ca. 56 und 70 kDa, die nach Protein-Liganden-Affinitätschromatographie in der Elutionsfraktion der GCDH-Matrix detektiert wurden (Abb. 4.17), könnten daher auf die Proteine DLAT (Dihydrolipoamid-Acetyltransferase des PDC-Komplexes; 72 kDa) und DBT ("Dihydrolipoamide branched chain transacylase" des BCKDC-Komplexes; 54 kDa) zurückzuführen sein.

Die enzymatische Aktivität von OGDC wird unter physiologischen Bedingungen von mehreren Faktoren wie z.B. der ATP/ADP-Ratio und der Ca²⁺-Konzentration reguliert. Die wichtigste Regulierung erfolgt jedoch über eine Produkt-Feedback-Inhibition durch entstehende CoA-Ester und die NAD/NADH-Ratio (Sheu et al. 1999; Gibson et al. 2000b). So inhibiert Glutaryl-CoA, das aus dem Abbau von α -Ketoadipat entsteht, konzentrationsabhängig die DLST-Untereinheit des OGDC *in vitro* (Sauer et al. 2005).

Durch den zusätzlichen Nachweis der direkten Interaktion von GCDH mit DLST könnte bei GA1-Patienten der OGDC-Komplex nicht nur durch das akkumulierende Produkt Glutaryl-CoA, sondern auch durch eine beeinträchtigte Proteinwechselwirkung zwischen GCDH und DLST nachhaltig gestört werden. Eine reduzierte OGDC-Aktivität wurde bereits bei mehreren neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer (Gibson et al. 2000a; Ohta et al. 2006; Dumont et al. 2009), Chorea Huntington (Klivenyi et al. 2004) und Parkinson (Kobayashi et al. 1998; Gibson et al. 2003)
beschrieben. Der Mechanismus, über den mutante DLST zur Neurodegeneration beitragen soll, ist jedoch unklar.

Die in dieser Arbeit bestätigte Interaktion des GCDH-Proteins mit anderen Proteinen wie DLST und ETF lassen vermuten, dass die GCDH-Aktivität durch Wechselwirkung mit verschiedenen Proteinen reguliert werden kann. Da DLST und auch ETF zudem an direkt aufeinander folgenden Reaktionswegen der oxidativen Decarboxylierung von Glutaryl-CoA zu Crotonyl-CoA beteiligt sind, spricht dies dafür, dass die genannten Proteine als Multienzymkomplex vorliegen. Denkbar wäre, ähnlich den α-Ketosäure-Dehydrogenase-Komplexen, dass GCDH die E1-Untereinheit, DLST die E2-Untereinheit und das Flavoprotein ETF die E3-Untereinheit des Komplexes bilden. Die Protein-Protein-Interaktionen innerhalb des Komplexes regulieren dabei die Aktivitäten der Einzelkomponenten. Multienzymkomplexe sind katalytisch effizient, da die Reaktionsgeschwindigkeit aufgrund der räumlichen Nähe der Reaktionszentren höher ist. Die einzelnen Reaktionsintermediate werden sofort durch das nachfolgende Enzym umgesetzt und können somit keine Nebenreaktionen eingehen. Diese Vorteile können aber auch zum Nachteil eines Multienzymkomplexes werden, wenn durch Mutationen Komplex beteiligter Proteine, oder durch Änderungen einzelner. am der physiologischen Begebenheiten der Reaktionsfluss blockiert wird. So könnten z.B. Mutationen der GCDH nicht nur die katalytische Reaktion von Glutaryl-CoA zu Crotonyl-CoA beeinträchtigen, sondern auch den OGDC-Komplex nachhaltig stören, oder durch fehlende ETF-Interaktion zu einer Störung der Atmungskette beitragen. Die Beteiligung der GCDH an einem Multienzymkomplex könnte auch die fehlende Korrelation zwischen enzymatischer Restaktivität mutanter GCDH und dem klinischen Phänotyp der GA1 erklären, wie bereits für die Interaktion mit ETF diskutiert wurde. Mutationen wie z.B. p.Met263Val, die eine relativ hohe enzymatische GCDH-Restaktivität aufweisen, an der Protein-Oberfläche lokalisiert sind und strukturell keine Auswirkungen auf das GCDH-Protein einnehmen (Tetramerisierung und aktives Zentrum), könnten durch gestörte Interaktion mit GCDH-Interaktionspartnern zur Blockade eines Multienzymkomplexes beitragen. Die additive Wirkung auf den Stoffwechsel von Neuronen könnte dadurch einen schweren Krankheitsverlauf bewirken. Wichtig ist es daher auch, die an der Interaktion von DLST beteiligten Aminosäuren zu identifizieren und zu charakterisieren. Für die in dieser Arbeit analysierten Mutationen kann eine Beteiligung von Pro248 und Met263, wie bei α ETF auch für die Bindung von DLST nicht ausgeschlossen werden.

Die Bedeutung von Pro248 und Met263 sowie weiterer auf der GCDH-Oberfläche lokalisierter Aminosäurereste für die Bindung von DLST sollten über die bereits etablierten Methoden wie SPR, "Pull-Down", PCA und auch "Yeast-Two-Hybrid" evaluiert werden. Längerfristig sollte auch hier die Kristallstruktur von GCDH mit DLST erstellt werden. Die experimentellen Voraussetzungen für die Aufreinigung von GCDH und DLST sind gegeben.

Zur Identifizierung eines postulierten GCDH-Multienzymkomplexes könnte die Technik der "Blue-native"-Gelelektrophorese (BN-PAGE) angewandt werden. BN-PAGE ermöglicht eine hochauflösende Trennung von intakten Multienzymkomplexen unter nativen Bedingungen im Größenbereich von 100 bis 1000 kDa (Schagger et al. 1991; Vogtle et al. 2010). Die BN-PAGE mit anschließender 2D-SDS-Gelelektrophorese wurde z.B. erfolgreich zur Identifizierung der beteiligten Proteine der Atmungskette oder der mitochondrialen Proteintransportmaschinerie eingesetzt (Truscott et al. 2002; Eubel et al. 2005). Zum Nachweis eines Multienzymkomplexes könnten isolierte Mitochondrienextrakte über BN-PAGE aufgetrennt werden, die resultierenden Proteinkomplexe ausgeschnitten und über Massenspektroskopie bzw. GCDH/DLST/ETF spezifischen Western Blot analysiert werden. Desweiteren könnte Analyse eines möglichen Multienzymkomplexes die Methode der zur Größenausschlusschromatographie unter Verwendung von Mitochondrien-Matrix-Extrakten aus Wildtyp- und Gcdh^{-/-}-Mäusen mit anschließendem Western Blot eingesetzt werden.

6. Zusammenfassung

Die mitochondriale Glutaryl-CoA-Dehydrogenase (GCDH) ist am Abbauweg der Aminosäuren Lysin, Hydroxylysin und Tryptophan beteiligt und katalysiert die oxidative, FAD-abhängige Decarboxylierung von Glutaryl-CoA zu Crotonyl-CoA. Mutationen in der GCDH führen zur Glutarazidurie Typ 1 (GA1) und sind mit der Akkumulation der toxischen Metabolite Glutarsäure (GA) und 3-Hydroxyglutarsäure (3OHGA) in Körperflüssigkeiten und Geweben verbunden, die während kataboler Krisen zur Degeneration von Neuronen des Striatums führen. Die Pathomechanismen der Erkrankung sowie Gründe für die Diskrepanz zwischen enzymatischer Restaktivität mutanter GCDH und klinischem Phänotyp sind unklar.

Im ersten Teil der Arbeit konnte an Gcdh-defizienten Astrozyten und Neuronen eines GA1-Mausmodells gezeigt werden, dass GA und 3OHGA den Export von [¹⁴C]-Succinat aus Astrozyten und die über den Na⁺-abhängigen Dicarboxylat-Transporter NaC3 vermittelte Aufnahme von [¹⁴C]-Succinat in Neurone stören. Dieser interzelluläre Transport ist Teil der anaplerotischen Versorgung von neuronalen Zellen mit Tricarbonsäure-(TCA)-Zyklus-Intermediaten, die für die ATP-Synthese und Neuro-transmitterproduktion benötigt werden. Die reduzierte Bereitstellung von TCA-Zyklus-Intermediaten in Anwesenheit von GA und 3OHGA könnte den Energiestoffwechsel beeinträchtigen und zur Degeneration von Neuronen im Striatum von GA1-Patienten führen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Untersuchungen zur Interaktion der homotetrameren GCDH mit anderen mitochondrialen Matrixproteinen und mutationsvermittelte Analyse möglicher Bindungsstellen durchgeführt. Mit Hilfe von "Protein-Complementation-Assay", Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie und "Pull-Down"-Experimenten konnte sowohl die Bindung der Untereinheiten des Elektronen-Transfer-Flavoproteins (ETF) als auch der Dihydrolipoamid-Succinyltransferase (DLST) nachgewiesen und charakterisiert werden. ETF und DLST sind an aufeinanderfolgenden Reaktionen der GCDH-katalysierten oxidativen Decarboxylierung von Glutaryl-CoA zu Crotonyl-CoA beteiligt und lassen aufgrund der funktionalen Nähe der Proteine auf einen einheitlichen Kontrollmechanismus in Form eines Multienzymkomplexes schließen. GA1-Patienten

mit Mutationen, die eine relativ hohe enzymatische Restaktivität aufweisen und strukturell keine Auswirkung auf das GCDH-Protein haben, könnten durch die gestörte Interaktion mit ETF und DLST zur Blockade des postulierten Multienzymkomplexes führen und so zu einem klinisch schweren Phänotyp beitragen. Die Identifizierung und Charakterisierung dieses Multienzymkomplexes würde das Grundverständnis der Pathobiochemie der GA1 erheblich erweitern und eine Klärung für die fehlende Korrelation zwischen dem Genotyp und dem klinischen Phänotyp bereitstellen.

7. Literatur

- Alebouyeh, M., Takeda, M., Onozato, M.L., Tojo, A., Noshiro, R., Hasannejad, H., Inatomi, J., Narikawa, S., Huang, X.L., Khamdang, S., Anzai, N. and Endou, H. (2003). "Expression of human organic anion transporters in the choroid plexus and their interactions with neurotransmitter metabolites." J Pharmacol Sci 93(4): 430-436.
- Bahn, A., Ljubojevic, M., Lorenz, H., Schultz, C., Ghebremedhin, E., Ugele, B., Sabolic, I., Burckhardt, G. and Hagos, Y. (2005). "Murine renal organic anion transporters mOAT1 and mOAT3 facilitate the transport of neuroactive tryptophan metabolites." <u>Am J Physiol Cell Physiol</u> 289(5): C1075-1084.
- Baric, I., Baraka, K., Maradin, M., Bartonicek, D., Sarnavka, V., Begovic, D. and Fumic, K. (2003). "[Glutaric aciduria type 1: an example of the importance of early detection of so-called cerebral organic aciduria]." <u>Lijec Vjesn</u> 125(11-12): 312-316.
- Benga, G., Hodarnau, A., Tilinca, R., Porutiu, D., Dancea, S., Pop, V. and Wrigglesworth, J. (1979). "Fractionation of human liver mitochondria: enzymic and morphological characterization of the inner and outer membranes as compared to rat liver mitochondria." J Cell Sci 35: 417-429.
- Biery, B.J., Stein, D.E., Morton, D.H. and Goodman, S.I. (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." <u>Am J Hum Genet</u> 59(5): 1006-1011.
- Brauburger, K., Burckhardt, G. and Burckhardt, B.C. (2011). "The sodium-dependent di- and tricarboxylate transporter, NaCT, is not responsible for the uptake of D-, L-2-hydroxyglutarate and 3-hydroxyglutarate into neurons." J Inherit Metab Dis 34(2): 477-482.
- Busquets, C., Merinero, B., Christensen, E., Gelpi, J.L., Campistol, J., Pineda, M., Fernandez-Alvarez, E., Prats, J.M., Sans, A., Arteaga, R., Marti, M., Campos, J., Martinez-Pardo, M., Martinez-Bermejo, A., Ruiz-Falco, M.L., Vaquerizo, J., Orozco, M., Ugarte, M., Coll, M.J. and Ribes, A. (2000). "Glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency in Spain: evidence of two groups of patients, genetically, and biochemically distinct." <u>Pediatr Res</u> 48(3): 315-322.
- Chacinska, A., Koehler, C.M., Milenkovic, D., Lithgow, T. and Pfanner, N. (2009). "Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms." <u>Cell</u> **138**(4): 628-644.
- Christensen, E. (1983). "Improved assay of glutaryl-CoA dehydrogenase in cultured cells and liver: application to glutaric aciduria type I." <u>Clin Chim Acta</u> **129**(1): 91-97.
- 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): 861-868.

- Crane, F.L. and Beinert, H. (1956). "On the mechanism of dehydrogenation of fatty acyl derivatives of coenzyme A. II. The electron-transferring flavoprotein." J Biol <u>Chem</u> 218(2): 717-731.
- Dumont, M., Ho, D.J., Calingasan, N.Y., Xu, H., Gibson, G. and Beal, M.F. (2009). "Mitochondrial dihydrolipoyl succinyltransferase deficiency accelerates amyloid pathology and memory deficit in a transgenic mouse model of amyloid deposition." <u>Free Radic Biol Med</u> 47(7): 1019-1027.
- Eubel, H., Braun, H.P. and Millar, A.H. (2005). "Blue-native PAGE in plants: a tool in analysis of protein-protein interactions." <u>Plant Methods</u> **1**(1): 11.
- Frerman, F.E. and Goodman, S.I. (1985). "Deficiency of electron transfer flavoprotein or electron transfer flavoprotein:ubiquinone oxidoreductase in glutaric acidemia type II fibroblasts." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 82(13): 4517-4520.
- Freudenberg, F., Lukacs, Z. and Ullrich, K. (2004). "3-Hydroxyglutaric acid fails to affect the viability of primary neuronal rat cells." <u>Neurobiol Dis</u> **16**(3): 581-584.
- Fu, Z., Wang, M., Paschke, R., Rao, K.S., Frerman, F.E. and Kim, J.J. (2004). "Crystal structures of human glutaryl-CoA dehydrogenase with and without an alternate substrate: structural bases of dehydrogenation and decarboxylation reactions." <u>Biochemistry</u> 43(30): 9674-9684.
- Gibson, G.E., Blass, J.P., Beal, M.F. and Bunik, V. (2005). "The alpha-ketoglutaratedehydrogenase complex: a mediator between mitochondria and oxidative stress in neurodegeneration." <u>Mol Neurobiol</u> **31**(1-3): 43-63.
- Gibson, G.E., Haroutunian, V., Zhang, H., Park, L.C., Shi, Q., Lesser, M., Mohs, R.C., Sheu, R.K. and Blass, J.P. (2000a). "Mitochondrial damage in Alzheimer's disease varies with apolipoprotein E genotype." <u>Ann Neurol</u> 48(3): 297-303.
- Gibson, G.E., Kingsbury, A.E., Xu, H., Lindsay, J.G., Daniel, S., Foster, O.J., Lees, A.J. and Blass, J.P. (2003). "Deficits in a tricarboxylic acid cycle enzyme in brains from patients with Parkinson's disease." <u>Neurochem Int</u> **43**(2): 129-135.
- Gibson, G.E., Park, L.C., Sheu, K.F., Blass, J.P. and Calingasan, N.Y. (2000b). "The alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex in neurodegeneration." <u>Neurochem</u> <u>Int</u> **36**(2): 97-112.
- Goodman, S.I. (2001). "Prenatal diagnosis of glutaric acidemias." <u>Prenat Diagn</u> **21**(13): 1167-1168.
- Goodman, S.I., Markey, S.P., Moe, P.G., Miles, B.S. and Teng, C.C. (1975). "Glutaric aciduria; a "new" disorder of amino acid metabolism." <u>Biochem Med</u> **12**(1): 12-21.
- Goodman, S.I., Norenberg, M.D., Shikes, R.H., Breslich, D.J. and Moe, P.G. (1977). "Glutaric aciduria: biochemical and morphologic considerations." J Pediatr 90(5): 746-750.
- Goodman, S.I., Stein, D.E., Schlesinger, S., Christensen, E., Schwartz, M., Greenberg, C.R. and Elpeleg, O.N. (1998). "Glutaryl-CoA dehydrogenase mutations in glutaric acidemia (type I): review and report of thirty novel mutations." <u>Hum Mutat</u> 12(3): 141-144.
- Gordon, N. (2006). "Glutaric aciduria types I and II." <u>Brain Dev</u> 28(3): 136-140.
- Graham, J.M. (2001). "Isolation of mitochondria from tissues and cells by differential centrifugation." <u>Curr Protoc Cell Biol</u> Chapter 3: Unit 3 3.

- Greenberg, C.R., Duncan, A.M., Gregory, C.A., Singal, R. and Goodman, S.I. (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." <u>Genomics</u> 21(1): 289-290.
- Greenberg, C.R., Reimer, D., Singal, R., Triggs-Raine, B., Chudley, A.E., Dilling, L.A., Philipps, S., Haworth, J.C., Seargeant, L.E. and Goodman, S.I. (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." <u>Hum</u> <u>Mol Genet</u> 4(3): 493-495.
- Hagos, Y., Krick, W., Braulke, T., Mühlhausen, C., Burckhardt, G. and Burckhardt, B.C. (2008). "Organic anion transporters OAT1 and OAT4 mediate the high affinity transport of glutarate derivatives accumulating in patients with glutaric acidurias." <u>Pflugers Arch</u> 457(1): 223-231.
- Harting, I., Neumaier-Probst, E., Seitz, A., Maier, E.M., Assmann, B., Baric, I., Troncoso, M., Mühlhausen, C., Zschocke, J., Boy, N.P., Hoffmann, G.F., Garbade, S.F. and Kölker, S. (2009). "Dynamic changes of striatal and extrastriatal abnormalities in glutaric aciduria type I." <u>Brain</u> 132(Pt 7): 1764-1782.
- Hassel, B. (2000). "Carboxylation and anaplerosis in neurons and glia." <u>Mol Neurobiol</u> **22**(1-3): 21-40.
- Hassel, B. and Brathe, A. (2000). "Neuronal pyruvate carboxylation supports formation of transmitter glutamate." J Neurosci **20**(4): 1342-1347.
- Hertz, L. (1979). "Functional interactions between neurons and astrocytes I. Turnover and metabolism of putative amino acid transmitters." <u>Prog Neurobiol</u> **13**(3): 277-323.
- Hertz, L. and Kala, G. (2007). "Energy metabolism in brain cells: effects of elevated ammonia concentrations." <u>Metab Brain Dis</u> 22(3-4): 199-218.
- Hoffmann, G.F., Athanassopoulos, S., Burlina, A.B., Duran, M., de Klerk, J.B., Lehnert, W., Leonard, J.V., Monavari, A.A., Müller, E., Muntau, A.C., Naughten, E.R., 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." <u>Neuropediatrics</u> 27(3): 115-123.
- Jitrapakdee, S., St Maurice, M., Rayment, I., Cleland, W.W., Wallace, J.C. and Attwood, P.V. (2008). "Structure, mechanism and regulation of pyruvate carboxylase." <u>Biochem J</u> **413**(3): 369-387.
- Keyser, B., Glatzel, M., Stellmer, F., Kortmann, B., Lukacs, Z., Kölker, S., Sauer, S.W., Muschol, N., Herdering, W., Thiem, J., Goodman, S.I., Koeller, D.M., Ullrich, K., Braulke, T. and Mühlhausen, C. (2008a). "Transport and distribution of 3hydroxyglutaric acid before and during induced encephalopathic crises in a mouse model of glutaric aciduria type 1." <u>Biochim Biophys Acta</u> 1782(6): 385-390.
- Keyser, B., Mühlhausen, C., Dickmanns, A., Christensen, E., Muschol, N., Ullrich, K. and Braulke, T. (2008b). "Disease-causing missense mutations affect enzymatic activity, stability and oligomerization of glutaryl-CoA dehydrogenase (GCDH)." <u>Hum Mol Genet</u> 17(24): 3854-3863.

- Klivenyi, P., Starkov, A.A., Calingasan, N.Y., Gardian, G., Browne, S.E., Yang, L., Bubber, P., Gibson, G.E., Patel, M.S. and Beal, M.F. (2004). "Mice deficient in dihydrolipoamide dehydrogenase show increased vulnerability to MPTP, malonate and 3-nitropropionic acid neurotoxicity." J Neurochem 88(6): 1352-1360.
- Kobayashi, T., Matsumine, H., Matuda, S. and Mizuno, Y. (1998). "Association between the gene encoding the E2 subunit of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex and Parkinson's disease." <u>Ann Neurol</u> **43**(1): 120-123.
- Koeller, D.M., DiGiulio, K.A., Angeloni, S.V., Dowler, L.L., Frerman, F.E., White, R.A. and Goodman, S.I. (1995). "Cloning, structure, and chromosome localization of the mouse glutaryl-CoA dehydrogenase gene." <u>Genomics</u> 28(3): 508-512.
- Koeller, D.M., Woontner, M., Crnic, L.S., Kleinschmidt-DeMasters, B., Stephens, J., Hunt, E.L. and Goodman, S.I. (2002). "Biochemical, pathologic and behavioral analysis of a mouse model of glutaric acidemia type I." <u>Hum Mol Genet</u> 11(4): 347-357.
- Kölker, S., Ahlemeyer, B., Krieglstein, J. and Hoffmann, G.F. (2001). "Contribution of reactive oxygen species to 3-hydroxyglutarate neurotoxicity in primary neuronal cultures from chick embryo telencephalons." <u>Pediatr Res</u> **50**(1): 76-82.
- Kölker, S., Christensen, E., Leonard, J.V., Greenberg, C.R., Boneh, A., Burlina, A.B., Burlina, A.P., Dixon, M., Duran, M., Garcia Cazorla, A., Goodman, S.I., Koeller, D.M., Kyllerman, M., Mühlhausen, C., Müller, E., Okun, J.G., Wilcken, B., Hoffmann, G.F. and Burgard, P. (2011). "Diagnosis and management of glutaric aciduria type I - revised recommendations." J Inherit Metab Dis.
- Kölker, S., Christensen, E., Leonard, J.V., Greenberg, C.R., Burlina, A.B., Burlina, A.P., Dixon, M., Duran, M., Goodman, S.I., Koeller, D.M., Müller, E., Naughten, E.R., Neumaier-Probst, E., Okun, J.G., Kyllerman, M., Surtees, R.A., Wilcken, B., Hoffmann, G.F. 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.
- Kölker, S., Garbade, S.F., Greenberg, C.R., Leonard, J.V., Saudubray, J.M., Ribes, A., Kalkanoglu, H.S., Lund, A.M., Merinero, B., Wajner, M., Troncoso, M., Williams, M., Walter, J.H., Campistol, J., Marti-Herrero, M., Caswill, M., Burlina, A.B., Lagler, F., Maier, E.M., Schwahn, B., Tokatli, A., Dursun, A., Coskun, T., Chalmers, R.A., Koeller, D.M., Zschocke, J., Christensen, E., Burgard, P. and Hoffmann, G.F. (2006). "Natural history, outcome, and treatment efficacy in children and adults with glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency." Pediatr Res 59(6): 840-847.
- Kölker, S., Kohr, G., Ahlemeyer, B., Okun, J.G., Pawlak, V., Horster, F., Mayatepek, E., Krieglstein, J. and Hoffmann, G.F. (2002a). "Ca(2+) and Na(+) dependence of 3-hydroxyglutarate-induced excitotoxicity in primary neuronal cultures from chick embryo telencephalons." <u>Pediatr Res</u> 52(2): 199-206.
- Kölker, S., Okun, J.G., Ahlemeyer, B., Wyse, A.T., Horster, F., Wajner, M., Kohlmüller, D., Mayatepek, E., Krieglstein, J. and Hoffmann, G.F. (2002b). "Chronic treatment with glutaric acid induces partial tolerance to excitotoxicity

in neuronal cultures from chick embryo telencephalons." <u>J Neurosci Res</u> **68**(4): 424-431.

- Külkens, S., Harting, I., Sauer, S., Zschocke, J., Hoffmann, G.F., Gruber, S., Bodamer, O.A. and Kölker, S. (2005). "Late-onset neurologic disease in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency." <u>Neurology</u> 64(12): 2142-2144.
- Kusch-Poddar, M., Drewe, J., Fux, I. and Gutmann, H. (2005). "Evaluation of the immortalized human brain capillary endothelial cell line BB19 as a human cell culture model for the blood-brain barrier." <u>Brain Res</u> **1064**(1-2): 21-31.
- Lamp, J., Keyser, B., Koeller, D.M., Ullrich, K., Braulke, T. and Mühlhausen, C. (2011). "Glutaric aciduria type 1 metabolites impair the succinate transport from astrocytic to neuronal cells." J Biol Chem 286(20): 17777-17784.
- Latini, A., Rodriguez, M., Borba Rosa, R., Scussiato, K., Leipnitz, G., Reis de Assis, D., da Costa Ferreira, G., Funchal, C., Jacques-Silva, M.C., Buzin, L., Giugliani, R., Cassina, A., Radi, R. and Wajner, M. (2005). "3-Hydroxyglutaric acid moderately impairs energy metabolism in brain of young rats." <u>Neuroscience</u> 135(1): 111-120.
- Liesert, M., Zschocke, J., Hoffmann, G.F., Mühlhauser, N. and Buckel, W. (1999). "Biochemistry of glutaric aciduria type I: activities of in vitro expressed wildtype and mutant cDNA encoding human glutaryl-CoA dehydrogenase." J Inherit Metab Dis 22(3): 256-258.
- Lindner, M., Kölker, S., Schulze, A., Christensen, E., Greenberg, C.R. and Hoffmann, G.F. (2004). "Neonatal screening for glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency." J Inherit Metab Dis 27(6): 851-859.
- Lipton, S.A., Choi, Y.B., Pan, Z.H., Lei, S.Z., Chen, H.S., Sucher, N.J., Loscalzo, J., Singel, D.J. and Stamler, J.S. (1993). "A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitrosocompounds." <u>Nature</u> 364(6438): 626-632.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." <u>Methods</u> **25**(4): 402-408.
- Lund, T.M., Christensen, E., Kristensen, A.S., Schousboe, A. and Lund, A.M. (2004).
 "On the neurotoxicity of glutaric, 3-hydroxyglutaric, and trans-glutaconic acids in glutaric acidemia type 1." J Neurosci Res 77(1): 143-147.
- Lynch, D.R. and Guttmann, R.P. (2002). "Excitotoxicity: perspectives based on N-methyl-D-aspartate receptor subtypes." J Pharmacol Exp Ther **300**(3): 717-723.
- Morton, D.H., Bennett, M.J., Seargeant, L.E., Nichter, C.A. and Kelley, R.I. (1991). "Glutaric aciduria type I: a common cause of episodic encephalopathy and spastic paralysis in the Amish of Lancaster County, Pennsylvania." <u>Am J Med</u> <u>Genet</u> **41**(1): 89-95.
- Mühlhausen, C., Burckhardt, B.C., 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.
- 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." <u>J</u> <u>Inherit Metab Dis</u> 26(7): 713-714.

- Mühlhausen, C., Hoffmann, G.F., Strauss, K.A., Kölker, S., Okun, J.G., Greenberg, C.R., Naughten, E.R. and Ullrich, K. (2004). "Maintenance treatment of glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency." J Inherit Metab Dis 27(6): 885-892.
- Mühlhausen, C., Ott, N., Chalajour, F., Tilki, D., Freudenberg, F., Shahhossini, M., Thiem, J., Ullrich, K., Braulke, T. and Ergun, S. (2006). "Endothelial effects of 3-hydroxyglutaric acid: implications for glutaric aciduria type I." <u>Pediatr Res</u> 59(2): 196-202.
- Nyfeler, B. and Hauri, H.P. (2007). "Visualization of protein interactions inside the secretory pathway." <u>Biochem Soc Trans</u> **35**(Pt 5): 970-973.
- Ohta, S. and Ohsawa, I. (2006). "Dysfunction of mitochondria and oxidative stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease: on defects in the cytochrome c oxidase complex and aldehyde detoxification." J Alzheimers Dis 9(2): 155-166.
- Olney, J.W. (1990). "Excitotoxicity: an overview." <u>Can Dis Wkly Rep</u> 16 Suppl 1E: 47-57; discussion 57-48.
- Olney, J.W. (1993). "Role of excitotoxins in developmental neuropathology." <u>APMIS</u> <u>Suppl</u> **40**: 103-112.
- Olney, J.W. and Sharpe, L.G. (1969). "Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monsodium glutamate." <u>Science</u> **166**(903): 386-388.
- Pajor, A.M., Gangula, R. and Yao, X. (2001). "Cloning and functional characterization of a high-affinity Na(+)/dicarboxylate cotransporter from mouse brain." <u>Am J</u> <u>Physiol Cell Physiol</u> 280(5): C1215-1223.
- Parker, A.R. (2003). "A single arginine residue is required for the interaction of the electron transferring flavoprotein (ETF) with three of its dehydrogenase partners." <u>Mol Cell Biochem</u> **254**(1-2): 91-100.
- Pessin, J.E., Thurmond, D.C., Elmendorf, J.S., Coker, K.J. and Okada, S. (1999). "Molecular basis of insulin-stimulated GLUT4 vesicle trafficking. Location! Location! Location!" J Biol Chem 274(5): 2593-2596.
- Pineda, M., Ribes, A., Busquets, C., Vilaseca, M.A., Aracil, A. and Christensen, E. (1998). "Glutaric aciduria type I with high residual glutaryl-CoA dehydrogenase activity." <u>Dev Med Child Neurol</u> 40(12): 840-842.
- Rea, S. and James, D.E. (1997). "Moving GLUT4: the biogenesis and trafficking of GLUT4 storage vesicles." <u>Diabetes</u> **46**(11): 1667-1677.
- Reed, L.J. and Hackert, M.L. (1990). "Structure-function relationships in dihydrolipoamide acyltransferases." J Biol Chem **265**(16): 8971-8974.
- Sauer, S.W., Okun, J.G., Fricker, G., Mahringer, A., Müller, I., Crnic, L.R., Muhlhausen, C., Hoffmann, G.F., Hörster, F., Goodman, S.I., Harding, C.O., Koeller, D.M. and Kölker, S. (2006). "Intracerebral accumulation of glutaric and 3-hydroxyglutaric acids secondary to limited flux across the blood-brain barrier constitute a biochemical risk factor for neurodegeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency." J Neurochem 97(3): 899-910.
- Sauer, S.W., Okun, J.G., Schwab, M.A., Crnic, L.R., Hoffmann, G.F., Goodman, S.I., Koeller, D.M. and Kölker, S. (2005). "Bioenergetics in glutaryl-coenzyme A

dehydrogenase deficiency: a role for glutaryl-coenzyme A." J Biol Chem **280**(23): 21830-21836.

- 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." <u>Anal Biochem</u> **166**(2): 368-379.
- Schagger, H. and von Jagow, G. (1991). "Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form." <u>Anal Biochem</u> 199(2): 223-231.
- Schousboe, A., Westergaard, N., Waagepetersen, H.S., Larsson, O.M., Bakken, I.J. and Sonnewald, U. (1997). "Trafficking between glia and neurons of TCA cycle intermediates and related metabolites." <u>Glia</u> 21(1): 99-105.
- Schwartz, M., Christensen, E., Superti-Furga, A. and Brandt, N.J. (1998). "The human glutaryl-CoA dehydrogenase gene: report of intronic sequences and of 13 novel mutations causing glutaric aciduria type I." <u>Hum Genet</u> 102(4): 452-458.
- Sheu, K.F. and Blass, J.P. (1999). "The alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex." <u>Ann N Y Acad Sci</u> **893**: 61-78.
- Stellmer, F., Keyser, B., Burckhardt, B.C., Koepsell, H., Streichert, T., Glatzel, M., Jabs, S., Thiem, J., Herdering, W., Koeller, D.M., Goodman, S.I., Lukacs, Z., Ullrich, K., Burckhardt, G., Braulke, T. and Mühlhausen, C. (2007). "3-Hydroxyglutaric acid is transported via the sodium-dependent dicarboxylate transporter NaDC3." J Mol Med 85(7): 763-770.
- Strauss, K.A. and Morton, D.H. (2003a). "Type I glutaric aciduria, part 2: a model of acute striatal necrosis." Am J Med Genet C Semin Med Genet **121C**(1): 53-70.
- Strauss, K.A., Puffenberger, E.G., Robinson, D.L. and Morton, D.H. (2003b). "Type I glutaric aciduria, part 1: natural history of 77 patients." <u>Am J Med Genet C Semin Med Genet</u> 121C(1): 38-52.
- Toogood, H.S., Leys, D. and Scrutton, N.S. (2007). "Dynamics driving function: new insights from electron transferring flavoproteins and partner complexes." <u>FEBS</u> <u>J</u> 274(21): 5481-5504.
- Toogood, H.S., van Thiel, A., Basran, J., Sutcliffe, M.J., Scrutton, N.S. and Leys, D. (2004). "Extensive domain motion and electron transfer in the human electron transferring flavoprotein.medium chain Acyl-CoA dehydrogenase complex." J <u>Biol Chem</u> 279(31): 32904-32912.
- Torgner, I. and Kvamme, E. (1990). "Synthesis of transmitter glutamate and the glialneuron interrelationship." Mol Chem Neuropathol **12**(1): 11-17.
- Truscott, K.N., Wiedemann, N., Rehling, P., Müller, H., Meisinger, C., Pfanner, N. and Guiard, B. (2002). "Mitochondrial import of the ADP/ATP carrier: the essential TIM complex of the intermembrane space is required for precursor release from the TOM complex." <u>Mol Cell Biol</u> 22(22): 7780-7789.
- Twomey, E.L., Naughten, E.R., Donoghue, V.B. and Ryan, S. (2003). "Neuroimaging findings in glutaric aciduria type 1." <u>Pediatr Radiol</u> **33**(12): 823-830.
- 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.

- Uwai, Y., Okuda, M., Takami, K., Hashimoto, Y. and Inui, K. (1998). "Functional characterization of the rat multispecific organic anion transporter OAT1 mediating basolateral uptake of anionic drugs in the kidney." <u>FEBS Lett</u> **438**(3): 321-324.
- Vogtle, F.N., Schmidt, O., Chacinska, A., Pfanner, N. and Meisinger, C. (2010). "Native techniques for analysis of mitochondrial protein import." <u>Methods Mol</u> <u>Biol</u> 619: 425-436.
- Watmough, N.J. and Frerman, F.E. (2010). "The electron transfer flavoprotein: ubiquinone oxidoreductases." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1797**(12): 1910-1916.
- Westover, J.B., Goodman, S.I. and Frerman, F.E. (2003). "Pathogenic mutations in the carboxyl-terminal domain of glutaryl-CoA dehydrogenase: effects on catalytic activity and the stability of the tetramer." <u>Mol Genet Metab</u> **79**(4): 245-256.
- White, L.E., Hodges, H.D., Carnes, K.M., Price, J.L. and Dubinsky, J.M. (1994).
 "Colocalization of excitatory and inhibitory neurotransmitter markers in striatal projection neurons in the rat." J Comp Neurol 339(3): 328-340.
- Wilson, G.N., de Chadarevian, J.P., Kaplan, P., Loehr, J.P., Frerman, F.E. and Goodman, S.I. (1989). "Glutaric aciduria type II: review of the phenotype and report of an unusual glomerulopathy." <u>Am J Med Genet</u> **32**(3): 395-401.
- 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): 162-173.
- Zinnanti, W.J., Lazovic, J., Housman, C., LaNoue, K., O'Callaghan, J.P., Simpson, I., Woontner, M., Goodman, S.I., Connor, J.R., Jacobs, R.E. and Cheng, K.C. (2007). "Mechanism of age-dependent susceptibility and novel treatment strategy in glutaric acidemia type I." J Clin Invest 117(11): 3258-3270.
- Zinnanti, W.J., Lazovic, J., Wolpert, E.B., Antonetti, D.A., Smith, M.B., Connor, J.R., Woontner, M., Goodman, S.I. and Cheng, K.C. (2006). "A diet-induced mouse model for glutaric aciduria type I." <u>Brain</u> 129(Pt 4): 899-910.
- Zschocke, J., Quak, E., Guldberg, P. and Hoffmann, G.F. (2000). "Mutation analysis in glutaric aciduria type I." J Med Genet **37**(3): 177-181.

8. Anhang

Verwendete Primer

1 ab. 8.1: Primer für die Keal-time-PC	e Real-time-PCR
--	-----------------

Gen	Protein	TaqMan [®] -Gene Expression Assay
Actin	Actin	Mm00607939_s1
Catalase	Catalase	Mm00437992_m1
Gapdh	Gapdh	Mm999999915_g1
Glutathionreduktase	Glutathionreduktase	Mm00439151_m1
SLC13a5	NaC2	Mm01334459_m1
SLC13a3	NaC3	Mm00475280_m1
Slc22a6	OAT1	Mm00456258_m1

Tab. 8.2: Primer zur Genotypisierung Gcdh-defizienter Mäuse

Name	Sequenz	$T_M [°C]$
GA1-wt-for	5'-CTTCCGTAACTACTGGCAGGAGCGG-3'	67,9
GA1-wt-rev	5'-AGCTCTCGGGTCAGAAGCCCATAGG-3'	67,9
GA1-ko-for	5'-TTAGGCCTAGTGTGCTGGTCCCGGA-3'	67,9
GA1-ko-rev	5'-TCTGGTGCCGGAAACCAGGCAAAGC-3'	67,9

Tab. 8.3: Primer zur l	Klonierung der	verwendeten	GCDH-Mutanten
------------------------	----------------	-------------	----------------------

Name	Sequenz	Τ _M [°C]
Pro182Ala-for	5'-CGGGCTCACAGAGGCCAACAGCGGCC-3'	74,3
Pro182Ala-rev	5´-GGCCGCTGTTGGCCCTCTGTGAGCCCG-3´	74,3
Thr211Ala-for	5'-CCTCAATGGGACCAAGGCCTGGATCACG-3'	71,0
Thr211Ala-rev	5'-CGTGATCCAGGCCTTGGTCCCATTGAGG-3'	71,0
Pro248Leu-for	5´-CGGGGTCTCTCGGCCCTCAGGATCCAGGGC-3´	>75
Pro248Leu-rev	5'-GCCCTGGATCCTGAGGGCCGAGAGACCCCG-3'	>75
Asn392Ala-for	5´-CGAGACATGCTGGGGGGGGGGGATGGGATTTCTGACG-3´	>75
Asn392Ala-rev	5'-CGTCAGAAATCCCATCCCCCCAGCATGTCTCG-3'	>75
Asn392Asp-for	5´-CGAGACATGCTGGGGGGGGGGGGGGATTTCTGACG-3´	>75
Asn392Asp-rev	5'-CGTCAGAAATCCCAGCCCCCCAGCATGTCTCG-3'	>75

Fett hervorgehoben sind die Stellen, die mittels "Quick Change site-Directed Mutagenesis Kit" mutiert wurden.

Name	Sequenz	Τ _M [°C]
NcoI-aETFfor	5'-CCATGGGCTTCCGAGCGGCGGCTCCGGGG-3'	> 75
α ETF-HindIIIrev	5´-AAGCTTTTTTTTTTTCTTCAATATCTCAGTC-´3	57,8
NdeI-βETFor	5´-CATATGGCGGAGCTGCGCGTGCTCGTAG-3´	72,4
βETF-HindIIIrev	5′-AAGCTTAATCCGCCCAATCTCCTTCAGC-3′	66,6
NcoI-mGCDHfor	5´-CCATGGGCCGTCCCGAGTTTGACTGGCAG-3´	73,7
GCDH-HindIIIrev	5´-AAGCTTCTTGCTGGCCGTGAACGCCTG-3´	69,5

Tab. 8.4: Primer zur Klonierung von His-Fusionsproteinen

Hervorgehoben sind die Restriktionsschnittstellen NcoI (CCATGG) und HindIII (AAGCTT). Die Ligation erfolgte nach Restriktion in den Vektor pET28a(+).

Tab. 8.5: Primer zur Klonierung von GST-Fusionsproteinen

Name	Sequenz	$T_M [^{\circ}C]$
4T2-αETFfor	5`-CTCAGGGAATTCCCTTCCGAGCGGCGGCTCCGGGG-3`	> 75
4T2-αETFrev	5`-CTCAGGCTCGAGTCATTTTTTTTCTTCAATATCTC-3´	65,8
4T2-βETFfor	5`-CTCAGGGAATTCCCGCGGAGCTGCGCGTGCTCGTA-3`	> 75
4T2-βETFrev	5´-CTCAGGCTCGAGTCAAATCCGCCCAATCTCCTT-3`	72

Hervorgehoben sind die Restriktionsschnittstellen EcoRI (GAATTC) und XhoI (CTCGAG). Die Ligation erfolgte nach Restriktion in den Vektor pGEX4T_2.

Tab. 8.6: Primer zur Klonierung von αETF, βETF, DLST und GCDH in pcDNA3.1

Name	Sequenz	$T_M [^{\circ}C]$
pc-αETFfor	5'-GAGATGTTCCGAGCGGCGGCTCCG-3`	71,3
α ETF-HindIIIrev	5'-AAGCTTTTTTTTTTTCTTCAATATCTCAGTC-'3	57,8
pc-βETFfor	5'-CACCATGGCGGAGCTGCGCGTGCTC-'3	72;8
βETF-HindIIIrev	5'-AAGCTTAATCCGCCCAATCTCCTTCAGC-3'	66,6
pc-DLSTfor	5´-GAGATGCTGTCCCGATCCCGCTGT-3´	67,8
pc-DLSTrev	5'-AAGCTTAAGATCCAGGAGGAGGACTCTG-3'	66,6
pc-GCDHfor	5'-CACCATGGCCCTGAGAGGCGTCTCC-3'	71,2
GCDH-HindIIIrev	5'-AAGCTTCTTGCTGGCCGTGAACGCCTG-3'	69,5

Die cDNA von αETF und DLST wurde mit einem A-Überhang durch Verwendung der Taq-Polymerase in den Vektor pcDNA3.1/V5-His-TOPO eingefügt. Die cDNA von βETF und GCDH wurde über einen CACC-Überhang (fett markiert) in den Vektor pcDNA3.1D/V5-His-TOPO eingefügt.

Name	Sequenz	$T_M [^{\circ}C]$
YFP1/2for	5´-TCTGCAGATATCGGTGGCGGTGGCTCTGGAGGT-3´	74,5
YFP1rev	5'-CGTCGTCTCGAGTTACTGCTTGTCGGCCATGATATA-3'	71,5
YFP2rev	5'-CGTCGTCTCGAGTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC-3'	74,0

Tab. 8.7: Primer zur Klonierung von YFP-Fusionsproteinen

Die cDNA der Fragmente YFP1 und YFP2 des "Yellow fluorescence protein" wurden nach Amplifikation über die Restriktionsschnittstellen EcoRV (GATATC) und XhoI (CTCGAG) in die pcDNA3.1-Vektoren aus Tab. 8.6 kloniert.

Publikation und Tagungsbeiträge

Publikationen

J. Lamp, B. Keyser, D.M. Koeller, K. Ullrich, T. Braulke and C. Mühlhausen (2011). "Glutaric aciduria type 1 metabolites impair the succinate transport from astrocytic to neuronal cells." <u>J Biol Chem</u> **286**(20): 17777-17784.

Abstracts

C. Mühlhausen, **J. Lamp**, B. Keyser, K. Ullrich, T. Braulke (2010) "Glutaric and 3hydroxyglutaric acids impair the transport of succinate from astrocytic to neuronal cells". <u>Eur J Pediatr</u> **169**, 387

C. Mühlhausen, **J. Lamp**, B. Keyser, K. Ullrich, T. Braulke (2010) Glutar- und 3-Hydroxyglutarsäure beeinträchtigen den Transport von Succinat von Astrozyten zu neuronalen Zellen. Monatsschreiben Kinderheilkunde **158**, 298

J. Lamp, S. Kumar, E. Christensen, K. Ullrich, T. Braulke and C. Mühlhausen (2011) Nachweis der direkten Interaktion von Glutaryl-CoA-Dehydrogenase mit Untereinheiten des Elektron-Transferierenden Flavoproteins. Monatsschreiben Kinderheilkunde **159**, 290

Vorträge

"Glutaric aciduria type 1: biochemical analysis of pathogenic GCDH mutants",

Lysosom-Meeting der Universitäten Hamburg und Kiel in Westerland (2010).

Interaktion von Glutaryl-CoA-Dehydrogenase mit dem Elektron-Transferierenden Flavoprotein, 25. Jahrestagung der APS in Fulda (2011, prämiert als bester Vortrag).

Poster

J. Lamp, B. Hofmann, B. Keyser, M. Glatzel, K. Ullrich, T. Braulke, and C. Mühlhausen (2008): "Pathomechanisms of glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency". UKE-Forschertag in Hamburg.

J. Lamp, B. Keyser, K. Ullrich, T. Braulke, and C. Mühlhausen (2010) "Disease-related glutaric and 3-hydroxyglutaric acids impair the transport of succinate from astrocytic to neuronal cells". "Targeting Mitochondria" in Berlin.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die mich direkt oder indirekt bei der Entstehung und Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben:

Ein besonderer Dank geht an Thomas Braulke und Chris Mühlhausen für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die fortwährende Unterstützung während der gesamten Doktorarbeit.

Herrn Dr. René Lorbiecke danke ich für die Begutachtung der Arbeit.

Herrn Prof. Christensen danke ich für die Aktivitätsmessungen der GCDH, sowie Dr. Sudhir Kumar für die 3D-Strukturanalyse der mutanten GCDH.

Herrn Prof. Höning danke ich für die freundliche Hilfe bei den SPR-Analysen.

Bei Sandra Pohl und Kathrin Kollmann möchte ich mich für drei sehr schöne Jahre bedanken, in denen ihr mir <u>immer</u> mit Rat und Tat zur Seite standet und auch mal für Abwechslung außerhalb des Laboralltags gesorgt habt (Ein Hoch auf die "Fricke").

Bei Annika Kurze möchte ich mich für eine sehr schöne, lustige und ausgesprochen abwechslungsreiche Laborzeit bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Biochemie für die lockere und entspannte Arbeitsatmosphäre, die meine Doktorarbeitszeit wie im Flug vergehen ließ, bedanken. Der Dank gilt besonders Annika, Bastian, Georgia, Inke, Johannes, Katrin K. und M., Lisa, Marisa, Melanie, Mine, Pieter, Sandra M. und P.

Sefa und Paul möchte ich für die gewissenhafte Auseinandersetzung mit meiner Arbeit danken.

Ein sehr großer Dank geht an Wolfgang, der mir auch in den stressigen Phasen immer zur Seite stand.

Zuletzt möchte ich meiner gesamten Familie danken. Meinen Eltern die mich immer bedenkenlos auf meinem Lebensweg unterstützt haben. Ohne euch und euren Glauben an mich, wäre ich erst gar nicht soweit gekommen. Meinen Brüdern, sowie allen anderen meiner Familie, das ihr immer für mich da seid.