

**Untersuchungen zu *in vitro* und
in vivo (*Mus musculus*, Linneaus L., 1758)
Effekten von 3-Hydroxyglutarsäure**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium

vorgelegt von

Nicola Ott

aus Hamburg

beim Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg

Hamburg 2005

Gutachter: Prof. Dr. T. Braulke
Prof. Dr. K. Wiese

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Glutarazidurie Typ 1	5
1.1.1	Glutamat-Rezeptoren	7
1.1.2	NMDA-rezeptor-abhängige pathophysiologische Konzepte	10
1.2	Gefäßveränderungen bei der GA-1	13
1.2.1	Funktionen vaskulärer Endothelzellen	13
1.2.2	Vascular endothelial growth factor (VEGF)	15
1.3	Tiermodell	17
2	Zielsetzung	18
3	Material und Methoden	19
3.1	Material	19
3.1.1	Chemikalien und Reagenzien	19
3.1.2	Radioaktive Substanzen	20
3.1.3	Geräte	20
3.1.4	Verbrauchsmaterialien	21
3.1.5	Kits	22
3.1.6	DNA-Standards	22
3.1.7	Enzyme und Nukleotide	22
3.1.8	Proteine, Protease-Inhibitoren und Proteinstandards	22
3.1.9	GCDH-defiziente Mäuse und Zelllinien	23
3.1.10	Puffer, Medien und Lösungen	23
3.1.11	Zellkulturlösungen	23
3.1.12	Antikörper	24
3.1.12.1	Primärantikörper	24
3.1.12.2	Sekundärantikörper	24
3.2	Methoden	25
3.2.1	Molekularbiologische Methoden	25
3.2.1.1	Isolierung genomischer DNA aus Schwanzspitzen zur Genotypisierung	25
3.2.1.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	25
3.2.1.3	Auftrennung von DNA in Agarosegelen	26
3.2.1.4	Polymerase-Kettenreaktion	26
3.2.1.5	RNA-Isolation aus Gewebe und kultivierten Zellen	27
3.2.1.6	Semiquantitative PCR	28
3.2.1.7	Quantitative RT-PCR	28
3.2.1.8	DNA-Mikroarray	29
3.2.2	Zellbiologische Methoden	29
3.2.2.1	Kultivierung von Zelllinien	29
3.2.2.2	Trypsinieren von Zellen	29
3.2.2.3	Gefrierkonservierung und Revitalisierung von Zellen	29
3.2.2.4	[¹²⁵ I]-Arylsulfatase A-Endozytose	30
3.2.2.5	[¹²⁵ I]-Transferrin-Endozytose	31
3.2.2.6	[¹²⁵ I]-2C2-Bindungsassay	31
3.2.2.7	Migrationsassay	32
3.2.2.8	Kapillarformierungsassay	32
3.2.3	Biochemische Methoden	33
3.2.3.1	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	33
3.2.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33
3.2.3.3	Westernblot	33
3.2.3.4	Immunhistochemie	34
3.2.4	<i>in vivo</i> Methoden	35
3.2.4.1	Hühner-Chorioallantois-Membran (CAM)-Assay	35
4	Ergebnisse	36
4.1	Genexpression in GCDH-defizienten Mäusen	36
4.1.1	Quantitative RT-PCR	38
4.1.2	Westernblot-Analyse	40
4.2	Untersuchungen zu Effekten von 3-OH-GA auf Funktionen von Endothelzellen	41
4.2.1	Migrationsassay	41
4.2.2	Kapillarformierungs-Assay	43
4.2.2.1	Immunhistochemie	43
4.2.2.2	Westernblot Analyse	45
4.2.3	CAM-Assay (<i>in vivo</i>)	46
4.2.4	Expression von NMDAR-1 in HDMEC	47

Inhaltsverzeichnis

4.2.5	DNA-Mikroarray mit Endothelzellen	48
4.2.5.1	Quantitative RT-PCR	50
4.2.5.2	Westernblot-Analysen	52
4.3	Einfluß von 3-OH-GA auf die Endozytose in Endothelzellen	52
4.3.1	Wirkungen von 3-OH-GA auf Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-abhängige Endozytose	53
4.3.1.1	Endozytose von Arylsulfatase A in kultivierten HDMEC und PBMEC	53
4.3.2	Wirkungen von 3-OH-GA auf die Transferrin-Rezeptor-abhängige Endozytose in PBMEC und HeLa-Zellen	57
4.3.3	Wirkung von 3-OH-GA auf die Anzahl und Kinetik von Zelloberflächen-lokalisierten Rezeptoren	59
4.3.3.1	Wirkung von 3-OH-GA auf die Anzahl von MPR 300 an der Oberfläche von HeLa-Zellen	59
4.3.3.2	Wirkung von 3-OH-GA auf Exozytoserate des Transferrin-Rezeptors in PBMEC	60
4.3.4	Expression von Adaptormolekülen in HeLa-Zellen	61
5	Diskussion	63
5.1	NMDA-Rezeptor-abhängige Effekte	63
5.2	NMDA-Rezeptor-unabhängige Effekte	64
5.3	Bedeutung von 3-OH-GA für endotheliale Funktionen	65
5.3.1	Bedeutung von Adhäsionsmolekülen	66
5.4	Rezeptor-vermittelte Endozytose	70
6	Zusammenfassung	72
7	Literatur	73
8	Abkürzungsverzeichnis	83
9	Anhang	85
9.1	Primer	85
9.2	Bereits vorgestellte Ergebnisse	87

1 EINLEITUNG

1.1 Glutarazidurie Typ 1

Die Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Defizienz (GA-1; synonym: Glutarazidurie/-ämie Typ I; MIM 231670) ist eine 1975 von Goodman erstbeschriebene, autosomal-rezessiv erbliche neurometabolische Erkrankung, die mit einer geschätzten Inzidenz von 1:80.000-1:100.000 Neugeborenen auftritt (Roeschinger et al. 2000). In genetisch isolierten Populationen wie der Amish Community (Pennsylvania, USA) wird die Inzidenz auf ca. 1:400 Neugeborenen geschätzt (Strauss et al. 2003). Von klinischer Seite weist die GA-1 im Säuglings- und frühen Kleinkindesalter häufig nur diskrete, z.T. erst retrospektiv identifizierbare, neurologische Zeichen auf (muskuläre Hypotonie, Irritabilität). Typisches Merkmal in diesem Alter ist eine zumeist progredient erlaufende Makrozephalie (Hoffman et al. 1996). Mit einem Manifestationsgipfel zwischen dem 6. und 18. Lebensmonat entwickeln ca. 75%-90% aller unbehandelten GA-1 Patienten im Rahmen einer fieberhaften Infektion oder Routineimpfung eine akute Enzephalopathie mit irreversibler Destruktion des Striatums und konsekutiv eine dyston-dyskinetische Bewegungsstörung (bei meist erhaltener Intelligenz) (Strauss et al. 2003, Bjugstad et al. 2000, Bismar & Ozand 1995, Hoffman et al. 1996, 1994). Die Basalganglien sind die tiefgelegenen Kerngebiete des Groß- und Zwischenhirns. Sie gehören als wichtige motorische Koordinationszentren zum extrapyramidalen motorischen System. Es werden dort die Muskelbewegungen und der Muskeltonus gesteuert. Die größte Kernanhäufung der Basalganglien ist der Streifenkörper (corpus striatum). Dieser ist den übrigen Basalganglien als höheres Koordinationszentrum der Motorik übergeordnet. Mögliche Folge von Störungen des corpus striatum können spastische Lähmungen, Störungen des Muskeltonus, abnorme, langanhaltende Kontraktionen (Dystonien) sowie das Auftreten von unwillkürlichen Bewegungen sein. Die Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung einer akuten Enzephalopathie nimmt mit zunehmendem Lebensalter ab. Neben den geschilderten striatalen Veränderungen ist bei betroffenen Patienten häufig eine frontotemporale Hypoplasie nachweisbar (Forstner et al. 1999, Bismar & Ozand 1995, Amir et al. 1987). In den Gehirnen

während einer enzephalopathischen Krise verstorbener GA1-Patienten ließen sich postsynaptische Vakuolisierungen nachweisen, die einen exzitotoxischen Pathomechanismus vermuten ließen (Goodmann et al. 1977). Unter Exzitotoxizität versteht man den toxischen Effekt exzitatorischer Neurotransmitter im zentralen Nervensystem. Durch eine unphysiologisch hohe Konzentration dieser Neurotransmitter, z.B. Glutamat, im synaptischen Spalt, werden postsynaptische Glutamat-Rezeptoren übermäßig erregt. Es kommt zur Öffnung von Ionenkanälen und einer Überladung der Zelle mit Calciumionen. Durch vermehrte Aktivierung calciumabhängiger Enzyme wie beispielsweise Adenylatcyclase, Phosphodiesterase, Calcineurin oder Calmodulin (CaM)-Proteinkinase, die durch Bindung von vier Ca^{2+} -Ionen sowie dem Calcium-bindenden Protein Calmodulin (CaM) ihre maximale Aktivierung erhalten, kommt es schließlich zu einem neurotoxischen Zelluntergang. (Pavon et al. 1998). Eine pathogenetische Rolle der Exzitotoxizität wird mittlerweile für eine Vielzahl neurodegenerativer Erkrankungen postuliert (Lipton & Rosenberg, 1994, Choi, 1988).

Das menschliche Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Gen (*GCDH*) ist auf Chromosom 19p13.2 (Greenberg et al. 1994) lokalisiert, enthält 11 Exone und umfaßt 7 kb. Es sind mehr als 150 pathogenetisch relevanten Mutationen im menschlichen *GCDH*-Gen bekannt, die der GA-1 zugrundeliegen können. Abgesehen von wenigen, in sich geschlossenen Gruppen (wie den Old-Order-Amish in Pennsylvania, und den Island-Lake-Indians in Kanada), ist bisher keine Regelmäßigkeit im Auftreten bestimmter Mutationen erkennbar (Strauss et al. 2003, Busquets et al. 2000, Zschocke et al. 2000, Goodman et al. 1998). Die Glutaryl-CoA-Dehydrogenase ist ein mitochondriales Flavoprotein, das aus 438 Aminosäuren besteht und als Schlüsselenzym die Dehydrogenierung und Decarboxylierung von Glutaconyl-CoA zu Crotonyl-CoA und CO_2 in der gemeinsamen Endstrecke der Abbauege der Aminosäuren L-Tryptophan, L-Lysin und L-Hydroxylysin katalysiert (Westover et al., 2001, Liesert et al. 1999). Mutationen im *GCDH*-kodierenden Gen verursachen eine Reduktion der Enzymaktivität, verbunden mit einer Akkumulation der Metaboliten Glutarsäure, 3-Hydroxyglutarsäure und Glutaconsäure in den Körperflüssigkeiten sowie im Hirngewebe der Patienten. Diese Metaboliten bilden sich über mehrere, noch nicht bekannte Zwischenschritte aus Glutaryl-CoA (Glutarsäure) oder Glutaconyl-CoA (3-Hydroxyglutarsäure, Glutaconsäure) (Liesert et al. 1999) (Abb. 1).

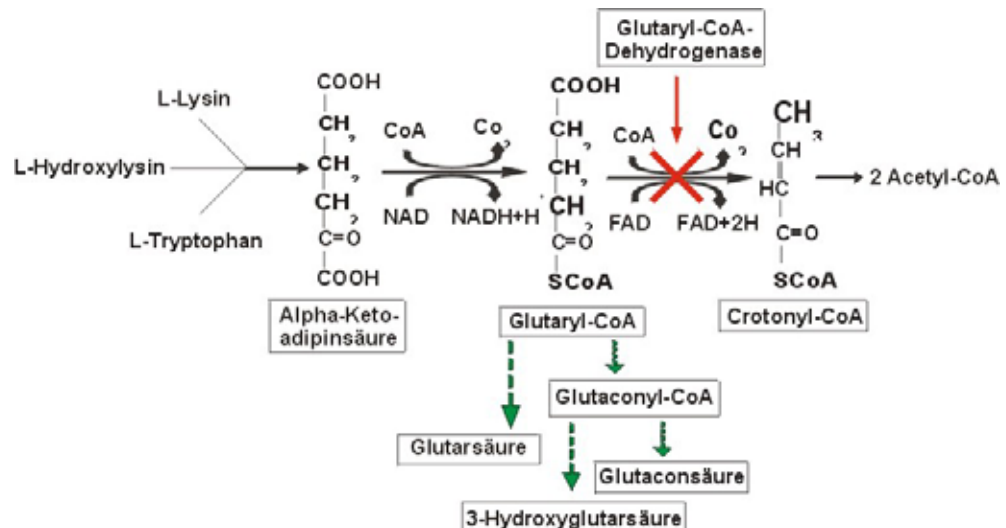


Abb. 1.: Gestörter Stoffwechselweg bei der GA-1:

Das Schlüsselenzym Glutaryl-CoA-Dehydrogenase katalysiert die Dehydrogenierung und Decarboxylierung von Glutaconyl-CoA zu Crotonyl-CoA und CO₂ in der gemeinsamen Endstrecke der Abbauege der Aminosäuren L-Tryptophan, L-Lysin und L-Hydroxylysin. Bei einem Aktivitätsverlust der Glutaryl-CoA-Dehydrogenase (X) kommt es zu einer Störung des Abbaus von Glutaryl-CoA zu Crotonyl-CoA und CO₂. Die dabei entstehenden Metaboliten bilden sich über mehrere, noch nicht vollständig bekannte Zwischenschritte aus Glutaryl-CoA (.....► Glutarsäure) oder Glutaconyl-CoA (.....► Glutaconsäure und.....► 3-Hydroxyglutarsäure).

1.1.1 Glutamat-Rezeptoren

Die Aminosäure L-Glutamat ist der wichtigste erregende Neurotransmitter im Gehirn und strukturell der 3-OH-GA ähnlich (Abb. 2).

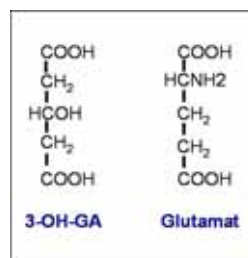


Abb. 2: Strukturformeln von 3-OH-GA und Gutamat

Die Rezeptoren für diesen Botenstoff bilden zwei große membranständige Rezeptorfamilien: Es werden metabotrope und ionotrope Glutamat-Rezeptoren unterschieden (Nakanishi, 1992 a, b; Sommer und Seeburg, 1992). Bei den metabotropen Rezeptoren (mGluR) handelt es sich um G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die nach Ligandbindung über den cAMP-(cyklisches Adenosinmonophosphat) und PIP-(Phosphoinositoltriphosphat) Signalweg aktivieren können. Ionotropen Glutamatrezeptoren sind Ligand-gesteuerte Ionenkanäle, die

aufgrund ihrer unterschiedlichen synthetischen Agonisten in NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-, AMPA (alpha-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol Propionat)- und Kainat-Rezeptoren unterteilt werden (Bettler & Mülle, 1995) (Abb. 3).

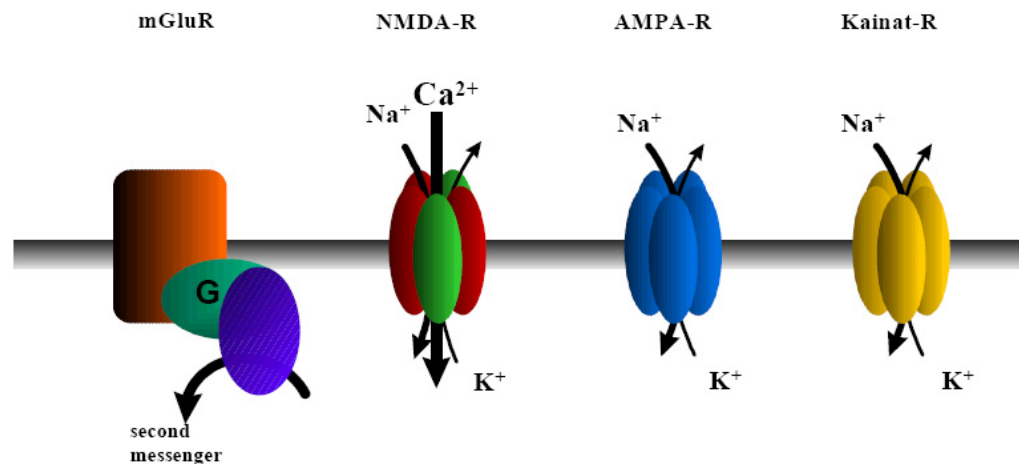


Abb. 3: Einteilung der Glutamaterezeptoren in metabotrope und ionotrope Rezeptoren

Darstellung der Transmembran-Glutamaterezeptoren. **mGluR** (metabotrope Glutamaterezeptoren) sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Nach Rezeptoraktivierung stimuliert das an den Rezeptor in der Zellmembran gekoppelte G-Protein (grün), bestimmte Enzyme (z.B. Ca^{2+} -unabhängige Adenylatcyclase oder Phospholipase C (blau)), die zur Aktivierung des cAMP- und PIP-Signalweges benötigt werden. Die Folgenden drei Rezeptoren gehören zu den ionotropen Glutamaterezeptoren, die durch Zusammenlagerung einzelner Untereinheiten einen Ionenkanal ausbilden. Diese ligandengesteuerten Ionenkanäle werden aufgrund ihrer verschiedenen synthetischen Agonisten in **NMDA-R** (N-Methyl-D-Aspartat)-, **AMPA-R** (alpha-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionat)- und **Kainat-Rezeptoren** unterteilt. Eine Stimulation (z.B. durch Glutamat) von ionotropen Glutamaterezeptoren führt zu einer vorübergehenden Erhöhung der Membranleitfähigkeit, so daß Na^+ -Ionen aus dem Extrazellularraum in das Zellinnere einströmen, sowie K^+ -Ionen aus der Zelle ausströmen. Der NMDA-R besitzt zusätzlich eine Durchlässigkeit für Ca^{2+} -Ionen.

Die NMDA-Rezeptoren bestehen aus zwei verschiedenen Typen von Untereinheiten (UE), NMDAR1 (NR1) und NMDAR2 (NR2), wobei NR2 in vier weitere Subtypen unterteilt wird: NR2A bis NR2D (Hollmann & Heinemann 1994, Meguro et al., 1992). Die Bildung von heterotetrameren Komplexen aus den konstitutiven NR1- und der variablen NR2-UE führt zu einem voll funktionsfähigen NMDA-Rezeptor ($\text{NR1}_2/\text{NR2}_2$) (Dingledine et al., 1999, Buller et al. 1994). In Ratten wird die NR1-Untereinheit ubiquitär in allen Hirnarealen exprimiert, sowohl embryonal, postnatal, als auch im adulten Entwicklungsstadium. Die Expression der NR2-Untereinheit ist im Vergleich zur NR1-Untereinheit viel schwächer. Zudem sind die verschiedenen NR-2-Untereinheiten auf bestimmte Hirnregionen beschränkt und weisen eine Altersabhängigkeit auf. Die NR2B und NR2D-Untereinheiten lassen sich schon pränatal, die NR2A und NR2C-Untereinheiten hingegen erst ab der frühen postnatalen Phase nachweisen. NR2A lässt sich ab dem postnatalen-Tag 7 (P 7) auf mRNA-Ebene in Hippocampus und im Cortex

nachweisen. NR2B zeigt ab dem embryonalen Tag 17 (E17) eine gleichmäßig hohe Expression im Hippocampus und Cortex und eine mäßige im Striatum, Septum und im Cerebellum. Zum Zeitpunkt der Geburt nimmt die Expression der NR2B-Untereinheit stetig ab. NR2C ist zunächst ab P 7 sehr schwach im Cerebellum und im Thalamus exprimiert, ab P12 nimmt die Expression im Cerebellum hingegen stark zu. Die Expression der NR2D- Untereinheit im Thalamus, Hirnstamm und Cerebellum nimmt bis zur Geburt kontinuierlich zu, erlangt an P7 ihr Expressionsmaximum und nimmt bis zum adulten Stadium wiederum ab (Wenzel et al., 1997, Monyer et al. 1994). Die Proteinexpression der NMDA-Rezeptor-Untereinheiten- je nach Untereinheit besitzen sie Molekulargewichte von 120 kDa bis 190 kDa- verläuft simultan mit der mRNA-Expression (Wenzel et al. 1997). Die NMDA-Rezeptoren besitzen im Vergleich zum AMPA- und Kainat-Rezeptor neben einer Permeabilität für Na^+ und K^+ auch eine ausgeprägte Ca^{2+} -Leitfähigkeit (Schneppenburger et al., 1993, Burnashev et al., 1995;). Zusätzlich sorgt ein sogenannter spannungsabhängiger Mg^{2+} -Block bei den NMDA-Rezeptoren dafür, daß der Kanal im Ruhezustand oder bei schwacher Depolarisation durch ein Mg^{2+} -Ion blockiert ist. Die Aktivität von NMDA-Rezeptoren wird durch eine Vielzahl endogener und exogener Liganden oder Ionen reguliert (Traynelis et al., 1998) (Abb. 4): Glutamat stellt den eigentlichen Neurotransmitter-Ligand dar. Seine präsynaptische Ausschüttung und die Bindung an die NR2-Untereinheit des postsynaptischen Rezeptors genügen allerdings nicht für eine Rezeptoraktivierung (Anson et al., 1998, Laube et al., 1997). Erst durch den Co-Agonist Glycin, der an die NR1-Untereinheit des Rezeptors bindet, wird die Glutamat-Wirkung über eine allosterische Modulation verstärkt. Weitere Bindungsstellen am NMDA-Rezeptor sind unter anderem die Ifenprodil- und Polyamin-bindungsstellen, über welche die Aktivität durch nicht-kompetitive Antagonisten über allosterische Modulation reduziert werden kann (Carter et al. 1991). Mg^{2+} bewirkt eine spannungsabhängige Blockade des Kanals. Der NMDA-Rezeptor ist beim Ruhepotential oder bei schwacher Depolarisation durch ein Mg^{2+} -Ion blockiert. Eine postsynaptische Depolarisation führt dazu, daß das Mg^{2+} -Ion die Kanalpore verlässt. Zn^{2+} -Ionen inhibieren die Glutamat-Bindung der NMDA-Rezeptoren über einen spannungsabhängigen und -unabhängigen Mechanismus (Traynelis et al., 1998, Trombley & Shepherd, 1996, Bowie et al., 1994.). Sogenannte Kanalblocker können die exzitatorische Aktivität des NMDA-Rezeptors inhibieren. Die Bindung dieser Sub-

stanzen an ihre Bindungsstelle in der Kanalpore ist nur möglich, wenn der Rezeptor durch Glutamat und Glycin aktiviert sowie durch gleichzeitige Membrandepolarisation geöffnet wurde. Physiologische Liganden für die PCP-Bindungsstelle wurden bislang nicht nachgewiesen. Synthetische Kanalblocker sind z.B. das Kurznarkotikum Ketamin, das halluzinogene Phencyclidin sowie der prototypische NMDA-Rezeptor-Antagonist MK-801. NMDA-Rezeptoren können außerdem an der NR2-Untereinheit durch Protonen (Tang, 1990), sowie an der NR-1-Untereinheit durch Reduktion und Oxidation von zwei Cystein-Resten (Cys744 und Cys798) (Sullivan et al., 1994) und durch Phosphorylierung an Serin-, Threonin-, und Tyrosin-Resten reguliert werden (Liebermann and Mody, 1994).

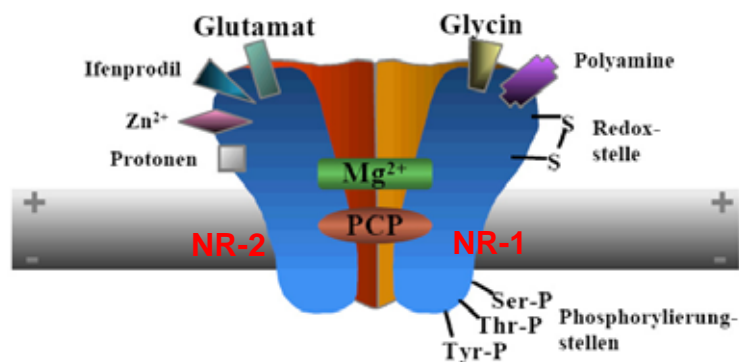


Abb. 4: Schematische Darstellung des NMDA-Rezeptors.

Der NMDA-Rezeptor ist ein heterotetramerer Komplex und besteht aus der konstitutiven NR-1- und der variablen NR-2-Untereinheit (NR1₂/ NR2₂). Die NR-2-Untereinheit trägt Bindungsstellen für Glutamat, Zn²⁺-Ionen, Protonen und Ifenprodil (= NMDA-Antagonist). Die NR-1-Untereinheit besitzt Bindungsstellen für Glycin, Polyamine, sowie zwei Redoxstellen und drei Phosphorylierungsstellen (Ser-P, Thr-P und Tyr-P). Darüber hinaus besitzt der NMDA-Rezeptor einen Mg²⁺-Blocker und eine PCP-Bindungsstelle für sogenannte Kanalblocker.

1.1.2 NMDA-rezeptor-abhängige pathophysiologische Konzepte

Die bei der GA-1 akkumulierenden Metaboliten (3-OH-GA und GA) weisen eine strukturelle Ähnlichkeit mit der wichtigsten exzitatorischen Aminosäure des menschlichen Gehirns L-Glutamat (2-Aminoglutarinsäure) auf. Bisherige *in vitro* Daten sprechen dafür, daß 3-OH-GA der pathophysiologische Metabolit bei der GA-1 ist. Der Transmitter Glutamat bindet vorübergehend an Glutamatrezeptoren (AMPA/Kainat-, NMDA- und metabotrope Rezeptoren). Die Stimulation der AMPA/Kainat- und NMDA-Rezeptoren führt zu einer niedrigen Depolarisation der Zelle und ermöglicht durch Öffnung eines Kanals, einen insgesamt schwachen Na⁺-Einstrom und K⁺-Ausstrom, nicht jedoch einen Ca²⁺-Einstrom. Das EPSP

(exzitatorisches postsynaptisches Potential) liegt in der postsynaptischen Zelle bei 20mV. Eine verstärkte Ausschüttung von Glutamat führt zu einer exzitotoxischen Aktivierung der Zelle. Dabei kommt es zunächst durch vermehrte Aktionspotentiale (AP) zu einer verstärkten Depolarisation. Das EPSP liegt in der postsynaptischen Zelle dann bei 100mV. Als Folge dessen wird der spannungsabhängige Mg-Block des NMDA-R aufgehoben und es kommt zu dem an sich für die Zelle nicht schädlichen Ca^{2+} -Einstrom. Beim exzitotoxischen Mechanismus folgen nun viele Aktivierungen des Kanals so stark aufeinander, dass zuviel Ca^{2+} einströmt und schließlich die erhöhten Calcium-Spiegel toxisch auf die Zellen wirken (Abb. 5).

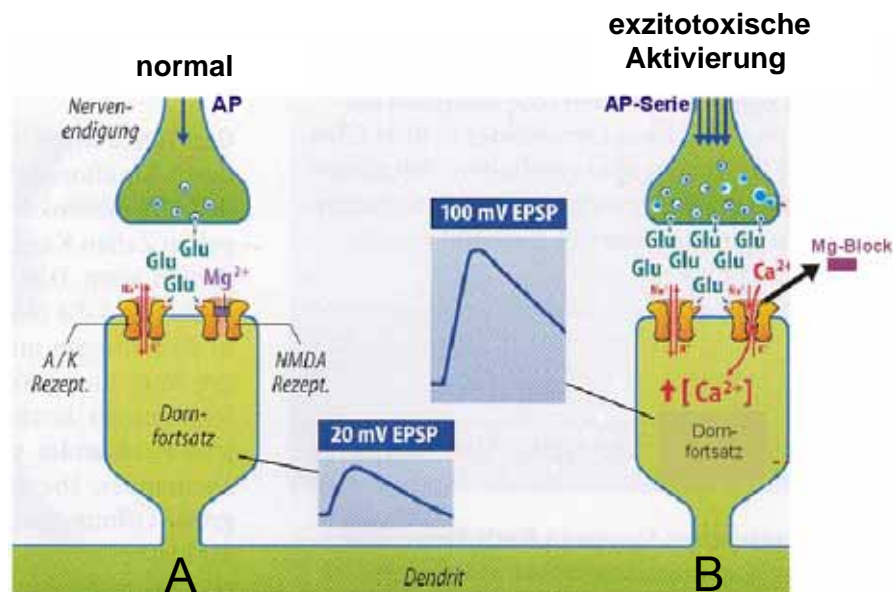


Abb. 5: Darstellung normaler und exzitotoxischer Aktivierung von NMDA-Rezeptoren

(A) Nach Ausschüttung des Neurotransmitters Glutamat aus der Präsynapse erfolgt die Bindung des Glutamat an die postsynaptisch (am Dornfortsatz) lokalisierten NMDA-Rezeptoren bzw. AMPA/Kainat (A/K)-Rezeptoren. Das EPSP (exzitatorisches postsynaptisches Potential) liegt in der postsynaptischen Zelle bei 20mV. Bei einer normalen Aktivierung des NMDA-Rezeptors reicht die schwache Depolarisation jedoch nicht aus um den Mg-Block aufzuheben, daher kommt es nur zum Na^+ , nicht aber zum Ca^{2+} -Einstrom im Gegensatz zur exzitotoxischen Aktivierung. (B) Eine erhöhte Zahl an Aktionspotentialen (AP) führt zu einer verstärkten Ausschüttung von Glutamat aus den postsynaptischen Zellen und folglich zu einer vermehrten Bindung an die Rezeptoren. Durch die starke Depolarisation der Zelle kommt es zur Aufhebung des Mg-Blocks des NMDA-R und somit zu einem vermehrten Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle. Das EPSP liegt in der postsynaptischen Zelle dann bei 100mV. Beim exzitotoxischen Mechanismus kommt es nun zusätzlich, zu dem an sich für die Zelle nicht schädlichen Ca^{2+} -Einstrom zu einer übermäßigen Aktivierung des Kanals, was zur Folge hat, daß zuviel Calcium einströmt was schließlich zum Zelluntergang führt.

NMDA-Rezeptoren sind in die Regulierung mehrerer wichtiger Hirnfunktionen involviert. Eine Überstimulation der NMDA Rezeptoren führt zu einem erhöhten Ca^{2+} -Einstrom in die postsynaptische Zelle. Die anschließende Aktivierung verschiedener Enzyme wie Kinasen, Lipasen, Proteasen oder Phosphatasen,

welche an verschiedenen neurotoxischen Vorgängen beteiligt sind, kann zum neuronalen Zelltod führen. Eine der wichtigsten Ursachen für pathophysiologische und neurodegenerative Prozesse kann eine Fehlregulierung der NMDA-Rezeptoren, hervorgerufen durch pathologische Bedingungen wie z.B. Ischämie oder Hypoglykämie, sein. Eine Überreaktion der NMDA-Rezeptoren, hervorgerufen durch Freisetzung von pathologisch erhöhten Mengen Glutamat, spielt möglicherweise auch bei der Auslösung von epileptischen Anfällen und bei der Entstehung von chronisch neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B. Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson eine Rolle (Lipton and Rosenberg, 1994).

Bisherige Daten sprechen dafür, daß 3-OH-GA der pathophysiologische Metabolit bei der GA-1 ist. Neben dem Nachweis einer postsynaptischen Vakuolisierung in Neuronen betroffener Patienten, konnte darüber hinaus an neuronalen primären Schnitt- Kulturen der Ratte gezeigt werden, daß insbesondere 3-OH-GA, nicht jedoch Glutarsäure, durch Herabsetzung des spannungsabhängigen Magnesiumblocks mit konsekutiv vermehrtem Calcium-Einstrom, einen neuronalen Zelluntergang induziert (Kolker et al. 2001 a, 2000a, b, Ullrich et al. 1999). Stereotaktische, intrastriatale Injektionen von 3-OH-GA in Ratten unterstützen die Hypothese einer NMDA-Rezeptor-vermittelte Neurotoxizität, da sich durch Zugabe des NMDA-Rezeptor- Antagonisten MK-801 der neuronale Zelluntergang vermindern lässt (de Mello et al. 2001). Andere Beobachtungen an primären Neuronen zeigen eine direkte Beeinflussung des mitochondrialen Energiemetabolismus durch 3-OH-GA, sowohl in der intrazellulären Abnahme der Kreatininphosphatkonzentration (Ullrich et al. 1999, Das et al. 2003), als auch eine protektive *in vitro* Wirkung auf die Zellen nach Applikation von Kreatinmonohydrat (Kölker et al. 2001a, b). Es wird angenommen, daß eine akute Enzephalopathie durch Energiemangelzuständen getriggert wird, die nach klinischer Erfahrung durch hochkalorische Ernährung positiv beeinflusst werden kann. Da 3-OH-GA nur in hohen Konzentrationen (> 1mM) einen neurotoxischen Effekt *in vitro* ausübt, wurde postuliert, daß zusätzliche Faktoren, z.B. inflammatorische Zytokine (Kölker et al. 2000c), zur Induktion der akuten enzephalopathischen Krisen beitragen. An gemischten neuronal/glialen Primärkulturen der Ratte konnte gezeigt werden, daß eine Zytokin- stimulierte Expression (wie z.B. Interleukin-1 β und Interferon- γ) der induzierbaren NO-Synthase in Astrozyten selektiv die NMDA-Rezeptor vermittelte

Neurotoxizität von 3-OH-GA steigert. Dies geschieht vermutlich über eine vermehrte Peroxynitritsynthese (Kölker et al. 2001b).

Anhand dieser experimentellen Befunde wurde postuliert, daß 3-OH-GA über eine Beeinflussung des spannungsabhängigen Mg-Blocks zu einer exzitotoxischen Aktivierung von NMDA-Rezeptoren führt. Als Folge dessen wird ein intrazellulärer Energiemangel durch Depletion energiereicher Phosphate sowie einer Erhöhung freier Radikale angenommen, die letztlich zum Zelluntergang führen (Kölker 2004 a, b, Strauss 2003, Ullrich et al. 1999). Neuere Daten zeigen gegensätzliche Befunde in denen an kultivierten primären neuronalen Zellen nachgewiesen werden konnte, daß sich die Zahl der abgestorbenen Kontroll-Zellen, die mit 1mM Glutamat behandelt wurden durch Inkubation der Zellen mit 4-8mM 3-OH-GA über einen Zeitraum von 24h, nicht steigern lässt (Freudenberg et al. 2004).

1.2 Gefäßveränderungen bei der GA-1

Neben akuten Symptomen im Sinne enzephalopathischer Krisen sind bei der GA-1 auch chronische Veränderungen nachweisbar. Hierzu gehören chronisch-subdurale Hämatoeme sowie intracranielle Gefäßveränderungen, beides Symptome, die unabhängig von enzephalopathischen Krisen bei ca 80% der GA-1 Patienten beobachtet werden können (Strauss et al. 2003, Kemp 2002, Hartley et al. 2001, Forstener et al 1999, Morris et al., 1999). Bei einem Teil dieser Patienten finden sich Magnetresonanz-tomographische Hinweise auf gestörte Gefäßfunktion mit Zeichen chronischer Extravasation (Strauss et al. 2003). Aufgrund dieser Befunde kann davon ausgegangen werden, daß die Pathogenese der GA-1 nicht nur durch direkte neuronschädigende Prozesse, sondern auch durch direkte Veränderungen in der Gefäßintegrität bestimmt wird.

1.2.1 Funktionen vaskulärer Endothelzellen

Die Gefäßintegrität wird durch die Wechselwirkung der Endothelzellen determiniert. Ein Grundelement der Zell-Zell-Wechselwirkung ist die Zelladhäsionsschicht, die aus zwei Hauptstrukturen, die Zonula occludens (Tight junctions) und die Zonula adherens (Adherens junctions) besteht. Die wichtigsten mit der Zonula occludens assoziierten Membranproteine sind PECAM (platelet

endothelial cell adhesion molecule), JAM (junctional adhesion molecule), Claudin und Occludin. In der Zonula adherens werden die Membranen benachbarter Endothelzellen von Transmembran-Verbindungsproteinen zusammen gehalten, die zur Familie der Ca^{2+} -abhängigen Zell-Zell-Adhäsionsproteine gehören und als Cadherine bezeichnet werden. Das wichtigste Adhäsionsmolekül, das die Kontakte zwischen Endothelzellen vermittelt und stabilisiert, ist das endothel-spezifische VE-Cadherin (Breviario et al. 1995). Das VE-Cadherin besitzt fünf extrazelluläre-Domänen und eine intrazelluläre-Domäne, die mit dem β -Catenin in Wechselwirkung tritt. In der Nähe des Adhäsionsgürtels liegt in jeder Zelle ein kontraktiles Bündel aus Aktin-Filamenten; es verläuft parallel zur Plasmamembran und ist mit ihr über einen Komplex aus intrazellulären Anheftungsproteinen verbunden; zu diesem Komplex gehören unter anderem α - und β -Catenin (Angst et al. 2001). Desweiteren verfügt das VE-Cadherin in der ersten extrazellulären-Domäne über eine Calcium-Bindungsstelle, über die homophile Wechselwirkungen eintreten können (Abb. 6). Die Zonula adherens sind also Kontaktstrukturen, die zum einen eine Diffusionsbarriere darstellen und zum anderen die Permeabilität von Zellschichten (parazelluläre Permeabilität) für niedermolekulare Stoffe bestimmen.

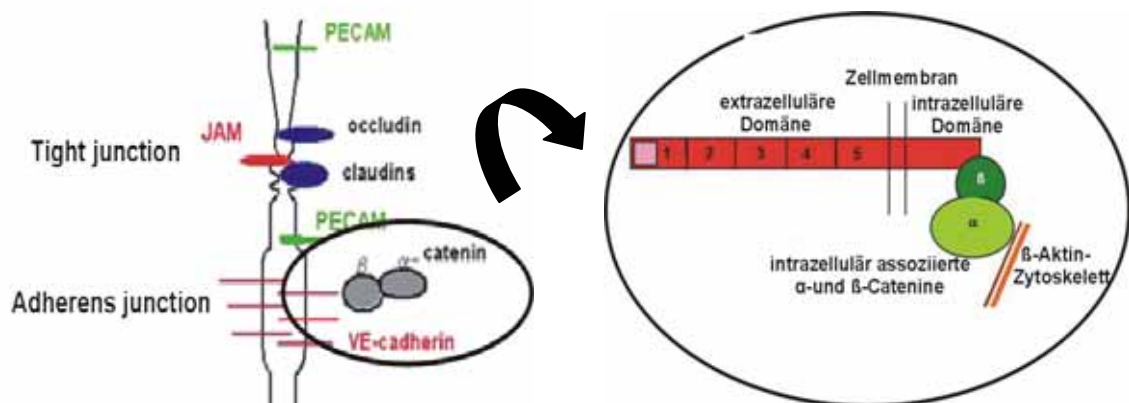


Abb. 6: Darstellung unterschiedlicher Zell-Zelladhäsionsstrukturen

Darstellung der Zonula occludens (Tight junction) mit den assoziierten Membranproteinen PECAM (platelet endothelial cell adhesion molecule), JAM (junctional adhesion molecule), Claudin und Occludin und der Zonula adherens (Adhärenz junction) mit dem Transmembran-Verbindungsprotein VE-Cadherin (links). Vergrößerter Ausschnitt (rechts) zeigt die Bindung der intrazellulären-Domäne des VE-Cadherins an das β -Catenin, das wiederum über α -Catenin mit dem β -Aktinzytoskelett interagiert.

1.2.2 Vascular endothelial growth factor (VEGF)

Ein wichtiger Wachstumsfaktor, der Migration, Proliferation und Differenzierung von Endothelzellen reguliert, ist der Vascular endothelial growth factor (VEGF). Inzwischen sind fünf Mitglieder der VEGF-Familie, VEGF-A, -B, -C, -D und -E bekannt (Ferrara et al. 2003). Das VEGF-codierende Gen besteht aus 8 Exons, die von 7 Introns unterbrochen werden. Die am besten charakterisierte Form ist das VEGF-A. Durch alternatives Spleißen des gesamten Exons erhält man fünf verschiedene Isoformen, die nach der Länge ihrer resultierenden Aminosäureketten als VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189 und VEGF206 bezeichnet werden (Enomoto et al., 2003), wobei die VEGF165 in den meisten Geweben die vorrangig sezernierte Isoform ist (Kalka et al., 2000). Die Splicevarianten haben unterschiedliche biologische Bedeutungen. So sind die kürzeren Formen VEGF121 und VEGF145 löslich und haben ein hohes angiogenetisches Potential. Dagegen binden die längeren Splicevarianten (VEGF165, 189 und 206) an die Heparansulfate der extrazellulären Domänen der VEGF-Rezeptoren (Cameliet & Collen 1998). Bei VEGF-A handelt es sich um ein homodimeres Glycoprotein von ca. 45 kDa Größe. Neben der proliferations- und differenzierungsfördernden Eigenschaften senkt VEGF-A die Apoptoserate von Endothelzellen, führt zur Dilatation der Gefäße und leitet die vaskuläre Destabilisierung ein. VEGF-Effekte werden im Wesentlichen von zwei der insgesamt drei Rezeptoren mit unterschiedlicher Spezifität und Affinität, die der RPTK (Rezeptor-Protein-Tyrosin-Kinasen) angehören, vermittelt. Der VEGFR-1 wird auch als Flt-1 (fms-like-tyrosine-kinase) und der VEGFR-2 auch als KDR (kinase insert domain containing receptor) bezeichnet.

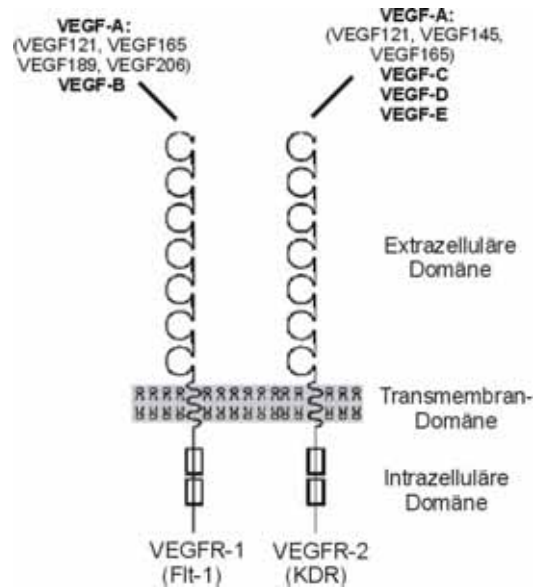


Abb. 7: Schematische Darstellung der Transmembran-Rezeptoren VEGFR-1 und 2

Die VEGF-Rezeptoren bestehen aus sieben Immunglobulin(Ig)-artigen extrazellulären Domänen, einer Transmembranregion und einer intrazellulären Tyrosinkinasedomäne. VEGFR-1 (Flt-1) bindet an der extrazellulären Domäne die Splice-Varianten des VEGF-A (VEGF121, 165, 189 und 206) und VEGF-B. Der VEGFR-2 (KDR) bindet die VEGF-A Splice-Varianten 121, 145 und 165 zudem die VEGF-C, -D und E.

Die VEGF-Transmembran-Rezeptoren sind durch sieben Immunglobulin-(Ig)-ähnlichen Domänen in ihrem extrazellulären Anteil, einer Transmembrandomäne und einer Tyrosinkinasedomäne charakterisiert (Abb. 7). Der VEGFR-1 ist hauptsächlich auf Endothelzellen lokalisiert, bindet VEGF-A (VEGF121, 165, 189 und 206) und -B und besitzt eine höhere VEGF-Bindungsaffinität als der VEGFR-2, wird im Vergleich zum VEGFR-2 jedoch nur schwach exprimiert (Shihab et al. 2002). Desweiteren ist der VEGFR-1 ein funktioneller Rezeptor für Monozyten/Makrophagen, vermittelt die Expression von Gewebefaktoren und beeinflusst die Chemotaxis (Carmeliet & Collen, 2000). Bekannt ist, daß VEGF über den VEGFR-1, in endothelialen Zellen Proliferation nicht aber die Migration vermittelt (Clauss et al. 1998). Der VEGFR-2 bindet zusätzlich zu VEGF-A (121, 145 und 165) auch noch VEGF-C, -D und -E. Über den VEGFR-2 werden endotheliale Proliferation, Migration und vaskuläre Gefäßpermeabilität vermittelt. Neben den Endothelzellen sind Vorläuferzellen, sowie frühe hämatopoetische Stammzellen Träger des VEGFR-2 (Carmeliet & Collen, 2000).

Der VEGFR-3 (Flt-4) hingegen bindet ausschließlich die Isoformen VEGF-C und -D und wird im Gegensatz zu den anderen VEGF-Rezeptoren auf embryonalen und adulten Lymph-Endothelzellen exprimiert und ist in der Lymphangiogenese ein entscheidender Faktor (Carmeliet & Collen, 2000).

1.3 Tiermodell

Es wurde eine GCDH-defiziente Maus generiert, die biochemisch und neuropathologisch ein Modell für die GA-1 darstellt (Koeller et al. 2002). Die Mäuse scheiden erhöhte Mengen an 3-Hydroxyglutarsäure und Glutarsäure im Urin aus und sind durch erhöhte Glutarylcarnitin-Konzentration im Blut gekennzeichnet. An Hirnschnitten GCDH-defizienter Mäuse zeigten sich postsynaptische Vakuolisierungen, deren Ausdehnung altersabhängig zunahm. In Verhaltensuntersuchungen ergaben sich diskrete motorische Auffälligkeiten bei GCDH-defizienten Tieren. Im Unterschied zu GA-1 Patienten bilden sich im Mausmodell keine enzephalopathischen Krisen aus.

2 ZIELSETZUNG

Die Glutarazidurie Typ 1 (GA-1) ist eine angeborene neurometabolische Erkrankung, verursacht durch einen Defekt des Enzyms Glutaryl-CoA-Dehydrogenase (*GCDH*). Dieses Enzym ist für den Abbau der Aminosäuren L-Lysin, L-Tryptophan und L-Hydroxylysin verantwortlich. Bei betroffenen Kindern im Alter zwischen 6 und 18 Monaten kommt es, vor allem ausgelöst durch katabole Zustände wie fieberhafte Infekte, zur Entwicklung akuter Enzephalopathien mit Akkumulation der Metaboliten Glutarsäure (GA) und 3-Hydroxyglutarsäure (3-OH-GA), sowie irreversibler Neurodegeneration im Striatum mit konsekutiven Bewegungstörungen. Bisherige *in vitro* Daten deuten darauf hin, daß der bei der GA-1 anfallende Metabolit 3-OH-GA über die exzitotoxische Aktivierung von NMDA-Rezeptoren zum Nervenzelluntergang führt. Bei 80% der GA-1 Patienten werden bei der Geburt bereits chronische subdurale Hämatome gefunden, die dafür sprechen, daß neben neuronalen Effekten auch das Gefäßsystem bei der GA-1 betroffen ist.

Ziel der Arbeit war es, direkte Wirkungen des Hauptmetaboliten 3-OH-GA bei der GA-1 auf Eigenschaften und Funktionen von vaskulären Endothelzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu untersuchen.

Um den Pathomechanismus bei der GA-1 auch auf zellulärer Ebene besser zu verstehen, sollten diese Untersuchungen durch DNA-Gen-Arrayanalysen sowohl von Gehirnmaterial *GCDH*-defizienter Mäuse als auch in 3-OH-GA-behandelten Endothelzellen ergänzt werden, um so die Wirkung von permanent erhöhter 3-OH-GA im Tiermodell und auch akut verabreichter Metabolitmengen im *in vitro* Zellkultursystem auf die Expression von Genen zu bestimmen. Die physiologische Relevanz veränderter Genexpressionsmuster sollte anschließend auf transkriptionaler als auch auf posttranslationaler Ebene verifiziert werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien entsprachen dem Reinheitsgrad pro analysis. Die nicht angegebenen Reagenzien wurden entweder von Merck, GIBCO/BRL, Pierce, Sigma, Amersham Pharmacia oder BioRad bezogen.

Acrylamid 30% / Bisacrylamid 0,8%	Roth, Karlsruhe
Agar	Sigma, Deisenhofen
Agarose für DNA-Gelelektrophorese	GIBCO/BRL, Eggenstein
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	BioRad, München
BSA (bovine serum albumin)	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dithiotreitol (DTT)	Serva, Heidelberg
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz (EDTA)	Merck, Darmstadt
ECL-Reagenz (Super Signal)	Pierce Rockford, IL, USA
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Eukitt	Sigma, Deisenhofen
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glutarsäure	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumacetat (NaAc)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Serva, Heidelberg
3-Hydroxyglutarsäure	Synthetisiert und zur Verfügung gestellt von Prof. J. Thiem, Institut für Organische Chemie Universität Hamburg
Para-Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Sigma, Deisenhofen
Saccharose	Merck, Darmstadt

Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Serva, Heidelberg
VEGF ¹⁶⁵	R&D Systems, Minnesota USA
Vitogen 100	Collagen Corp., Palo Alto, CA

3.1.2 Radioaktive Substanzen

[¹²⁵ I]-Natriumjodid, trägerfrei in NaOH-Lösung pH 7-11, 100 mCi/ml	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
---	--------------------------------------

3.1.3 Geräte

Analysenwaagen Typ AC 100	Mettler Waagen Giessen
Analysenwaagen Typ BP 2100S	Sartorius, Göttingen
Audio Device	Sony, Japan
Drehrad für Eppendorfgefäße	Eigenbau, Werkstatt des Instituts für Biochemie II der Universität Göttingen
Eismaschine AF 10	Scotsman
Elektrophoresekammern für Agarosegele	BioRad, München
Elektrophoresekammern für Polyacrylamidgele	Hoefer Scientific Instruments, USA
Filmentwicklungsmaschine	Agfa-Gevaert, Leverkusen
Modell Gevomatic 60	
Gammastrahlenzähler, 1470 Wizard™	Wallac, Finnland
Gefrierschrank -80 °C	New Brunswick, Edison
Geltrockner, Modell Gel Air Dryer	BioRad Herkules, USA
Homogenisator Typ Tissue Tearer, Model 985-370	Biospec Products, France
Heizblock Modell Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Inkubationsschüttler Modell G25	New Brunswick Sc., Edison
LightCycler Instrument	Roche Diagnostics, Mannheim
Magnetrührer Ika-Combimag Ret	Janke & Kunkel, Staufen
<u>Mikroskope:</u>	
Phasenkontrastmikroskop, Modell ID 03	Zeiss, Oberkochen
Fluoreszenzmikroskop, Axiovert 100	Zeiss, Oberkochen
Zusatzausstattung für das Axiovert 100:	
DP 50-Kamera	Olympus, Hamburg
Software: Analysis Soft Imaging System	
Mikrowellenherd	Bosch
Multipette, Combitips	Eppendorf, Hamburg
Blot-System, Transphor Typ SE 600	Hoefer Scientific Instruments, USA
Netzgerät Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Netzgerät EPS 1001	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

PH-Meter Knick 647	Schütt, Göttingen
Photometer, Model RS 232 C	Eppendorf Hamburg
Sterilbank HS 12	Heraeus Osterode
Sterilfilter Minisart NML	Sartorius AG, Göttingen
Stickstoff-Einfriertank Typ Arpege 55	Air Liquide, Frankreich
Tissue Tearer	Dremel, USA
Ultraschall-Desintegrator Sonifier W-450	Branson Ultrasonic SA, Carouge-Geneve, USA
Vakuum Konzentrator Model Speed Vac SPD 111V	Vacuubrand, Wertheim
Vortex-Genie	Bender & Hobein AG, Zürich
Wasserbad Typ HOR 7225	Köttermann, Häningsen
 <u>Zentrifugen:</u>	
Minifuge GL	Heraeus, Osterode
Eppendorf Kühlzentrifuge, Modell 5417	Eppendorf Hamburg
Eppendorf Tischzentrifuge 5415 D	Eppendorf Hamburg
Sorvall RC 5C PLUS	Kendro Laboratory Products, Newtown, Connecticut USA
Ultrazentrifuge Sorvall Discovery M120	Kendro Laboratory Products, Newtown, Connecticut USA
Ultrazentrifuge Sorvall Du Pont OTD SOB	Du Pont de Nemours, Bad Homburg
 <u>Rotoren für die Minifuge:</u>	
F-45-30-11	Heraeus, Osterode
F-45-24-11	Heraeus, Osterode
 <u>Rotoren für die Sorvall-Zentrifugen:</u>	
SS-34	Eppendorf, Hamburg
SLA-3000	Eppendorf, Hamburg
 <u>Rotoren für die Ultrazentrifugen:</u>	
S 100 AT4, S55S, SW55	Kendro Laboratory Products, Newtown, Connecticut USA

3.1.4 Verbrauchsmaterialien

Einfrierröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Gewebekulturflaschen 25 und 75 cm ²	Greiner, Nürtingen
Gewebekulturschalen, Ø 36 und 100 cm	Greiner, Nürtingen
48-well Gewebekulturschalen	Costar, Cambridge, MA
96-well Boyden Kammer	Neuroprobe, Cabin John, MD
8µm Nucleopore Filter	Costar, Cambridge, MA
Immersionsöl 518 C	Zeiss, Oberkochen
Linsenpapier MN 10 B	Zeiss, Oberkochen
Nitrocellulose Blotting Membran 0,2 µm	BioRad, München
Objektträger und Deckgläser	Menzel Gläser
Röntgenfilme, XAR-5	Kodak, Stuttgart

Whatman GB002-Papier	Schleicher & Schüll, Daße
Whatman GB003-Papier, extra dick	Schleicher & Schüll, Daßel
2.2 PA Zentrifugenröhrchen	Hitachi, USA

3.1.5 Kits

LightCycler-FastStart DNA Master SYBR-Green I RT-PCR-Kit	Roche Diagnostics, Mannheim Perkin Elmer, Cetus, Norwalk, USA
--	--

3.1.6 DNA-Standards

DNA-Ladder	GIBCO/BRL, Eggenstein
------------	-----------------------

3.1.7 Enzyme und Nukleotide

dNTP-Set, ultrapure	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Taq-DNA-Polymerase	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

3.1.8 Proteine, Protease-Inhibitoren und Proteinstandards

Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma, Deisenhofen
Rainbow™-coloured Protein-Standard	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Normal-Schweine-Serum (NSS)	Sigma, Deisenhofen

3.1.9 GCDH-defiziente Mäuse und Zelllinien

Beschreibung	Referenz
Humane (Cervixkarzinom) Tumorzelllinie (HeLa)	
Human dermal microvascular endothelial cells (HDMEC)	Promocell, Heidelberg
Porcine microvascular endothelial cells (PBMEC)	Teifel and Freidl, 2000
GCDH-defiziente und WT-Mäuse, entstanden aus heterozygoten Mäusen des Hintergrundes C57Bl6 und 129SVJ. Das Gehirn wurde am Tag 21, 42, 60 und 100 nach der Geburt entnommen, Gehirn wurde in Cortex, Stamm und Cerebellum unterteilt	Koeller et al. 2002

3.1.10 Puffer, Medien und Lösungen

Die verwendeten Puffer und Lösungen wurden gemäß den Instruktionen der „Current Protocols in Molecular Biology“ (2000), Harvard Medical School angesetzt.

3.1.11 Zellkulturlösungen

Dulbeccos (DMEM)	GIBCO/BRL, Eggenstein
Optimem-1	GIBCO/BRL, Eggenstein
Fötale Kälberserum (FKS)	GIBCO/BRL, Eggenstein
PBS für Zellkultur	GIBCO/BRL, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin (10.000 U)	Seromed/Biochrom, Berlin
Trypsin/EDTA-Lösung	GIBCO/BRL, Eggenstein
Endothelial Cell growth Medium MV	Promocell, Heidelberg
Supplement Mix	Promocell, Heidelberg
Detachkit bestehend aus:	Promocell, Heidelberg
1. HapesBSS	Promocell, Heidelberg
2. Trypsin/EDTA	Promocell, Heidelberg
3. TNS	Promocell, Heidelberg

3.1.12 Antikörper

3.1.12.1 Primärantikörper

Antigen	Spezies	Referenz/Firma	Verdünnung	
			WB	IH
Human VE-Cadherin	Z	Santa Cruz	1:100	1:100
Human NMDA1, 2A und B	Z	Santa Cruz	1:500	-
Schwein α -Adaptin (AP-2)	M/mab	Transduction Laboratoroes	1:500	-
Schwein γ -Adaptin (AP-1)	M/mab	Transduction Laboratoroes	1:500	-
μ -Adaptin (AP-3)	r	Transduction Laboratoroes	1:3000	-
Human [¹²⁵ I]-2C2 (MPR 300 Antikörper)	mab	Dr. T. Dierks, Universität Göttingen	-	-

M: Maus, Z: Ziege, r: rabbit, mab: Monoklonaler Antikörper, WB: Westernblot, IH: Immunhistochemie

3.1.12.2 Sekundärantikörper

Anti-Ziege-IgG-biotin (schwein)	Dianova, Hamburg
Kaninchen-anti-Ziege-IgG, HRP-gekoppelt; 1:10.000 im WB	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Kaninchen-IgG, HRP-gekoppelt, 1: 10.000 im WB	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Maus-monoklonal, HRP-gekoppelt 1:2.000 im WB	Dianova, Hamburg
Streptavidin-Antikörper, HRP-gekoppelt; 1:5.000 in WB	Dianova, Hamburg

WB: Westernblot, IH: Immunhistochemie

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Isolierung genomischer DNA aus Schwanzspitzen zur Genotypisierung

Lysispuffer	100mM	Tris/HCl pH 7,4
	5mM	EDTA
	200mM	NaCl
SDS-Lösung	10%	SDS
Proteinase K-Lösung	20 mg/ml	in Lysispuffer
Solubilizer	100mM	Tris/HCl pH 7,4
	5mM	EDTA

Für die Genotypisierung wurde genomische DNA aus den Schwanzspitzen der Mäuse isoliert. Dazu wurden die Schwanzspitzen über Nacht in 500 µl Lysispuffer, 10 µl SDS-Lösung und 40 µl Proteinase K-Lösung unter Schütteln bei 56 °C inkubiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4 °C wurde dem Überstand 500 µl Isopropanol zugegeben. Nach mehrmaligem Invertieren erfolgte eine 5-minütige Zentrifugation. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet getrocknet. Die getrocknete DNA wurde anschließend mit 1ml 70%igen Ethanol gewaschen und erneut bei 37 °C getrocknet. Das DNA-Pellet wurde nun in 100 µl H₂O aufgenommen und 30 min bei 37 °C gelöst. Von dieser DNA wurde dann 1 µl für eine PCR eingesetzt.

3.2.1.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die photometrische Messung der DNA-Konzentration erfolgte bei 260 nm in einer UV-Küvette gegen TE-Puffer bzw. Aqua bidest. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 31 µg/ml Oligonukleotiden.

3.2.1.3 Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe wurden 1-2% (w/v) Agarosegele verwendet. Die erforderliche Agarosemenge wurde in TAE-Puffer im Mikrowellenherd aufgeköcht und nach dem Abkühlen auf ca. 55 °C mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 0,5 µg/ml). Die Proben wurden mit Ficoll-Marker (0,05% Bromphenolblau; 0,05% Xylencyanol; 15% Ficoll) versehen und aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 3-4 V/cm durchgeführt. Durch das in die DNA eingelagerte Ethidiumbromid wurden die DNA-Fragmente unter UV-Licht als Bande sichtbar. Zur Dokumentation wurde das Agarosegel auf dem UV-Transilluminator mit einem Fotosystem aufgenommen und ein Ausdruck des Bildes erstellt.

3.2.1.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein Methode, um definierte DNA-Fragmente mit Hilfe der thermostabilen DNA-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermophilus aquaticus* (*Taq*) zu amplifizieren (Saiki et al., 1988).

Als Template wurde DNA verwendet, die mittels Präparation aus Schwanzspitzen oder durch Umschreibung aus RNA gewonnen wurde. Das dNTP-Set wurde auf 10 mM je Nukleotid verdünnt. Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte in einem Thermocycler (Primer und PCR-Bedingungen siehe Tabelle im Anhang).

DNA-Template	Primer 3' und 5' (10 pmol/µl)	dNTP (10 mM je Nukleotid)	10 x PCR-Puffer	<i>Taq</i> - Polymerase (5U/µl)	ad H ₂ O
50 ng	je 1 µl	1µl	5 µl	0,5µl	50 µl

Bei jeder PCR wurden zwei Kontrollen mitgeführt. Es wurde jeweils eine Probe ohne DNA-Template und eine ohne Oligonukleotid-Primer angesetzt.

3.2.1.5 RNA-Isolation aus Gewebe und kultivierten Zellen

Gewebe-Guanidin-Lsg.	5M	Guanidine-Thiocyanat
	50mM	Tris/HCl pH 7,5
Sacrosyl-Lsg.	20% (w/v)	Sacrosyl
Caesiumchlorid-Lsg.	5,7M	Caesiumchlorid
		in 100mM EDTA pH 8,0
Resuspensionspuffer	5mM	EDTA
	0,5% (w/v)	Sacrosyl
	5%	β-Mercaptoethanol

Frisches oder bei – 80 °C gelagertes Gewebe wurde mit dem Skalpell zerkleinert. Nach Zugabe von 950 µl Gewebe-Guanidin-Lösung und 50 µl β-Mercaptoethanol wurde das Gewebe durch 20 Züge mit einer 24G-Nadel homogenisiert und anschließend 10 min bei 12.000 x g und 12 °C zentrifugiert. (Bei RNA-Isolierung aus kultivierten Zellen wurden diese in der Gewebe-Guanidin-Lösung abgeschabt und anschließend identisch wie oben fortgefahren). Der Überstand wurde mit 100 µl Sacrosyllösung versetzt und 2 min bei 65 °C inkubiert. 500 µl Caesiumchloridlösung wurden mit dem Überstand überschichtet und 20 h bei 113.000 x g und 22 °C im Swing-out-Rotor S55S zentrifugiert. Danach wurde das Pellet aufgenommen und resuspendiert. Durch sequenzielles Mischen mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) wurde die RNA aufgereinigt und anschließend aus der oberen Phase durch Zugabe von Na-Acetat ad 0,3M sowie 2 Vol. Ethanol bei -80 °C/30 min oder -20 °C/über Nacht präzipitiert. Die RNA wurde durch Zentrifugation bei 4 °C für 30 min und bei 14.000 rpm pelletiert, mit 70%igen Ethanol gewaschen und erneut 10 min zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde anschließend bei Raumtemperatur (RT) getrocknet, in 50 µl A. dest. aufgenommen und anschließend einer DNase-Behandlung nach den Instruktionen des Herstellers unterzogen. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurde die RNA wiederholt durch Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt (s.o.).

3.2.1.6 Semiquantitative PCR

Zunächst wurde die aus Geweben oder kultivierten Zellen isolierte RNA durch die Reverse Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben. Die RT ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die einzelsträngige RNA als Template für die Synthese eines komplementären DNA-Stranges benutzt. Es wurde ein Kit der Firma Perkin Elmer verwendet.

RT-Reaktion	2 µl	10 x Puffer
	2 µl	25mM MgCl ₂
	je 1 µl	10mM dNTPs
	0.5 µl	50 µM Oligo d(T)-Primer
	0.5 µl	RNAsin
	0.5 µl	MuLV Reverse Transkriptase
	1 µg	template RNA
	Ad A. dest	20 µl

Anschließend erfolgte eine PCR mit spezifischen Primern für mMNDAR-1, NMDAR-2A und 2B, β -Aktin und GAPDH (siehe Tabelle im Anhang) nach den Instuktionen des Herstellers. Zur Auswertung wurden die Proben anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe 3.2.1.3).

3.2.1.7 Quantitative RT-PCR

Die Umschreibung aus RNA in cDNA erfolgte genauso wie bei der semi-quantitativen PCR (siehe 3.2.1.6). Bei der anschließenden PCR mit spezifischen Primern (Tabelle Primerliste und PCR-Bedingungen siehe 8. Anhang) wird während der Reaktion das fluoreszierende SYBR-Green an die DNA gebunden und die Fluoreszenz nach jedem Zyklus durch den Light Cycler gemessen. Als Standard wurden verschiedene Verdünnungen (von 1:1000 - 1:1Mio) des PCR-Produktes der jeweiligen Primer verwendet. Die erhaltenen Werte ließen sich anschließend anhand einer Standardreihe quantifizieren.

3.2.1.8 DNA-Mikroarray

Aus Zellen oder Gewebe isolierte RNA wurde zur Mikroarray-Analyse in das UKE-eigene Servicelabor gegeben. Die Analyse erfolgte unter Verwendung des Affimetrix-Systems. Für humane Proben wurde der Gen-Chip Human Genome U133 Set und für murine Proben der Chip Mouse Expression Set 430 verwendet.

3.2.2 Zellbiologische Methoden

3.2.2.1 Kultivierung von Zelllinien

Immortalisierte Zellen wurden in DMEM mit 10% fötalem Kälberserum (FKS) und 1% Penicillin/Streptomycin bei 37 °C, 85% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert. Die Endothelzellen (HDMEC/PBMEC) wurden in speziellen Endothelial Cell Growth Medium MV mit 5% Supplement Mix (Promocell, Heidelberg) kultiviert.

3.2.2.2 Trypsinieren von Zellen

Der Zellrasen wurde mit PBS gespült, um Trypsininhibitoren aus dem FKS zu entfernen. Nach dem Absaugen des PBS wurden die Zellen mit 0,5 ml Trypsin (0,05% w/v)/EDTA (0,02% w/v) pro 25 cm²-Flasche für 2-5 min bei 37 °C inkubiert. Die Trypsin-Reaktion wurde durch Zugabe von FKS-haltigem Medium gestoppt, die Zellen durch mehrfaches Aufsaugen mit einer Pipette vereinzelt und in der gewünschten Dichte ausgesät.

3.2.2.3 Gefrierkonservierung und Revitalisierung von Zellen

Einfriermedium 10% DMSO / 20% FKS / 1% Penicillin / Streptomycin in DMEM

Zur Konservierung wurden konfluent gewachsene Zellen trypsiniert, in Medium aufgenommen und für 5 min bei 1.000 x g in der Labofuge sedimentiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen aus einer 25 cm²-Flasche in 3 ml Einfriermedium aufgenommen und auf drei Einfrierröhrchen verteilt. Die Zellen

wurden zunächst bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zur Revitalisierung wurde das Einfrierröhrchen aus dem Stickstofftank genommen, zunächst für ca. 1 min bei RT angewärmt und anschließend im Ethanolbad bei 37°C aufgetaut, bis nur noch ein kleiner Eiskern zu sehen war. Die Zellsuspension wurde entnommen, in 3,5 ml kaltes Medium ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) überführt und in der Laborfuge 5 min bei 1.000 x g pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 5 ml Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, um DMSO-Reste, tote Zellen und Zelltrümmer zu entfernen.

3.2.2.4 $[^{125}\text{I}]$ -Arylsulfatase A-Endozytose

Zur radioaktiven Markierung von rekombinanter humaner Arylsulfatase A (ASA) (von PD Dr. T. Dierks, Universität Göttingen freundlicherweise zur Verfügung gestellt) wurde mit Hilfe von Iodogen-beschichteten Röhrchen (Pierce Rockford, USA) die Methode nach Parker und Strominger (1983) angewendet. Die Methode beruht auf dem Prinzip der Oxidation von $\text{Na}[^{125}\text{I}]$ in Gegenwart von Proteinmolekülen, in deren Tyrosinreste $[^{125}\text{I}]$ eingebaut wird.

Kultivierte PBMEC oder HDMEC wurden für 24 h mit unbehandeltem Medium oder verschiedenen Konzentrationen 3-OHGA/GA (0,1mM bis 4mM) bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in DMEM/ 0,05% BSA inkubiert. Anschließend wurde den Zellen für weiter 4 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ DMEM/ 0,05% BSA mit 300.000 cpm/700 μl $[^{125}\text{I}]$ -Arylsulfatase A (ASA), in An- und Abwesenheit des kompetitiven Inhibitors Mannose-6-Phosphat-(M6P)-Natriumsalz (10mM), zur Aufnahme angeboten. Danach wurde das Medium abgenommen, die Zellen 5 x mit kaltem PBS auf Eis gewaschen und oberflächengebundene ASA durch 2 Waschschriffe mit M6P-Bariumsalz (2mM in PBS) für 5 min entfernt. Nach einem weiteren Waschschriff mit PBS wurden die Zellen in 1 ml PBS abgeschabt und die zellassoziierte Radioaktivität im γ -Counter gezählt. Die Zellen wurden sedimentiert, solubilisiert und unter reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

3.2.2.5 [¹²⁵I]-Transferrin-Endozytose

Saurer Waschpuffer: 0,5M NaCl, 0,2M HAc, pH 2,5

Kultivierte PBMEC oder HeLa-Zellen wurden für 24 h vorinkubiert (3.2.2.4). Anschließend wurde den Zellen für weitere 30 min bei 37 °C DMEM/ 0,05% BSA mit 300.000 cpm/700µl [¹²⁵I]-Transferrin in An- und Abwesenheit von 28µg unmarkiertem Transferrin, zur Aufnahme angeboten. Anschließend wurde das Medium abgenommen, die Zellen 5 x mit kaltem PBS auf Eis gewaschen und oberflächengebundenes [¹²⁵I]-Transferrin durch zwei saure Waschschrte (pH 2,5) von je 5 min entfernt. Nach einem weiteren Waschschrte mit PBS wurden die Zellen in 1 ml PBS abgeschabt und die zellassozierte Radioaktivität im γ-Counter gezählt. Die Zellen wurden sedimentiert und unter reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

3.2.2.6 [¹²⁵I]-2C2-Bindungsassay

Um die Zahl der 300kDa M6P-Rezeptoren an der Zelloberfläche zu bestimmen, wurden HeLa-Zellen für 24 h vorinkubiert (3.2.2.4) und anschließend wurden die Zellen für 5 h bei 4 °C mit 600.000cpm/700µl [¹²⁵I]-2C2 (MPR 300 monoklonaler Antikörper) in DMEM/ 0,05% BSA/ 20mM Hepes pH 7,4) inkubiert um die Plasmamembranständigen Rezeptoren an der Zelloberfläche zu markieren. Anschließend wurde das Medium abgenommen, die Zellen 5 x mit kaltem PBS auf Eis gewaschen und oberflächengebundener [¹²⁵I]-2C2 durch zwei saure Waschschrte (pH 2,5) von je 5 min entfernt (entspricht oberflächengebundene Rezeptoren). Nach zwei weiteren Waschschrten mit PBS wurden die Zellen in 1 ml PBS abgeschabt und die zellassozierte sowie die oberflächengebundene Radioaktivität im γ-Counter gezählt.

3.2.2.7 Migrationsassay

Mit Hilfe eines Migrationsassay wurde unter Verwendung einer 96-well Boyden-Kammer die Migration durch eine Collagen-Matrix in Abhängigkeit z.B. chemotaktischer Faktoren untersucht (Abb. 8) (Ergün et al. 2000).

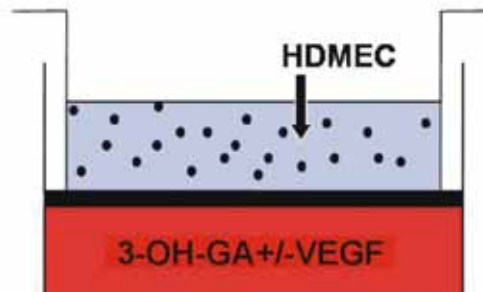


Abb. 8: Modelldarstellung einer Boyden-Kammer. Im unteren Teil der Zellkulturschale befindet sich Medium mit 3-OH-GA +/- VEGF (rot). Im oberen Teil der Kammer befindet sich eine Kollagen-Gel-Matrix (blau), die vom unteren Medium durch einen Filter (schwarz) getrennt ist. Die Zellen können nun für 24 h durch die Gelmatrix dem Stimulus entgegen, nicht jedoch durch den Filter migrieren. Zur Auswertung werden die an der Unterseite des Filters angelagerten Zellen mit dem Mikroskop ausgezählt.

In den unteren Teil der Boyden-Kammer werden dem Medium, VEGF (50ng/ml) oder 3-OH-GA zugefügt. Ein 8µm Nucleopore-Filter stellt den Einsatz für die Kammer dar, dieser wird über Nacht mit Vitrogen 100, einer Collagenmatrix, überschichtet. Am nächsten Tag werden auf diesem Filter HDMEC in Basalmedium/0,1% BSA ausgesät. Nach einer 5-6 stündigen Inkubation bei 37 °C, werden die migrierten Zellen an der Filterunterseite von je 3 wells pro Konzentration des Effektors unter dem Mikroskop (Zeiss, Jena, Germany) ausgezählt.

3.2.2.8 Kapillarformierungsassay

Endothelzellen werden auf 48-well Zellkulturschalen ausgesät, die mit einer 3-D Type I Collagengel-Matrix (Vitrogen 100) beschichtet wurden sind. Diese Matrix wurde im Vorfeld mit verschiedenen Konzentrationen 3-OH-GA (2-6mM) und VEGF (50ng/ml) allein und in Kombination versetzt. Nach einer Inkubation für 24 h und 37 °C wurden die Zellen täglich mikroskopisch überprüft. Nach Ausbildung der Tubes wurde das Gel fixiert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden aus diesen Paraffinblöcken ca. 4-10 µm dünne Schnitte auf Objektträger gezogen und einer immunhistochemischen Analyse (3.2.3.4) unterzogen.

3.2.3 Biochemische Methoden

3.2.3.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen wurden in Doppelbestimmungen nach dem Protokoll von Bradford, 1976, gemessen.

3.2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine wurden nach ihrer Größe durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in modifizierter Form nach Laemmli, 1970, in einem diskontinuierlichen Puffersystem getrennt. Die Acrylamid-Konzentration der Trenngele variierte von 8-15%. Die Auftrennung erfolgte bei RT und 50 mA/Gel für ca. 3 h.

3.2.3.3 Westernblot

Transferpuffer 1	25mM	Tris
	192mM	Glycin
	20%	Methanol

Zur spezifischen Detektion von Proteinen wurden Westernblotanalysen durchgeführt. Der Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrocellulosemembran geht auf Towbin et al., 1979, zurück und wurde für 90 min bei 900 mA in einer Elektroblobt-Apparatur durchgeführt. Nach dem Transfer der Proteine aus der SDS-PAGE wurde die Nitrocellulosemembran über Nacht bei 4 °C in Blockpuffer (10mM PBS/ 5% Milchpulver/ 0,05% Tween-20) inkubiert. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte für 2 h bei RT. Danach wurde die Nitrocellulosemembran 3 x 5 min mit Waschpuffer (10mM PBS/ 0,05% Tween-20) gewaschen und für 1 h bei RT mit dem entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Detektion der gebundenen Antikörper durch ECL („enhanced chemoluminescence“, SuperSignal, Pierce Rockford, IL, USA) und Belichtung eines Röntgenfilms.

3.2.3.4 Immunhistochemie

In Paraffin eingebetteten Kapillarformierungsassays wurde als 4-10 µm dünne Schnitte auf Objektträger gezogen. Das Paraffin wurde in verschiedenen Bädern entfernt: 3 x 5 min in Histoclear, 1 x 5 min in 100% Ethanol, 1 x 30 min in 1,5% H₂O₂/Methanol, 1 x 5 min in 96% Ethanol, 1 x 5 min in 80% Ethanol, 1 x 5 min in 70% Ethanol, 1 x 5 min in A. dest, 15 min in PBS. Um unspezifische Bindungen auszuschließen erfolgte ein 30 minütiger Blockierungsschritt mit 2% NSS (Normal-Schweine-Serum)/PBS. Der primäre Antikörper wurde 1:100 verdünnt in 0,2% BSA + 0,1% NaN₃/PBS und über Nacht bei 4 °C auf den Schnitten in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte in PBS-Bädern 3 x 10 min gewaschen und für 30 min in einer feuchten Kammer mit dem Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörper (Ziege-IgG-biotin 1:250 verdünnt in PBS) inkubiert. Nachdem die Schnitte erneut 3 x 5 min in PBS-Bädern gewaschen wurden, erfolgte die Inkubation für 30 min mit den Lösungen A und B, 1:250 verdünnt in PBS, aus dem Vectastain Elite ABC-Reagent-Kit der Firma Vector. Nach weiterem Waschen der Schnitte mit PBS folgte die Detektion durch Entwicklung der Peroxidase-Aktivität mit der Entwickler-Lösung für 5 – 15 min. Die Schnitte wurden 3 x mit PBS gespült und 20 s in 1:5 verdünnter Mayers-Hematoxylin-Lösung gefärbt. Überschüssige Farblösung wurde durch intensives Spülen mit A. dest. entfernt. Die Dehydrierung der Schnitte erfolgte durch die aufsteigende Alkoholreihe (70-100%igen Ethanol). Anschließend wurden die Schnitte mit Eukitt eingebettet.

3.2.4 *in vivo* Methoden

3.2.4.1 Hühner-Chorioallantois-Membran (CAM)-Assay

Der CAM-Assay ist ein *in vivo* Assay zur Beobachtung der Blutgefäßentwicklung in der Chorioallantoismembran (CAM) von Hühnerembryonen. Dabei wird ein befruchtetes Hühnerei bei 37 °C, 85% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ inkubiert. Nach 5 Tagen wird die obere Eischale und Teile der Luftsackmembran entfernt, anschließend wird das Ei in eine sterile Kammer überführt und für weitere 24 h bei 37 °C inkubiert. Type I Collagengel wurde mit 3-OH-GA (2-6mM) +/- VEGF (50ng/ml) oder einer Kontrollsubstanz vermischt und anschließend ein Gewebegitter (4x4 mm Tetko, Zürich) mit dieser Matrix überschichtet und die Substanzen bei 37 °C einpolymerisiert. Anschließend wurde dieses Gitter für 7 Tagen auf die Chorioallantoismembran implantiert. Zur Photodokumentation der Gefäßentwicklung erfolgte eine tägliche Überprüfung mit dem Mikroskop.

4 ERGEBNISSE

4.1 Genexpression in GCDH-defizienten Mäusen

Um die Mechanismen der Neuropathogenese der Glutarazidurie Typ 1 zu verstehen, und neue, bislang nicht berücksichtigte Faktoren zu identifizieren, wurden DNA-Mikroarrays durchgeführt. Aus dem Stammhirn eines 42 Tage alten GCDH-defizienten- und eines Kontroll-Tieres wurde RNA isoliert, die im Service-Labor des UKE zur Durchführung des Gen-Mikro-Array verwendet wurde.

Tabelle 1 stellt die ersten 20 Genpositionen aus insgesamt ca. 100 veränderten Genen (d.h. Hochregulation um den Faktor > 1.5) der gesamten Array-Analyse (20.000 Gene), die in ihrer Expression in der GCDH-defizienten Maus erhöht sind dar. Der Faktor gibt das Verhältnis des Signals GCDH-defizienter/Kontroll-Maus wieder.

Position:	Gen-Symbol:	Gen-Titel:	Vorkommen	Faktor:
1	AVP	Arginine Vasopressin	Extrazellularraum	13.9
2	Cul 4a	Cullin 4A	-	10.4
3	-	-	-	4.9
4	D3Ertd246e	DNA segment, Chr 3	-	4.5
5	-	-	-	4.2
6	Rbbp4	Retinoblastoma binding protein 4	Zellkern	3.7
7	Hcrt	Hypocretin	Extrazellularraum	3.7
8	-	Transcribed sequences	-	3.2
9	oxt	Oxytocin	Extrazellularraum	3.2
10	HRnt 1/2	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, methyltransferase-like 2	Integrales Membranprotein	3.0
11	Pcdh15	Protocadherin	Extrazellularraum	2.4
12	-	-	-	2.1
13	Mrps 25	Mitochondrial ribosomalprotein S 25	Mitochondrien	2.1
14	0610009H04 RIK	Riken cDNA	-	2.0
15	Sh 3d19	SH3 domain protein D19	-	2.0

Ergebnisse

16	Hnrpab	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	Zellkern	2.0
17	1110001A16 RIK	Riken cDNA	-	2.0
18	3110004018 RIK	Riken cDNA	Mitochondrien	2.0
19	Commd2	COMM domain containing 2	-	2.0
20	2410026K10 RIK	Riken cDNA	-	2.0

Tab. 1: Heraufregulierte Gene des Maushirn-Array. Tabellarische Darstellung der ersten 20 Positionen (Gene) aus der gesamten DNA-Mikro-Array-Analyse, die in ihrer Expression in GCDH-defizienten Maus erhöht sind. Der Faktor gibt das Verhältnis des Signals von GCDH-defizienter/Kontroll-Maus wieder.

Tabelle 2 stellt die ersten 20 Genepositionen aus insgesamt ca. 40 veränderten Genen (d.h. Faktor < 0.5) der gesamten Mikro-Array-Analyse dar, die in ihrer Expression in der GCDH-defizienten Maus erniedrigt sind. Der Faktor gibt das Verhältnis des Signals GCDH-defizienter/Kontroll-Maus wieder. Zwei Gene, die dem endothelialen System zugeordnet werden können, stehen auf Position 53 und 62. Da beide um einen Faktor > 0.5 herunterreguliert sind, haben sie nur wenig Aussagekraft. Ebenso das an Position 301 (in der Tabelle in blau unterlegt) stehende Gen, das für die NMDAR-1 Untereinheit kodiert, unterliegt mit einem Faktor von 0.75 ebenfalls keiner deutlichen Herabregulation.

Position:	Gen-Symbol:	Gen-Titel:	Vorkommen	Faktor:
1	GH	Growth Hormon	Extrazellularraum	0.02
2	GH	Growth Hormon	Extrazellularraum	0.03
3	Rnf 134	Ring finger protein 134	Zellkern	0.05
4	SL c6a4	Solute carrier family 6	Integrales Membranprotein	0.09
5	GH	Growth Hormon	Extrazellularraum	0.12
6	Ttr	Transthyretin	Extrazellularraum	0.12
7	gcdh	Glutaryl-CoA-dehydrogenase	Mitochondrien	0.13
8	Arc	Activity regulated cytoskeletal associated protein	Zytoskelett	0.14
9	Ttr	Transthyretin	Extrazellularraum	0.16
10	GH	Growth Hormon	Extrazellularraum	0.19
11	Ubx4	UBX domain containing 4	-	0.21
12	Ttr	Transthyretin	Extrazellularraum	0.25
13	Prdx2	Peroxiredoxin 2	-	0.25

Ergebnisse

14	Anp32a	Acidic nuclear phosphoprotein 32 family	Zellkern	0.33
15	23100043N10 RIK	Riken cDNA	-	0.33
16	-	Adult male corpora Quadrigemina cDNA	-	0.38
17	Prl	Prolactin	Extrazellularraum	0.38
18	Ppp1r1b	Protein phosphatase 1 subunit 1B	Cytoplasma	0.4
19	Adora 2a	Adenosine A2a receptor	Integrales Membranprotein	0.4
20	Gpr 88	G-protein coupled receptor 88	Integrales Membranprotein	0.4
53	Pcdha6	Protocadherin alpha 6	Integrales Membranprotein	0.6
62	Alcam	Activated leukocyte cell adhesion molecule	Integrales Membranprotein	0.6
301	GRIN 1	Glutamat receptor, ionotropic, NMDA1, zeta1	Integrales Membranprotein	0.75

Tab. 2: Herabregulierte Gene des Maushirn-Array. Dargestellt sind die ersten 20 Positionen (Gene) aus der gesamten DNA-Array-Analyse, die in ihrer Expression in GCDH-defizienten Maus erniedrigt sind. Zusätzlich sind zwei Gene, die in Verbindung mit endothelialen Funktionen stehen, mit roten Positionsnummer gekennzeichnet (Position 53 und 62). Ein weiteres Gen, das für die NMDAR-1 Untereinheit kodiert, steht an Position 301 (blau unterlegt). Der Faktor gibt das Verhältnis des Signals von GCDH-defizienter/Kontroll-Maus wieder.

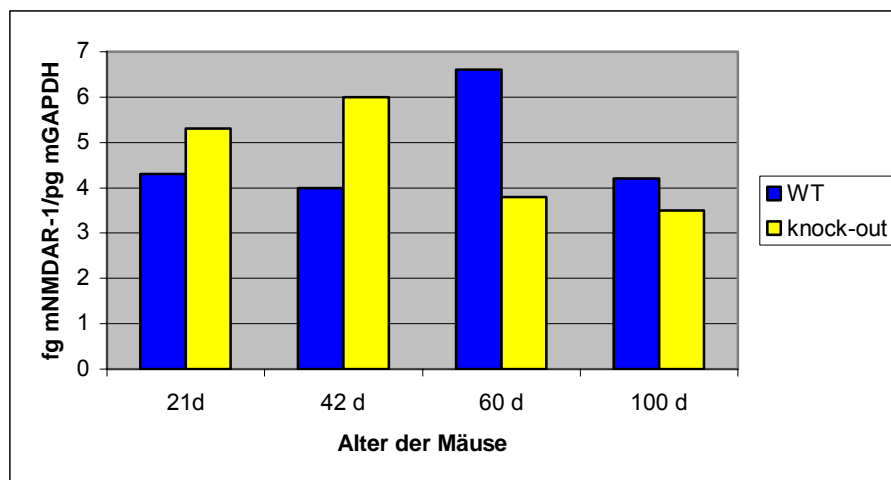
4.1.1 Quantitative RT-PCR

Die Expression der NMDA-Rezeptoruntereinheit NMDAR-1 sollte durch Bestimmung des mRNA-Gehaltes überprüft werden. Aus diesem Grund wurde die Menge der NMDA-Rezeptoruntereinheiten-mRNA in Kontroll- und GCDH-defizienten Mäusen verschiedenen Alters durch quantitative RT-PCR im Light Cycler bestimmt. Dazu wurde neben Stammhirn-RNA aus 42 Tage alten Mäusen, auch Stammhirn-RNA aus Mäusen im Alter von 21, 60 und 100 Tagen eingesetzt. Aus Zuchtgründen der Mäuse konnten hier nur Einzelbestimmungen durchgeführt werden. Bestimmt wurden die mRNA-Mengen an NMDA-Rezeptoruntereinheiten mNMDAR-1, mNMDAR-2A und -2B bezogen auf die Mengen an GAPDH mRNA. Zunächst lässt sich feststellen, daß die mRNA-Menge der NMDAR-Untereinheiten sehr unterschiedlich ist. Die NMDAR-1 Untereinheit liegt in ihrer mRNA-Expression zwischen 3,5 und 6,5 fg/pg GAPDH. Im Gegensatz dazu liegen die mRNA-Expressions-Mengen der NMDAR-2A und 2B- Untereinheiten im pg-Bereich (NMDAR-2A zwischen 10 und 40pg und NMDAR-2B zwischen 10 und

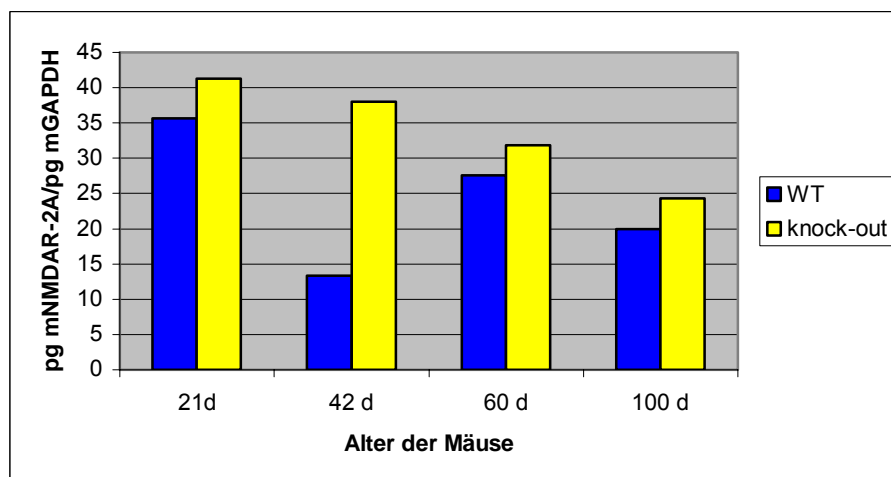
Ergebnisse

200 pg/pg GAPDH, je nach Altersstufe). Die Menge an NMDAR-1 mRNA ist in den 21 und 42 Tage alten GCDH-defizienten Mäusen im Gegensatz zu Wildtyp Mäusen um 20-30% erhöht. Bei den 60 und 100 Tage alten Tieren ist das Verhältnis umgekehrt. Hier zeigt sich eine 50%ige Reduktion bei den 60 Tage und eine 10%ige bei 100 Tage alten Tieren im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 9A). Der Gehalt an NMDAR-2A mRNA ist in allen Altersstufen im Gegensatz zu den Kontrollen bei den GCDH-defizienten Mäusen erhöht. Bei den GCDH-defizienten Mäusen nimmt die NMDAR-2A mRNA Expression zwischen dem 21.Tag und dem 100. Tag um ca. 50% ab (Abb. 9B). Die Menge an mRNA der Untereinheit NMDAR-2B ist in den GCDH-defizienten Tieren im Vergleich zu den Kontrollen um ca. 50% höher. Wie schon bei der NMDAR-2A Untereinheit zu beobachten war, ist auch hier eine deutliche mRNA Abnahme mit zunehmendem Alter der Mäuse festzustellen (Abb. 9C).

A



B



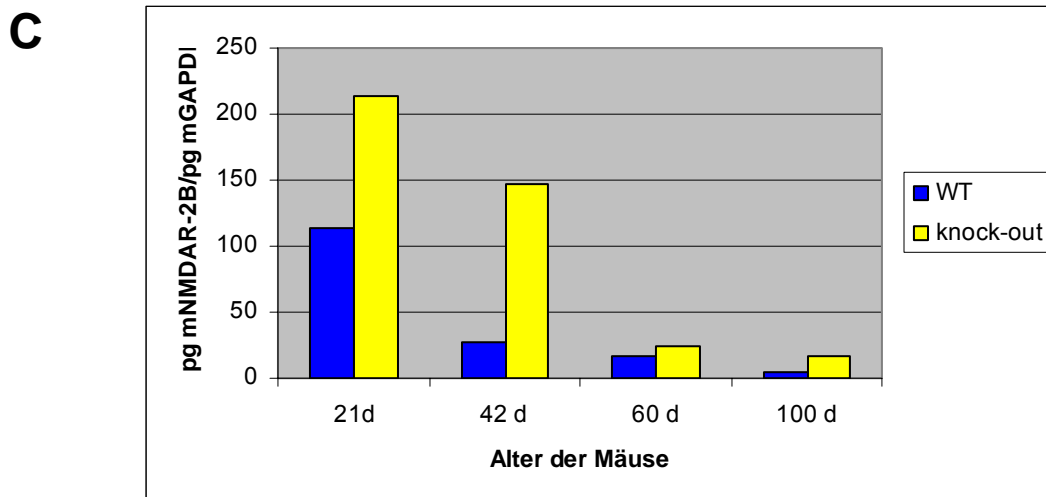


Abb. 9: Bestimmung der mRNA-Menge der NMDAR-1, NMDAR-2A, und 2B Untereinheiten im Vergleich von GCDH-defizienten und Kontroll- Mäusen verschiedener Altersstufen. Gesamt-RNA wurde aus Stammhirnen 21, 42, 60 und 100 Tage alter GCDH-defizienter und Kontroll-Mäuse isoliert und in cDNA umgeschrieben. Hierbei wurde pro Altersstufe der Mäuse nur ein Versuchstier verwendet. Die quantitative PCR wurde wie unter 3.2.1.7 beschrieben durchgeführt. Die Menge an NMDAR-1 in fg (A), NMDAR-2A-mRNA in pg (B) und NMDAR-2B mRNA in pg (C) wurden auf die jeweilige GAPDH-mRNA-Menge normalisiert. Als Standardreihe dienten verschiedene Verdünnungen des PCR-Produktes für GAPDH, NMDAR-1, NMDAR-2A und 2B.

4.1.2 Westernblot-Analyse

Um festzustellen, ob die auf mRNA-Ebene gefundenen Veränderungen auch mit Veränderungen auf Proteinebene korrelieren, wurden Westernblot-Analysen durchgeführt. Dazu wurden Proteinextrakte aus Membranfraktionen aus dem Stammhirn von 60 und 100 Tage alten GCDH-defizienten und Kontroll-Mäusen hergestellt. Diese Proteinextrakte wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und durch Westernblot mit anti-NMDAR-1, anti-NMDAR-2A und anti-NMDAR-2B Antikörper untersucht. Im Stammhirn der 60 Tage alten Mäuse lässt sich eine Reduktion der Expression der NMDAR-1 Untereinheit, bei der GCDH-defizienten Maus im Vergleich zu dem Wildtyp um ca. 45% nachweisen. Die Expression dieser Untereinheit bei den 100 Tage alten Tieren zeigt keine Unterschiede in der Proteinmenge. Die NMDAR-2A und 2B-Rezeptoruntereinheiten zeigen bei 60 Tage und 100 Tage alten Mäusen keine Unterschiede in der Proteinmenge (Abb. 10).

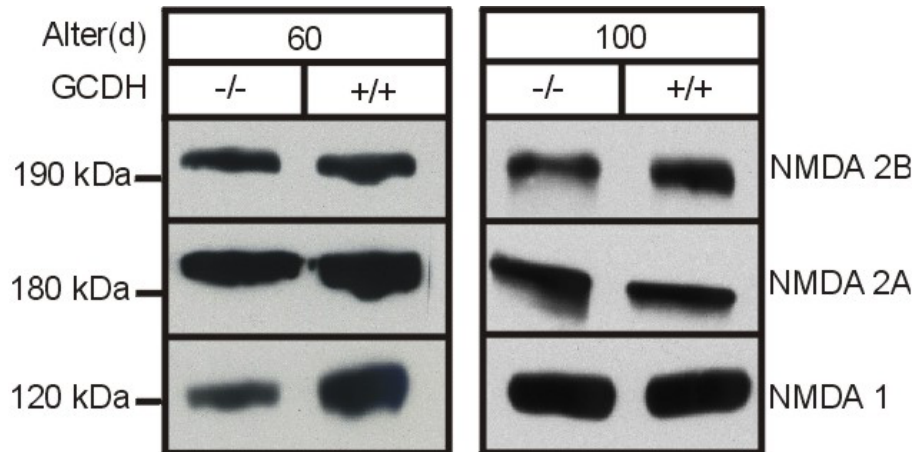


Abb. 10: NMDA-Rezeptor-Westernblot-Analysen aus Stammhirn von GCDH-defizienten und Kontroll Mäusen. Membranproteine (100µg) aus dem Stammhirn von 60 und 100 Tage alten GCDH-defizienten und Kontrollmäusen wurden unter reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembran gebロットet und mit anti-NMDAR-1, anti-NMDAR-2A und anti-NMDAR-2B Antikörpern sowie ECL analysiert.

4.2 Untersuchungen zu Effekten von 3-OH-GA auf Funktionen von Endothelzellen

Die Beobachtung, daß ca 80% der Patienten subdurale Hämatome aufweisen, sowie der MR-tomographische Nachweis von Zeichenn intracerebraler chronischer Extravasationen, weisen sowohl auf akute neurotoxische als auch auf chronische, das Gefäßsystem betreffende, Pathomechanismen bei der GA-1 hin.

4.2.1 Migrationsassay

Um zu untersuchen ob es direkte Effekte von 3-OH-GA auf Funktionen der Endothelzellen gibt, wurde die Migration von HDMEC untersucht. Die Durchführung des Versuches erfolgte mit Hilfe einer Boyden-Kammer. VEGF (50ng/ml) diente als Positivkontrolle für die chemotaktische Migration und erhöht die Zahl der migrierten HDMEC gegenüber unbehandelten Zellen um das 2-fache. Bei den mit 3-OH-GA für 24h vorbehandelten HDMEC zeigt sich eine 3-OH-GA-konzentrationsabhängige Reduktion der Zahl durch die Matrix migrierter Zellen (Abb 11A).

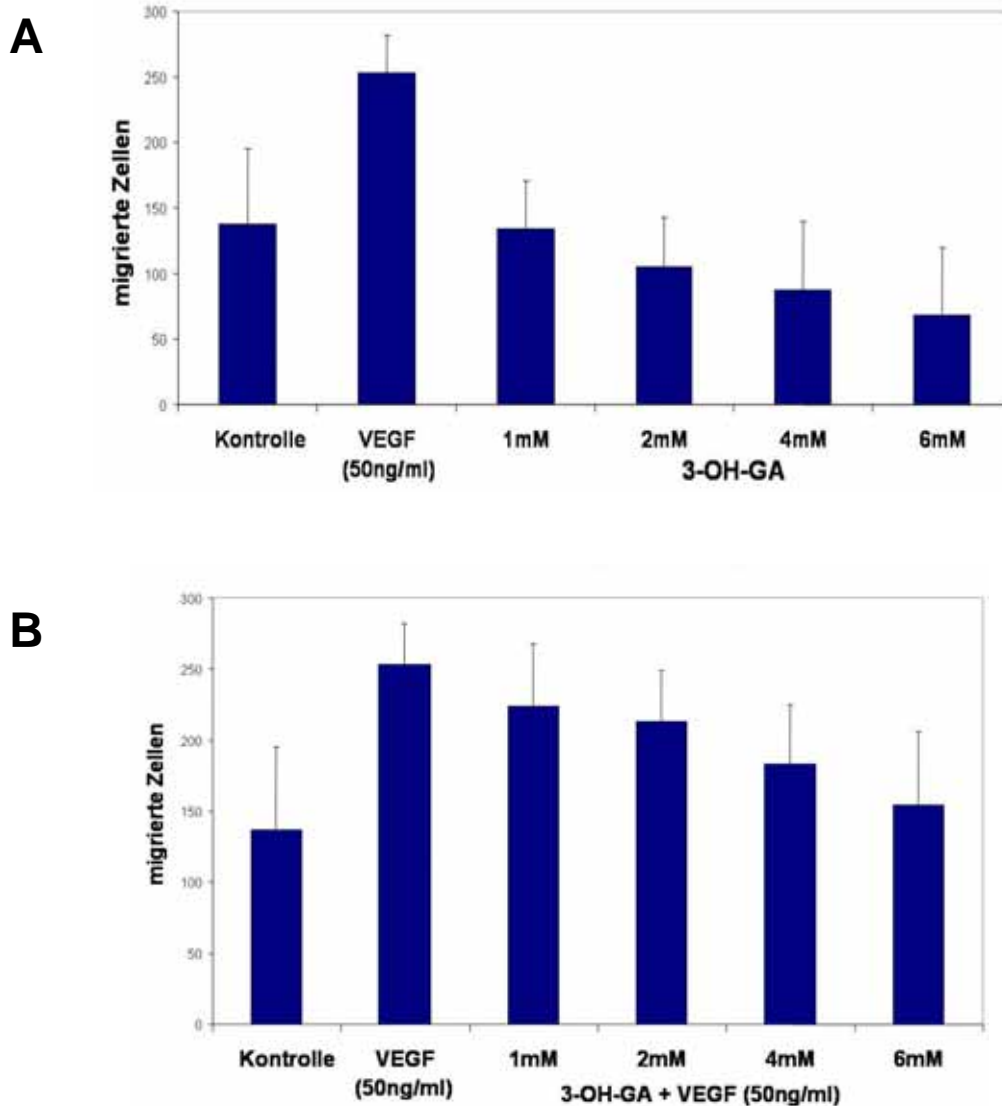


Abb. 11: Migrationsassay mit HDMEC. (A) Die HDMEC wurden für 24 h mit 1, 2, 4 und 6mM 3-OH-GA behandelt. Als Kontrolle dient Medium ohne Zusätze, als Positiv-Kontrolle für eine chemotaktische Aktivierung der Migration dient VEGF (50ng/ml). (B) Die Zellen wurden simultan mit VEGF (50ng/ml) und aufsteigenden Konzentrationen von 3-OH-GA behandelt. Zur Auswertung der migrierten Zellen wurden je 3 wells für jede Konzentration des Effektors aus einem Versuch ausgezählt.

Neben dem Einfluß von 3-OH-GA auf die basale Migration von HDMEC sollte auch der Effekt auf die chemotaktisch aktivierte Zellmigration untersucht werden. Hierzu wurden in das Medium im unteren Teil der Boyden-Kammer simultan VEGF (50ng/ml) und aufsteigende Konzentrationen von 3-OH-GA gegeben. Auch bei den chemotaktisch aktivierten HDMEC zeigt sich in Gegenwart von 3-OH-GA eine konzentrationsabhängige Reduktion der Anzahl an migrierten Zellen. Dabei zeigt sich das 4mM 3-OH-GA die basale Migration auf 60% und die VEGF-stimulierte Migration der Zellen auf 75% senkt (Abb. 11B).

4.2.2 Kapillarformierungs-Assay

Um die Gefäßentwicklung unter Einfluß von 3-OH-GA *in vitro* zu untersuchen, wurde ein Kapillarformierungs-Assay durchgeführt. In die Kollagen-Matrix wurde zu Beginn des Versuches der Wachstumsfaktor VEGF in einer Konzentration von 50ng/ml mit und ohne 4mM 3-OH-GA einpolymerisiert. Nachdem die HDMEC auf die Matrix ausgesät wurden, folgte eine Inkubationszeit von ca. 3-6 Tagen. In dieser Zeit wandern die Zellen in die Kollagen-Matrix ein und können Gefäßstrukturen ausbilden. An Haematoxylin-Eosin-gefärbten Paraffin-Schnitten lassen sich die gebildeten Gefäße später darstellen. Ein Gefäßanschnitt ist in (Abb. 12) zu sehen, dabei zeigen die roten Pfeile auf einen Gefäßabschnitt, in dem die Zellen aufgelöste Zell-Zell-Kontakte aufweisen. Die schwarzen Pfeile zeigen auf einen Abschnitt, in dem die Zellen flach und adhärent an der Gefäßinnenseite liegen und ein regelrechtes Endothel darstellen.

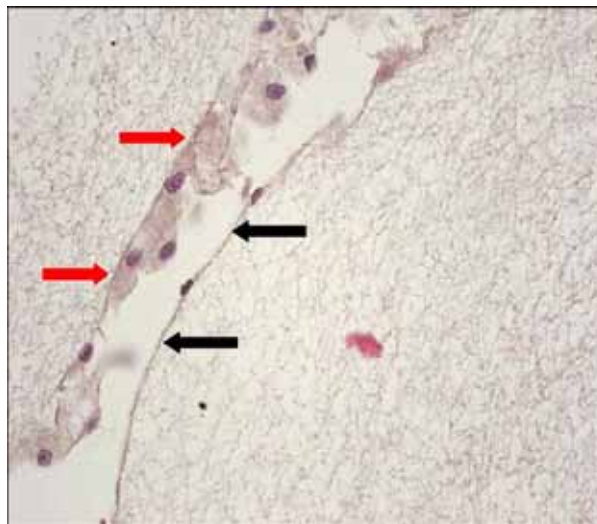


Abb. 12: Kapillarformierungs-Assay. Haematoxylin-Eosin gefärbter Anschnitt eines Kapillarformierungs-Assay (HDMEC) in einer Kollagenmatrix, in der VEGF (50ng/ml) und 3-OH-GA (4mM) einpolymerisiert wurde. Die roten Pfeile zeigen einen Gefäßabschnitt in denen die Zellen aufgelöste Zell-Zell-Kontakte aufweisen. Die schwarzen Pfeile zeigen einen intakten Gefäßabschnitt mit flach und adhärent liegenden Zellen.

4.2.2.1 Immunhistochemie

Um zu analysieren, welche Faktoren möglicherweise an der Auflösung intakter Zell-Zell-Kontakte des Endothels beteiligt sind, wurden Paraffinschnitte der Kapillarformierungs-Assays immunhistochemisch untersucht. Hierfür wurden Antikörper gegen Proteine verwendet, die Einfluß auf endotheliale Zell-Zell-Kontakte

haben, wie z.B. Occludin, VE-Cadherin, VEGF und VEGF-Rezeptor 1 und 2. In Gegenwart von 3-OH-GA zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle keine veränderte Anfärbung von Occludin, VEGF und VEGF-Rezeptor 1 und 2 (Daten nicht gezeigt). Ausschließlich die immunhistochemische Untersuchung mit VE-Cadherin-Antikörper zeigt eine rot-braune punktförmige Immunreaktivität in der Zonula adherens der Gefäße. Ohne Zugabe von VEGF unterbleibt die Ausbildung von Kapillarstrukturen (Abb. 13A). In Gegenwart von VEGF (50ng/ml) lassen sich Gefäßstrukturen und deren Verzweigungen erkennen (Abb. 13B). Sowohl ohne VEGF (Abb.13A) als auch mit VEGF (Abb. 13B) sind mit dem VE-Cadherin-Antikörper punktförmige, rot-braune Anfärbungen im Bereich der Zonula adherens zwischen den Endothelzellen nachweisbar. An Paraffinschnitten eines Kapillarformierungs-Assays in Gegenwart von 2mM 3-OH-GA (Abb.13C und D) nimmt die Intensität der Immunreaktivität ab und die punktförmige Anfärbung der Zonula adherens verschwindet. Dies lässt sich unter 4mM 3-OH-GA noch verstärkt darstellen (Abb.13 E und F).

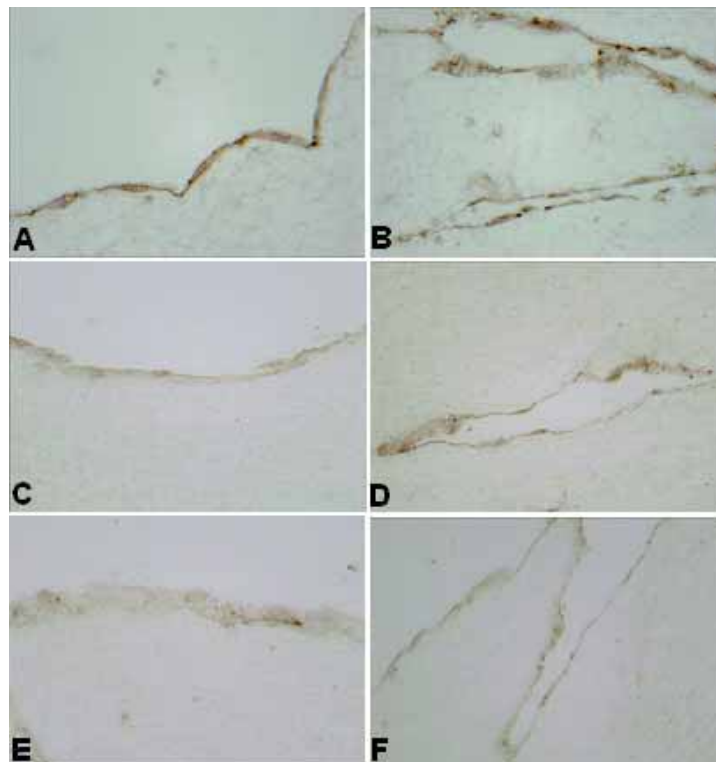


Abb. 13 : Immunhistochemischer Nachweis von VE-Cadherin in humanen Endothelzellen.

In Paraffinschnitten aus Kapillarformierungs-Assays mit HDMEC ohne VEGF-(A) und mit VEGF-(50ng/ml) (B) kann das immunreaktivitäts-Antigen des VE-Cadherin-Antikörper als eine rot-braune, punktförmige Färbung innerhalb der Zonula adherens dargestellt werden. In Gegenwart von 2mM 3-OH-GA ohne VEGF(C) und 4mM 3-OH-GA ohne VEGF (E) nimmt die Immunreaktivität des VE-Cadherin-Antikörper ab. Bei einer Kombination aus 2mM 3-OH-GA mit VEGF (50ng/ml) (D) und 4mM 3-OH-GA mit VEGF (50ng/ml) (F) ist die Abnahme der Immunreaktivität ebenfalls zu beobachten.

4.2.2.2 Westernblot Analyse

Um zu untersuchen, ob die unter 3-OH-GA zu beobachtende Abnahme der VE-Cadherin Immunreaktivität auf die verminderte Expression von VE-Cadherin zurückzuführen ist, wurden Westernblot-Analysen durchgeführt. Kultivierte HDMEC in Monolayer wurden, für 24 h bei 37 °C mit 3-OH-GA (2mM und 4mM) allein oder in Kombination mit VEGF (50ng/ml) inkubiert. Proteinextrakte aus diesen Zellen wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels VE-Cadherin-Westernblot analysiert (Abb. 14). Die densitometrische Auswertung zeigt, daß es unter Anwesenheit von 3-OH-GA zu einer 30-70%igen Reduktion, in Kombination mit VEGF sogar zu einer 90-95%igen Reduktion der 120 kDa VE-Cadherin Bande im Vergleich zur Kontrolle kommt. Die Auswertung der mit VEGF allein behandelten Zellen zeigt keine Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollzellen. Bei der Zweiten bei 90kDa detektierbaren immunoreaktiven VE-Cadherin Bande handelt es sich um ein Abbauprodukt von VE-Cadherin. Die Expressionsunterschiede der 90 kDa-Bande verlaufen simultan zu der 120 kDa VE-Cadherin Bande. Zur Protein Lade-Kontrolle diente der Westernblot-Nachweis von Vimentin.

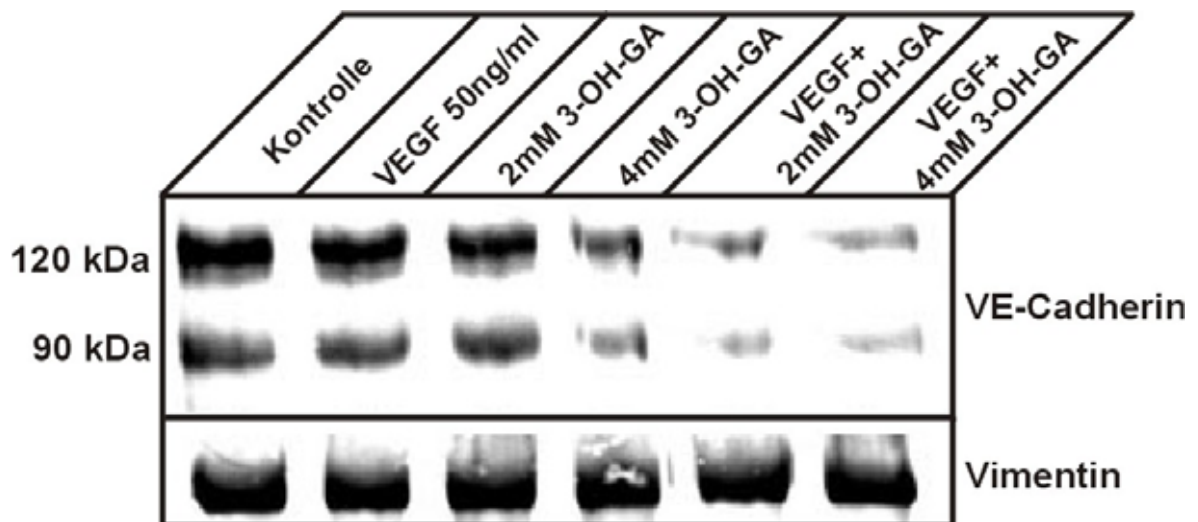


Abb. 14.: VE-Cadherin Westernblot Analyse von Proteinextrakten aus HDMEC. Proteinextrakte (25 µg Protein) aus vorbehandelten (2mM und 4mM 3-OH-GA +/- VEGF 50ng/ml) HDMEC wurden unter reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Westernblot auf die Anwesenheit von VE-Cadherin getestet. Als Proteinlade-Kontrolle diente der Nachweis von Vimentin.

Um zu überprüfen, ob sich der Einfluß von 3-OH-GA auf die Expression des VE-Cadherin *in vitro* auch *in vivo* zeigen lässt, wurde ein exemplarischer Westernblot mit Proteinextrakten aus GCDH-defizienten und Kontroll-Mäusen

durchgeführt. Dazu wurden Proteinfraktionen aus Stammhirn und Cortex einer 60 Tage alten GCDH-defizienten und Kontroll-Maus durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Westernblot auf die Anwesenheit von VE-Cadherin getestet. Die Auswertung mittels Densitometrie zeigt, sowohl im Stammhirn als auch im Cortex der GCDH-defizienten Maus eine Reduktion der 120 kDa Bande von ca. 90% im Vergleich zum Wildtyp. Die 90 kDa Proteinbande konnte nicht detektiert werden (Abb. 15).

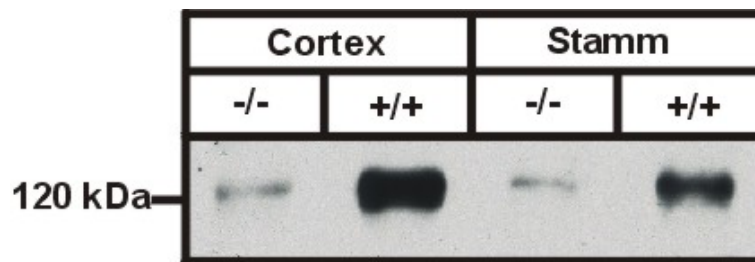


Abb.15: Westernblot-Analyse von Proteinextrakten aus Stamm und Cortex einer GCDH-defizienten und Kontroll-Maus

Proteinextrakte (50µg Protein) aus Stammhirn und Cortex einer 60 Tage alten GCDH-defizienten und Kontroll-Maus wurden unter reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Westernblot auf die Anwesenheit von VE-Cadherin getestet.

4.2.3 CAM-Assay (*in vivo*)

Um die direkte Wirkung von 3-OH-GA auf die Gefäße *in vivo* zu beobachten, bot sich die Durchführung eines CAM-Assays an. Dabei wurden zuvor präparierte Hühnereier (3.2.4.1) für 24 h bei 37 °C unter Einwirkung von 3-OH-GA (4mM) inkubiert. Als Kontrolle diente eine mit PBS getränkte Matrix sowie eine Kombination aus 3-OH-GA (2mM) und VEGF (50ng/ml). In Gegenwart von 3-OH-GA zeigt sich nach einer 24-stündigen Inkubationszeit der CAM eine Veränderung in der Gefäßmorphologie. In Gegenwart von 3-OH-GA zeigt sich eine deutliche Erweiterung der Gefäße. Zugleich ist die Struktur unscharf und verwaschen, was auf eine erhöhte Gefäßpermeabilität hinweist. In Gegenwart von 3-OH-GA und VEGF kommt es in einigen Gefäßbereichen zur Auflösung der Gefäßstruktur und Extravasation von Erythrozyten (Abb. 16).

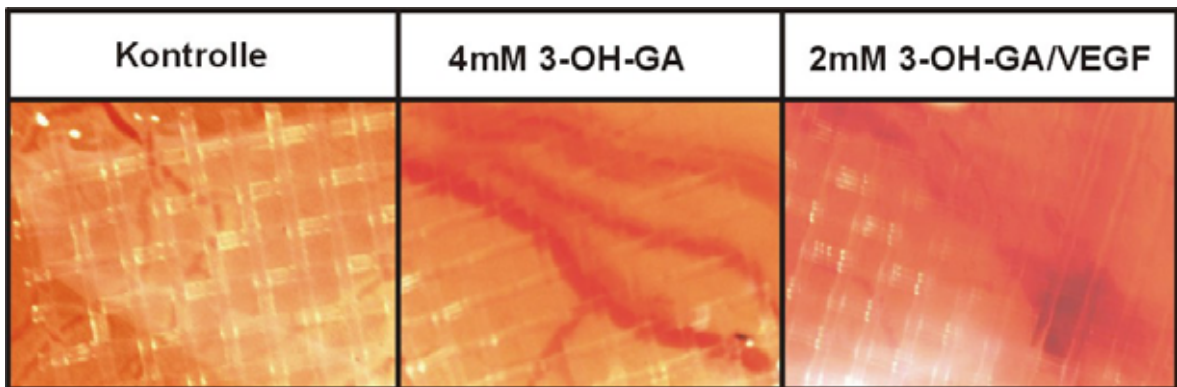


Abb 16: CAM-Assay nach einer Inkubationszeit von 24 h

(links) In der Kontrolle mit PBS kommt es zur Ausbildung von kleinen Gefäßstrukturen, (mitte) mit 4mM 3-OH-GA zeigt sich eine deutliche Erweiterung der Gefäße, darüber hinaus ist die Struktur unscharf und verwaschen, (rechts) 2mM 3-OH-GA+ VEGF (50ng/ml) führt in einigen Gefäßbereichen zur Auflösung der Gefäßstruktur und Extravasation von Erythrozyten.

4.2.4 Expression von NMDAR-1 in HDMEC

Zur weiteren Analyse wurden für experimentelle Untersuchungen der gestörten Endothelfunktion zwei unterschiedliche Endothelzelllinien verwendet, „human dermal microvascular endothelial cells“ (HDMEC) und eine immortalisierte Zelllinie, „porcine brain microvascular endothelial cells“ (PBMEC).

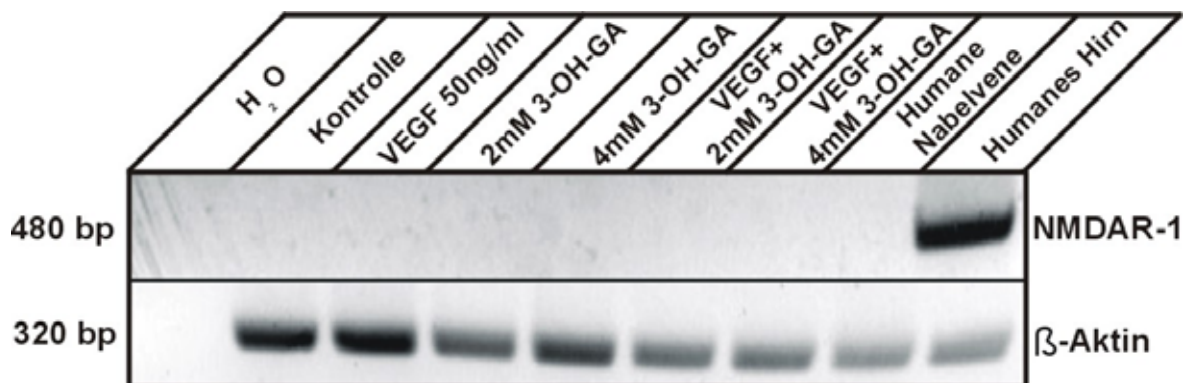


Abb. 17: Semiquantitative PCR der NMDAR-1 mRNA Expression in HDMEC.

Eingesetzt wurden je 500 ng RNA aus HDMEC die für 24 h mit 2mM und 4mM 3-OH-GA mit und ohne VEGF(50ng/ml) vorbehandelten wurden. Als Negativkontrolle diente dabei RNA aus humaner Nabelvene und als Positivkontrolle aus humanen Hirn. Als Kontrolle für den Einsatz gleicher RNAMengen diente eine PCR für β-Actin.

Um auszuschließen, daß die 3-OH-GA Effekte auf die verwendeten Endothelzellen eventuell über NMDA-Rezeptoren vermittelt werden, wurde die Expression der konstitutiven NMDAR-1 durch eine qualitative RT-PCR überprüft. Als Kontrolle

für den Einsatz gleicher RNA-Mengen wurde parallel dazu eine PCR für β -Actin durchgeführt (Abb. 17). Die RNA für diese PCRs wurde aus Endothelzellen (HDMEC) isoliert. Zuvor wurden diese für 24 h mit 2 oder 4mM 3-OH-GA +/- VEGF (50ng/ml), nur VEGF (50ng/ml) oder PBS vorbehandelt. Neben der H₂O-Kontrolle diente als weitere Negativkontrolle RNA aus der humanen Nabelvene und als Positivkontrolle RNA aus humanem Hirn. Die NMDAR-1-Untereinheit wird ausschließlich im humanen Hirn exprimiert, in den HDMEC sowie in Endothelzellen der Nabelvene sind NMDA Rezeptoren nicht exprimiert. Die Ergebnisse zeigen, daß in HDMEC die Wirkungen von 3-OH-GA nicht über NMDA Rezeptoren vermittelt werden.

4.2.5 DNA-Mikroarray mit Endothelzellen

Um Hinweise auf 3-OH-GA-induzierte Veränderungen in der Expression von Genen in Endothelzellen zu erhalten, wurden HDMEC Zellen, die mit oder ohne 3-OH-GA für 24 h behandelt wurden, einer DNA-Mikroarray-Analyse unterzogen. Tabelle 3 stellt die ersten 20 Gene aus insgesamt ca. 1000 veränderten Genen (d.h. > 1.5) der gesamten Array-Analyse dar, die in ihrer Expression in behandelten Zellen mit 4mM 3-OH-GA erhöht sind. Der Faktor gibt das Verhältnis des Signals 4mM 3-OH-GA/Kontroll-Zellen wieder.

Position:	Gen-Symbol:	Gen-Titel:	Vorkommen	Faktor:
1	IFIT1	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	Cytoplasma	194.0
2	BST 2	Bone marrow stromal cell antigen 2	Integrales Membranprotein	68.6
3	C1orf 29	Chromosom 1 open reading frame 29	Integrales Membranprotein	48.5
4	NGFR	Nerve growth factor receptor	Integrales Membranprotein	48.5
5	MME	membran metallo-endopeptidase	Integrales Membranprotein	48.5
6	IFIT 2	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	Integrales Membranprotein	45.2
7	Cig 5	viperin	Integrales Membranprotein	45.2

Ergebnisse

8	SULT1C1	sulfotransferase family, cytosolic, 1C	Cytoplasma	45.2
9	TRIM 14	Tripartite motif-containing 14	Cytoplasma	34.2
10	ISG 20	Interferon stimulated gene	Intrazellulär, nucleoplasma	32
11	OAS 2	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2	Integrales Membranprotein	29.8
12	MX 2	Myxovirus resistance 2	-	27.8
13	IFIT 4	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 4	-	27.8
14	CRIP 1	Cysteine-rich protein 1	-	25.9
15	IFIT 5	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5	-	24.2
16	MX 1	Myxovirus resistance 1	-	22.6
17	TBC1D2	TBC 1 domain family, member 2	-	21.1
18	RRAGD	Ras-related GTP binding D	Zellkern/Cytoplasma	21.1
19	SLC16A6	Solute carrier family 16	Integrales Membranprotein	21.1
20	GRB 14	Growth factor receptor-bound protein 14	-	19.6

Tab. 3: Gene, die in 3-OH-GA-behandelten Zellen heraufreguliert sind. Dargestellt sind die ersten 20 Positionen (Gene) aus der gesamten DNA-Array-Analyse, die in ihrer Expression in behandelten Zellen mit 4mM 3-OH-GA erhöht sind. Der Faktor gibt das Verhältnis des Signals 4mM 3-OH-GA/Kontroll-Zellen wieder.

In der Tabelle 4 sind die ersten 20 Gene aus insgesamt ca. 350 veränderten Genen (d.h. Herabregulation um den Faktor < 0.5) der gesamten Array-Analyse dargestellt, die in ihrer Expression in behandelten Zellen mit 4mM 3-OH-GA erniedrigt sind.

Die rot dargestellten Positionsnummern markieren Gene unter besonderer Berücksichtigung des Bezuges zu angiogenetischen und endothelialen Systemen (6, 16 und 20). Aufgrund dieser speziellen Auswahl wurden zusätzlich drei weitere Gene der Positionen 38, 60 und 822 in die Tabelle aufgenommen. Der Faktor gibt das Verhältnis des Signals 4mM 3-OH-GA/Kontroll-Zellen wieder.

Position:	Gen-Symbol:	Gen-Titel:	Vorkommen	Faktor:
1	-	Transcribed sequence with weak similarity to proteinsp:P39188	-	0.02
2	C5orf13	Chromosome 5 open reading frame 13	-	0.05

Ergebnisse

3	FABP 4	Fatty acid binding protein 4	-	0.06.
4	DKFZp34L142	Hypothetical protein DKFZp34L142	-	0.07
5	CCND 2	Cyclin D2	Zellkern	0.07
6	E-SEL	E-Selektin	Integrales Membranprotein	0.07
7	GJA 4	Gag junction protein, alpha 4	Integrales Membranprotein	0.09
8	SLC7A6	Solute carrier family 7	Integrales Membranprotein	0.10
9	SNCAIP	Synuclein, alpha interacting protein	Cytoplasma	0.11
10	SC65	Synaptonemal complex protein SC65	Zellkern	0.11
11	KIAA 1305	KIAA 1305	-	0.13
12	LOC56920	Semaphorin sem 2	-	0.13
13	FABP 5	Fatty acid binding protein 5	Cytoplasma	0.14
14	CHST1	Carbohydrate sulfotransferase 1	Integrales Membranprotein	0.15
15	IFNAR2	Interferon receptor 2	Integrales Membranprotein	0.15
16	PCDH16	Protocadherin 16	Integrales Membranprotein	0.16
17	-	CDNA FLJ20137	-	0.16
18	POSTN	Periostin, osteoblast specific factor	Extrazelluläre Matrix	0.16
19	DACH 1	Dachshund homolog 1	Zellkern	0.16
20	VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1	Integrales Membranprotein	0.16
38	EDN 1	Endothelin 1	Extrazellulärraum	0.25
60	ALCAM	activated leukocyte cell adhesion molecule	Integrales Membranprotein	0.28
822	PECAM	platelet endothelial cell adhesion molecule	Integrales Membranprotein	0.66

Tab. 4: Gene, die in 3-OH-GA-behandelten Zellen herabreguliert sind. Dargestellt sind die ersten 20 Positionen (Gene) aus der gesamten DNA-Array-Analyse, die in ihrer Expression in behandelten Zellen mit 4mM 3-OH-GA erniedrigt sind. Zusätzlich sind die Gene, die in Verbindung mit angiogenetischen und endothelialen Funktionen stehen mit roten Positionsnummer gekennzeichnet. Drei weitere Gene die sich in das endotheliale System eingliedern lassen stehen an Position 38, 60 und 822 und sind ebenfalls mit roten Nummern gekennzeichnet. Der Faktor gibt das Verhältnis des Signals 4mM 3-OH-GA/Kontroll-Zellen wieder.

4.2.5.1 Quantitative RT-PCR

Um die erhaltenen Daten aus dem DNA-Array zu verifizieren, wurden Expressionsanalysen mittels der quantitativen RT-PCR durchgeführt. Dazu wurden zunächst die Gene mit der stärksten Veränderung im Expressionsspiegel

ausgewählt, wie z.B. E-Selektin und VCAM-1. Verwendet wurde dazu Gesamt-RNA aus 3-OH-GA behandelten und nicht vorbehandelten HDMEC. Um einen eventuell verstärkten Effekt zu beobachten, wurde noch ein dritter Ansatz mit 6mM 3-OH-GA gewählt. Die mRNA-Mengen von E-Selektin bzw. VCAM-1 wurden auf die RNA-Menge von β -Actin bezogen. Die Menge an E-Selektin und VCAM-1-mRNA nimmt mit Zunahme der 3-OH-GA-Konzentration ab. Im Vergleich zur Kontrolle nimmt die Expression von E-Selektin bei 4mM 3-OH-GA um 43% und bei 6mM 3-OH-GA um 97% ab (Abb. 18A). Bei VCAM-1 nimmt die Expression bei 4mM 3-OH-GA um 76% und bei 6mM 3-OH-GA um 83% im Vergleich zur Kontrolle ab (Abb. 18B).

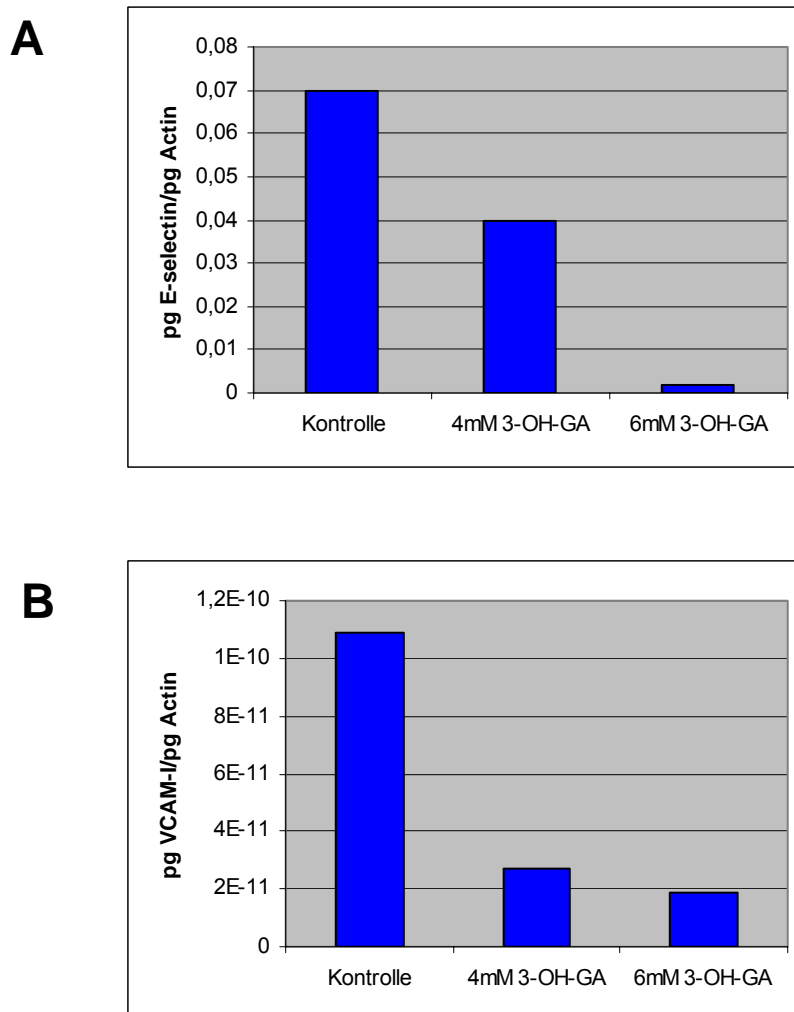


Abb.18: Bestimmung der mRNA-Menge von E-Selektin und VCAM-1 in 3-OH-GA vorbehandelten HDMEC mittels quantitativer RT-PCR. Gesamt-RNA wurde aus Kontroll-HDMEC und mit 4 bzw. 6mM 3-OH-GA vorbehandelten Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die quantitative PCR wurde wie unter 3.2.1.7 beschrieben durchgeführt. Die mRNA-Menge von E-Selektin (A) und VCAM-1 (B) wurde auf die mRNA-Menge von β -Actin-mRNA normalisiert. Die Graphik zeigt den Mittelwert von zwei unabhängigen Experimenten. Als Standardreihe dienten verschiedene Verdünnungen des PCR-Produktes für E-Selektin, VCAM-1 und β -Aktin.

4.2.5.2 Westernblot-Analysen

Um zu überprüfen, ob die auf mRNA-Ebene gefundenen Veränderungen auch mit Veränderungen auf Proteinebene korrelieren, wurden Westernblot-Analysen durchgeführt. Dazu wurden Proteinextrakte aus 24 h mit 4mM 3-OH-GA vorbehandelten PBMEC isoliert und unter nicht-reduzierenden Bedingungen über eine SDS-PAGE aufgetrennt und durch Westernblot mit anti-E-Selektin-Antikörper und analysiert. Die densitometrische Auswertung der 115 kDa-Doppelbande zeigt eine 45%ige Reduktion der E-Selektin-Proteinmenge bei den 4mM 3-OH-GA vorbehandelten Zellen im Gegensatz zu den Kontrollzellen (Abb. 19).

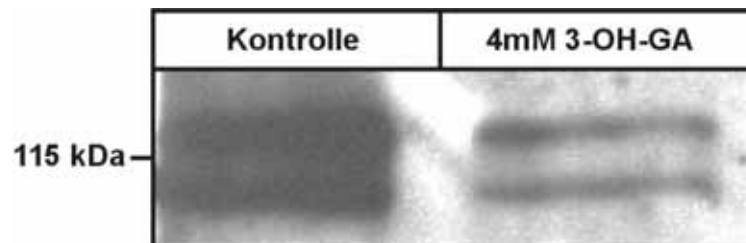


Abb. 19: E-Selektin-Expression in PBMEC

Proteinextrakte (25 µg Protein) aus 24h vorbehandelten 4mM 3-OH-GA PBMEC und Kontrollzellen wurden unter nicht reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Westernblot auf die Anwesenheit von E-Selektin getestet.

4.3 Einfluß von 3-OH-GA auf die Endozytose in Endothelzellen

Wie im vorherigen Kapitel gezeigt wurde, reduziert die Inkubation von Endothelzellen mit 3-OH-GA die Expression von VE-Cadherin. VE-Cadherin hat als Zell-Zell-Adhäsionsmolekül einen Einfluß auf den Erhalt von Gewebestrukturen und epithelialen Interaktionen. Über Interaktionen mit dem zytoplasmatische Proteinen α - und β -Catenin steht VE-Cadherin mit dem Aktinzytoskelett in Kontakt (Kowalczyk et al. 1998). Es wäre daher eventuell zu erwarten, daß eine 3-OH-GA induzierte Reduktion des VE-Cadherin-Gehaltes in Endothelzellen, die Wechselwirkung des Aktinzytoskeletts mit der Plasmamembrann beeinflusst. Ein sensibler zellbiologischer Parameter, der die Intaktheit des Zytoskeletts widerspiegelt, ist die rezeptor-vermittelte Endozytose.

4.3.1 Wirkungen von 3-OH-GA auf Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-abhängige Endozytose

Die Aufnahme lysosomaler Mannose-6-Phosphat-markierter Enzyme über Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (MPR) wurde nach Inkubation von PBMEC oder HDMEC in An- und Abwesenheit von 3-OH-GA gemessen. Dazu wurde das [¹²⁵I]-markierte lysosomale Enzym Arylsulfatase A (ASA) den Zellen im Kulturmedium bei 37 °C angeboten. Nach Bindung an Oberflächenrezeptoren erfolgt die Internalisierung der Rezeptor-Ligand-Komplexe über Clathrin-beschichtete Vesikel. Nach der Endozytose-Phase wurde das [¹²⁵I]-haltige Medium entfernt, die Zellen mehrfach gewaschen und die noch an Zelloberflächen MPR gebundene [¹²⁵I]-ASA durch einen Überschuss von M6P bei 4 °C verdrängt. Die in den Zellen verbliebene Radioaktivität kann als internalisiert angesehen werden und ist quantifizierbar durch die direkte Bestimmung im γ -Zähler oder durch Trennung der Zellextrakte durch SDS-PAGE und Densitometrie der Autoradiogramme.

4.3.1.1 Endozytose von Arylsulfatase A in kultivierten HDMEC und PBMEC

Zunächst wurde die Endozytose von [¹²⁵I]-ASA in PBMEC nach 24 h Vor-inkubation der Zellen in An- und Abwesenheit von 4mM 3-OH-GA für 2 und 4 h (ebenfalls in An- und Abwesenheit von 3-OH-GA) gemessen. Die Spezifität der Aufnahme wurde durch den Zusatz von 10mM M6P im Endozytoseansatz gemessen, das als kompetitiver Inhibitor die Bindung der [¹²⁵I]-ASA an MPR verhindert. In unbehandelten Zellen ist eine zeitabhängige Aufnahme von [¹²⁵I]-ASA in PBMEC festzustellen, die komplett durch M6P hemmbar ist. Nach Vorbehandlung mit 3-OH-GA ist die Menge endozytierter [¹²⁵I]-ASA gegenüber den Kontrollen stark erhöht (2,2 – 3 fach). Auch unter diesen Bedingungen erfolgte die Aufnahme spezifisch (M6P-hemmbar) über MPR (Abb. 20).

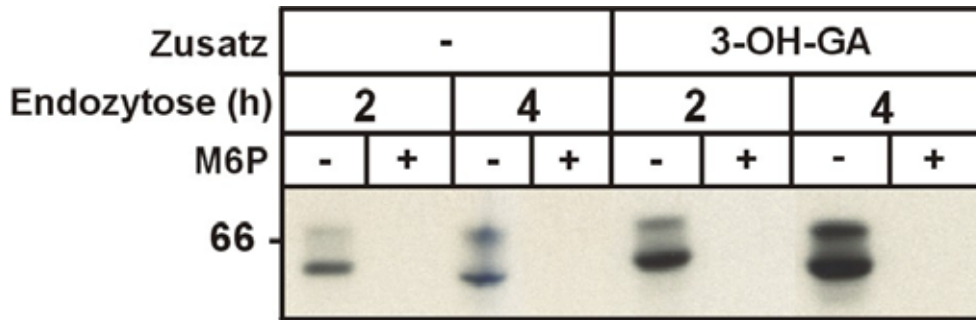


Abb. 20: Endozytose von [¹²⁵I]-ASA in kultivierten PBMEC.

Kontroll- und für 24h mit 4mM 3-OH-GA vorbehandelte PBMEC, wurden für 2 und 4 h in An- und Abwesenheit des kompetitiven Inhibitors Mannose-6-Phosphat (M6P; 10mM) bei 37 °C mit [¹²⁵I]-ASA (250.000 cpm/700µl) inkubiert. Nach Entfernung der an die Zelloberfläche gebundenen ASA durch Waschen mit M6P (2mM), wurden Zelllysate unter nicht-reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE (10 % Acrylamid) und Autoradiographie analysiert.

Um die Konzentrationsabhängigkeit des Effektes von 3-OH-GA auf die MPR-vermittelte Endozytose zu untersuchen, wurden PBMEC in An- und Abwesenheit von verschiedenen Konzentrationen (0,1- 4mM) 3-OH-GA für 24 h vorbehandelt, gefolgt von der [¹²⁵I]-ASA Endozytosephase von 1 und 3 h in An- und Abwesenheit von 3-OH-GA. Als Negativkontrolle wurden den Zellen, die mit 4mM 3-OH-GA vorbehandelt wurden, während der Endozytose 5µM Latrunculin A zugesetzt, das die Depolymerisierung des Aktinzytoskeletts bewirkt (Morton et al. 2000, Yarmola et al. 2000). Nach 1 h Endozytose zeigt sich eine durchschnittliche Steigung der [¹²⁵I]-ASA-Aufnahme um 50-100% in den behandelten Zellen unabhängig von der 3-OH-GA-Konzentration im Vergleich zu den Kontrollen. Nach 3 h Endozytose wird dieser Effekt jedoch verstärkt und zeigt eine lineare, konzentrationsabhängige Steigung der [¹²⁵I]-ASA- Aufnahme von 50-300% in den mit 3-OH-GA vorbehandelten Zellen im Gegensatz zu der Kontrolle. Die Negativkontrolle mit Latrunculin A zeigt keine [¹²⁵I]-ASA-Aufnahme (Abb. 21A und B). Die Befunde zeigen, daß die Wirkung von 3-OH-GA auf die VE-Cadherin-Expression in HDMEC oder PBMEC keine allgemeinen Effekte auf die Integrität des Aktinzytoskeletts hat, da die MPR-vermittelte Endozytose von ASA sonst verringert sein müsste wie z.B. nach Latrunculin A-Behandlung.

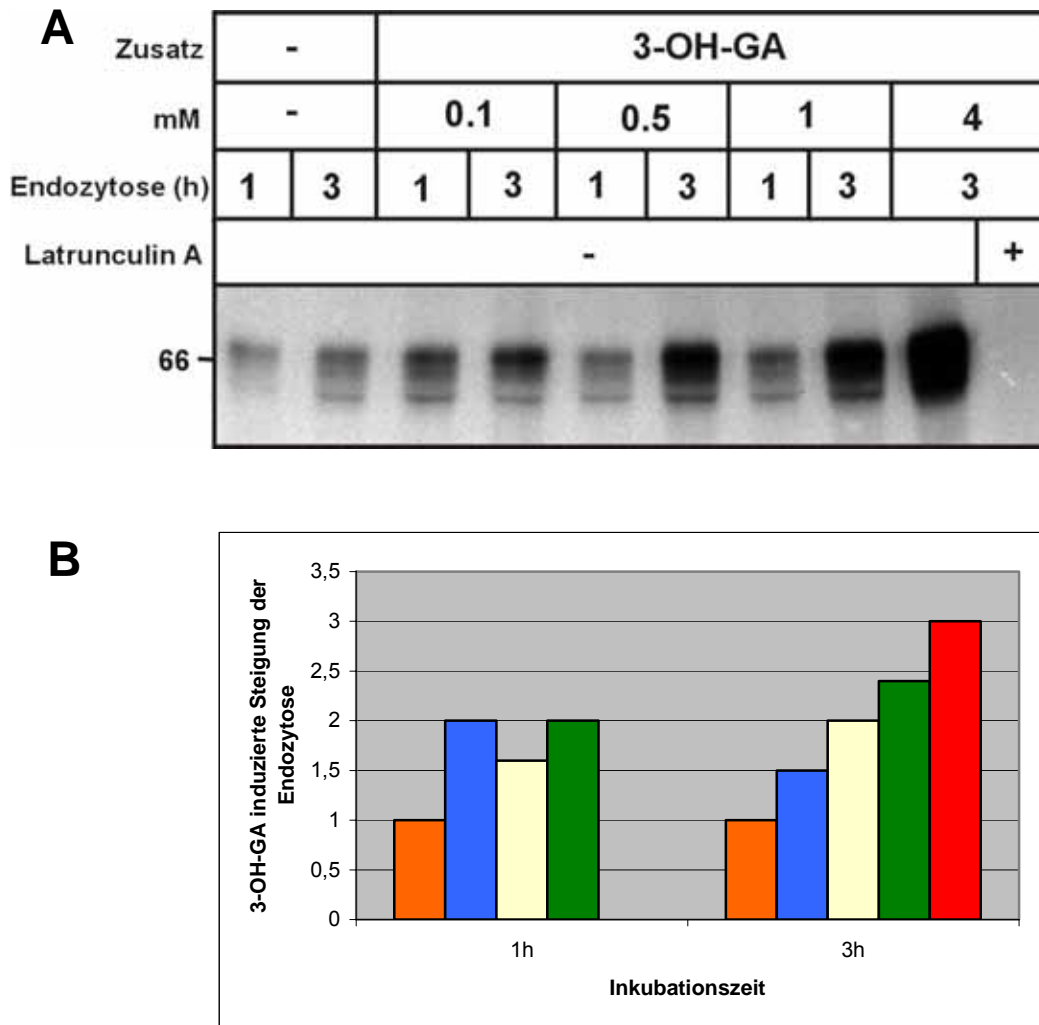


Abb. 21: Konzentrationsabhängige Endozytose von [¹²⁵I]-ASA in kultivierten PBMEC
 Kontroll- und für 24 h mit 0,1-4mM 3-OH-GA vorbehandelte PBMEC wurden für 1 h und 3 h bei 37 °C mit [¹²⁵I]-ASA (250.000 cpm/700µl) inkubiert. Als Negativkontrolle wurden den Zellen, die mit 4mM 3-OH-GA vorbehandelt wurden, während der Endozytose 5µM Latrunculin A zugesetzt. Nach Entfernung der an die Zelloberfläche gebundenen [¹²⁵I]-ASA durch Waschen mit M6P wurden Zelllysate unter nicht-reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE (10 % Acrylamid) und Autoradiographie analysiert (A). Darstellung der densitometrischen Auswertung des Röntgenfilms im Balkendiagramm, orange = Kontrolle, blau = 0,1mM 3-OH-GA, beige = 0,5mM 3-OH-GA, grün = 1mM 3-OH-GA und rot = 4mM 3-OH-GA. Zusammengefaßt dargestellt sind alle Konzentrationen des Effektors für 1h und 3h (B)

In einem weiteren Experiment sollte die Zellspezifität der 3-OH-GA-Effekte auf die Endozytose untersucht werden. Dazu wurde eine humane Endothelzelllinie (HDMEC) benutzt. Neben Kontrollzellen wurden HDMEC für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen von 3-OH-GA vorbehandelt. Zur Kontrolle der Spezifität des 3-OH-GA Effektes wurden die HDMEC mit 4mM Glutarsäure (4mM) vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit [¹²⁵I]-ASA für 4 h bei 37 °C inkubiert und die endozytierte [¹²⁵I]-ASA über die Messung der Radioaktivität in Zellhomogenaten und durch SDS-PAGE autoradiographisch bestimmt. Die densitometrische

Auswertung ergab, daß mit Zunahme der 3-OH-GA-Konzentration eine 2 - 5fache Erhöhung der endozytierten Menge [¹²⁵I]-ASA gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen nachweisbar war. Bei den mit 4mM GA vorbehandelten Zellen ließ sich eine 1,5fache Zunahme der [¹²⁵I]-ASA nachweisen. Die Daten zeigen, daß die gesteigerte MPR-vermittelte Endozytose unter 3-OH-GA nicht Zelltyp abhängig ist (Abb. 22).

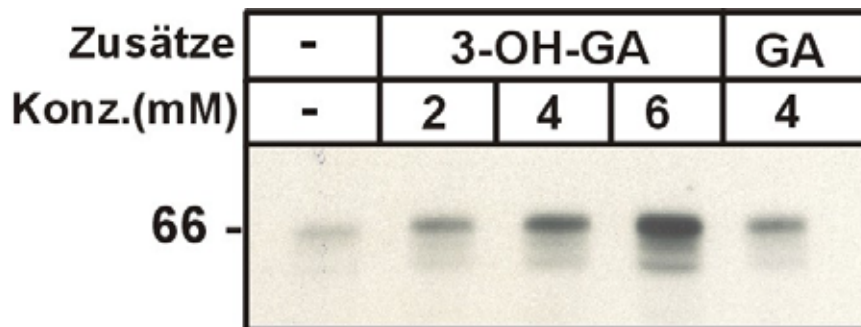


Abb. 22: Endozytose von [¹²⁵I]-ASA in kultivierten HDMEC

Kontroll- und für 24 h mit 2, 4 und 6mM 3-OH-GA, sowie 4mM GA vorbehandelte HDMEC, wurden für 4 h in An- und Abwesenheit des kompetitiven Inhibitors Mannose-6-Phosphat (M6P; 10mM) bei 37 °C mit [¹²⁵I]-ASA (250.000 cpm/700µl) inkubiert. Nach Entfernung der an die Zelloberfläche gebundenen ASA durch Waschen mit M6P (2mM), wurden Zelllysate unter nicht reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE (10 % Acrylamid) und Autoradiographie analysiert.

Die bisher beschriebenen Wirkungen von 3-OH-GA auf die MPR-vermittelte Endozytose von [¹²⁵I]-ASA sind nach 24-stündiger Vorbehandlung und kurzer Inkubationszeit (2 - 4 h) nachweisbar. Im Folgenden sollte überprüft werden, ob 3-OH-GA direkt ohne Vorbehandlung der Zellen die Endozytose von [¹²⁵I]-ASA stimulieren kann. Wie in Abb. 23 zu sehen ist, erhöht die simultane Zugabe von 4mM 3-OH-GA zum Endozytosemedium ohne 24-stündige Vorinkubation mit 3-OH-GA die [¹²⁵I]-ASA Internalisierung in PBMEC im gleichen Ausmaß um das 3 - 5fache im Vergleich zu unbehandelten Zellen, wie nach einer kontinuierliche 24-stündige Vorbehandlung. Die Daten lassen vermuten, daß 3-OH-GA über einen schnellen, direkten Mechanismus die MPR-vermittelte Ligand-Endozytose beeinflusst.

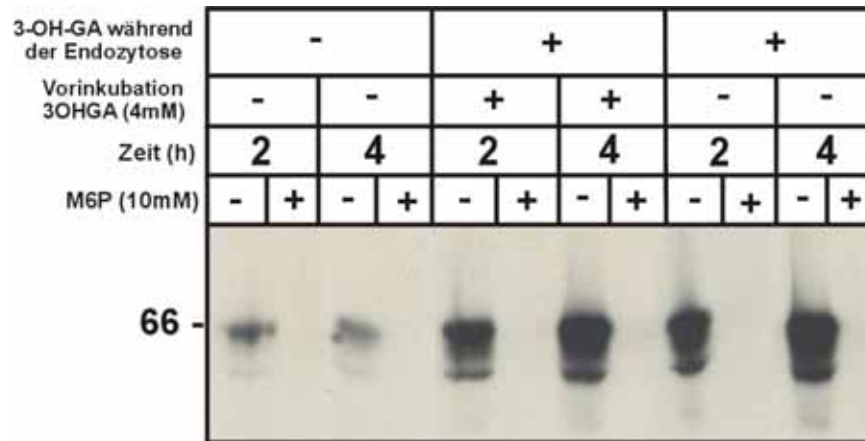


Abb. 23: Endozytose von [¹²⁵I]-ASA in kultivierten PBMEC.

Kontroll- und für 24 h mit 4mM 3-OH-GA vorbehandelte PBMEC wurden für 2 und 4 h in An- und Abwesenheit des kompetitiven Inhibitors Mannose-6-Phosphat (M6P; 10mM) bei 37 °C mit [¹²⁵I]-ASA (250.000 cpm/700µl) inkubiert. Bei einem Teil der Zellen erfolgte keine 24-stündige Vorbehandlung mit 3-OH-GA, sondern diese erhielten den Metabolit erst bei der Zugabe der radioaktiv-markierten ASA, d.h für einen Endozytosezeitraum von 2 und 4 h. Die oberflächengebundene ASA wurde mit einem M6P-(2mM)-Waschschritt entfernt. Die Zellextrakte wurden anschließend unter nicht-reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE (10 % Acrylamid) und Autoradiographie analysiert.

4.3.2 Wirkungen von 3-OH-GA auf die Transferrin-Rezeptor-abhängige Endozytose in PBMEC und HeLa-Zellen

Um zu testen, ob es sich bei der 3-OH-GA gesteigerten Endozytose um M6P-Rezeptor-spezifische Effekte handelt, sollte die Transferrin-Rezeptor-abhängige Endozytose von [¹²⁵I]-Transferrin analysiert werden. Nach Bindung des [¹²⁵I]-Transferrin an den Rezeptor wird der Rezeptor-Ligand-Komplex internalisiert und vesikulär zu den frühen Endosomen transportiert. Innerhalb von 20-30 Minuten nach Dissoziation der Fe³⁺-Ionen rezykliert der Rezeptor/apo-Transferrin-Komplex wieder zur Plasmamembran. PBMEC wurden für 24 h in An- und Abwesenheit von 4mM 3-OH-GA und 4mM GA vorbehandelt. Nach Mediumwechsel wurden die Zellen mit [¹²⁵I]-Transferrin für 30 min bei 37 °C in An- und Abwesenheit der Effektoren inkubiert. Zelloberflächengebundenes Material wurde anschließend bei 4 °C mit einem sauren Waschschritt verdrängt und das internalisierte [¹²⁵I]-Transferrin über die Messung der Radioaktivität in Zellhomogenaten und nach SDS-PAGE durch Autoradiographie sichtbar gemacht (Abb. 24A). Die densitometrische Auswertung ergab, daß in 4mM 3-OH-GA behandelten PBMEC bis zu 1,6fach mehr [¹²⁵I]-Transferrin internalisiert wurde als

in Kontroll oder GA-behandelten Zellen. Die Aufnahme ist spezifisch und läßt sich fast vollständig durch einen molaren Überschuß an unmarkiertem Transferrin hemmen. Um zu untersuchen ob die durch 3-OH-GA gesteigerte Transferrin-Endozytose zellspezifisch verläuft, wurden HeLa-Zellen überprüft (Abb. 24B). Die densitometrische Auswertung dieses Experiments zeigt, daß auch in mit 4mM 3-OH-GA vorbehandelten HeLa-Zellen eine 2,3fache Zunahme der [¹²⁵I]-Transferrin-Internalisierung im Vergleich zu unbehandelten oder GA-behandelten Kontrollzellen messbar war.

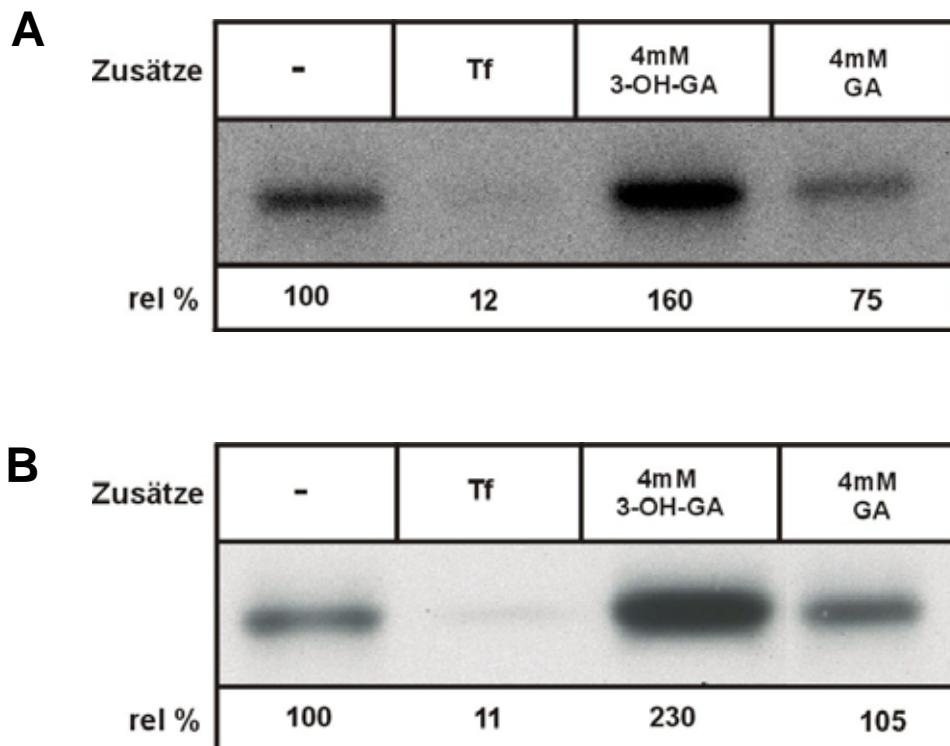


Abb. 24: Endozytose von [¹²⁵I]-Transferrin in PBMEC und HeLa-Zellen

Kontroll- und für 24 h mit 4mM 3-OH-GA und 4mM GA vorbehandelte PBMEC wurden für 30 min bei 37 °C mit [¹²⁵I]-Transferrin (300.000 cpm/700µl) inkubiert. Zur Überprüfung der Spezifität wurde unmarkiertes Transferrin im molaren Überschuß als kompetitiver Inhibitor eingesetzt. Nach Entfernung des an die Zelloberfläche gebundenen Transferrins durch waschen mit einem sauren Puffer (pH 2,5), wurden die Zelllysate unter nicht-reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE (10% Acrylamid) und Autoradiographie analysiert. [¹²⁵I]-Transferrin-Endozytose an PBMEC (**A**). [¹²⁵I]-Transferrin-Endozytose in HeLa-Zellen (**B**).

4.3.3 Wirkung von 3-OH-GA auf die Zahl und Kinetik von Zelloberflächen-lokalisierten Rezeptoren

Da sowohl die internalisierte Menge von [¹²⁵I]-ASA und [¹²⁵I]-Transferrin durch 3-OH-GA gesteigert war, aber beide Liganden in unterschiedlichen intrazellulären Kompartimenten akkumulieren (Lysosom und Endosom), kann eine 3-OH-GA-induzierte Hemmung des lysosomalen Abbaus als Erklärung der erhöhten [¹²⁵I]-Ligandmenge ausgeschlossen werden. Alternativ könnte 3-OH-GA die Zahl der Rezeptoren an der Zelloberfläche oder die Kinetik des Rezeptortransportes beeinflussen.

4.3.3.1 Wirkung von 3-OH-GA auf die Zahl von MPR 300 an der Oberfläche von HeLa-Zellen

Mit Hilfe des MPR 300-spezifischen 2C2-Antikörpers soll nach 3-OH-GA-Inkubation die Menge des an der Zelloberfläche lokalisierten MPR 300 bestimmt werden. HeLa-Zellen wurden in An- und Abwesenheit von 0,1mM/4mM 3-OH-GA, und 4mM GA für 24 h vorbehandelt. Nach Abkühlung der Zellen auf 4 °C erfolgte die Bindung des [¹²⁵I]-2C2-Antikörpers für 5 h bei 4 °C. Nicht gebundener Antikörper wurde durch Waschen mit Puffer (pH 7,4) und der an der Zelloberfläche Rezeptor-gebundene [¹²⁵I]-2C2-Antikörper durch sauren Waschpuffer (pH 2.5) abgelöst und quantifiziert (Abb. 25). Die anschließende Auswertung zeigte eine 3-OH-GA-beeinflusste Zunahme des gebundenen radioaktiv markierten 2C2-Antikörpers. Nach Vorbehandlung der Zellen sowohl mit 0,1mM als auch mit 4mM 3-OH-GA konnte eine 2,3fache Zunahme der Antikörperbindung im Vergleich zu Kontroll-Zellen gemessen werden. Die Vorinkubation der Zellen mit 4mM GA veränderte die Zahl der MPR 300 an der Zelloberfläche nicht.

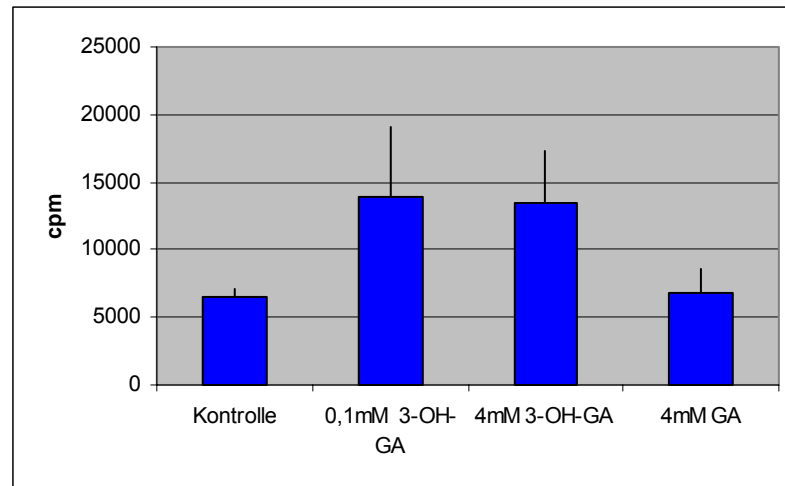


Abb. 25: Oberflächen- ^{125}I -2C2-Bindungsassay an HeLa-Zellen

Kontroll-, und mit 0,1 und 4mM 3-OH-GA bzw. 4mM GA vorbehandelte HeLa-Zellen wurden für 5 h mit ^{125}I -2C2 (600.000cpm/700 μl) bei 4 °C inkubiert. Das an die Zelloberfläche gebundene radioaktive 2C2 wird durch saures Waschen (Puffer pH 2,5) entfernt und durch Messung der Radioaktivität quantifiziert.

4.3.3.2 Wirkung von 3-OH-GA auf Exozytoserate des Transferrin-Rezeptors in PBMEC

Um die Exozytoserate von Transferrin-Rezeptoren zu untersuchen wurden Kontroll- und 24 h mit 4mM 3-OH-GA vorbehandelte PBMEC in An- und Abwesenheit von 4mM 3-OH-GA für 30 min bei 37 °C mit ^{125}I -Transferrin inkubiert. Die Zellen wurden dann auf 4 °C abgekühlt und zelloberflächengebundenes ^{125}I -Transferrin entfernt. Anschließend wurde durch einmalige Zugabe eines 37 °C warmen Mediums für 10, 20 und 30 min bei 37 °C die Exozytose von ^{125}I -Transferrin gemessen. Das an der Zelloberfläche gebundene Material wurde anschließend erneut bei 4 °C mit einem sauren Waschschrift verdrängt und das in den Zellen verbliebene ^{125}I -Transferrin über die Messung der Radioaktivität und durch anschließender SDS-PAGE der Zelllysate autoradiographisch dargestellt. Die 3-OH-GA-behandelten Zellen zeigen, wie schon vorher beschrieben, eine 1,5fache Zunahme des radioaktiv markierten, endozytierten Transferrins im Vergleich zu den Kontrollzellen. Nach Austausch des Mediums wird in Kontrollzellen zuvor internalisiertes ^{125}I -Transferrin innerhalb von 30 min vollständig exozytiert (Abb. 26). Hingegen verbleibt bei den 3-OH-GA behandelten Zellen ein Anteil von 18% der Radioaktivität in den Zellen.

	Kontrolle					4mM 3-OH-GA				
Zusätze	-	Tf	-			-	Tf	-		
Exozytose (min)	-	-	10'	20'	30'	-	-	10'	20'	30'
rel %	100	2	35	8	1	100	1	22	19	18

Abb. 26: Exozytose mit [¹²⁵I]-Transferrin an PBMEC

Kontroll- und für 24 h mit 4mM 3-OH-GA-vorbehandelte PBMEC wurden mit [¹²⁵I]-Transferrin (300.000 cpm/700µl) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe eines 37 °C warmen Mediums ohne Zusatz von [¹²⁵I]-Transferrin auf die Zellen erfolgte ein Exozytosephase von 10, 20 und 30 min bei 37 °C. Durch Zugabe eines molaren Überschusses an unmarkiertem Transferrin lässt sich die Endozytose spezifisch hemmen. Mit Hilfe eines sauren Waschpuffers (pH 2,5) wurde die oberflächengebundene Radioaktivität verdrängt und anschließend die intrazellulär verbleibende Radioaktivität gemessen. Die Zellysate von Kontroll- und mit 4mM 3-OH-GA-behandelten Zellen wurden unter nicht-reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE (10% Acrylamid) und Autoradiographie analysiert.

4.3.4 Expression von Adaptormolekülen in HeLa-Zellen

Es ist bekannt, daß die Defizienz des cytoplasmatischen Adaptormoleküls AP-1, das für die Abschnürung von Transportvesikeln am TGN notwendig ist, zu einer Umverteilung von MPR an die Plasmamembran führen (Meyer et al., 2000). Um die Expression von Adaptorproteinen zu bestimmen, wurden Westernblot-Analysen mit Antikörpern gegen verschiedene Untereinheiten, der AP-1, 2 und 3 in 3-OH-GA- oder GA- behandelten und unbehandelten humanen HeLa-Zellen durchgeführt. Proteinextrakte aus diesen Zellen wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot mit Antikörpern gegen anti-γ Adaptin (AP-1), anti-α Adaptin (AP-2) und anti-μ Adaptin (AP-3) detektiert. Im Vergleich von Kontroll- und GA-behandelten Zellen zeigt eine densitometrische Auswertung, daß es durch die Vorbehandlung der Zellen mit 0,1mM 3-OH-GA zu einer 70%igen und bei 4mM 3-OH-GA zu einer 60%igen Reduktion des AP-2 kommt. Im Westernblot gegen AP-3 zeigt sich bei den 4mM mit GA vorbehandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen eine Reduktion des Proteins um 60% im Vergleich zu den Kontrollzellen. Im AP-1 Westernblot sind zwischen mit 3-OH-GA behandelten und unbehandelten Zellen keine Unterschiede feststellbar (Abb. 27).

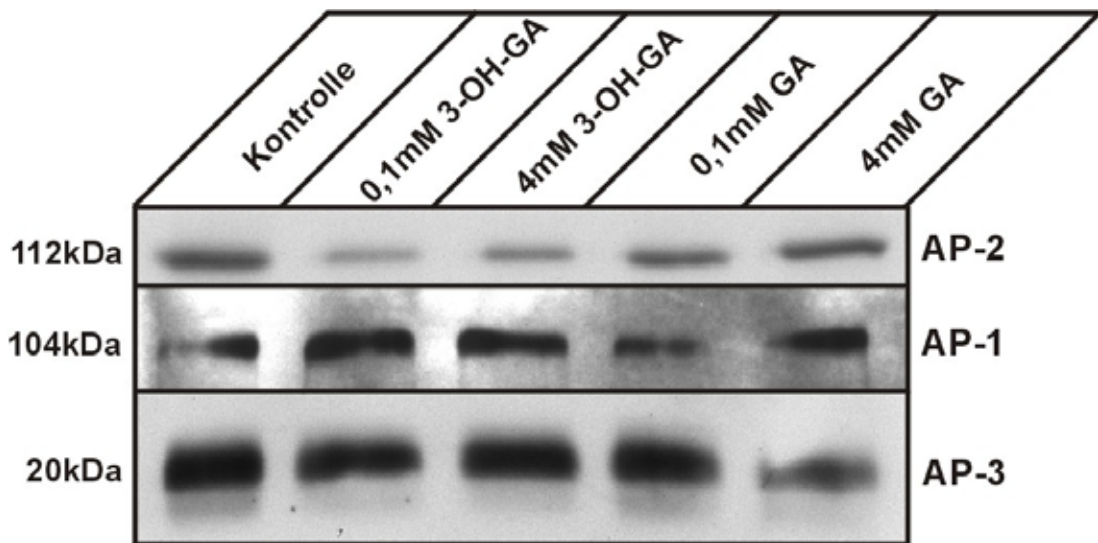


Abb. 27: Westernblot-Analysen der Adaptorproteine AP-1, -2 und -3 in HeLa-Zellen

Proteinextrakte aus kultivierten HeLa-Zellen. Je 50 µg Protein aus Kontroll- und mit 0,1 und 4mM 3-OH-GA behandelten Zellen wurden unter nicht-reduzierenden Bedingungen über SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt, auf Nitrocellulose-Membran geblottet und mit anti-γ Adaptin (1:500), anti-α-Adaptin-(1:500) und anti-μ-Adaptin-(1:3000) Antikörpern und ECL analysiert.

5 DISKUSSION

5.1 NMDA-Rezeptor-abhängige Effekte

Die bisherigen elektrophysiologischen und pharmakologischen Untersuchungen an organotypischen Schnittkulturen und gemischten Cortexkulturen der Ratte zeigten, daß der bei der GCDH-Defizienz akkumulierende Metabolit 3-OH-GA *in vitro* zu exzitotoxischen Mechanismen führt, die durch NMDA-Rezeptor-Antagonisten aufhebbar sind (Kölker et al. 1999, Ullrich et al. 1999). Daher besteht die Möglichkeit, daß *in vivo* NMDA-Rezeptor-abhängige exzitotoxische Prozesse an der bei der GCDH-Defizienz zu beobachtenden striatalen Degeneration und der daraus resultierenden Bewegungsstörung beteiligt sind. Weiterhin konnte in Zellkulturversuchen gezeigt werden, daß 3-OH-GA zu einer Erniedrigung der intrazellulären Kreatinphosphat-Konzentration führt (Das et al. 2003, Ullrich et al. 1999). Besteht in der GCDH-defizienten Maus metabolischer Streß und eine Stimulation von NMDA-Rezeptoren, so wäre – in Analogie etwa zu bestehenden Ischämie-modellen- eine Veränderung der Expression von NMDA-Rezeptoren (z.B. NR2B-Reduktion nach Ischämie) möglich (Zhang et al. 1997). Veränderungen des Expressionsmuster von NMDA-Rezeptoren könnten eventuell auch erklären, warum die Patienten nach dem 5. Lebensjahr im Allgemeinen keine Progredienz der Erkrankung aufweisen. Aus der Literatur ist bekannt, daß bei der Ratte altersabhängige Unterschiede in der Zusammensetzung der Heteromere beobachtet worden sind, und beispielsweise NR2B-Rezeptoren nur kurz vor der Geburt exprimiert werden und mit zunehmendem Alter die NR2B-Expression zugunsten der Expression von NR2A-Untereinheiten abnimmt (Monyer et al. 1994). Untersuchungen zur Expression von NMDA-Rezeptoruntereinheiten wurden an GCDH-defizienten und Kontrollmäusen durchgeführt. Für Untersuchungen zur Bestimmung der mRNA-Menge wurde RNA aus Mäusen im Alter von 21, 42, 60 und 100 Tagen verwendet. Die NMDAR-1 Untereinheit stellt für den Rezeptor die konstitutive Untereinheit dar, in Kombination mit NMDAR-2-Untereinheiten werden funktionsfähige Rezeptoren gebildet. Die Expression der NMDAR-1-Untereinheit ist auf RNA-sowie auch auf Proteinebene in den 60 Tage

alten GCDH-defizienten im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen vermindert. Die Ursache für die Erniedrigung der NMDAR-1-Expression in GCDH-defizienten Mäusen ist unklar. Es ist bekannt, daß die Menge an NMDAR-1-Protein sowohl durch Inhibition der NR1-mRNA-Translation als auch durch die Degradation von im ER retinierter NMDAR-1-Untereinheiten reguliert wird (Vazhappilly & Sucher 2004).

5.2 NMDA-Rezeptor-unabhängige Effekte

Ein Teil der Symptome von GA-1 Patienten, insbesondere der krisenhafte Untergang striataler Nervenzellen, könnte durch NMDA-Rezeptor-abhängige Mechanismen erklärt werden. Zusätzlich gibt es eine Reihe von Hinweisen für die Beteiligung NMDA-Rezeptor-unabhängiger Prozesse. Studien an primären Mausneuronen zeigten nur schwache Wirkungen von 3-OH-GA auf NMDA-Rezeptoren, die zudem nur bei sehr hohen 3-OH-GA-Konzentrationen von 3-10mM auftraten (Lund et al. 2004). Eine Reihe von Beobachtungen an Patienten sprechen für die Beteiligung nicht-neuronaler Veränderungen, die die Funktion intracerebraler Gefäße betreffen. So zeigen MR-tomographische Bilder von GA-1 Patienten während einer enzephalopathischen Krise Basalganglien-ödeme und bilaterale intrastriatale perivaskuläre Hyperintensitäten als Zeichen einer gestörten Endothelfunktion (Strauss et al. 2003). Bei ca. 80% der GA-1 Patienten lassen sich chronische subdurale Hämatome nachweisen (Strauss et al. 2003, Forstner et al 1999). Bei einem Teil der Patienten lassen sich MR-tomographisch Zeichen chronischer Extravasationen nachweisen (Strauss et al. 2003 und persönliche Mitteilung). Diese Befunde sprechen für das Vorliegen einer gestörten intracerebralen Gefäß- und Endothelfunktion. Da Endothelzellen keine NMDA-Rezeptoren besitzen, und außerdem die beobachteten Veränderungen außerhalb krisenhafter Verschlechterungen auch bei klinisch unauffälligen Patienten auftreten, muß es neben NMDA-Rezeptor-abhängigen auch –unabhängige Mechanismen geben.

5.3 Bedeutung von 3-OH-GA für endotheliale Funktionen

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen erstmals, daß der für die GA-1 spezifische Metabolit 3-OH-GA die strukturelle Integrität von Blutgefäßen durch Desorganisation von Endothelzellen beeinflusst. Diese Befunde könnten die bei GA-1 Patienten beobachteten Symptome wie chronische subdurale Hämatomate, Gefäßextravasationen und Netzhautblutungen erklären (Strauss et al. 2003, Hartley et al. 2001, Morris et al. 1999). Es konnte gezeigt werden, daß 3-OH-GA *in vitro* funktionelle Eigenschaften von HDMEC wie Migrationsverhalten und Morphogenese *in vitro*-gebildeter Kapillare in NMDA-Rezeptor-unabhängiger Weise beeinflusst, und daß 3-OH-GA *in vivo* zu abnormen Gefäßdilataationen und Haemorrhagien führt. Des Weiteren findet sich nach 3-OH-GA-Behandlung eine Auflösung des Aktin-Zytoskeletts sowie eine Reduzierung des Gehaltes von VE-cadherin sowohl in kultivierten HDMEC als auch in HDMEC in *in vitro* Kapillarformierungs-Experimenten.

Die Entwicklung, Formierung und der Umbau vaskulärer Systeme wird unter normalen wie auch unter pathologischen Bedingungen durch eine Vielzahl extrazellulärer Signale wie beispielsweise lösliche Wachstumsfaktoren, Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle und Zell-Matrix-Interaktionen reguliert (Folkmann et al. 2003, Carmeliet et al. 2002). Diese unterschiedlichen Signale müssen von Endothelzellen korrekt verarbeitet werden, um die ersten Schritte in der Morphogenese von Gefäßen, insbesondere die Formierung endothelialer Kapillaren, zu steuern. In dieser Arbeit wurde mit drei verschiedenen experimentellen Methoden der direkte Effekt von 3-OH-GA und die damit verbundenen Mechanismen in HDMEC untersucht. Mit Hilfe des ersten *in vitro* Modells konnte gezeigt werden, daß 3-OH-GA konzentrationsabhängig sowohl die basale als auch die VEGF-induzierte Migration der HDMEC reduziert. Diese Daten sprechen für einen direkten Effekt von 3-OH-GA auf humane primäre vaskuläre Endothelzellen, und deuten auf eine inhibitorische Wirkung von 3-OH-GA auf die Migration als einen der wichtigsten Schritte zur Initiierung der Angiogenese hin. Eine Erklärung der physiologischen Bedeutung bezüglich der Gefäßmorphologie kann hieraus jedoch nicht abgeleitet werden, weil die verwendete Methode lediglich die chemotaktische

Migration isolierter Zellen untersucht. Der zweite verwendete *in vitro* Assay belegt, daß 3-OH-GA die strukturelle Integrität von VEGF-induzierten Gefäßen stört. In Anbetracht der Tatsache, das es in Gegenwart von 3-OH-GA während der VEGF-induzierten Morphogenese von Kapillaren *in vitro* zu einer Ablösung und Mobilisation von Endothelzellen kommt, erscheint es paradox, daß 3-OH-GA auch die endotheliale Chemotaxis inhibiert. Die vorliegenden Daten zeigen jedoch, daß 3-OH-GA mit wenigstens zwei unterschiedlichen Eigenschaften von Endothelzellen interferiert, zum Einen hat 3-OH-GA Auswirkungen auf die Motilität von Endothelzellen, zum Anderen auf inter-endotheliale Zell-Zell-Kontakte, gezeigt anhand der erhöhten Degradation von VE-Cadherin. Da 3-OH-GA auch *in vivo* im CAM-Assay die Endothelintegrität sowohl von kleinen als auch großen Blutgefäßen beeinflusst, kann angenommen werden, daß 3-OH-GA grundlegende Auswirkungen auf die Morphogenese und Aufrechterhaltung der Endothelfunktion in diesen Gefäßen hat.

Mehrere Beobachtungen an ähnlichen pathophysiologischen Modellen stützen die These einer Beteiligung von Endothel-vermittelten Mechanismen. So wurde die Intoxikation mit 3-Nitropropionsäure (3-NPA) von einigen Autoren als Modell für die Gehirnschädigung bei GA-1 Patienten vorgeschlagen (Straus et al. 2003). Bei der Intoxikation mit 3-NPA wurde eine Dysfunktion der Blut-Hirn-Schranke mit anschließender Extravasation von großen Proteinen aus intracerebralen Blutgefäßen beschrieben (Nishino et al. 1997). Ein Verlust der Integrität der humanen cerebralen Endothelbarriere wurde auch bei der Glutamat-Toxizität beobachtet (Sharp et al. 2003).

5.3.1 Bedeutung von Adhäsionsmolekülen

Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle, die an der Ausbildung inter-endothelialer Kontakte beteiligt sind, spielen eine maßgebliche Rolle bei der Bildung und Aufrechterhaltung von Blutgefäßen. Ein solches Adhäsionsprotein ist das VE-Cadherin (Dejana et al. 1997). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß 3-OH-GA die Expression von VE-Cadherin sowohl in Kapillarformierungsexperimenten als auch in kultivierten HDMEC beeinflusst. VE-Cadherin ist das wichtigste Zell-Zell-Adhäsionsmolekül in der Zonula adherens (Breviario et al. 1995). Die cyto-

plasmatische Domäne enthält Bindungsstellen für Catenin p120 und β -Catenin (=Plakoglobulin). Somit besteht eine Verbindung zwischen VE-Cadherin und sowohl dem Aktin- als auch dem Vimentin-Zytoskelett (Nawroth et al. 2002, Angst et al. 2001, Kowalczyk et al., 1998). Der Verlust von VE-Cadherin und Plakoglobulin führt zu einer abnormen Zusammenballung von Endothelzellen innerhalb von Gefäßstrukturen während der Entwicklung und einer Auflösung interendothelialer Zellkontakte, so daß die Barrierefunktion der Endothelien gestört wird (Schnittler et al. 1997, Vittet et al. 1997). In Untersuchungen an murinen embryonalen Stammzellen, bei denen das VE-Cadherin durch Einfügen einer Null-Mutation in das VE-Cadherin-codierende Gen fehlt, konnte gezeigt werden, daß es in der frühen Vaskulogenese zu einer mangelnden Organisation von Gefäßvorläufern kommt (Vittet et al. 1997). Da bezüglich VE-Cadherin auf mRNA-Ebene in 3-OH-GA-behandelten HDMEC in dem von uns durchgeführten DNA-Mikro-Array kein Unterschied im Vergleich zu Kontrollen nachweisbar war, liegt es nahe, daß die Reduktion des VE-Cadherin-Proteins durch einen erhöhten Abbau zustande kommt. In humanen primären mikrovaskulären Endothelzellen konnte gezeigt werden, daß VE-Cadherin nach Ubiquitinylierung am Proteasomen abgebaut wird (Xiao et al. 2003). In nicht abgeschlossenen Versuchsreihen wurde untersucht, ob die 3-OH-GA-induzierte Reduktion im VE-Cadherin-Gehalt in HDMEC durch die gleichzeitige Anwesenheit von Proteasomeninhibitoren wie Laktazystin oder ALLN (N-Acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO), aufgehoben werden kann. Bei den verwendeten Konzentrationen an Proteasomeninhibitoren ließen sich keine Veränderungen im VE-Cadherin-Gehalt nachweisen.

DNA-Genarray-Analysen von 3-OH-GA-behandelten HDMEC zeigten jedoch, daß verschiedene andere Adhäsionsmoleküle wie E-Selektin, VCAM-1 und Protocadherin in ihrer mRNA Expression erniedrigt sind. Das lässt vermuten, daß auch die Expression dieser Adhäsionsmoleküle auf Proteinebene unter 3-OH-GA erniedrigt ist. Offensichtlich wird die Expression von Adhäsionsmolekülen in HDMEC auf transskriptionaler und posttranslationaler Ebene reguliert. Die Übertragbarkeit dieser Daten auf die *in vivo*-Wirkung von 3-OH-GA auf Gefäßdysfunktionen in GCDH-defizienten Mäusen bzw. GA-1 Patienten ist unklar. Es werden zwar auch im Stammhirn und Cortex von 60 Tage alten GCDH-defizienten Mäusen reduzierte VE-Cadherin-Spiegel gefunden, jedoch sind diese weder mit verminderten mRNA-Spiegeln anderer Adhäsionsproteine assoziiert noch

erscheint die Integrität cranieller Gefäße beeinflusst zu sein. Andererseits sind die chronisch erhöhten 3-OH-GA-Spiegel im Blut GCDH-defizienter Mäuse, die altersabhängige Vaskularisierungsaktivität in verschiedenen Hirnregionen und die regulatorischen Einflüsse veränderter Hormonsysteme (siehe DNA-Mikro-Array an Stammhirn 42 Tage alter Tiere) nicht direkt vergleichbar mit akuten Wirkungen von kurzzeitig erhöhter 3-OH-GA-Spiegel im Medium von kultivierten HDMEC. Um Effekte an endothelialen Zellen zu beobachten, waren höhere Konzentrationen an 3-OH-GA erforderlich als *in vivo* gemessen. So werden in Gehirnen verstorbener GA-1 Patienten, je nach Hirnareal und Alter der Patienten, 3-OH-GA-Konzentrationen zwischen 280-740 nmol/g Protein gemessen, entsprechend einer Gewebekonzentration von etwa 100 μM (Funk et al. 2005). In zirkulierendem Blut wurden Konzentrationen von GA und 3-OH-GA von 30 μM bzw. 50 μM gemessen (Goodmann et al. 2001). Kölker et al (2003) beschreibt zudem GA- und 3-OH-GA-Konzentrationen in Gehirnen verstorbener GA-1 Patienten im äquimolaren Verhältnis, während andere Veröffentlichungen von Patienten mit GA-Konzentrationen von mehr als 1 mM berichten (Goodmann et al. 2002, 2001). Es kann also angenommen werden, daß auch die Konzentrationen von 3-OH-GA in Hirngewebe von GA-1 Patienten um 1mM liegen könnten. Wie hoch die Konzentrationen von GA und 3-OH-GA während einer enzephalopathischen Krise in Patienten tatsächlich ansteigen können, ist spekulativ. Post mortem Untersuchungen an Patientengewebe, die frühestens 48h nach dem Tod vorgenommen werden können, müssen nicht mit den tatsächlichen Konzentrationen der Metaboliten in Geweben und Körperflüssigkeiten lebender Patienten übereinstimmen. In Gehirnen GCDH-defizienter Mäuse wurden 3-OH-GA-Konzentrationen von 0,1 mM und GA-Konzentrationen von bis zu 2mM gemessen (Sauer et al. 2004). Zusammenfassend kann jedoch keine genaue Aussage über die steady state Konzentrationen von GA und 3-OH-GA im Intra- und Extrazellularraum von Hirngewebe gemacht werden. Ebenso kann keine verlässliche Aussage über die Verteilung von GA und 3-OH-GA-Konzentrationen innerhalb der verschiedenen Hirnregionen gemacht werden. Die in dieser Arbeit beschriebenen Wirkungen auf Migration und Kapillarformierung an den Endothelzellen waren bei Konzentrationen von 2-6mM 3-OH-GA nachweisbar.

Zusammengefaßt zeigen die vorliegenden Daten, daß 3-OH-GA NMDA-Rezeptor-unabhängige Wirkungen auf vaskuläre Endothelzellen hat sowie die Expression

von VE-cadherin auf Proteinebene beeinflusst. Durch *in vitro* und *in vivo* Studien konnte nachgewiesen werden, daß 3-OH-GA Veränderungen sowohl an kleinen als auch großen Blutgefäßen zur Folge hat, und zwar durch Desintegration des Endothels, die besonders in Gegenwart von VEGF zu Haemorrhagien und Extravasationen führt. Diese Ergebnisse bieten zusätzliche Einblicke in die Pathophysiologie der GA-1. Dabei zeigt 3-OH-GA einen zweifachen Effekt sowohl auf Neurone als auch auf die Gefäßintegrität. Das Fehlen sowohl komplexer Zellinteraktionen als auch von Aspekten der dynamischen Entwicklung des Gefäßsystems in den hier verwendeten experimentellen Modellen erlaubt nur Spekulationen über die selektive Schädigung am striatalen Gefäßsystem in GA-1 Patienten. Die Empfindlichkeit speziell dieser Gefäße gegenüber 3-OH-GA könnte mit entwicklungspezifischen Gegebenheiten korrelieren, und auch von anderen hirnspezifischen Besonderheiten, wie beispielsweise zellabhängigen Faktoren, Bestandteilen der extrazellulären Matrix oder aber anderen Proteinen, die an der Modulation interzellulärer Kontakte beteiligt sind, abhängen. Die Entwicklung humaner striataler Gefäße unterscheidet sich maßgeblich von der Entwicklung der Gefäße aller übrigen Hirnareale (Kuban & Giles 1985). Dies könnte die arealspezifische Empfindlichkeit gegenüber 3-OH-GA bei GA-1 Patienten erklären. Aufgrund dieser Besonderheiten in der Entwicklung und damit den Eigenschaften des Gefäßbettes des Striatums könnte 3-OH-GA zu einer arealspezifischen Veränderung sowohl der hämodynamischen Eigenschaften als auch der intrastriatalen Konzentration von 3-OH-GA führen, und somit die lokale Empfänglichkeit für Läsionen weiter steigern. Wie die Synaptogenese oder die Myelinisierung ist auch die cerebrale Angiogenese ein dynamischer Prozess, der vor allem innerhalb der ersten beiden Lebensjahre starken entwicklungspezifischen Veränderungen unterworfen ist. Dieses Lebensalter wiederum fällt mit dem Zeitfenster für die Ausbildung encephalopathischer Krisen bei GA1-Patienten zusammen. Eine gestörte Gefäßbiologie innerhalb dieser Phase könnte einige charakteristische Symptome der GA-1 erklären, wie beispielsweise den neonatalen Hydrozephalus, subdurale und retinale Blutungen, strukturelle Veränderungen an der Wand intracerebraler Gefäße und dem perivaskulären Gefäßbett, sowie die als metabolischer Schlaganfall imponierende Striatum-Nekrose.

5.4 Rezeptor-vermittelte Endozytose

Untersuchungen des vaskulären Systems haben Aufschluß über Veränderungen bezüglich der Zellintegrität und Morphogenese von Endothelzellen gegeben. Ein dabei auffällig verändertes Protein war das VE-Cadherin. Dieses Protein steht über α - und β -Catenin mit dem Aktinzytoskelett in Verbindung und dient zur Stabilisierung des Endothels und der Integrität von Endothel-Barrieren. Da in vorhergehenden Untersuchungen eine Reduktion der Proteinmenge von VE-Cadherin in 3-OH-GA-exponierten Endothelzellen beobachtet wurde, wurde vermutet, daß auch das Aktinzytoskelett beeinflusst sein könnte. Um diese strukturellen und funktionellen Verbindungen zwischen VE-Cadherin und dem Aktinzytoskelett zu überprüfen, wurde die Rezeptor-vermittelte Endozytose von Liganden als Maß für die Beeinträchtigung des Aktinzytoskelett unter Wirkung von 3-OH-GA gemessen. Es wurden zwei verschiedene Rezeptorsysteme in die Untersuchungen eingeschlossen, der 300kDa-Mannose-6-Phosphat (MPR)-Rezeptor (MPR 300) und der Transferrin-Rezeptor, die ihre Liganden, M6P-haltige Glykoproteine bzw. Fe^{3+} -beladenes Transferrin, zum Lysosom bzw. Endosom transportieren. Für beide Rezeptorsysteme wurde eine Abhängigkeit der Ligandendozytose von einem intakten Aktinzytoskelett nachgewiesen (K. Fritsch, Dissertation, Universität Hamburg 2002, Lamaze et al. 1997). Wenn sich also die verminderte Expression von VE-Cadherin unter 3-OH-GA auf die Intaktheit des Catenin-verknüpften Aktinzytoskelett auswirken würde, sollte 3-OH-GA die Endozytose von MPR 300- bzw. Transferrinrezeptor-Liganden vermindern. Für beide Rezeptoren wurde jedoch die Endozytose von [^{125}I]-markierten Liganden durch 3-OH-GA konzentrations- und zeitabhängig erhöht. Die 3-OH-GA-induzierte Stimulation der Rezeptor-vermittelten Endozytose von Liganden tritt bereits bei klinisch relevanten 3-OH-GA-Konzentrationen von 100 μM auf, ohne daß die Zellen für 24h vorbehandelt werden mussten. Die vorliegenden Daten lassen vermuten, daß 3-OH-GA sowohl eine Erhöhung der Zahl der Rezeptoren (MPR 300) an der Zelloberfläche, als auch eine Retention von Liganden ([^{125}I]-Transferrin) in intrazellulären Kompartimenten, aus dem die Rezyklisierung zur Plasmamembran nicht mehr erfolgen kann, bewirkt. In welchen subzellulären Strukturen Transferrin unter dem Einfluß von 3-OH-GA akkumuliert, und die Mechanismen, die zur MPR 300-Umverteilung an der Zelloberfläche führen,

müssen noch untersucht werden. Eine Umverteilung von MPR 300 an intrazellulären Membranen zur Zelloberfläche konnte in AP-1-defizienten Mausfibroblasten, aber auch induziert durch verschiedene Wachstumsfaktoren wie IGF-II, EGF oder durch Proteinkinase A-Aktivatoren, beobachtet werden (Meyer et al. 2000, Braulke et al. 1989, Braulke et al. 1990). In den hier untersuchten HeLa-Zellen war keine 3-OH-GA-abhängige Veränderung im AP-1 Gehalt nachweisbar. Diese Untersuchungen müssen an HDMEC wiederholt werden.

Die kurze Wirkdauer von 3-OH-GA, nach der bereits eine erhöhte Rezeptor-abhängige Liganden-Endozytose beobachtet werden konnte, läßt die Wechselwirkung mit 3-OH-GA-sensitiven Rezeptorsystemen vermuten. Die Natur dieser Rezeptoren und der ausgelöste Signaltransduktionsweg, der zur Umverteilung von Proteinen an die Plasmamembran führt, wird Gegenstand weiter führender Untersuchungen sein.

Die Daten zeigen außerdem, daß selbst bei Erniedrigung des VE-Cadherin-Gehalts in 3-OH-GA-behandelten Zellen die mögliche sekundäre Beeinträchtigung der Aktinzytoskelettverankerung in der Zonula adherens den Transport von Rezeptor zur Plasmamembran und die Aufnahme von extrazellulären Liganden über die Clathrin-abhängige Rezeptor-vermittelte Endozytose nicht negativ beeinflusst.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Bei Patienten mit Glutarazidurie Typ 1 kommt es im Rahmen von enzephalopatischen Krisen zum Untergang von Basalganglien-Neuronen mit einer konsekutiven irreversiblen Bewegungsstörung. Die NMDA-Rezeptor-vermittelte Exzitotoxizität wurde als ein daran beteiligter Pathomechanismus identifiziert. Neben diesen akuten krisenhaften Veränderungen liegen bei GA-1 Patienten auch Symptome einer gestörten intracerebralen Gefäßfunktion vor, und zwar sowohl subdurale Hämatome als auch Zeichen chronischer Extravasationen aus intracerebralen Gefäßen. In der vorliegenden Arbeit wurden daher die Effekte des für die GA-1 spezifischen Metaboliten 3-OH-GA auf morphologische und funktionelle Eigenschaften von Endothelzellen untersucht. 3-OH-GA inhibiert sowohl die basale als auch die chemotaktische VEGF-induzierte Migration von HDMEC. Desweiteren konnte gezeigt werden, daß 3-OH-GA die Morphologie von HDMEC in *in vitro* durch VEGF-Stimulation gebildeten Kapillaren verändert und zu einer Desintegration der Endothelzellen und Auflösung der Endothelintegrität führt. Diese Effekte sind unabhängig von NMDA-Rezeptoren und können mit einer immunhistochemisch und im Westernblot gemessenen Verminderung der Proteinmenge des Adhäsionsproteins VE-Cadherin korreliert werden. Im CAM-Assay als *in vivo*-Modell wurde gezeigt, daß es in Gegenwart von 3-OH-GA zu einer abnormen Dilatation von Gefäßen mit Extravasationen und Haemorrhagien kommt. Untersuchungen mit radioaktiv markierten Liganden an HDMEC und PBMEC ergaben, daß es in Gegenwart von 3-OH-GA durch Erhöhung der Anzahl membranständiger Rezeptoren und Retention von Rezeptorliganden in intrazellulären Kompartimenten zu einer Erhöhung der Aufnahme von rezeptorgebundenen Liganden in die Zelle kommt.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen erstmals, daß 3-OH-GA direkte Effekte auf Endothelzellen und die vaskuläre Integrität hat. Die Ergebnisse lassen primäre vaskulopathische Wirkungen von 3-OH-GA vermuten und stellen einen neuen Ansatz für ein pathophysiologisches Modell der GA-1 dar.

7 LITERATUR

- Amir, N., O. el-Peleg, R. S. Shalev and E. Christensen. (1987). "Glutaric aciduria type I: clinical heterogeneity and neuroradiologic features." *Neurology* 37, 1654-7.
- Angst, B. D., C. Marcozzi and A. I. Magee. (2001). "The cadherin superfamily." *J Cell Sci* 114, 625-6.
- Anson, L. C., Chen, P. E., Wyllie, D. J., Colquhoun, D., and Schoepfer, R. (1998). "Identification of amino acid residues of the NR2A subunit that control glutamate potency in recombinant NR1/NR2A NMDA receptors." *J Neurosci* 18(2), 581-9.
- Bettler, B. and C. Mülle. (1995). "Review: neurotransmitter receptors. II. AMPA and kainate receptors." *Neuropharmacology* 34, 123-39.
- Bjugstad, K. B., S. I. Goodman and C. R. Freed. (2000). "Age at symptom onset predicts severity of motor impairment and clinical outcome of glutaric acidemia type 1." *J Pediatr* 137, 681-6.
- Bowie, D., and Smart, T. G. (1994). "Species-dependent functional properties of non-NMDA receptors expressed in *Xenopus laevis* oocytes injected with mammalian and avian brain mRNA." *Br J Pharmacol* 111(3), 803-10.
- Braulke, T., Tippmer, S., Neher, E., and von Figura, K. (1989). "Regulation of the mannose 6-phosphate/IGF II receptor expression at the cell surface by mannose 6-phosphate, insulin like growth factors and epidermal growth factor." *EMBO J* 8(3), 681-6.
- Braulke, T., Tippmer, S., Chao, H. J., and von Figura, K. (1990). "Insulin-like growth factors I and II stimulate endocytosis but do not affect sorting of lysosomal enzymes in human fibroblasts." *J Biol Chem* 265(12), 6650-5.
- Breviario, F., L. Caveda, M. Corada, I. Martin-Padura, P. Navarro, J. Golay, M. Introna, D. Gulino, M. G. Lampugnani and E. Dejana. (1995). "Functional properties of human vascular endothelial cadherin (7B4/cadherin-5), an endothelium-specific cadherin." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15, 1229-39.
- Brismar, J. and P. T. Ozand. (1995). "CT and MR of the brain in glutaric acidemia type I: a review of 59 published cases and a report of 5 new patients." *AJNR Am J Neuroradiol* 16, 675-83.

- Buller, A. L., H. C. Larson, B. E. Schneider, J. A. Beaton, R. A. Morrisett and D. T. Monaghan. (1994). "The molecular basis of NMDA receptor subtypes: native receptor diversity is predicted by subunit composition." *J Neurosci* 14, 5471-84.
- Burnashev, N., Z. Zhou, E. Neher and B. Sakmann. (1995). "Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and kainate receptor subtypes." *J Physiol* 485 (Pt 2), 403-18.
- Busquets, C., M. J. Coll, B. Merinero, M. Ugarte, M. A. Ruiz, A. Martinez Bermejo and A. Ribes. 2000. "Prenatal molecular diagnosis of glutaric aciduria type I by direct mutation analysis." *Prenat Diagn* 20, 761-4.
- Carmeliet, P. and E. Storkebaum. (2002). "Vascular and neuronal effects of VEGF in the nervous system: implications for neurological disorders." *Semin Cell Dev Biol* 13, 39-53.
- Carmeliet, P., and Collen, D. (2000). "Molecular basis of angiogenesis. Role of VEGF and VE-cadherin." *Ann N Y Acad Sci* 902, 249-62; discussion 262-4.
- Carmeliet, P., and Collen, D. (1998). "Vascular development and disorders: molecular analysis and pathogenic insights." *Kidney Int* 53(6), 1519-49.
- Carter, A. J., and Muller, R. E. (1991). "Activation of excitatory amino acid receptors cannot alone account for anoxia-induced impairment of protein synthesis in rat hippocampal slices." *J Neurochem* 57(3), 888-96.
- Choi, D. W. (1988). "Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system." *Neuron* 1, 623-34.
- Clauss, M., (1998), "Functions of the VEGF receptor-1 (FLT-1) in the vasculature" *Trends Cardiovas Med.* 8, 241-245.
- Das, A.M., Lücke, T. and Ullrich, K. (2003) „ Glutaric aciduria I: creatine supplementation restores creatinephosphate levels in mixed cortex cells from rat incubated with 3-hydroxyglutarate" *Mol Genet Metab* 78, (108-111)
- de Mello, C. F., S. Kolker, B. Ahlemeyer, F. R. de Souza, M. R. Figuera, E. Mayatepek, J. Krieglstein, G. F. Hoffmann and M. Wajner. (2001). "Intrastriatal administration of 3-hydroxyglutaric acid induces convulsions and striatal lesions in rats." *Brain Res* 916, 70-5.
- Dejana, E. (1997). "Endothelial adherens junctions: implications in the control of vascular permeability and angiogenesis." *J Clin Invest* 100, S7-10.

- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., and Traynelis, S. F. (1999). "The glutamate receptor ion channels." *Pharmacol Rev* 51(1), 7-61.
- Enomoto, H., Inoki, I., Komiya, K., Shiomi, T., Ikeda, E., Obata, K., Matsumoto, H., Toyama, Y., and Okada, Y. (2003). "Vascular endothelial growth factor isoforms and their receptors are expressed in human osteoarthritic cartilage." *Am J Pathol* 162(1), 171-81.
- Ergun, S., N. Kilik, G. Ziegeler, A. Hansen, P. Nollau, J. Gotze, J. H. Wurmbach, A. Horst, J. Weil, M. Fernando and C. Wagener. (2000). "CEA-related cell adhesion molecule 1: a potent angiogenic factor and a major effector of vascular endothelial growth factor." *Mol Cell* 5, 311-20.
- Ferrara, N., Gerber, H.P., Le Couter, J., (2003), "The biology of VEGF and its receptors", *Nat Med* 9, 669-676
- Folkman, J. (2003). "Fundamental concepts of the angiogenic process." *Curr Mol Med* 3:643-51.
- Forstner, R., G. F. Hoffmann, I. Gassner, P. Heideman, J. B. De Klerk, B. Lawrenz-Wolf, E. Doring, P. Weiss-Wichert, J. Troger, J. P. Colombo and E. Plochl. (1999). "Glutaric aciduria type I: ultrasonographic demonstration of early signs." *Pediatr Radiol* 29, 138-43.
- Freudenberg, F., Lukacs, Z., and Ullrich, K. (2004). "3-Hydroxyglutaric acid fails to affect the viability of primary neuronal rat cells." *Neurobiol Dis* 16(3), 581-4.
- Fritsch K. (2002) „Wechselwirkungen von Proteinen mit der cytoplasmatischen Domäne des 46 kDa Mannose-6-Phosphat-Rezeptors bei *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1796)“ *Dissertation*, Universität-Hamburg (UKE)
- Funk, C. B., Prasad, A. N., Frosk, P., Sauer, S., Kolker, S., Greenberg, C. R., and Del Bigio, M. R. (2005). "Neuropathological, biochemical and molecular findings in a glutaric acidemia type 1 cohort." *Brain* 128(Pt 4), 711-22.
- Goodman, S. I., M. D. Norenberg, R. H. Shikes, D. J. Breslich and P. G. Moe. (1977). "Glutaric aciduria: biochemical and morphologic considerations." *J Pediatr* 90,746-50.
- 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." *Hum Mutat* 12(3), 141-4.

- Goodman, S.I., Frerman F.E., (2001) " Organic acidemias due to defects in lysine oxidation: 2-ketoadipic acidemia and glutaric acidemia. *The Metabolic and Molecular bases of Inh Disease* McGraw-hill Inc., New York, USA,pp2195-2204
- Goodman, S. I., Binard, R. J., Woontner, M. R., and Frerman, F. E. (2002). "Glutaric acidemia type II: gene structure and mutations of the electron transfer flavoprotein:ubiquinone oxidoreductase (ETF:QO) gene." *Mol Genet Metab*, 77(1-2), 86-90
- Greenberg, C. R., A. M. Duncan, C. A. Gregory, R. Singal and S. I. Goodman. (1994). "Assignment of human glutaryl-CoA dehydrogenase gene (GCDH) to the short arm of chromosome 19 (19p13.2) by in situ hybridization and somatic cell hybrid analysis." *Genomics* 21, 289-90.
- Hartley, L. M., B. Mrcp, O. S. Khwaja, C. M. Verity and B. Frpcch. (2001). "Glutaric aciduria type 1 and nonaccidental head injury." *Pediatrics* 107, 174-5.
- Hoffmann, G. F., K. M. Gibson, F. K. Trefz, W. L. Nyhan, H. J. Bremer and D. Rating. (1994). "Neurological manifestations of organic acid disorders." *Eur J Pediatr* 153, S94-100.
- Hoffmann, G. F., S. Athanassopoulos, A. B. Burlina, M. Duran, J. B. de Klerk, W. Lehnert, J. V. Leonard, A. A. Monavari, E. Muller, A. C. Muntau, E. R. Naughten, B. Plecko-Starting, A. Superti-Furga, J. Zschocke and E. Christensen. (1996). "Clinical course, early diagnosis, treatment, and prevention of disease in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency." *Neuropediatrics* 27, 115-23.
- Hollmann, M., and Heinemann, S. (1994). "Cloned glutamate receptors." *Annu Rev Neurosci*, 17, 31-108.
- Kalka, C., Masuda, H., Takahashi, T., Gordon, R., Tepper, O., Gravereaux, E., Pieczek, A., Iwaguro, H., Hayashi, S. I., Isner, J. M., and Asahara, T. (2000). "Vascular endothelial growth factor(165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects." *Circ Res*, 86(12), 1198-202.
- Kemp, A. M. (2002). "Investigating subdural haemorrhage in infants." *Arch Dis Child* 86, 98-102.

- Koeller, D. M., M. Woontner, L. S. Crnic, B. Kleinschmidt-DeMasters, J. Stephens, E. L. Hunt and S. I. Goodman. (2002). "Biochemical, pathologic and behavioral analysis of a mouse model of glutaric acidemia type I." *Hum Mol Genet* 11, 347-57.
- Kolker, S., Ahlemeyer, J. Krieglstein and G. F. Hoffmann. (1999) "3-Hydroxyglutaric and glutaric acids are neurotoxic through NMDA receptors *in vitro*" *J Inherit Metab Dis* 22, 259-262.
- Kolker S., Ahlemeyer, J. Krieglstein and G. F. Hoffmann. (2000a). „ Maturation-dependent neurotoxicity of 3-hydroxyglutaric and glutaric acids *in vitro*: a new pathophysiological approach to glutaryl-CoA-dehydrogenase deficiency". *Pediatr Res* 47, 495-503
- Kolker S., Ahlemeyer, J. Krieglstein and G. F. Hoffmann. (2000b) "Cerebral organic acid disorders induce neuronal damage via excitotoxic organic acids *in vitro*". *Amino Acids* 18, 31-40
- Kolker, S., B. Ahlemeyer, J. Krieglstein and G. F. Hoffmann. (2000c). "Evaluation of trigger factors of acute encephalopathy in glutaric aciduria type I: fever and tumour necrosis factor-alpha." *J Inherit Metab Dis* 23:359-62.
- Kolker, S., B. Ahlemeyer, J. Krieglstein and G. F. Hoffmann. (2001a). "Contribution of reactive oxygen species to 3-hydroxyglutarate neurotoxicity in primary neuronal cultures from chick embryo telencephalons." *Pediatr Res* 50, 76-82.
- Kolker, S., B. Ahlemeyer, R. Huhne, E. Mayatepek, J. Krieglstein and G. F. Hoffmann. (2001b). "Potentiation of 3-hydroxyglutarate neurotoxicity following induction of astrocytic iNOS in neonatal rat hippocampal cultures." *Eur J Neurosci* 13, 2115-22.
- Kolker, S., D. M. Koeller, S. Sauer, F. Horster, M. A. Schwab, G. F. Hoffmann, K. Ullrich and J. G. Okun. (2004a). "Excitotoxicity and bioenergetics in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency." *J Inherit Metab Dis* 27, 805-12.
- Kolker, S., D. M. Koeller, J. G. Okun and G. F. Hoffmann. (2004b) "Pathomechanisms of neurodegeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency." *Ann Neurol* 55, 7-12.

- Kowalczyk, A. P., Navarro, P., Dejana, E., Bornslaeger, E. A., Green, K. J., Kopp, D. S., and Borgwardt, J. E. (1998). "VE-cadherin and desmoplakin are assembled into dermal microvascular endothelial intercellular junctions: a pivotal role for plakoglobin in the recruitment of desmoplakin to intercellular junctions." *J Cell Sci* 111 (Pt 20), 3045-57
- Kuban, K.C.K. and Gilles F.H., (1985), "Human telencephalic angiogenesis", *Ann Neurol* 17, 539-548
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227, 680-5.
- Lamaze, C., Fujimoto, L. M., Yin, H. L., and Schmid, S. L. (1997). "The actin cytoskeleton is required for receptor-mediated endocytosis in mammalian cells." *J Biol Chem* 272(33) 20332-5.
- Laube, B., Hirai, H., Sturgess, M., Betz, H., and Kuhse, J. (1997). "Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit." *Neuron* 18(3), 493-503.
- Lieberman, D. N., and Mody, I. (1994). "Regulation of NMDA channel function by endogenous Ca(2+)-dependent phosphatase." *Nature*, 369(6477), 235-9.
- Liesert, M., J. Zschocke, G. F. Hoffmann, N. Muhlhauser and W. Buckel. (1999). "Biochemistry of glutaric aciduria type I: activities of *in vitro* expressed wild-type and mutant cDNA encoding human glutaryl-CoA dehydrogenase." *J Inherit Metab Dis* 22, 256-8.
- Lipton, S. A. and P. A. Rosenberg. (1994). "Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders." *N Engl J Med* 330, 613-22.
- 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), 143-7.
- Meguro, H., H. Mori, K. Araki, E. Kushiya, T. Kutsuwada, M. Yamazaki, T. Kumanishi, M. Arakawa, K. Sakimura and M. Mishina. (1992). "Functional characterization of a heteromeric NMDA receptor channel expressed from cloned cDNAs." *Nature* 357, 70-4.
- Meyer, C., Zizioli, D., Lausmann, S., Eskelinen, E. L., Hamann, J., Saftig, P., von Figura, K., and Schu, P. (2000). "mu1A-adaptin-deficient mice: lethality, loss of AP-1 binding and rerouting of mannose 6-phosphate receptors." *Embo J* 19(10), 2193-203.

- Monyer, H., N. Burnashev, D. J. Laurie, B. Sakmann and P. H. Seeburg. (1994). "Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors." *Neuron* 12, 529-40.
- Morris, A. A., G. F. Hoffmann, E. R. Naughten, A. A. Monavari, J. E. Collins and J. V. Leonard. (1999). "Glutaric aciduria and suspected child abuse." *Arch Dis Child* 80, 404-5.
- Morton, W. M., Ayscough, K. R., and McLaughlin, P. J. (2000). "Latrunculin alters the actin-monomer subunit interface to prevent polymerization." *Nat Cell Biol* 2(6), 376-8.
- Nakanishi, N., R. Axel and N. A. Shneider. (1992 a). "Alternative splicing generates functionally distinct N-methyl-D-aspartate receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 8552-6.
- Nakanishi, S. (1992 b). "Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function." *Science* 258:597-603.
- Nawroth, R., G. Poell, A. Ranft, S. Kloep, U. Samulowitz, G. Fachinger, M. Golding, D. T. Shima, U. Deutsch and D. Vestweber. (2002) "VE-PTP and VE-cadherin ectodomains interact to facilitate regulation of phosphorylation and cell contacts." *EMBO J* 21, 4885-95.
- Nishino, H., Kumazaki, M., Fukuda, A., Fujimoto, I., Shimano, Y., Hida, H., Sakurai, T., Deshpande, S. B., Shimizu, H., Morikawa, S., and Inubushi, T. (1997). "Acute 3-nitropropionic acid intoxication induces striatal astrocytic cell death and dysfunction of the blood-brain barrier: involvement of dopamine toxicity." *Neurosci Res* 27(4), 343-55.
- Parker KC, Strominger JL. (1983). "Localization of the sites of iodination of human beta 2-microglobulin: quaternary structure implications for histocompatibility antigens". *Biochemistry* 22(5),1145-1153.
- Pavon, N., Vidal, L., Blanco, L., Alvarez-Fonseca, P., Torres-Montoya, A., Lorigados, L., Alvarez-Gonzalez, L., and Macias, R. (1998). "Factors that lead to death of neurons in neurodegenerative diseases." *Rev Neurol* 26(152), 554-60.
- Roschinger, W., A. C. Muntau, M. Duran, L. Dorland, I. Jlst L, R. J. Wanders and A. A. Roscher. (2000) "Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency: metabolic consequences of an impaired mitochondrial carnitine cycle." *Clin Chim Acta* 298:55-68.

- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* 239, 487-91.
- Sauer, S., Okum, J.G., Feyh, P., Goodman, S.I., Crnic, L.S., Hoffman, G.F., Koeller, D.M., Kölker, S., (2004) "The brain is different-tissue-specific distribution of 3-hydroxyglutaric and glutaric acids in GCDH^{-/-} mice (abstract)", *J Inherit Metab Dis* (27) Suppl. 1, 74
- Schneggenburger, R., F. Tempia and A. Konnerth. (1993). "Glutamate- and AMPA-mediated calcium influx through glutamate receptor channels in medial septal neurons." *Neuropharmacology* 32, 1221-8.
- Schnittler, H. J., Puschel, B., and Drenckhahn, D. (1997). "Role of cadherins and plakoglobin in interendothelial adhesion under resting conditions and shear stress." *Am J Physiol* 273(5 Pt 2), H2396-405.
- Sharp, C. D., Hines, I., Houghton, J., Warren, A., Jackson, T. H. t., Jawahar, A., Nanda, A., Elrod, J. W., Long, A., Chi, A., Minagar, A., and Alexander, J. S. (2003). "Glutamate causes a loss in human cerebral endothelial barrier integrity through activation of NMDA receptor." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285(6), H2592-8.
- Shihab, F. S., Bennett, W. M., Isaac, J., Yi, H., and Andoh, T. F. (2002). "Angiotensin II regulation of vascular endothelial growth factor and receptors Flt-1 and KDR/FIk-1 in cyclosporine nephrotoxicity." *Kidney Int* 62(2), 422-33.
- Sommer, B. and P. H. Seeburg. (1992). "Glutamate receptor channels: novel properties and new clones." *Trends Pharmacol Sci* 13, 291-6.
- Strauss, K. A., E. G. Puffenberger, D. L. Robinson and D. H. Morton. (2003a). "Type I glutaric aciduria, part 1: natural history of 77 patients." *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 121, 38-52.
- Strauss, K.,A. and Morton, D.H. (2003b) "Type I glutaric aciduria, part 2: a model of acute striatal necrosis" *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 121, 53-70.
- Sullivan, J. M., Traynelis, S. F., Chen, H. S., Escobar, W., Heinemann, S. F., and Lipton, S. A. (1994). "Identification of two cysteine residues that are required for redox modulation of the NMDA subtype of glutamate receptor." *Neuron* 13(4), 929-36.

- Tang, C. M., Dichter, M., and Morad, M. (1990). "Modulation of the N-methyl-D-aspartate channel by extracellular H⁺." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(16), 6445-9.
- Teifel, M. and Freidl, P. (1996). „ Establishment of the permanent microvascular endothelial cell line PBMEC/C1-2 from porcine brains” *Exp Cell Res* (228), 50-57
- Traynelis, S. F., Burgess, M. F., Zheng, F., Lyuboslavsky, P., and Powers, J. L. (1998). "Control of voltage-independent zinc inhibition of NMDA receptors by the NR1 subunit." *J Neurosci* 18(16), 6163-75.
- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4.
- Trombley, P. Q., and Shepherd, G. M. (1996). "Differential modulation by zinc and copper of amino acid receptors from rat olfactory bulb neurons." *J Neurophysiol* 76(4), 2536-46.
- 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.
- Vazhappilly, R., and Sucher, N. J. (2004). "Translational regulation of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1." *Neurosignals* 13(4), 190-3.
- Vittet, D., Buchou, T., Schweitzer, A., Dejana, E., and Huber, P. (1997). "Targeted null-mutation in the vascular endothelial-cadherin gene impairs the organization of vascular-like structures in embryoid bodies." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(12), 6273-8.
- Wenzel, A., Fritschy, J. M., Mohler, H., and Benke, D. (1997). "NMDA receptor heterogeneity during postnatal development of the rat brain: differential expression of the NR2A, NR2B, and NR2C subunit proteins." *J Neurochem* 68(2), 469-78.
- Westover, J. B., S. I. Goodman and F. E. Frerman. (2001). "Binding, hydration, and decarboxylation of the reaction intermediate glutaconyl-coenzyme A by human glutaryl-CoA dehydrogenase." *Biochemistry* 40, 14106-14.

- Xiao, K., Allison, D. F., Kottke, M. D., Summers, S., Sorescu, G. P., Faundez, V., and Kowalczyk, A. P. (2003). "Mechanisms of VE-cadherin processing and degradation in microvascular endothelial cells." *J Biol Chem* 278(21), 19199-208.
- Yarmola, E. G., Somasundaram, T., Boring, T. A., Spector, I., and Bubb, M. R. (2000). "Actin-latrunculin A structure and function. Differential modulation of actin-binding protein function by latrunculin A." *J Biol Chem* 275(36), 28120-7.
- Zhang, L., Hsu, J. C., Takagi, N., Gurd, J. W., Wallace, M. C., and Eubanks, J. H. (1997). "Transient global ischemia alters NMDA receptor expression in rat hippocampus: correlation with decreased immunoreactive protein levels of the NR2A/2B subunits, and an altered NMDA receptor functionality." *J Neurochem* 69(5), 1983-94.
- Zschocke, J., E. Quak, P. Guldberg and G. F. Hoffmann. (2000). "Mutation analysis in glutaric aciduria type I." *J Med Genet* 37, 177

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A. bidest	doppelt destilliertes Wasser
ALLN	N- <u>A</u> cetyl-Leu- <u>L</u> eu- <u>N</u> le-CHO (Calpain-Inhibitor)
AP	Adaptorproteine
APS	Ammoniumperoxidisulfat
AS	Aminosäure
ASA	Arylsulfatase A
bp	Basenpaare
BSA	Rinder-Serumalbumin
cDNA	Copy-DNA (zur mRNA komplementäre DNA)
DMEM	<u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal-growth-factor
FKS	Fötales Kälberserum
GA	Glutarsäure
GA-1	Glutarazidurie Typ1
GCDH	<u>G</u> lutaryl- <u>C</u> oA- <u>D</u> ehydrogenase
HDMEC	<u>H</u> umane <u>d</u> ermal <u>m</u> icrovascular <u>e</u> ndothelial <u>c</u> ells
HeLa	humane Tumorzelllinie
HEPES	N-[<u>H</u> ydroxy <u>e</u> thyl]- <u>p</u> iperazin-N`-[2- <u>e</u> thansulfonsäure]
HRP	<u>h</u> orse <u>r</u> adish <u>p</u> eroxidase
IGF	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor
kb	kilo Basen
kDa	kilo Dalton
M6P	Mannose-6-Phosphat
M6PR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
mRNA	messenger RNA

Abkürzungsverzeichnis

NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
3-OHGA	3-Hydroxyglutarsäure
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMEC	porcine <u>m</u> icrovascular <u>e</u> ndothelial <u>c</u> ells
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	para-Formaldehyd
rpm	rounds per minute
Rt	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE-Puffer	<u>T</u> ris- <u>A</u> cetate- <u>E</u> DTA-Puffer
TGN	<u>T</u> rans <u>G</u> olgi <u>N</u> etzwerk
Tf	Transferrin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TX-100	Triton X-100
UE	Untereinheit
WT	Wildtyp
VEGF	<u>V</u> ascular <u>e</u> ndothelial <u>g</u> rowth <u>f</u> actor

Bei einigen Begriffen, wie z.B. Blot, well und wash, wurden die englischen Fachtermini verwendet, da in der deutschsprachigen Fachliteratur eine Übersetzung unüblich ist.

9 ANHANG

9.1 Primer

h β -Aktinfor	5'GCGGGAAATCGTGCGTGACATT'3
h β -Aktinrev	5'GATGGAGTTGAAGGTAGTTTCGTG'3
mGAPDHfor	5'TCATCAACGGGAAGCCCATCACCATCTTC'3
mGAPDHrev	5'GTCTTCTGGTTGGCAGTAATGGCATGGAC'3
mNMDAR1for	5'CCAACATCTGGAAGACAGGAC'3
mNMDAR1rev	5'ATGAGCAGGTCTATGCAGAAG'3
mNMDAR2Afor	5'CCGGGAGGGATGAAGGCTGTAAACTG'3
mNMDAR2Arev	5'CAACTGTAGATGCCCTGCTGATGGAG '3
mNMDAR2Bfor	5'TGGCCTGCCCTCCTCCAAACAC'3
mNMDAR2Brev	5'GCCGCCTCCACTGACCGAATC'3
hE-Selektinfor	5'AAAATGTCAAGCCTGGCAGTTCC '3
hE-Selektinrev	5'GTGGTGATGGGTGTTGCGGTTTCA'3
hVCAM-1for	5'TGGCCTCGTGAATGGGAGC'3
hVCAM-1rev	5'CCGCATCCTTCAACTGGGC'3
GA-1-KFfor	5'TTAGGCCTAGTGTGCTGGTCCCGGA'3
GA-1-KRrev	5'TCTGGTGCCGGAAACCAGGCAAAGC'3
GA-1-F13for	5'CTTCCGTA ACTACTGGCAGGAGCGG'3
GA-1-R21rev	5'AGCTCTCGGGTCAGAAGCCCATAGG-3

Anhang

PCR-Bedingungen:

Primer	Denaturierung		Annealing		Extension		Zyklen
	Zeit (s)	°C	Zeit (s)	°C	Zeit (s)	°C	
hß-Aktinfor/ rev	60	95	60	55	60	72	30
mGAPDHfor/ rev	60	95	60	61	60	72	30
mNMDAR1 for/rev	60	95	60	54	60	72	30
mNMDAR2A for/ rev	60	96	60	61	60	72	32
mNMDAR2B for/ rev	60	96	60	61	60	72	32
GA-1Kfor/ rev	15	94	60	63	60	72	35
GA-1F13/R21 for/ rev	15	94	60	63	60	72	35
hE-Selektin for/rev	60	94	60	63	60	72	40
hVCAM-1 for/rev	60	94	60	61	60	72	40

9.2 Bereits vorgestellte Ergebnisse

Manuskript:

Mühlhausen C, Ott N, Chalajour F, Tilki D, Freudenberg F, Shahhossini M, Thiem J, Ullrich K, Braulke T, Ergün S (2005). "Endothelial effects of 3-hydroxyglutaric acid: implications for glutaric aciduria type 1." *Pediatr Res*, in press

Abstracts:

Mühlhausen C, Chalajour F, Ott N, Freudenberg F, Ullrich K, Braulke T, and Ergün S (2003) NMDA-receptor-independent effects of 3-hydroxy glutaric acid on angiogenesis in human endothelial cells (abstract). *Monatsschr Kinderheilkd* 151:480.

Mühlhausen C, Ott N, Chalajour F, Ullrich K, Braulke T, and Ergün S (2004) *In vivo* and *in vitro* effects of 3-hydroxyglutaric acid on human endothelial cells (abstract). *Eur J Pediatr* 163:R8.

Mühlhausen C, Ott N, Chalajour F, Ullrich K, Braulke T, and Ergün S (2004) Effects of 3-hydroxyglutaric acid on human endothelial cells *in vitro* and *in vivo* (abstract). *Hämostaseologie* 24:A55.

Mühlhausen C, Ott N, Strauss KA, Ullrich K, Ergün S, and Braulke T (2004) Einfluss von 3-Hydroxyglutarsäure auf die Integrität vaskulärer Endothelzellen *in vitro* und *in vivo* (abstract). *Monatsschr Kinderheilkd* 152:713.

Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Kurt Ullrich für die Vergabe des Themas und Herrn Prof. Dr. Thomas Braulke für die Betreuung der Arbeit danken. Ich möchte ebenfalls Herrn Prof. Dr. Wiese danken, der freundlicherweise die Begutachtung übernommen hat.

Ein spezieller Dank geht an Dr. Chris Mühlhausen, der mir mit Rat und Tat zur Seite stand (und immer da war- am Telefon und zum Glück gibt es e-mails!!!!).

Danken möchte ich auch Juliane, Franziska, Britta, Stephan & Stephan, Sandra & Sandra, Bettina, Bernd, Arne, Claudia, Inke und Adrian und all den anderen. Ich danke allen für ihre Hilfe, Unterstützung und den Spaß bei der Arbeit und danach.

Weiterhin danke ich Herrn PD Dr. Ergün (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf Institut für Anatomie) für den *in vivo*-und Kapillarformierungs-Assay! Ein Dank geht auch an Frau Kirstin Mieth, die mir bei der Immunhistochemie der Paraffinschnitte aus dem Kapillarformierungsassay geholfen hat.

Dem GRK 336 möchte ich für die Bereitstellung des Light-Cycler danken und insbesondere Herrn Prof. Dr. Seitz (DFG) für die Finanzierung dieser Arbeit.

Und natürlich wären die Arbeiten an den GCDH-knock out Tieren ohne Herrn Prof. Dr. Goodman der freundlicherweise die Mäuse zur Verfügung gestellt hat, und Frau Damann und Frau Kessler, die sich um die Haltung und Zucht der Tiere gekümmert haben, nicht möglich gewesen.

Den „Immunologen“ sei natürlich ebenfalls für Ihre Nachbarschaftshilfe gedankt.

DANKE