

# Charakterisierung und Reinigung des Hirnenzyms L-Aspartat-N-Acetyltransferase

## **Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. Nat.)

der

Mathematisch – Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich – Wilhelms – Universität Bonn

vorgelegt von

Yolina Hubenova

aus

Plovdiv

Bonn 2004

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch – Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich – Wilhelms – Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. Gieselmann

2. Referent: Prof. Dr. Koch

Tag der Promotion:

Für meine Mutter und meine Tochter

Inhaltsverzeichnis:

	Seite
1 Einleitung .....	6
2 Zielsetzung .....	12
3 Material und Methoden .....	13
3.1 Proteinbiochemie .....	13
3.1.1 Allgemeine chemische Methoden .....	13
3.1.1.1 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	13
3.1.1.1.1 Lowry Methode - BioRad DC .....	13
3.1.1.1.2 Bradford Methode - BioRad .....	13
3.1.1.1.3 Extinktion bei 280 nm .....	14
3.1.1.2 Dialyse .....	14
3.1.1.3 Pufferlösungen .....	14
3.1.1.4 Konzentrierungsmethoden .....	14
3.1.1.4.1 Zentrifugation unter Vakuum – Bedingungen (Speed-vac) .....	14
3.1.1.4.2 Zentrifugation – Ultrafiltration .....	15
3.1.1.4.3 Zip Tip – Säulchen .....	15
3.1.1.4.4 Reversed Phase Chromatographie .....	15
3.1.1.5 Polyacrylamid- Gelelektrophorese .....	15
3.1.1.5.1 SDS –PAGE .....	15
3.1.1.5.2 Färbung der Gele .....	16
3.1.1.5.2.1 Silberfärbung von Proteingelen .....	16
3.1.1.5.2.2 Coomassie Brillant Blau R250 .....	17
3.1.1.5.3 Trocknen der Gele .....	17
3.1.1.5.4 Westernblot .....	17
3.1.1.5.5 Immunenzymologische Detektion (Immunfärbung) .....	18
3.1.2 Methoden zur Trennung und Bestimmung von Proteinen .....	19
3.1.2.1 Konventionelle Reinigungsmethoden .....	19
3.1.2.1.1 Ionenaustauscherchromatographie (IC) .....	19
3.1.2.1.1.1 SP- Sepharose .....	19
3.1.2.1.1.2 Q-Sepharose .....	20
3.1.2.1.1.3 CM- Sepharose .....	20
3.1.2.1.2 Größenausschlusschromatographie (GC) .....	20
3.1.2.1.2.1 Superdex G-200 HR 10/30 .....	20
3.1.2.1.2.2 Superose 6 HR 10/30 (Pharmacia) .....	21
3.1.2.1.3 Affinitätschromatographie .....	21

3.1.2.1.3.1	Reaktivfarben – Affinitätschromatographie	21
3.1.2.1.3.2	Concanavalin A Chromatographie	21
3.1.2.1.3.3	Heparin-Säule	22
3.1.2.1.4	Andere Chromatographien	22
3.1.2.1.4.1	Hydroxylapatit (HA)	22
3.1.2.1.4.2	Reversed- Phase –HPLC	22
3.1.2.1.4.3	Ni-NTA Affinitätschromatographie	23
3.1.2.1.4.4	Dünnschichtchromatographie (TLC)	23
3.1.2.1.4.4.1	Dünnschichtchromatographie	23
3.1.2.1.4.4.2	Bidimensionale Dünnschichtchromatographie	24
3.1.2.2	Bestimmung der Enzymaktivitäten	25
3.1.2.2.1	L-Aspartat-N-Acetyltransferase – Reaktion	25
3.1.2.2.2	Aspartoacylase – Reaktion	27
3.1.2.2.3	Gekoppelte Enzymreaktionen: L-Aspartat-N-Acetyltransferase- und Aspartoacylase- Reaktion	27
3.1.2.2.4	Spezifische Organellenmarker – Leitenzyme	28
3.1.2.2.4.1	Das Leitenzym von Lysosomen – $\beta$ Hexosaminidase	28
3.1.2.2.4.2	Das Leitenzym von Mitochondrien – Cytochrom c Oxidase	28
3.2	Physikalische und chemische Verfahren	29
3.2.1	Refraktometrie	29
3.2.2	Chemische Synthese von [ $^{14}$ C]- N-Acetyl-L-Aspartat	29
3.2.3	Phosphoimager	29
3.3	Desoxyribonukleinsäure (DNA)	30
3.3.1	Routine Methoden	30
3.3.1.1	DNA Fällung	30
3.3.1.2	DNA – Waschen	30
3.3.1.3	DNA - Verdauen	30
3.3.1.4	Ligation der Plasmid-DNA mit der genomischen DNA	30
3.3.1.5	Agarosegelelektrophorese	31
3.3.2	Rekombinante DNA - Techniken	32
3.3.2.1	PCR (Polymerase Chain Reaction)	32
3.3.2.2	Überprüfung des Erfolgs einer Transformation	33
3.3.2.3	Minipräparation von Plasmid-DNA (Miniprep)	34
3.3.2.4	Sequenzierung	34
3.4	Analysiertes Material	36
3.4.1	Gehirn aus Ratten und Rindern	36
3.4.1.1	Gehirnhomogenisationsmedium	36

3.4.1.2 Vorbereitung der Probe: Homogenisation .....	36
3.4.1.3 Differentialzentrifugation .....	36
3.4.1.4 Solubilisierungsverfahren .....	36
3.4.1.5 Zellorganellen .....	37
3.4.1.5.1 Anreicherung von Mitochondrien .....	37
3.4.2 Eukaryontische Zellkulturen .....	38
3.4.2.1 Zelllinien / Kultivierungsbedingungen .....	38
3.4.2.2 Auftauen von Kulturzellen .....	39
3.4.2.3 Einfrieren von Kulturzellen .....	39
3.4.2.4 Zellen auszählen .....	40
3.4.2.5 Zellhomogenisationsmedium .....	40
3.4.2.6 Subzelluläre Fraktionierung .....	40
3.4.2.6.1 Das Leitenzym von Peroxysomen - die Katalase .....	40
3.4.2.6.2 Das Leitenzym von Golgi-Apparat - $\alpha$ -Mannosidase II .....	41
3.4.2.6.3 Das Leitenzym von Lysosomen - $\beta$ -Hexosaminidase .....	42
3.4.2.6.4 Das Leitenzym von Cytosol – Laktatdehydrogenase .....	42
3.4.2.6.5 Das Leitenzym von Mitochondrien - Cytochrom c- Oxidase .....	42
3.4.2.6.6 Das Leitenzym von Plasmamembranen- Alkalische Phosphatase .....	42
3.4.3 Bakterien .....	43
3.4.3.1 Anlegen einer Über-Nacht-Kultur .....	43
3.4.3.2 Anlegen einer Bakterienkultur für Plasmid-Präparationen .....	43
3.4.3.3 Klassische Transformation .....	44
3.4.3.4 IPTG-Expressionsaktivierung .....	44
3.4.3.5 Lyse der Bakterien .....	44
4 Versuche und Ergebnisse .....	45
4.1 Nachweis der L-Aspartat-N-Acetyltransferase – Reaktion .....	45
4.1.1 Nachweis der L-Aspartat-N-Acetyltransferase – Reaktion durch die spezifischen Substrate .....	45
4.1.2 Nachweis der L-Aspartat-N-Acetyltransferase – Reaktion durch den Nachweis von Enzymaktivität in Organen .....	47
4.1.3 Nachweis der L-Aspartat-N-Acetyltransferase- Reaktion mittels Aspartoacylase - Hydrolyse des N-Acetyl-Aspartats .....	48
4.1.3.1 Aspartoacylase II - Klonierung und - Anreicherung .....	48
4.1.3.2 Aktivität der exprimierten Aspartoacylase .....	49
4.1.3.3 Aspartoacylase - Hydrolyse des in L-Aspartat-N-Acetyltransferase – Reaktion gebildeten N-Acetyl-Aspartats .....	51
4.1.4 Nachweis der L-Aspartat-N-Acetyltransferase – Reaktion mittels	

Produktinhibition .....	53
4.2 Charakterisierung und Enzymkinetik der Hirn- L-Aspartat-N-Acetyltransferase .....	54
4.2.1 pH – Abhängigkeit der L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität .....	54
4.2.2 Temperaturabhängigkeit der L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität .....	55
4.2.3 Abhängigkeit der L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität von der Konzentration des Cosubstrates Acetyl-Coenzym A .....	55
4.2.4. Abhängigkeit der L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität von dem Proteingehalt des Hirnextrakts .....	56
4.2.5 L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität in Abhängigkeit von der Dauer der Reaktion .....	57
4.2.6 Mögliche Hemmstoffe der L-Aspartat-N-Acetyltransferase .....	59
4.2.6.1 Einfluss des Oxalacetats auf die L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität .....	61
4.2.6.2 Einfluss des Jodacetamids und N-Ethylmaleinimids auf die L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität .....	62
4.3 Aufreinigung der Hirn- L-Aspartat-N-Acetyltransferase .....	64
4.3.1 Zellfraktionierung .....	64
4.3.1.1 Homogenisation .....	65
4.3.1.2 Differentialzentrifugation .....	65
4.3.1.3 Mitochondrienanreicherung .....	68
4.3.1.3.1 Bestimmung der spezifischen Aktivitäten der Leitenzyme Cytochrom c Oxidase und $\beta$ -Hexosaminidase sowie L-Aspartat-N-Acetyltransferase in Rattenhirn .....	69
4.3.1.4 Enzymanreicherung während der Zellfraktionierung des Rattenhirns .....	71
4.3.1.5 Aufreinigung der L-Aspartat-N-Acetyltransferase aus Rinderhirn .....	73
4.3.2 Reinigung der membranassoziierten Proteine .....	75
4.3.3 Solubilisierung des Membranproteins L-Aspartat-N-Acetyltransferase .....	77
4.3.4 Konventionelle Reinigung der L-Aspartat-N-Acetyltransferase .....	82
4.3.4.1 Sulphopropyl - Sepharose – Chromatographie .....	82
4.3.4.2 Q- Sepharose – Chromatographie .....	85
4.3.4.3 Carboxymethyl - Sepharose – Chromatographie .....	87
4.3.4.4 Heparin – Affinitätschromatographie .....	89
4.3.4.5 Lektinchromatographie – Concanavalin A .....	91
4.3.4.6 Reaktivfarbenschromatographie .....	92
4.3.4.7 Ausschlusschromatographie .....	93
4.4 Aufreinigung der L-Aspartat-N-Acetyltransferase von eukaryontischen Zelllinien durch diskontinuierliche Dichtegradienten – Zentrifugation .....	97
4.4.1 L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität in verschiedenen eukaryontischen Zelllinien .....	97

4.4.2 Anreicherung der L-Aspartat-N-Acetyltransferase aus NT-2 Zelllinien durch Dichtegradienten .....	98
4.4.3 Nachweisen der L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität in den Mastzellen .....	100
4.4.3.1 Subzelluläre Fraktionierung der HMC-1 - Zellen .....	101
4.4.3.2 Subzelluläre Lokalisation der L-Aspartat-N-Acetyltransferase in Mastzellen .....	102
5 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse .....	105
6 Abkürzungen .....	113
7 Literaturverzeichnis .....	116
Lebenslauf .....	121

# 1 Einleitung

Die Funktion des N-Acetyl-L-Aspartats, der zweithäufigsten im Gehirn vorkommenden freien Aminosäure nach dem Glutamat, ist bis heute nicht geklärt. Das Enzym L-Aspartat-N-Acetyltransferase (ANAT; EC 2.3.1.17), welches die Acetylierung des L-Aspartats ausgehend vom Acetyl-Coenzym A katalysiert (s. Abb. 1), wurde ebenfalls noch nicht gereinigt und nur unzureichend charakterisiert.

Abbildung 1: Biochemische Enzymreaktion und katalytische Funktion der L-Aspartat-N-Acetyltransferase



Die Aufmerksamkeit der Wissenschaft auf das N-Acetyl-L-Aspartat (NAA) in den letzten Jahren geht auf die Tatsache zurück, dass das N-Acetyl-L-Aspartat als diagnostischer Marker in der klinischen und experimentellen Medizin, in der "Protonenmagnetischen Resonanzspektrometrie"<sup>(PMRS)</sup> verwendet wird (Bhakoo und Pearce 2000, Bates et al. 1996, Knaap et al. 1992). Das N-Acetyl-L-Aspartat dient als Marker bei verschiedenen neurologischen und neuropsychiatrischen Krankheitsbildern: Erhöhte Mengen von N-Acetyl-L-Aspartat wurden in Patienten mit Canavan - Krankheit (autosomal rezessive Leukodystrophie) und Gehirntumoren, geringe Werte - bei neurodegenerativen Krankheiten wie Multiple Sklerose, Schizophrenie, Morbus Alzheimer und Huntington's Krankheit festgestellt (Tsai und Coyle 1995, Dunlop et al. 1992, Grossman et al. 1992, Grodd et al. 1990). Die reduzierten Mengen N-Acetyl-L-Aspartat stehen im Zusammenhang mit der Verringerung von Neuronenvitalität (Bhakoo und Pearce 2000), zellulärer Funktionsstörung und Neuronenverlust (Demougeot et al. 2001, Clarke 1998). Der Rückgang des N-Acetyl-L-Aspartat - Niveaus zu seinem ursprünglichen Zustand während der ruhigen Phasen im Multiplen Sklerose – Krankheitsverlauf korrespondiert mit einer Verbesserung der Neuronenfunktion (Bhakoo und Pearce 2000). Beim ischämischen Schlaganfall sind die hohen Mengen N-Acetyl-L-Aspartat ein Zeichen für eine negative Krankheitsentwicklung (Stevens et al.1999).

---

<sup>(PMRS)</sup> - Auf breiter Basis wird die kernmagnetische Resonanz zur Untersuchung der Struktur verhältnismäßig einfacher organischer Moleküle eingesetzt und stellt für die Neurowissenschaft ein nicht gewaltsames Mittel von Festsetzen der Gewebebiochemie in vivo dar.

Es wird vermutet, dass das N-Acetyl-L-Aspartat bei der Erkenntnisfähigkeit und der Intelligenz des Menschen eine Rolle spielt (Jung et al. 1999b). Es ist noch ungeklärt, warum und wie sich die Mengen von N-Acetyl-L-Aspartat verändern. Ebenfalls unbekannt bleiben die Synthese- und Regulationsmechanismen dieser Prozesse im Gehirn.

Noch im Jahr 1956 spricht Tallan zum ersten Mal über "grosse Mengen gebundenen Aspartats im Gehirn." Er identifiziert die bis dahin unbekannt Substanz und bestimmt eine Konzentration von 0.8 mg N-Acetyl-L-Aspartat pro Gramm Gehirn.

Goldstein beschreibt erstmals im Jahr 1959 ein Enzym, welches das Aspartat spezifisch acetyliert und im 30.000xg - Überstand von Gehirnhomogenaten entdeckt wurde. Die Grundlage zur Erforschung der L-Aspartat-N-Acetyltransferase wurde damit gelegt.

Im Jahr 1967 äußert sich Knizley zu dem unzureichenden Nachweis der Produktspezifität der L-Aspartat-N-Acetyltransferase - Reaktion. Seine Argumentation basiert darauf, dass das Aspartat an dem Intermediär-Stoffwechsel teilnimmt und mit den bekannten Methoden unterschiedliche Metaboliten gemessen wurden, ohne dass das Aspartat eindeutig von den anderen Substanzen abgegrenzt werden konnte. Der Grund dafür liegt darin, dass bei der Transaminierung<sup>1</sup> die Aminogruppe des Aspartats auf eine 2-Oxosäure übertragen wird, wobei das Aspartat durch Desaminierungsprozesse in Oxalacetat bzw. das Oxalacetat durch Aspartat-Transaminase in Aspartat umgewandelt werden. In dem Enzymtest wurde einer von den Metaboliten des Intermediären Stoffwechsels und nicht das N-Acetyl-Aspartat gemessen und registriert.

Zwei Jahre später (1969) berichtet Goldstein, dass sich das spezifische Enzym L-Aspartat-N-Acetyltransferase in Partikeln befindet, die verteilt im Cytoplasma liegen. Bis heute noch zitiert man die Annahme, dass diese Partikel Mitochondrien sind. Goldsteins Vermutung, dass diese Partikel auch Mikrosomen sein könnten, wird nicht weiter untersucht und gerät bald in Vergessenheit. Unabhängig davon untersuchen andere Wissenschaftler die Teilnahme des N-Acetyl-L-Aspartats und der L-Aspartat-N-Acetyltransferase im komplizierten Metabolismus des Gehirns. Patel und Klark (1979) erweitern diese Untersuchungen, indem sie ein breiteres Netz von biochemischen Citrat - Zyklus - Reaktionen einschließen. Darüber hinaus weisen sie die Inkorporation der radioaktiven Acetylgruppe des N-Acetyl-L-Aspartats in den Hirnlipiden nach.

25 Jahre vergehen, bevor die Forschungen über die L-Aspartat-N-Acetyltransferase wieder aufgenommen werden. Truckenmiller und Nambodirri untersuchen zum ersten Mal (1985) gründlich die Biosynthese des N-Acetyl-L-Aspartats im Nervensystem. Sie publizieren die

---

<sup>1</sup> Die Transaminierungsprozesse kommen im katabolen wie im anabolen Aminosäure-Stoffwechsel vor.

von ihnen gewählten optimalen Bedingungen für den Enzymtest, bei welchem radioaktiv markiertes Aspartat verwendet wurde. Zur Messung des N-Acetyl-L-Aspartats wurde die Dünnschichtchromatographie eingesetzt. L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität wurde im Hirn, jedoch nicht in dem Herzen, der Leber und den Nieren festgestellt. Die Solubilisierungsversuche von Truckenmiller et al. weisen auf die Membrangebundenheit des Enzyms hin. Sie glauben, dass das tRNA- gebundene Aspartat und nicht das freie Aspartat an den Acetylierungsprozessen teilnimmt. Die Analysen wurden damals mit tiefgefrorenen Geweben durchgeführt, so dass die Lokalisation der Transferase nicht untersucht werden konnte.

Die Entwicklung der Medizin und der laborortechnischen Anlagen führt zur Verbreitung der Verwendung des N-Acetyl-Aspartats in der Neurologie. In ihrer Übersicht über die Rolle des N-Acetyl-L-Aspartats in neuropsychiatrischen Krankheiten fassen Tsai et al. 1995 zusammen, dass eine Konzentration des N-Acetyl-L-Aspartats von bis zu 0.1 % vom Gehirngewicht erreicht werden kann, und dass das N-Acetyl-L-Aspartat eine wichtige Rolle bei der psychischen Gesundheit der Menschen spielt.

Metha und Namboodiri behaupten 1995 erneut, ohne eine Organellenisolierungsprozedur und / oder Leitenzym aufzuzeigen, dass das N-Acetyl-L-Aspartat in den Mitochondrien gebildet und durch die mitochondriale Membran in das Cytoplasma transportiert wird, wo 80 % von dem Gehirn - N-Acetyl-L-Aspartat zu finden ist. Sie veranschaulichen ihre Hypothese mit einem unbegründeten Schema, das immer wieder zitiert wird, obwohl die Studie eher auf die Rolle des N-Acetyl-L-Aspartat als Acetyl - Quelle in dem Nervensystem ausgerichtet ist. Das "Mitochondrien - Dogma" findet einen festen Platz in der Weltwissenschaft und wird schon als ein Lemma<sup>1</sup> angenommen.

Seit 1985 (Bogonez et al.), als der Aspartat- Rezeptor von Bakterien in nativer Form isoliert wurde, bis 1991 (Simmons et al.) ist die Wissenschaft mit der Funktion und der Lokalisation des N-Acetyl-Aspartats beschäftigt. Bis heute bleibt dessen Rolle jedoch enigmatisch und ungeklärt. Es entstehen viele Spekulationen und Annahmen. So wird das N-Acetyl-L-Aspartat als Precursor für Protein- Synthese und Regulation angenommen (Clarke et al. 1975, Metha und Namboodiri 1995). Ebenso könnte das N-Acetyl-L-Aspartat als Precursor für die Synthese von dem Neurotransmitter N-Acetyl-Aspartyl-Glutamat (NAAG) und / oder Acetylcholin dienen (Faull et al. 1999). Das Synthesenzym des N-Acetyl-Aspartyl-Glutamats ist dabei jedoch unbekannt. D'Adamo (1968) sowie Burri et al. (1991) vermuten, dass das N-Acetyl-L-Aspartat eine wichtige Rolle bei der Fettsäuresynthese spielt. Chakraborty et al.

---

<sup>1</sup> Lemma: eine Behauptung, die als Wahrheit angenommen und als Begründung für weitere Thesen gilt, ohne dass sie bewiesen ist.

(2001), Bhakoo und Pearce (2000) sowie Tsai und Coyle (1995) sind von der unmittelbaren Teilnahme der Aminosäure an der Myelinisation der Neuronen überzeugt.

Die Untersuchungen der N-Acetyl-L-Aspartat - Synthese gehen regelmäßig mit der Erforschung der Kreuzreaktionen und des Metabolismus des Citrat – Zyklus einher. Millers Hypothese von 1996 lautet: das Glutamat wird durch Oxalacetat / Malat Shuttle (Transporter) in das Mitochondrieninnere transloziert. Das Glutamat wird in 2-Oxoglutarat umgewandelt, parallel dazu entsteht Aspartat, welches danach zum N-Acetyl-L-Aspartat acetyliert wird.

Burlina zeigt 1997 zum ersten Mal das Vorhandensein des N-Acetyl-L-Aspartats in nicht aus Gehirn stammendem Gewebe, nämlich Mastzellen. Die Teilnahme der Mastzellen an den allergischen Reaktionen und Entzündungen führt ihn zu der Idee, dass nicht nur Histamin, sondern auch das N-Acetyl-L-Aspartat sich in den sekretorischen intrazellulären Vesikeln der Mastzellen befindet. Eine weitere Funktion des N-Acetyl-L-Aspartats vermutet er in den Prozessen der neuroimmunologischen Wechselwirkungen und zwar unter Beteiligung der Immun-Effektorzellen.

Um eine Antwort auf die Frage nach der biologischen Rolle der Acetylierung zu finden, vergleicht Baslow im selben Jahr (1997) zwei acetylierte Aminosäuren, N-Acetyl-Histidin und N-Acetyl-Aspartat, und ihre Metabolismen in phylogenetischer und embryologischer Hinsicht miteinander. Er vermutet, dass die Acetylierung der Aminosäuren ihren interzellulären Transport im Gehirn bedingt.

Huang nimmt 2000 an, dass der natriumabhängige Dicarboxylat - Transporter (NaDC3) das N-Acetyl-L-Aspartat in den verschiedenen Teilen im Gehirn transloziert.

Baslow 2000 wirft die Frage auf, ob die Rolle des N-Acetyl-L-Aspartats und N-Acetyl-Aspartyl-Glutamats als Neurotransmitter in der zellspezifischen Signalisierung und Nervenimpulsübertragung in den Synapsen liegen könnte. Nach seiner Meinung werden das N-Acetyl-L-Aspartat und das N-Acetyl-Aspartyl-Glutamat vor allem in Neuronen synthetisiert, die N-Acetyl-L-Aspartat- Amidohydrolase wird nur in Oligodendrocyten und das abbauende Enzym für N-Acetyl-Aspartyl-Glutamat nur in Astrocyten exprimiert. Dies lässt das folgende Schema vermuten: das N-Acetyl-Aspartyl-Glutamat wird von dem N-Acetyl-L-Aspartat und dem L- Glutamat in Neuronen synthetisiert, zunächst bis N-Acetyl-L-Aspartat und L-Glutamat in Astrocyten und anschließend bis L-Aspartat und Acetat in den Oligodendrocyten hydrolysiert. Diese komplexe Bewegungskette zu den drei Zelltypen im Nervensystem lässt darauf schliessen, dass die genannten Substanzen eine wichtige Rolle bei der zellspezifischen Glial-Signalübertragung spielen (Baslow 2000).

Das Enzym, welches das N-Acetyl-L-Aspartat bis zu L-Aspartat und Acetat hydrolysiert (D'Adamo et al. 1973, Goldstein 1976), ist die N-Acetyl-L-Aspartat-Amidohydrolase (EC 3.5.1.15.), auch Aspartoacylase II genannt (s. Abb. 2).

Abbildung 2: Biochemische Enzymreaktion und katalytische Funktion der Aspartoacylase II



Die Degeneration des Gehirns bei Menschen mit Canavan Disease (CD) ist Folge einer Aspartoacylase – Defizienz (Kaul 1993). Der Mangel führt zur Akkumulation des N-Acetyl-L-Aspartats. Noch 1976 demonstriert Goldstein, dass die Acylase 25 Mal mehr Aktivität in der weißen Gehirns substanz als in der grauen und 14 Mal mehr Aktivität in den Nieren als in dem Gehirn zeigt. Unter den pathologischen und klinischen Symptomen der Canavan - Krankheit wie Mangel der Motoraktivität, Zunahme des Hirngewichts sowie der Oligodendrocyten und Astrocyten, wird ein intensiver Myelinverlust und ein totaler Lipidverlust in der weißen Gehirns substanz beobachtet. 1993 wurde die Aspartoacylase (ASPA) kloniert. Die menschliche Aspartoacylase - cDNA ist 1.435 bp lang und das Enzym hat ein Molekulargewicht von ca. 36 kD. Patienten mit der Canavan - Krankheit weisen eine Mutation im Aspartoacylase - Gen auf. Bei ihnen ist Glutamin-285 durch Alanin substituiert. Im Jahr 2000 wurde die Maus - Aspartoacylase - cDNA kloniert und mit der menschlichen verglichen (Namboodiri et al. 2000). Die Gentherapie gibt eine Möglichkeit, die Aspartoacylase - Defizienz in Patienten mit Canavan – Krankheit (CD) zu kompensieren (Fink 2000). Die zweite Möglichkeit besteht darin, eine pharmakologische Substanz zu finden, welche die N-Acetyl-L-Aspartat - Synthese verringert oder reguliert (Hickman et al. 1999) und so die Oligodendrocyten vor grossen Mengen N-Acetyl-L-Aspartat bewahrt.

Das N-Acetyl-L-Aspartat wurde von Baslow 1997 als eine wichtige osmotisch wirkende Substanz im Extrazellulärraum des Gehirns bestimmt, die in das Blut eintritt und durch die Nieren ausgeschieden wird (vgl. Taylor et al. 1995). Zu welchen Folgewirkungen könnte die Störung des N-Acetyl-L-Aspartat - Gleichgewichts im Organismus führen?

Um auf diese und viele andere Fragen antworten zu können, sind die Mechanismen und die Orte der N-Acetyl-L-Aspartat - Synthese, das komplizierte Netz der Wechselwirkungen zwischen den unterschiedlichen Metaboliten sowie die vielfältigen Funktionen des Produkts zu klären.

Unabhängig davon, ob das N-Acetyl-L-Aspartat eine Speicherform für L-Aspartat ist, als Acetyldonor für Fettsäurensynthese dient, sich als Neurotransmitter beteiligt, oder an dem Transfer der Aminogruppen in Neurogeweben teilnimmt, bleibt die Frage offen, wie das N-Acetyl-L-Aspartat synthetisiert wird. Die Entwicklung einer Knockout - Maus mit Mutation(en) für die L-Aspartat-N-Acetyltransferase könnte die Rolle des Enzyms und die Funktion des N-Acetyl-L-Aspartats im Zentralnervensystem beleuchten. Die Charakterisierung und die Reinigung der L-Aspartat-N-Acetyl-Transferase sind die Grundlagen dafür sowie ein weiterer Schritt in der Klärung der physiologischen Prozesse und des morphologischen Bildes einer Reihe neurologischer Krankheiten.

## 2 Zielsetzung

Die geringe und unzureichende Information über die L-Aspartat-N-Acetyltransferase und ihr unbekanntes Gen haben das Ziel der vorliegenden Arbeit bestimmt – die Charakterisierung und Entwicklung eines Reinigungsschemas der L-Aspartat-N-Acetyltransferase. Als Erstes musste die Spezifität der Reaktion, was die Überprüfung der Substratspezifität, Organspezifität und Produktspezifität der Reaktion einschließt, zum Nachweis der L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität untersucht werden. Die Bedingungen für die L-Aspartat-N-Acetyltransferase - Enzymreaktion in dem Hirngewebe mussten optimiert und etabliert werden. Die Enzymkinetik musste charakterisiert sowie die Enzymeigenschaften und die Enzymaktivität in Abhängigkeit von dem pH des Puffersystems, dem Proteingehalt, der Dauer der Reaktion, der Temperatur und dem Einfluß von Inhibitoren bestimmt werden. Solubilisierungsschemata mussten für die L-Aspartat-N-Acetyltransferase als Membranprotein etabliert werden. Die subzelluläre Lokalisation der L-Aspartat-N-Acetyltransferase musste untersucht werden, um die Frage zu beantworten, ob die L-Aspartat-N-Acetyltransferase wirklich ein mitochondriales Enzym ist oder nicht. Die L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität musste in den verschiedenen Geweben und Organen wie Niere, Leber, Mastzellen, etc. untersucht werden, um das für eine Reinigung günstigste Gewebe zu identifizieren. Ein mögliches Reinigungsschema des Enzyms musste mittels Zellfraktionierung, Differentialzentrifugation und Chromatographischen Verfahren ermittelt werden. Die Charakterisierung und die Etablierung eines Reinigungsschema's der L-Aspartat-N-Acetyltransferase in möglichst größter Reinheit bestimmten das Ziel dieser Arbeit.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Proteinbiochemie**

#### **3.1.1 Allgemeine chemische Methoden**

##### **3.1.1.1 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Das Prinzip basiert auf der Möglichkeit, Proteine kolorimetrisch zu bestimmen. In den meisten Fällen werden chemische Substanzen den Proteinen beigefügt, und die Farbveränderung wird spektrometrisch gemessen.

###### **3.1.1.1.1 Lowry Methode - BioRad DC**

Die BioRad DC – Proteinbestimmung ist eine modifizierte Lowry Methode, welche zum Quantifizieren von Protein in Gegenwart von Detergenz geeignet ist. Die Methode basiert auf der Reduktion des Folin - Reagenz von Kupfer – Protein – Komplexen. Bei Proteinkonzentrationen der Probe von 0.2 - 1.5 mg/ml wurden folgende Volumina verwendet:

5 µl Probe : 20 µl Reagenz A' : 200 µl Reagenz B.

Die Lösungen werden miteinander vermischt. Nach 10 Minuten wird die Absorption bei OD655 gemessen. Bei Konzentrationen 5 – 250 µg/ml Protein werden 20 µl Probe mit 10 µl Reagenz A' und 80 µl Reagenz B gemischt. Das Reagenz A' wird frisch hergestellt, indem Reagenz S und Reagenz A im Verhältnis 1:50 vermischt werden.

Beim Herstellen von Proteinstandards wurde beachtet, dass die Standards die gleiche Detergenzkonzentration wie die Proben enthielten und in dem gleichen Puffer gelöst wurden. Gewöhnlich wurde BSA als Standard in Konzentrationen von 0,1 bis 5 mg/ml benutzt. Es wurde die funktionelle Abhängigkeit der Konzentrations- und Extinktionswerte der BSA - Standards erstellt und auf dieser Basis wurde mit Hilfe von Verdünnungen die jeweilige Proteinkonzentration bestimmt.

###### **3.1.1.1.2 Bradford Methode - BioRad**

Die basischen und aromatischen Aminosäuren der Proteine werden von der Coomassie Brillant Blau G-250 - Lösung gefärbt, und die Farbveränderungen werden kolometrisch bestimmt. Für Konzentrationen im Bereich 0.05 – 0.5 mg/ml Protein wurden die Proben (Standards) und das 4-fach verdünnte Reagenz im Verhältnis 1:20

vermischt. Für Konzentrationen von 8 bis 80 µg/ml Protein werden die Probe und das Reagenz - Konzentrat im Verhältnis 40:1 vermischt. Gemessen wird bei OD 595.

#### **3.1.1.1.3 Extinktion bei 280 nm**

Die Proteinkonzentration kann auch mittels ihrer Extinktion bei 280 nm Wellenlänge bestimmt werden, wobei die Faustregel, dass 1mg/ml BSA etwa 1OD gibt, gilt.

#### **3.1.1.2 Dialyse**

Die Dialyse ist ein Trennverfahren, das mittels semipermeabler Membranen Moleküle gemäß ihrer Größe trennt. Die Größe der Membranporen liegt dabei unterhalb makromolekularer Abmessungen. Diese Poren erlauben es kleinen Molekülen, z.B. Lösungsmitteln, Salzen und kleinen Metaboliten, durch Membran zu diffundieren, während grössere Moleküle zurück gehalten werden. Meist wird Cellophan oder Nitrocellulose als Dialyse-Membran verwendet. Die Standardprozedur im Dialyseschlauch dauert 16 Stunden bei 4°C oder 3mal 2 Stunden bei Zwischenwechsel der Pufferlösung.

#### **3.1.1.3 Pufferlösungen**

Die folgenden Pufferlösungen mit ausreichender Pufferkapazität in den beabsichtigten pH- Bereichen wurden verwendet:

0.1 M Tris, titriert mit 0.1 M HCl, im pH- Bereich 7.5 – 8.5

0.1 M Natrium Acetat, titriert mit 0.1 M HCl, im pH- Bereich 3.8 – 5.7

Natriumphosphat, in den pH- Bereichen 2.2 – 3.3 und 6.2 – 7.6.

#### **3.1.1.4 Konzentrierungsmethoden**

##### **3.1.1.4.1 Zentrifugation unter Vakuum - Bedingungen (Speed-vac)**

Die „Speed-vac“ – Konzentrierungsmethode gehört zu den chemischen Routine–Verfahren. In hohem Vakuum verdampfen flüssige Lösungen schon bei 20°C. Die gleichzeitige Zentrifugation der Lösung bei hoher g-Zahl treibt die Gasblasen aus und verhindert das Schäumen. Das Zentrifugieren bei 24.000xg im Vakuum wurde verwendet sowohl bei der chemischen Synthese von [<sup>14</sup>C]-NAA (s. Abschn. Material und Methoden – 2.2) als auch bei der Konzentrierung der dialysierten 200 mM - Imidazol - Aspartoacylase – Elutionsfraktion nach der Durchführung der Reversed Phase Chromatographie und als Vorbereitung der Probe auf die Massenspektrometrie.

#### **3.1.1.4.2 Zentrifugation - Ultrafiltration**

Die zu konzentrierende Flüssigkeit wird über ein Filter abzentrifugiert. Das Konzentrat sammelt sich oberhalb des Filters (verschiedene Porengrösse) und kann in einem zweiten Zentrifugationsschritt in ein Röhrchen transferiert werden. Die Firma Amicon bietet verschiedene Systeme an, z.B. Microcon, Centricon u.a., die 0.5 ml bis 15 ml Anfangslösung auf 5-500 µl innerhalb von 10 Minuten bis 3 Stunden konzentrieren können. Die Probe 50.000xg- Pellet wurde nach der Detergenzextraktion 30 Minuten lang im Centricon - Röhrchen bei 2000xg ultrafiltriert, um eine Proteinkonzentration von 3 - 5 mg/ml zu erreichen.

#### **3.1.1.4.3 Zip Tip – Säulchen**

Die Zip Tip - Säulchen wurden verwendet, um die Proteinlösung schnell zu entsalzen und konzentrieren. Die Zip Tip – Säulchen sind für µl- Volumina in der Massenspektrometrie geeignet. 10 µl von 200 mM – Imidazol – Aspartoacylase – Elutionsfraktion wurden mittels eines Zip-Tip-Säulchens entsalzt und konzentriert. Die konzentrierte Probe wurde danach mit Acetonitril / Trifluoressigsäure für die Massenspektrometrieanalyse behandelt (s. Abschn. Material und Methoden – 1.2.2.2).

#### **3.1.1.4.4 Reversed Phase Chromatographie**

Die Reversed Phase Chromatographie ist eine weitere Konzentrationsmethode, welche im Abschnitt Methoden zur Trennung und Bestimmung von Proteinen, Punkt 3.1.2.1.4 beschrieben wird.

#### **3.1.1.5 Polyacrylamid- Gelelektrophorese**

##### **3.1.1.5.1 SDS –PAGE**

Die Polyacrylamid- Gelelektrophorese basiert auf der Eigenschaft des anionischen Detergenzes Natriumdodecylsulfat (SDS), an hydrophobe Regionen von Proteinen zu binden, Proteine zu denaturieren und negativ zu laden. Die verschiedenen SDS-Protein-Komplexe unterscheiden sich somit nur in ihrer Grösse und haben vergleichbare hydrodynamischen Eigenschaften. Bei der SDS-PAGE wandern diese Komplexe im elektrischen Feld zur Anode und sind in der porösen Polyacrylamidmatrix trennbar. Um die Proteine in scharfe Banden auftrennen zu können, wird am häufigsten die von Laemmli eingeführte diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese verwendet. Die Porengrösse variiert durch den Einsatz von Acrylamid und

Methylenbisacrylamid (Quervernetzer) in unterschiedlichen Konzentrationen. Die Gele werden in eine BioRad- Giessvorrichtung gegossen. Davor wurden die Lösungen für das Trenn- und das Sammelgel nach folgenden Rezepten hergestellt:

Für 12 %iges Trenngel mit einem Volumen von 60 ml:

Wasser:	24.99 ml
30 % Acrylamid (29.26g Acrylamid, 0.735g N',N'-Methylenbisacrylamid auf 100ml Lösung):	18.75 ml
1.5M Tris pH 8.8:	15.00 ml
10%SDS:	0.60 ml
10% APS:	0.60 ml
TEMED:	0.06 ml

Für 5 %iges Sammelgel mit einem Volumen von 10ml:

Wasser:	6.04 ml
30 % Acrylamid:	1.25 ml
0.5M Tris pH 6.8:	2.50 ml
10%SDS:	0.10 ml
10% APS:	0.10 ml
TEMED:	0.01 ml

Die Polymerisationsreaktion wird durch Ammoniumpersulfat (APS) eingeleitet. Ammoniumpersulfat zerfällt zu Sulfatradikalen, welche die Doppelbindungen von Acrylamid aufbrechen und damit die Polymerisation einleiten. Tetramethylethylendiamin (TEMED) stabilisiert die freien Radikale und wirkt dadurch als Katalysator.

Nach dem Auftragen der vorbereiteten Proben auf das Gel wird die Laufkammer an eine Spannungsquelle angeschlossen und 120V eingestellt.

#### **3.1.1.5.2 Färbung der Gele**

Nach der Trennung der Proteine im elektrischen Feld werden diese gefärbt. Zwei Verfahren wurden verwendet:

##### **3.1.1.5.2.1 Silberfärbung von Proteingelen**

Das  $\text{Ag}^+$  - Ion bildet Komplexe mit den Glu-, Asp-, und Cys- Resten der Proteine. Alkalisches Formaldehyd reduziert das  $\text{Ag}^+$  der Komplexe zu Ag. Der Vorteil der Silberfärbung liegt in ihrer hohen Empfindlichkeit. Der Reduktionsschritt mit Thiosulfat setzt die Nachweisgrenze auf 50 – 100 pg Protein pro Bande herauf.

Die Färbung läuft wie beschrieben ab:

60 Minuten lang wird das Gel in 300 ml 10% Eisessig / 30% EtOH auf einer Wippe bei RT inkubiert. Die Lösung wird durch eine Mischung aus 12.3 g Na-Acetat, 90 ml EtOH, 6 ml 25%iges Glutaraldehyd, 0.6 g Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 300 ml H<sub>2</sub>O ersetzt und 30 Minuten auf der Wippe inkubiert. Danach wird es 3x30 Minuten mit bidestilliertem H<sub>2</sub>O gewaschen. Eine Lösung aus 0.3 g AgNO<sub>3</sub>, 162 µl 37%iges Formaldehyd in 300 ml H<sub>2</sub>O wird hinzugegeben, gefolgt von 3mal Waschen mit bidestilliertem H<sub>2</sub>O. Im Anschluss wird in einer Lösung aus 7.5 g NaCO<sub>3</sub>, 90 µl 37%iges Formaldehyd, 300 ml H<sub>2</sub>O, pH 11.5, 5 bis 10 Minuten inkubiert. Die Färbungsreaktion wird mit 300 ml 0.05 M EDTA beendet und es wird 3x je 20 Minuten mit bidestilliertem H<sub>2</sub>O gewaschen.

#### **3.1.1.5.2 Coomassie Brillant Blau R250**

Diese Methode wird bei Proteinmengen oberhalb 1 µg/Bande empfohlen. Die unteren Nachweisgrenzen liegen bei 200-400 ng Protein pro Bande. Das Gel wird in 7% Essigsäure für 10 Minuten fixiert. Nach dem Waschen wird das Gel für 30 Minuten in Coomassie- Lösung auf einer Wippe gefärbt. Um die Proteinbanden sichtbar zu machen, muss der nicht an Protein adsorbierte Farbstoff aus dem Gel herausgelöst werden. Dafür wird das Gel in einer Lösung aus 10% Ethanol und 10% Essigsäure entfärbt.

#### **3.1.1.5.3 Trocknen der Gele**

Standardprotokoll: Die Gele werden 2 Stunden bei 70°C unter Vakuum getrocknet.

#### **3.1.1.5.4 Westernblot**

Die in der SDS-PAGE separierten Proteine werden auf eine Nitrocellulosemembran elektrotransferiert. Die Membranen binden die Proteine durch hydrophobe Nitrocellulose oder hydrophobe und ionische Wechselwirkungen. Das Gel wird für 10 Minuten in Blotpuffer (48mM Tris, 40mM Glycin, 20% v/v Methanol, 0.375% SDS) equilibriert. Die Nitrocellulosemembran wird durch Methanol aktiviert. Die Halbtrockenzelle von BioRad wurde als Blotkammer verwendet. Die Kammer blottet 0.75 mm dicke Gele innerhalb von 15-20 Minuten bei einer Stromdichte von 0,8 mA/cm<sup>2</sup>. Die Spannung steigt unter diesen Bedingungen von anfänglich 5 V auf 10 – 15 V.

Nach dem Elektrotransfer wurde die Membran mit PBS gewaschen und anschließend kurz in Ponceau - Lösung inkubiert. Die Proteinbanden auf der Membran werden durch den Farbstoff rot angefärbt. Durch diese Färbung kann man erkennen, ob der Transfer

erfolgreich war. Anschließend wurde die Membran mit 3% BSA in TBS/Tween behandelt, um freie unspezifische Bindungsstellen zu blockieren.

#### **3.1.1.5.5 Immunezymologische Detektion (Immunfärbung)**

Die geblotteten Antigene lassen sich mit Antikörpern anfärben. Die Membran wird für eine Stunde in 25 ml Blockierungslösung (RotiBlock) inkubiert. Danach wird sie für eine weitere Stunde mit dem primären Antikörper inkubiert. Nach der Antikörperinkubation wird die Membran 3x für 10 Minuten mit Waschpuffer (1xPBS / 0.2% Tween 20) gewaschen, und der sekundäre Antikörper für 45 Minuten auf der Membran inkubiert. Nach diesem Schritt wird die Membran 4x 10 Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Das ECL - Reagenz (0.5% Lsg.A, 0.5 ml Lsg.B zuvor gemischt) wird auf die Membran verteilt und für eine Minute inkubiert. Die mit dem sekundären Antikörper konjugierte Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol mit Hilfe des von Wasserstoffperoxid abgespalteten Sauerstoffradikal und löst damit eine Chemiluminiszenz aus. Die Lichtemission führt nach Entwicklung des Röntgenfilms zu einer Schwärzung auf dem Film.

### **3.1.2 Methoden zur Trennung und Bestimmung von Proteinen**

#### **3.1.2.1 Konventionelle Reinigungsmethoden**

Die Chromatographien wurden mit der ÄKTA - Anlage und / oder per Hand durchgeführt. 1ml Säulen mit unterschiedlichen Füllungen wurden verwendet. Die Bedingungen wurden für jeden Versuch adaptiert und optimiert und in den Abschnitt Ergebnisse (Konventionelle Reinigungsmethoden - 4.3.4) beschrieben.

Als Startpuffer dienten im Allgemeinen 10-50 mM Natriumphosphat pH 7 bzw. Tris-HCl pH 7.4 bis pH 8.5 bzw. Natriumacetat pH 5.5 und 0,04% Detergenz. Die Equilibration jeder Säule sowie die Chromatographie liefen im Startpuffer bei Flussrate von 1 ml/Min ab. Das Volumen der Fraktionen betrug insgesamt 0,5 ml bis 1.5 ml. Die Elution erfolgte mittels einem erzeugten linearen NaCl- Gradienten. Die Chromatographien wurden mit frisch hergestellten Hirnextrakten aus der mit Natriumcarbonat gewaschenen Membranfraktion aus der Differenzialzentrifugation (Pellet 50.000xg bzw. 100.000xg) durchgeführt.

##### **3.1.2.1.1 Ionenaustauscherchromatographie (IC)**

Bei der Ionenaustauscherchromatographie (IC) binden Proteine durch elektrostatische Wechselwirkungen an eine unlösliche und chemisch inerte Matrix. Die Matrix trägt positiv geladene (Anionenaustauscher) oder negativ geladene Gruppen (Kationenaustauscher). Ausmaß und Stärke der Bindung eines Proteins an den Ionenaustauscher hängt von pH und Ionenstärke des Puffers, dem isoelektrischen Punkt des Proteins und der Dichte der Ladungen auf der Matrix ab.

###### **3.1.2.1.1.1 SP- Sepharose**

Die SP- Sepharose enthält Sulfopropyl – Gruppe, die ein starker Kationenaustauscher ist, und wird zur Trennung von basischen und neutralen Proteinen eingesetzt. 1ml- Säulen wurden verwendet. Der Puffer bestand aus 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 und 0.04 % Chaps. Die Flussrate des Durchbruchs, der Waschfraktionen und der Elutionsfraktionen wurde auf 1 ml pro Minute eingestellt. Die Bedingungen sind im Kapitel Versuche und Ergebnisse, Punkt 4.3.4.1, näher beschrieben.

### 3.1.2.1.1.2 Q - Sepharose

Die Q- Sepharose enthält Quaternary- Amino – Gruppen. Diese ist ein starker Anionenaustauscher und wird zur Fraktionierung saurer und neutraler Proteine verwendet. Die Bedingungen sind im Kapitel Versuche und Ergebnisse, Punkt 4.3.4.2, näher beschrieben.

### 3.1.2.1.1.3 CM - Sepharose

Die CM- Sepharose enthält Carboxymethyl– Gruppen. Diese ist ein schwacher Kationenaustauscher, welcher zur Fraktionierung von basischen und neutralen Proteinen genutzt wird.

### 3.1.2.1.2 Größenausschlusschromatographie (GC)

Durch die Gelfiltration, auch unter dem Namen Größenausschlusschromatographie bekannt, werden Moleküle nach ihrer Größe und Form getrennt. Die mit 0.5 % Triton X-100 solubilisierte Membranfraktion aus Rinderhirn wurde im 40 mM Natriumphosphat pH 6.8 gelöst. Das Eluens bestand aus 50 mM Natriumphosphat pH7, 150 mM Natriumchlorid und 0.5 % TX-100 und floss mit einer Geschwindigkeit von 0.5 ml pro Minute. Die Experimente wurden unter Verwendung von Superdex G-200 HR 10/30 und Superose 6 HR 10/30 Säulen (Pharmacia) durchgeführt.

#### 3.1.2.1.2.1 Superdex G-200 HR 10/30

Der Matrixaufbau besteht aus Dextran, vernetzt mit Epichlorhydrin und trennt Proteine zwischen 5 kD und 600 kD. Der für die Superdextran G-200 - Säule typische Verteilungskoeffizient  $K_d$ , wurde durch Kalibrierung bestimmt, um das Molekulargewicht der Acetyltransferase zu bestimmen. Als Kalibrierungsstandards wurden Thyroglobulin (669kD), Ferritin (440 kD), Katalase (232 kD) und BSA (67kDa) benutzt. Das Elutionsvolumen  $V_e$  einer bestimmten Substanz hängt vom Lösungsmittelvolumen zwischen den Gelperlen  $V_o$  (Leervolumen), vom Verteilungskoeffizienten und vom Lösungsmittelvolumen im Inneren der Gelperlchen  $V_i$  ab. Es gilt  $V_e = V_o + K_d V_i$ . Das innere Volumen  $V_i$ , lässt sich aus dem bekannten Trockengewicht des Gels und dem Wasseraufnahmewert berechnen. So entsteht die Gleichung:

$$K_d = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

Die Werte für die verwendete Superdextran - Säule betragen für das Totalgelperlchenvolumen  $V_t = 23.56$  und für das Leervolumen  $V_o = 7.51$ . Die

Berechnung des Molekulargewichts der L-Aspartat-N-Acetyltransferase ist in der Tabelle dargestellt und in Abschnitt Versuche und Ergebnisse, Punkt 4.3.4.7, beschrieben.

	Elutionsvolumen $V_e$ in ml	Molekulares Gewicht in Da	Differenz zwischen Elutions- u. Leervolumen	Logarithmus von molekularem Gewicht (MW)	Verteilungskoeffizient $K_d$
Thyroglobulin	8	669000	0,49	5,83	0,03
Ferritin	9,6	440000	2,09	5,6	0,13
Katalase	11,3	232000	3,79	5,37	0,24
BSA	13,1	67000	5,59	4,82	0,35
<b>ANAT</b>	10,5	<b>316228</b>	2,99	5,5	0,19
Dextran, Blau			Leervolumen = 7.51		

### 3.1.2.1.2 Superose 6 HR 10/30

Superose 6 HR trennt Proteine zwischen 5 kD und 5000 kD.

### 3.1.2.1.3 Affinitätschromatographie

#### 3.1.2.1.3.1 Reaktivfarben- Affinitätschromatographie

Die Farben sind in der Matrix immobilisiert. Die Säulen haben eine Protein-Bindungskapazität von ca. 20 mg/ml. Sechs bis sieben mg Protein, entsprechend einem ml Probenvolumen vom 1 %igen Octylglucosid-Extrakt, wurden auf 1-ml-Säule geladen. Es wurde mit folgenden Reaktivfarben - Affinitätssäulen experimentiert: Yellow 86, Blue 3 G A, Brown 10, Red 120, Blue 4, Green 19. Der Equilibrierungspuffer (Waschpuffer) bestand aus 50 mM Tris-HCl pH 7.4 und 0.04% OctGlc. Die als Gradienten verwendeten Elutionspuffer enthielten 300 mM NaCl bzw. 600 mM NaCl.

#### 3.1.2.1.3.2 Concanavalin A Chromatographie

Diese Methode gehört zu der Lektinchromatographie. Lektine sind Proteine, die reversibel Mono- und Polysaccharide bzw. die Zuckerreste von Glykoproteinen binden. Concanavalin A bindet Moleküle, die  $\alpha$ -D-Mannose,  $\alpha$ -D-Glucose besitzen. Gute Ergebnisse gibt hin und wieder das Hintereinanderschalten zweier verschiedener Lektinsäulen. Die Concanavalin A -Säule benötigt  $Mn^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  als Cofaktoren und einen hohen Salzgehalt (0.2-0.5 M NaCl).

Der Ausgangspuffer bestand aus: 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.5 M NaCl und 0.04 % Octylglucosid. Der Bindungspuffer/ Waschpuffer wurde daraus durch die Zugabe von 1mM  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  gewonnen. Der Elutionspuffer enthielt 0.1 M Methylmannoside bzw. 0.1 M Borat - Puffer pH 6.5. Die Chromatographie wurde bei 20°C sowohl auch bei 4°C durchgeführt.

### **3.1.2.1.3.3 Heparin-Säule**

Die Heparin- Sepharose- 6- Chromatographie dient zur Reinigung der Endonucleasen, Koagulationsfaktoren, Lipasen, DNA-Bindungsproteine, Wachstumsfaktoren, Lipoproteine und Steroidenfaktoren. Die Chromatographie - Bedingungen werden im Kapitel Versuche und Methoden beschrieben.

### **3.1.2.1.4 Andere Chromatographien**

#### **3.1.2.1.4.1 Hydroxylapatit (HA)**

Die Hydroxylapatit (HA) - Chromatographie wird oft als letzter Schritt verwendet. Die Reinigungsfaktoren sind 2-5 und die Ausbeuten mäßige 40-60%. Die HA-Chromatographie ist besonders gut für saure Proteine geeignet. Hydroxylapatit ist ein Calciumphosphatmineral, welches Proteine über zwei Mechanismen bindet: Basische Proteine binden über ihre Aminogruppen an die negative Oberflächenladung des Minerals, also über elektrostatische Wechselwirkungen. Saure Proteine bilden über ihre Carboxylgruppen Komplexbindungen mit dem  $\text{Ca}^{2+}$  des Minerals. Der Ausgangspuffer bestand aus: 10 mM Natriumphosphat pH 6,8 und 0.04 % OctGlc. Ein Stufengradient wurde mittels Konzentrationen 10 bis 400 mM NaPh hergestellt.

#### **3.1.2.1.4.2 Reversed- Phase –HPLC**

Die Wasser/ Acetonitril- Gradienten der Reversed Phase Chromatographie sind nutzbringend beim Reinigen von Peptiden und kleinen Proteinen. Die empfindliche Reversed-Phase-HPLC-Säule (HPLC - High Performance Liquid Chromatography) besitzt gute Trennfähigkeit und wird ebenfalls als Entsalzungs- und Konzentrierungsmethode verwendet. Die gewonnene salzfreie Fraktion ist unmittelbar zur Massenbestimmung im Maldi-TOF einsetzbar. Das Säulenmaterial besteht aus porösen Silicapartikeln, die in der Regel mit n- Alkylketten beschichtet sind. Peptide bzw. Proteine adsorbieren an die hydrophobe Oberfläche. Das Verfahren wurde für Aspartoacylase – Konzentrierung und - Entsalzung verwendet (s. Versuche und Methode – Abschnitt Spezifität).

### **3.1.2.1.4.3 Ni-NTA Affinitätschromatographie**

“QIAexpress Protein Purification System“ ist für Reinigung von 6xHis-tagged- Proteinen geeignet. Die Ni-NTA- Affinitätschromatographie wurde zur Reinigung der bakteriell exprimierten Aspartoacylase verwendet. Die cDNA des Proteins wurde in dem Vektor pQE – 80L zwischen den Spaltstellen der Restriktionsendonukleasen BamHI und HindIII ligiert. Das Fusionsprotein enthält eine Sequenz aus 6xHistidin-Resten, was die Immobilisation des Proteins an Nickel- Nitriltriessigsäure- haltigen Oberflächen erlaubt. Es wurde Ni-NTA-Agarose von QIAGEN mit einer Bindungskapazität von 5 - 10 mg 6xHis-tagget Proteine pro 1ml Agarose verwendet. Die Prozedur wurde unter nativen Bedingungen durchgeführt: 1ml Ni-NTA- Agarose wurde 2mal mit jeweils 10 ml Lysispuffer (100 mM Tris-Hcl pH7.6, 500 mM NaCl, 1mM -Mercaptoethanol, 2 mg/ml Aprotinin und 1 mM PMSF) equilibriert und anschließend mit dem BL21/ASPA-Überstand eine Stunde lang bei 4°C inkubiert. Nach dem Durchbruch (flow trough Fraktion) wurde die Säule mit Lysispuffer gewaschen. Die erste Elution erfolgte mit 80 mM Imidazol in Lysispuffer, die zweite Elution - mit 200mM Imidazol in Lysispuffer. Der Inhalt aller Fraktionen wurde mit SDS-PAGE und Proteinbestimmung analysiert sowie auf Aspartoacylaseaktivität untersucht. Aliquots von den E80- und E 200- Elution-Fraktionen wurden ebenfalls dialysiert und auf Aspartoacylase - Aktivität überprüft. Es wurden die folgenden zwei Dialysepuffer verwendet. Erster Dialysepuffer: 50 mM Tris-HCL; pH8, 50 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>. Zweiter Dialysepuffer: 50 mM Tris-HCl pH8.0, 50 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1 mM DTT, 1 % TX-100.

### **3.1.2.1.4.4 Dünnschichtchromatographie (TLC)**

#### **3.1.2.1.4.4.1 Dünnschichtchromatographie**

Die Dünnschichtchromatographie gehört zu den Chromatographien, bei denen eine Trennung organischer Moleküle, hier Aminosäuren und relevanter Substanzen, auf einer Kieselgel- Platte möglich ist.

Nach der Durchführung der Acetyltransferase- Reaktion wurden 14 µl aus dem Reaktionsgemisch auf die Startlinie einer HPTLC-Alufolie (Kieselgel 60 der Firma Merck) tropfenweise aufgetragen. Nach dem Trocknen wurde die Platte in eine Chromatographie – Kammer gestellt, die etwas Laufmittel enthält. Angesogen von Kapillarkräften wandert das Laufmittel auf der Platte hoch. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Probesubstanzen wird von ihrer Verteilung zwischen stationärer Phase (hydrophilem Kieselgel) und mobiler Phase (hydrophobem Laufmittel) bestimmt.

Für die Trennung des N-Acetyl-L-Aspartats als Enzymprodukt von dem Aspartat wurden folgende Laufmittel verwendet:

- ① Mischung aus: Chloroform, Methanol und Essigsäure im Verhältnis 90 : 10 : 50 bzw.
- ② Mischung aus: Methanol, Ameisensäure und Chloroform im Verhältnis 30 : 5 : 65.

Die Dauer der Chromatographie wurde auf 20 Minuten optimiert. Nach dem Verdunsten des Laufmittels können die getrennten Substanzen durch geeignete Färbemethoden oder physikalische Verfahren sichtbar gemacht werden. Wenn ein radioaktiv markiertes Substrat, [<sup>14</sup>C]-Asp bzw. [<sup>14</sup>C]-Acetylcoenzym A, in der Reaktionsmischung verwendet wurde, wurde die Kieselgelplatte unter einer Phosphorimager-Platte zum Exponieren über Nacht gelassen. Die Platte diente anschließend zur quantitativen Analyse des Enzymprodukts.

Zum Nachweis der Aspartat-Acetyltransferasespezifität wurden die Citrat - Zyklus - Metaboliten zusammen mit dem N-Acetyl-L-Aspartat, dem Aspartat und dem Glutamat dünn-schichtchromatographisch getrennt und ihre R<sub>f</sub>-Werte (relative Laufstrecken) ausgewertet. Die getrennten Metaboliten wurden mit 0.25 % Ninhydrin in Aceton gefärbt. Im Laufmittel aus Methanol, Ameisensäure und Chloroform im Verhältnis 30 : 5 : 65 wanderte das N-Acetyl-L-Aspartat auf eine Höhe mit dem Faktor R<sub>f</sub> 0.8, im Gegensatz zu dem Oxalacetat, welches den Faktor R<sub>f</sub> 0.7 besass. Die Methode wurde zur Bestimmung der Acetyltransferasespezifität angewandt.

#### **3.1.2.1.4.4.2 Bidimensionale Dünnschichtchromatographie**

Zum Enzymspezifitätsnachweis wurde Bidimensionale Dünnschichtchromatographie eingesetzt, wobei zwei nacheinander folgende Chromatographien in senkrechten Richtungen durchgeführt wurden. Die mit dem Aspartat, Glutamat, N-Acetyl-L-Aspartat und N-Acetylglutamat gemischten Citrat-Zyklus-Metaboliten wurden mittels bidimensionaler Dünnschichtchromatographie getrennt, und ihre relativen Laufstrecken - Koeffiziente wurden mit den R<sub>f</sub> - Werten der einzelnen Substanzen verglichen. Die erste Dimension der Dünnschichtchromatographie, welche für Citrat-Zyklus-Metaboliten geeignet ist, erfolgte im Laufmittel aus Methanol, Ameisensäure und Chloroform im Verhältnis 3 : 1.2 : 95.8. Nach dem Trocknen der Dünnschichtplatte wurde die zweite Dimension in einem Laufmittel aus Ether, Ameisensäure und Petroleum Ether im Verhältnis 3.7 : 2.4 : 93.9 durchgeführt. Es folgten eine Färbung mit 0.25 % Ninhydrin in Aceton sowie eine Phosphorimager - Analyse des radioaktiv markierten N-Acetyl-L-Aspartats. N-Acetyl-L-Aspartat und Oxalacetat können sowohl durch Mono- als auch durch Bidimensionale Dünnschichtchromatographie gut getrennt werden.

### 3.1.2.2 Bestimmung der Enzymaktivitäten

#### 3.1.2.2.1 L-Aspartat-N-Acetyltransferase - Reaktion

Das Enzym L-Aspartat-N-Acetyltransferase (ANAT; EC 2.3.1.17) katalysiert die Übertragung eines Acetylrestes von Acetyl-Coenzym A auf L-Aspartat. Die L-Aspartat-N-Acetyltransferase-Reaktion wurde etabliert. Der Nachweis der Enzymaktivität erfolgt in der Regel mit radioaktiv markiertem Aspartat. Acetyliertes Aspartat (Rf 0.7-0.8) lässt sich vom nicht acetylierten Aspartat (Rf. 0.2-0.3) dünnschichtchromatographisch trennen. Wird nicht radioaktives Aspartat und in der Acetyl-Gruppe radioaktiv markiertes Acetyl-CoA verwendet, so kommt es zur Bildung einer auf gleicher Höhe laufenden Bande. Nach der Dünnschichtchromatographie erfolgt die Quantifizierung der Radioaktivität von Aspartat und N-Acetyl-Aspartat, so dass die Radioaktivität in einer Berechnung der Enzymaktivität in Einheiten ausgedrückt werden kann. Das radioaktiv markierte Aspartat besaß eine spezifische Aktivität von 207 mCi/mmol (1.48 mCi/mg) sowie eine radioaktive Konzentration von 50 µCi/ml (1.85 MBq/ml). In der Enzymreaktion wurde 500 pmol [<sup>14</sup>C]-Aspartat absolute Menge verwendet. Die Reaktion wurde im 40 mM Natriumphosphatpuffer pH 6.8 bei 37°C durchgeführt. Die dazugegebenen Substratlösungen enthielten [<sup>14</sup>C]-Aspartat bzw. [<sup>14</sup>C]-Acetyl-CoA. Das Gesamtreaktionsvolumen betrug 20 µl und die Dauer der Reaktion variierte von 20 bis 40 Minuten. Die Enzymreaktion wurde mit absolutem Ethanol in Volumen 1:1 (20 µl) beendet. Die Probe wurde 2 Minuten lang bei 13.000xg abzentrifugiert. 14 µl von dem Reaktionsvolumen wurden unmittelbar entnommen und auf eine Dünnschichtchromatographie - Platte aufgetragen. Die Chromatographie dauerte 20 Minuten, anschließend wurde die Dünnschichtchromatographie - Platte getrocknet und unter eine Phospho-Imager-Platte für 12-16 Stunden gelegt. Diese wurde quantitativ analysiert und daraus die Acetyltransferaseaktivität berechnet.

Die Definition der L-Aspartat-N-Acetyltransferase - Aktivität in der Einheit mU/ml berechnet sich aus der Menge des gebildeten N-Acetyl-L-Aspartats. Nmol N-Acetyl-L-Aspartat pro ml Volumen werden mit 1000 multipliziert und durch die Reaktionsdauer in Minuten dividiert. Die Berechnung, wieviel Prozent N-Acetyl-L-Aspartat von den insgesamt 0.5 nmol Aspartat acetyliert wurden, erfolgt durch die quantitative Analyse im Phospho-Imager-Programm AIDA. Die Intensität (PLS) der radioaktiven N-Acetyl-L-Aspartat - Bande wird durch die Summe der Aspartat- und N-Acetyl-L-Aspartat-Intensitäten (PLS) dividiert, das Ergebnis in Prozent umgerechnet und mit dem 0,5 nmol Aspartat multipliziert.

Die spezifische L-Aspartat-N-L-Aspartat-N-Acetyltransferase - Aktivität wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Spezifische Aktivität} = \frac{\text{Biologische Einheiten des Proteins (mU)}}{\text{mg Protein}}$$

Zur Bestimmung der gesamten L-Aspartat-N-Acetyltransferase – Aktivität wurde das Volumen der jeweiligen Fraktion berücksichtigt:

$$\text{Gesamte Aktivität (mU)} = \text{mU/ml} \times \text{Volumen der Fraktion (ml)}$$

### **L-Aspartat-N-Acetyltransferase – Kinetik**

Mit der Hilfe des Massenwirkungsgesetzes und unter Berücksichtigung der Tatsache, dass beim Gleichgewicht,  $[E]_g = [E] + [ES]$ , die Konzentration  $[ES]$  des Enzym-Substrat-Komplexes als eine Funktion von der Konzentration des Substrates  $[S]$  ausgedrückt werden kann, wird die Grundgleichung der Enzymkinetik, die Michaelis- Menten-Gleichung berechnet und dadurch die Geschwindigkeit der enzymatischen L-Aspartat-N-Acetyltransferase - Reaktion bestimmt.

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]},$$

wobei  $V_0$  die Anfangsgeschwindigkeit,  $V_{\max}$  die Maximalgeschwindigkeit und  $K_m$  die Michaelis- Konstante darstellen.

Bei der Substratkonzentration  $[S] = K_m$  gilt die Gleichung  $V_0 = V_{\max} / 2$ . Die Michaelis-Konstante ( $K_m$ ) stellt also die Substratkonzentration dar, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Hälfte ihres Maximalwertes liegt, und die Affinität des Enzyms zu seinem Substrat charakterisiert. Die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Aspartat- sowie Acetylcoenzym A - Substratkonzentration wurde für die mikrosomale Hirnfraktion bestimmt.

### **3.1.2.2.2 Aspartoacylase – Reaktion**

Die Aspartoacylase (ASPA) hydrolysiert das N-Acetyl-L-Aspartat in L-Aspartat und Acetat. Die Aspartoacylase – cDNA wurde kloniert, und das Enzym wurde exprimiert und anschließend gereinigt. Die optimalen Bedingungen der Aspartoacylase- Reaktion wurden etabliert: 50 mM Tris-HCl pH8.0, 50 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1 mM DTT, 0.1 % TX-100, 0.5 mg/ml BSA, 3 mM N-Acetyl-L-Aspartat, 140 pmol [<sup>14</sup>C]-N-Acetyl-L-Aspartat. Die Reaktionsinkubationszeit lag in dem Bereich von 20 bis zu 40 Minuten. Das Reaktionsvolumen betrug 100 µl. Die Aspartoacylase - Reaktion wurde bei 37°C durchgeführt. Die Enzymreaktion wurde mittels zwei minütiger Zentrifugation bei 13.000xg beendet. Der Überstand wurde entnommen und 14 µl davon wurden auf die Dünnschichtchromatographie-Platte aufgetragen.

1mU der Aspartoacylase (ASPA)- Aktivität wird als ein nmol gebildetes Aspartat pro Minute Inkubationszeit definiert.

### **3.1.2.2.3 Gekoppelte Enzymreaktionen:**

#### **L-Aspartat-N-Acetyltransferase- und Aspartoacylase- Reaktion**

L-Aspartat-N-Acetyltransferase- und nachfolgende Aspartoacylase – Reaktion wurden für den Nachweis der N-Acetyl-L-Aspartat-Spezifität benötigt. Die optimalen Bedingungen für die Durchführung der einzelnen Enzymreaktionen sind mit den oben beschriebenen identisch. Zuerst wurde die L-Aspartat-N-Acetyltransferase-Reaktion mit dem radioaktiv markierten [<sup>14</sup>C]-Aspartat 30 – 40 Minuten lang bei 37°C durchgeführt. Die Reaktion wurde nicht unter Zugabe von EtOH beendet, sondern durch fünf-minütige Denaturierung der Probe bei 95°C, um die Enzyme zu deaktivieren. Nachdem die Probe abgekühlt war, wurde der Aspartoacylase – Reaktionsansatz hinzugefügt und die zweite Aspartoacylase - Enzymreaktion durchgeführt. Für die Aspartoacylase - Reaktion wurde kein radioaktiv markiertes N-Acetyl-L-Aspartat dazugegeben. Die Aspartoacylase hydrolysiert das aus der ersten Acetyltransferase – Reaktion acetylierte Aspartat ([<sup>14</sup>C]-NAA). Die zweite Enzymreaktion dauert 20 - 40 Minuten bei 37°C. Nach der anschließenden Zentrifugation werden die Enzymprodukte dünnschichtchromatographisch getrennt.

### 3.1.2.2.4 Spezifische Organellenmarker - Leitenzyme

#### 3.1.2.2.4.1 Das Leitenzym von Lysosomen – $\beta$ Hexosaminidase

Die Aktivität des Leitenzyms der Lysosomen -  $\beta$ -Hexosaminidase ( $\beta$ -Hex) wurde bestimmt. Die  $\beta$ -Hex-Substrat-Lösung bestand aus den folgenden Stoffen: 10 mM p-NPAG (para-Nitrophenyl-N-Acetyl- -D-Glucosaminid), 0.1 M Na-Citrat, pH 4.6, 0.2 % BSA, +/- 0.3 % TX-100. Für die Tests wurden 200  $\mu$ l  $\beta$ -Hex-Substrat-Lösung mit 20  $\mu$ l Probe vermischt und bei 37°C inkubiert. Die Inkubationsdauer wurde für jeden Versuch optimiert und betrug jeweils zwischen 5 und 30 Minuten. Die Reaktion wurde mit 1 ml 0.4 M Glycine, pH 10.4, abgebrochen. Die optische Dichte wurde bei 405 nm Wellenlänge gemessen. Die Enzymaktivität bleibt bei Einfrieren und Auftauen stabil.

Die  $\beta$ -Hexosaminidase - Aktivität (in mU pro ml) wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{mU / ml} = \frac{\text{Gesamtvolumen (in ml)} \times 1000 \times E_{405}}{\text{Mol.Ex.Koeff.} 18.5 \times \text{Probenvolumen (in ml)} \times \text{Inkubationszeit in Min.}}$$

#### 3.1.2.2.4.2 Das Leitenzym der Mitochondrien – Cytochrom c Oxidase

Die Cytochrom c Oxidase ist das Leitenzym für die inneren mitochondrialen Membranen. Die Substratlösung enthielt 0.24 % Lubrol in KPhi pH 6.8 (6.2 mM di-Kaliumhydrogenphosphat / 33.8 mM Kaliumdihydrogenphosphat), 13.5 mg Cytochrom c in 5 ml KPhi, reduziert durch die Zugabe von 60  $\mu$ l Natrium Hydrosulfit in 10 mg/ml Kphi. Die Cytochrome c – Lösung muss frisch hergestellt und während der Messungen in einem luftdichten Behälter bei 4°C aufbewahrt werden. Das Verhältniss der Werte bei OD550 : OD565 muss zwischen 6 und 9 liegen. Die Reaktion wurde in der Küvette bei 20°C durchgeführt. Die Zutaten werden innerhalb von 10 Sekunden in der folgenden Reihenfolge vermischt: 900  $\mu$ l Lubrol/Kphi, 100  $\mu$ l reduziertes Cytochrom c, 90  $\mu$ l 0.25 M Saccharose, 10  $\mu$ l Probe. Die Oxidation des Cytochroms c wird bei der Wellenlänge von 550 nm 10 Sekunden lang spektrophotometrisch aufgeschrieben. Die Veränderung der Extinktion während der Messung wird in  $\Delta E/\text{min}$  umberechnet.

Die Konzentration der Cytochrom c – Oxidase wird wie folgt berechnet:

$$\text{Enzymkonzentration} = \frac{\Delta E/\text{min}}{\epsilon^M_{550} \times M^{-1} \times \text{cm}^{-1}}$$

Für den Molar Extintionskoeffizient gilt  $\epsilon^M_{550} = 18.500 \times M^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ .

## **3.2 Physikalische und chemische Verfahren**

### **3.2.1 Refraktometrie**

Refraktometrische Analyse der Saccharose – Dichtegradienten – Lösungen wurde mittels Routinemessungen im Abbe – Refraktometer durchgeführt. Die Dichte (g/ml), die Molarität (mol/l) und der gemessene refraktometrische Index der Saccharose – Lösungen wurden untersucht.

### **3.2.2 Chemische Synthese von [<sup>14</sup>C]- N-Acetyl-L-Aspartat**

1.24 mg Aspartat wurden mit 75 µl Wasser und 50 µl [<sup>14</sup>C]-Asp (50 µCi/ml) gemischt. Die chemische Reaktion wurde durch die Zugabe von 500 µl Acetic Anhydrid ausgelöst. 500 µl Wasser wurden zugegeben und die Probe wurde geschüttelt, bis nur eine einzelne Phase bleibt. Die Essigsäure wurde durch Zentrifugieren im Vakuum verdampft. Das neugebildete [<sup>14</sup>C]- N-Acetyl-L-Aspartat wurde in 150 µl Wasser gelöst. Die spezifische Konzentration des [<sup>14</sup>C]-N-Acetyl-L-Aspartat betrug 70-80 nmol/ml (berechnet auf Basis der bekannten [<sup>14</sup>C]-Aspartat- Konzentration und bestätigt durch die Phosphoimager- Analyse).

Die Synthese von nicht radioaktivem N-Acetyl-Aspartat wurde nach dem selben Protokoll gestaltet, lediglich im 10-fachen Volumen der Substanzen. Das nicht radioaktive N-Acetyl-L-Aspartat wurde in HPLC analysiert und mit fertig gekauftem N-Acetyl-L-Aspartat verglichen, um das Syntheseprotokoll zu überprüfen und zu bestätigen.

### **3.2.3 Phosphoimager**

Die Dünnschichtchromatographie - Platte wurde unter eine Imaging - Platte zur Exposition gelegt und anschließend im Phosphoimager analysiert. Die Funktion der Imaging - Platte ist Phosphor - Strahlungsenergie zu speichern und nach dem Scannen die Energie als Lumineszenz freizugeben.

Das Prinzip basiert auf der Plattenstruktur. Die Imaging - Platte besteht aus 5 µm-kleinen Ionkristallen, gebildet aus Barium Fluorobromid um bi-valentes Europium als Lumineszenzzentrum (BaFBr:Eu<sup>2+</sup> ). Die obere Schicht besteht aus Polyester. Die Energie des radioaktiven Isotops führt zu Eu<sup>3+</sup> und die befreiten Elektronen treten in die Br-Ionen ein. Sie formen Farbzentren. Bei Erregung des Lasers absorbieren diese Farbzentren die Energie, und das Europium wandelt sich in seine bi-valente Form um.

### **3.3 Desoxyribonukleinsäure (DNA)**

#### **3.3.1 Routine Methoden**

##### **3.3.1.1 DNA - Fällung**

Die DNA - Fällung dient ebenfalls zur Konzentrierung und Abtrennung der Nukleotiden von Salzen. Diese Methode wurde verwendet, um bereinigtes Aspartoacylase-PCR-Produkt zu erhalten. Das PCR-Produkt wurde mit Natriumacetat pH 5.2 und absolutem Ethanol im Volumenverhältnis 10 : 1 : 20 vermischt. Die Mischung wird eine Stunde bei - 80°C inkubiert, danach 40 Minuten bei 15.000xg und 4°C zentrifugiert. Das dabei gewonnene Pellet enthält DNA, welche weiterverarbeitet wird.

##### **3.3.1.2 DNA - Waschen**

Das Pellet wird 2 mal mit 200- 500 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen und wie unter Punkt 3.1.1 erläutert zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt, das Pellet bei 20°C getrocknet und in 16 µl destilliertem Wasser 5 Minuten lang bei 20°C gelöst.

##### **3.3.1.3 DNA - Verdauen**

Das Aspartoacylase-PCR- Produkt und das Plasmid wurden, um die nachfolgende Ligation zu ermöglichen, mittels der Restriktionsenzyme BamH I und Hind III verdaut: Zu 16 µl PCR-cDNA gefälltem Produkt wurden 2 µl 10 x Reaktionspuffer (geeignet für beide Restriktionsendonucleasen<sup>1</sup>) sowie 1 µl Hind III (10-20U) und 1 µl BamH I (10-20U) beigefügt. 1,5 µg Plasmid (5µl) wird mit 11 µl Wasser, 2 µl 10X Puffer BamH I, 1 µl Hind III (10U) und 1µl BamH I (10U) vermischt. Dies ergab insgesamt 20 µl Volumen. Die Reaktion verläuft von 1 bis 16 Stunden bei 37°C.

##### **3.3.1.4 Ligation der Plasmid-DNA mit der genomischen DNA**

Das Plasmid pQE-80L und der zu klonierende Abschnitt (amplifizierte ASPA-cDNA), welche durch Restriktionsendonucleasen BamH I und Hind III verdaut wurden, mussten ligiert werden. Der Vektor (pQE-80L) hat eine Länge von 4751 bp, das ASPA-cDNA (Insert) ca. 950 bp. Der Ligationsansatz bestand aus: 20 ng Vektor (enthalten in

---

<sup>1</sup> Eine Einheit Restriktionsendonuclease verdaut 1µg Lambda-DNA vollständig in einer Stunde.

1 µl), 1 µl Insert, 2 µl 10 x Ligationspuffer verdünnt zu 15 µl H<sub>2</sub>O, und 1 µl T4-DNA-Ligase. Die Ligationsreaktion, wobei die Spaltstellen wieder geschlossen wurden, erfolgte bei 16°C mit einer Inkubationszeit von 2 bis 4 Stunden. Es wurde ein neues rekombinantes Plasmid – pQE-80L/ASPA konstruiert, welches für Transformation weiter verwendet wurde.

Zur Kontrolle wurde parallel eine Ligationsprobe nur mit dem Vektor - ohne Insert - durchgeführt.

### **3.3.1.5 Agarosegelelektrophorese**

Die DNA-Fragmenten werden durch Elektrophorese getrennt. Es wurde – entsprechend dem Standardprotokoll für 0.5 bis 7 kb Fragmentlänge – ein 1 %iges Agarosegel in 1 x TAE- Puffer verwendet und mit 0.1 bis 0.5 µg/ml Etidhumbromid (EtBr) gefärbt. Der Intekalator zeigt nach Bindung an DNA unter UV-Licht eine starke Fluoreszenz. Die Farbmarker Bromphenolblau (wandert bei ca. 300bp) und Xylencyanol (bei ca. 3 kb) sind im Probenpuffer enthalten. Die Elektrophorese verläuft bei 50 bis 150 Volt. Dabei durchlaufen die grossen DNA- Fragmente die Agarosegele langsamer als die kleinen Fragmente, in Richtung Anode. Die Proben wurden unter UV- Licht photographiert.

Die selben Lösungen und Bedingungen gelten bei der Präparativen Elektrophorese, bei welcher DNA-Banden aus dem Gel ausgeschnitten werden. Die Größe der DNA-Fragmente wurden mit Hilfe von 5-10 µl DNA- Grössenstandards von Fermentas eingeschätzt.

### 3.3.2 Rekombinante DNA - Techniken

#### 3.3.2.1 PCR ( Polymerase Chain Reaction )

Die Polymerase - Kettenreaktion ist ein wichtiges Verfahren der Gentechnik, mit dem man DNA-Abschnitte vermehrt (amplifiziert).

Als Komponenten werden eine Ausgang- DNA als Template (Schablone), zwei passende Oligonucleotidprimer, die mit jeweils einem der Stränge auf beiden Seiten des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts hybridisieren, Puffer, eine thermostabile DNA-Polymerase, und die vier Desoxynucleosidtriphosphate gebraucht. Das PCR-Programm besteht aus einem Denaturierungsschritt, einem Annealingsschritt und einem Elongationsschritt. Denaturiert wird bei 94°C, dabei trennen sich die beiden Stränge der Template-DNA. Anschließend wird die Temperatur auf 55°C gesenkt, so dass die Hybridisierung der im massiven Überschuss vorhandenen Oligonucleotidprimer an die einzelsträngige Template-DNA erfolgt. Die Temperatur von 72°C ist das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase, und der Primer wird verlängert bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt, die der ursprünglichen Template-DNA genau gleicht. Weil die Komplementierung an beiden Template-Strängen abläuft, hat man in einem Zyklus die Zahl der Template-DNAn verdoppelt. Wiederholt man den Zyklus, erhält man anschließend die vierfache Menge.

#### Protokoll für die DNA - PCR:

2 µl Mausgehirn -cDNA wurden mit je 1µl von den beiden 100 µM Aspartoacylasenprimer gemischt. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind folgende:

*Primer ASPA1:* GCGGATCCACCTCTTGTGTTGCTAAAGAAC

*Primer ASPA2:* GCAAGCTTGCAAAGACTTTTAGGGCAAAG

Der PCR- Reaktionsansatz enthielt noch 10 µl 10 x PCR-Puffer (GIBCO-BRL) einschliesslich 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> , 10 µl 2 mM dNTPs (Endkonzentration 200 µM) und 37 µl Wasser. Nach Erreichen von 80°C Temperatur, im PCR-Gerät, wurden 2 µl Taq-Polymerase (1U/µl) hinzugefügt.

Das PCR-Programm bestand aus 32 Zyklen wie folgt:

3 Minuten	94°C	Denaturierung
30 Sekunden	56°C	Annealing
1 Minute	72°C	Elongation
30 Sekunden	94°C	Denaturierung
10 Minuten	72°C	Polymerisation
unendlich	4°C	PCR- Ende

5 µl PCR-Lösung von insgesamt 100µl Volumen des PCR-Ansatzes wurden in 1 %ige Agarosegelelektrophorese überprüft. Das Aspartoacylase-PCR-Produkt (cDNA für Aspartoacylase II) hat eine Länge von ca. 950 bp.

Die Klonierung der Aspartoacylase – DNA wurde, mittels PCR- verbundener Verfahren, welche in der unten beschriebenen Reihenfolge folgten, durchgeführt:

Die Aspartoacylase - cDNA wurde durch PCR amplifiziert, die DNA durch Fällung gereinigt, dann von Salzen gewaschen, mit BamH I und Hind III verdaut, durch Elektrophorese kontrolliert und gereinigt, aus dem Agarose-Gel extrahiert und ins Plasmid ligiert. Nach der chemischen Transformation von E. coli DH5α, in welcher das rekombinante Plasmid in Gegenwart von Antibiotikum vermehrt wurde, und nachfolgender Ausstreichung der Wirtsbakterien auf einem Petri- Nährboden, wurden Kolonien in mit 5 ml Medium (10 µg Amp pro ml LB- Medium) eingefüllten 15-ml-Röhrchen eingeführt. Anschließend wurden die rekombinanten Plasmide (pQE80L/DNA-Abschnitt) durch Minipreparation isoliert. Die Nukleotidenfolge wurde mittels Sequenzierung überprüft. Der Klon mit der für Aspartoacylase richtigen Sequenz wurde in der für Überexpression von Proteinen geeigneten Kultur E. coli BL21 vermehrt. Die Bakterien wurden pelletiert, durch Ultraschall lysiert und das exprimierte Aspartoacylase-Protein wurde aus dem bakteriellen Extrakt extrahiert und auf weitere Versuche vorbereitet.

### **3.3.2.2 Überprüfung des Erfolgs einer Transformation**

Die Überprüfung, ob eine Transformation mit dem rekombinanten Plasmid erfolgreich war, fand wie folgt statt: Zu 100 µl Über- Nacht- Kultur- Bakterien werden 20 µl L-IV- Puffer und 50 µl Phenol oder Phenol/Chloroform hinzugefügt. Die Zutaten werden 10 Sekunden durch Vortex gemischt und danach eine Minute bei 15.000xg zentrifugiert. 20 µl vom Überstand wurden auf Agarosegel aufgetragen.

### 3.3.2.3 Minipräparation von Plasmid-DNA (Miniprep)

Es wurde das von QIAprep Spin Miniprep Kit empfohlene Protokoll angewandt. Das bakterielle Pellet von 5 ml-über Nacht bei 37°C inkubierter Kultur E.coli wurde in 250 µl Puffer P1/RNase A resuspendiert und vorsichtig mit 250 µl Puffer P2 vermischt. 350 µl von N3 wurden hinzugefügt und sofort vorsichtig gemischt. Die Mischung wurde in Eppendorfgefäßen 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand in QIAprep-Säulchen pipetiert. Nach dem Trocknen wurden die Säulchen mit 750 µl Puffer PE gewaschen. Der PE- Puffer wurde durch eine Minute Zentrifugation entfernt. Die DNA wurde mit 50 µl Puffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) eluiert. Eine Restriktionsanalyse sowie Photometrische Konzentrationsbestimmungen bei OD260 und OD280 wurden durchgeführt.

### 3.3.2.4 Sequenzierung

Die Nucleotid-Sequenz von der rekombinanten DNA wurde nach der Kettenabbruch-Methode bestimmt. Die klassische Methode wurde unter Verwendung von Thermo-Cycler, BigDyeKit und nachfolgender im Sequenzierer automatisch hergestellten Elektrophorese durchgeführt und so modernisiert. Das Prinzip basiert darauf, dass neben den vier Desoxynucleosid-Triphosphaten (dNTP), auch mit Fluoreszenzfarbstoffen kovalent markierte Dideoxynucleosid-Triphosphate (ddNTP) zu der Template und der Polymerase zugegeben werden. Der Einbau der ddNTP führt zum Abbruch der Zweitstrang-Synthese, und bei Belichtung mit dem Laser ergeben sie eine andere Farbe.

Die Konzentration der verwendeten Primer (ASPA1, ASPA2, pQE-forward, pQE-reverse) betrug 100 pmol/µl, was eine 20fache Verdünnung (bis 5 pmol/µl) verlangte. Die Konzentration der rekombinanten Plasmide wurde für jeden Ansatz gemessen und 500 ng bis 1 µg DNA zu dem Reaktionsansatz hinzugegeben.

Der Reaktionsansatz setzte sich zusammen aus:

0.5 µg Template-Plasmid - DNA (bis 1 µg).

2.0 µl Bid Dye Kit Pharmacia

1 µl Primer (d.h. 5 pmol) bis

10 µl HPLC-H<sub>2</sub>O

Die Konzentration des rekombinanten Plasmides pQE-80L/Aspartoacylase betrug 50 ng/µl, was 6 µl Eintrag entspricht.

Die Reaktionsansätze wurden in Thermo-Cycler (Perkin Elmer 9600 oder 2400) gelegt, und die Zyklen wurden 25 Mal wiederholt. Das Programm für die Zyklus – Sequenzierung enthielt folgende Schritte:

2 Minuten	96°C	Initiale Denaturierung
10 Sekunden	96°C	Denaturierung
5 Sekunden	50°C	Annealing
4 Minuten	60°C	Extention
unendlich	4°C	

Jeder 10 µl - Sequenzierungsansatz wurde danach bis 100 µl Volumen mit Wasser verdünnt und in 0.5 -ml- Eppendorf-Röhrchen pipetiert. 10.0 µl 3 M Natriumacetat, pH 4.6 bis pH 5.2, oder 3 M Kaliumacetat, pH 5.6, und 250 µl 95 %iges EtOH wurden dazugegeben, miteinander vermischt (im Vortex) und 10 - 20 Minuten bei 20°C stehen gelassen. Es folgte eine 10 Minuten lange Zentrifugation bei 13.000xg (20°C). Der Überstand wurde vollständig abgenommen, das DNA - Pellet mit 250 µl 70 %igem EtOH gewaschen, zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet 3 Minuten im Speed-Vac getrocknet. Die DNA wurde eine Minute in 5 µl Wasser bei 20°C gelöst und anschließend mit 20 µl TSR (Template Suppression Reagent) vermischt. Die Lösung wurde 3 Minuten bei 90°C denaturiert, dann bei 4°C gekühlt und in ein kleines Eppendorfgefäss überführt. Die Sequenzen wurden im Sequenzierer abgelesen.

### **3.4 Analysiertes Material**

#### **3.4.1 Gehirn aus Ratten und Rindern**

##### **3.4.1.1 Gehirnhomogenisationsmedium**

Das Medium besteht aus 250 mM Saccharose, 10 mM Tris-HCl pH 7.4 unter der Zugabe von folgenden Inhibitoren: gegen Metallproteasen – 1 mM EDTA, Ca<sup>2+</sup>-Chelator, dessen vier Acetat-(Essigsäure-)-Reste insgesamt zwei Ca<sup>2+</sup>-Ionen binden, sodass extrazellulären Ca<sup>2+</sup> entfernen und die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Bindung verhindert; gegen Serinproteasen – 1 mM PMSF; gegen saure Proteasen –2 bis 5 µg/ml Aprotinin und 1 µg/ml Pepstatin.

Die optimierten Bedingungen sind für Ratte- und Rindhirn gültig.

##### **3.4.1.2 Vorbereitung der Probe: Homogenisation**

Das frisch entnommene Gehirn wurde in Stücke zerkleinert und vor der Homogenisation mit dem kalten Homogenisationsmedium im Verhältnis 1 : 10 verdünnt. Die Homogenisation wurde bei 800 rpm Rotationsgeschwindigkeit des Potters, achtmal auf- und ab-angetrieben, im Potter- Elvehjem- Homogenisator durchgeführt.

##### **3.4.1.3 Differentialzentrifugation**

Die Differentialzentrifugation ist im Kapitel Versuche und Ergebnisse als Verfahren für partielle Aufreinigung der Acetyltransferase beschrieben. Alle Operationsschritte nach der Homogenisation wurden an einem Tag vorgenommen.

##### **3.4.1.4 Solubilisierungsverfahren**

- Die Extraktion des integralen Membranproteins Aspartat-N-Acetyltransferase erfolgte unter Detergenzenzugabe (im Kapitel Versuche und Ergebnisse beschrieben). Folgende Detergenzien in verschiedenen Konzentrationen wurden getestet: CHAPS, Natriumcholat, Natriumdeoxycholat, Digitonin, Octylglucoside, Lubrol, SDS, Triton-X-100, Nonidet P40 und Tween 20.
- Für die Extraktion der exprimierten Aspartoacylase aus E. coli BL21 wurden die Membranen der Bakterien durch Ultraschall gebrochen.

Solubilisation des Hirngewebes mittels Ultraschall führt zur Inaktivierung der Acetyltransferase.

### **3.4.1.5 Zellorganellen**

#### **3.4.1.5.1 Anreicherung von Mitochondrien**

Mitochondrien wurden aus Rattenhirn isoliert. Dabei gelten die klassischen Regeln: Es wurde immer frisches Gehirn und osmotisches Isolierungsmedium unter der Zugabe von Proteasen-Inhibitoren bei 4°C angewendet. Die Leitenzymaktivität für die inneren mitochondrialen Membranen - Cytochrom c Oxidase wurde bestimmt.

Das Gehirn einer frisch dekapitierten Ratte wurde abgewogen, gewaschen, mit Homogenisationsmedium aus 250 mM Saccharose, 0.5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, und Proteasehemmer im Verhältnis 1 : 3 vermischt und fünfmal auf- und abbei 800 rpm im Potter-Homogenisator zerdrückt. Das Homogenat wurde zweimal bei 2.000xg drei Minuten zentrifugiert, die Überstände wurden gesammelt und zusammengemischt. Sie wurden nachfolgend bei 12.500xg acht Minuten lang bei 4°C zentrifugiert. Das so erhaltene 12.500xg-Pellet wurde in 3 ml 3%-iger Ficoll- Lösung resuspendiert, und auf 6 % Ficoll vorsichtig aufgeschichtet. Der Gradient wurde anschließend 30 Minuten bei 4°C und 11.500xg zentrifugiert. Das weiße Pellet (oben) wurde entfernt, das braune Pellet im Homogenisationsmedium suspendiert und weitere 10 Minuten bei 11.500xg zentrifugiert. Die mitochondriale Fraktion wurde in 250 µl Medium aufgenommen.

Aus allen Fraktionen wurden Aliquots entnommen, in denen L-Aspartat-N-Acetyltransferase-,  $\beta$ -Hexosaminidase-, und Cytochrom c Oxidase- Aktivitäten sowie Proteinkonzentration bestimmt wurden.

### 3.4.2 Eukaryonische Zellkulturen

#### 3.4.2.1 Zelllinien / Kultivierungsbedingungen

Folgende Zellen wurden kultiviert:

- CHO (Chinesen Hamster Ovarium). Die Kultivierung erfolgte in einem Medium aus DMEM-Nut Mix F12 mit 5 % FCS, 2 mM Glutamin, G418 (500 µg/ml);
- CHO dhfr- (Dehydrofolatreduktase). Die Kultivierung erfolgte in einem Medium aus  $\alpha$ -MEM, mit 10 % FCS, 2 mM Glutamin;
- CHO Galt, mit cDNA für Ceramidegalactosyltransferase stabil transformierte Linie. Die Kultivierung erfolgte in einem Medium aus DMEM-Nut Mix F12 mit 5 % FCS, 2 mM Glutamin, G418 (500 µg/ml);
- CHO Sulf, mit cDNA für Cerebrosidesulfotransferase stabil transformierte Linie. Die Kultivierung erfolgte in einem Medium aus DMEM-Nut Mix F12, 5 %FCS, 2 mM Glutamin, G418 (500 µg/ml), Zeocin (300 µg/ml);
- 11(+/-) – Astrocyten. Die Kultivierung erfolgte in einem Medium aus DMEM mit 10 % FCS, 4 mM Glutamin;
- NT2 - neuronale Vorläufer. Die Kultivierung erfolgte in einem Medium aus DMEM mit 10 % FCS, 2 mM Glutamin;
- HMC-1 (Humane Mast Zellen-1). Die Kultivierung erfolgte im Medium 1250 unter Zugabe von 5 % FCS, 4 mM Glutamin und 1 mM Pyruvat;
- Cos7, mit dem SV-40 – Virus transfezierte, aus Affe stammende Nierenlinie. Die Kultivierung erfolgte in einem Medium aus DMEM, 10 % FCS, 2 mM Glutamin;
- AtT20 – Hypophysentumor-Linie von Maus, ATCC CCL89

In allen Medien wurden Penicillin (500 U/ml) und Streptomycin (500 µg/ml) hinzugefügt.

In der allgemeinen Arbeit mit Zellkulturen rechnet man mit der Zelldichte, welche in der nachfolgenden Tabelle dargestellt ist. Ausgehend von dem entsprechenden Zweck wurden verschiedene Zellkulturgefäße verwendet:

Zellkulturgefäß		Fläche (mm <sup>2</sup> )	Zelldichte bei Konfluenz <sup>1</sup>	Medium (ml)
Wellplatten	6-Well	962	1.2 x 10 <sup>6</sup>	3-5
	12-Well	401	4.0 x 10 <sup>5</sup>	1-2
	24-Well	200	2.0 x 10 <sup>5</sup>	0.5-1
Schalen	35 mm	962	1.2 x 10 <sup>6</sup>	2
	60 mm	2827	3.2 x 10 <sup>6</sup>	3
	100 mm	7854	8.8 x 10 <sup>6</sup>	10
Flaschen	T-25	2500	2.8 x 10 <sup>6</sup>	3-5
	T-75	7500	8.4 x 10 <sup>6</sup>	8-15
	T-160	16000	18.4 x 10 <sup>6</sup>	15-30

Die Zelldichte entspricht der jeweiligen Proteinmenge. Die Proteinkonzentration wurde für jede Zellfraktion neu bestimmt.

#### 3.4.2.2 Auftauen von Kulturzellen

Das Medium wurde bis 37°C aufgewärmt, 10 ml davon in Spitzröhrchen auf 0°C abgekühlt, die Cryoröhrchen wurden aus einem Stickstoffbehälter entnommen und eine Minute in der Hand auftauen gelassen. Die Cryoröhrchen wurden im 37°C-Wasserbad aufgetaut, bis nur noch ein kleiner Eiskern sichtbar war. Die Zellsuspension wurde mit einer Pasteurpipette entnommen und auf den Boden des Spitzröhrchens pipettiert; etwas kaltes Medium aufgesaugt und das Cryoröhrchen damit ausgespült. Die Suspension wurde drei Minuten bei 800xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in Medium resuspendiert und die Suspension in ein geeignetes Kulturgefäß hineingegeben.

#### 3.4.2.3 Einfrieren von Kulturzellen

Das Einfriermedium wurde wie folgt hergestellt:

320 ml DMEM wurden mit 40 ml DMSO vermischt. Das Medium wurde steril filtriert und in 45 ml Aliquots in Falconröhrchen bei -20°C gelagert. Pro Aliquot wurden 5 ml FCS in 10 %iger Endkonzentration beigegeben.

Das Einfriermedium wurde aufgetaut (nur kurze Zeit bei 37°C wegen der Oxidation des DMSO) und die beschrifteten Cryoröhrchen mit je ein ml Einfriermedium befüllt.

Die Zellen wurden sedimentiert und das Medium bis auf ca. 100-200 µl abgesaugt. Die Zellsuspension wurde auf die Cryoröhrchen aufgeteilt. Die Ampullen wurden in eine Styroporbox gesteckt, bei -80°C eingefroren und am nächsten Tag in einen Stickstoffbehälter überführt.

#### **3.4.2.4 Zellen auszählen**

Viabilitätsbestimmung durch Farbstoff- Ausschluss:

Es wurden 0.4 g Trypanblau in 100 ml 1xPBS aufgelöst. 100 µl Zellsuspension ( $1-2 \times 10^6$  Zellen/ml) wurde mit 100 µl 0.4 %iger Trypanblau- Lösung vermischt. Nach 1-2 Minuten wurde ein Aliquot der Zellsuspension in die Neubauer- Zählkammer gegeben, und die Zellen unter dem Mikroskop aus allen vier Großquadraten ausgezählt. Die Viabilität (die stark angefärbten - toten - und ungefärbten - lebenden - Zellen) wurde in Prozenten berechnet. Die Berechnung der Zellmenge in der Ausgangssuspension erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Zellen aus vier Großquadraten} \times \text{Kammerkonstanten} \times \text{Verdünnungsstufe} \times \text{Ausgangsvolumen}}{\text{Anzahl der ausgezählten Großquadrate}}$$

#### **3.4.2.5 Zellhomogenisationsmedium**

Folgendes Zellhomogenisationsmedium wurde verwendet: 250 mM Saccharose wurden mit 50 mM Tris-HCl pH 7.6 vermischt und die Proteasen Inhibitoren 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 2 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Pepstatin beigefügt.

Die Homogenisierung der HMC-1 Zellen wurde im Handhomogenisator durchgeführt.

#### **3.4.2.6 Subzelluläre Fraktionierung**

Die subzelluläre Fraktionierung und die Organellentrennung der HMC-1 Zelllinie wurde mittels dem Saccharosedichtegradienten (vgl. Kapitel Versuche und Ergebnisse, Punkt 4.4.2.4) durchgeführt. Die nachfolgend beschriebenen Leitenzymreaktionen wurden etabliert.

##### **3.4.2.6.1 Das Leitenzym von Peroxysomen - Katalase**

Folgende Lösungen wurden frisch hergestellt:

100 mM Natriumphosphat, pH 7.0

6 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Natriumphosphat ( 68 µl 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> /10 ml ) – Substrat - Lösung

3 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

2 mM KMnO<sub>4</sub>

Bei dieser Reaktion sind richtige Kontrollproben für die Berechnung der Katalaseaktivität wichtig:

1. Reagenzien-Kontrollprobe: 100 µl 3 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 500 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 500 µl Natriumphosphat. Nach der Zugabe von 700 µl 2 mM KMnO<sub>4</sub> muss sich die Probe wegen der Reaktion des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit dem KMnO<sub>4</sub> entfärben.
2. Spektrophotometrische Kontrollprobe: 700 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 100 µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 550 µl Natriumphosphat
3. Standard-Kontrollprobe: 550 µl Natriumphosphat + 100 µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 700 µl KMnO<sub>4</sub>
4. Zu jeder Probe wird die jeweilige Kontrollprobe (denaturiertes Enzym) hergestellt: 50 µl Probe wurden mit 100 µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gemischt, 500 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugegeben, 3 Minuten bei 4°C inkubiert und 700 µl KMnO<sub>4</sub> hinzugefügt.

Die Katalase- Reaktion läuft wie folgt:

50 µl Probe wurde mit 500 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vermischt, drei Minuten bei 4°C inkubiert, 100 µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (zum Anhalten der Reaktion ) zugegeben, 700 µl KMnO<sub>4</sub> (zur Visualisierung) hinzugefügt, und bei OD 480 nm gegen der spektrophotometrischen Kontrollprobe (2) gemessen. Die Reaktion muss mit frischem Gewebe durchgeführt werden. Die Absorptionswerte der Probe dürfen nicht höher als diese des Standards sein.

Die Katalaseaktivität (Units Enzymaktivität) wurde nach der Formel berechnet:

$K = \log(S_0/S_3) \times 2.3 / t$ , wobei

t – Zeit der Reaktion in Minuten, beträgt 3 Minuten

S<sub>0</sub> - Konzentration des Substrats am Anfang (0 Minuten)

S<sub>3</sub> - Konzentration des Substrats am Ende der Reaktion

$S_3 = \text{Abs. Standard} - \text{Abs. Probe}$

$S_0 = \text{Abs. Standard} - \text{Abs. Reagenzkontrolle}$

Abs.<sub>Standard</sub> = 0.882

Abs.<sub>Reagenzkontrolle</sub> = 0.019

#### 3.4.2.6.2 Das Leitenzym von Golgi-Apparat - α- Mannosidase II

Die Substrat – Lösung bestand aus: 4 mM 4-Methylumbelliferyl- -D-Mannopyranoside (6.8 mg/5ml), in 1X Dulbecco's PBS pH 7.4, 0.3 % TX-100. Zu der 200 µl - Substrat – Lösung wurde 20 µl Probe beigefügt. Nach einer 20 minütigen Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion mittels Zugabe von 1 ml 0.5 M Glycin und 0.5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> beendet.

Die Fluoreszenz wurde bei 364 nm Excitation und 448 nm Emission gemessen.

Die Mannosidaseaktivität wird als Relative Fluoreszenz - Einheit pro Minute definiert.

#### **3.4.2.6.3 Das Leitenzym von Lysosomen - $\beta$ -Hexosaminidase**

Der Ablauf der  $\beta$ -Hexosaminidase - Reaktion wird im Abschnitt Material und Methoden, Punkt 3.1.2.2.4.1, beschrieben.

#### **3.4.2.6.4 Das Leitenzym von Cytosol - Laktatdehydrogenase**

Folgende Lösungen wurden frisch hergestellt:

200 mM Tris-HCl pH 7.3

6.6 mM NADH in Tris-HCl (5 mg/ ml)

30 mM Natriumpyruvat in Tris-HCl, pH 7.3

10 % TX-100

Die Substrat Lösung bestand aus:

360  $\mu$ l 6.6 mM NADH in Tris-HCl, pH7.3

360  $\mu$ l 30 mM Natriumpyruvat in Tris – HCl, pH7.3

108  $\mu$ l 10 % TX-100

bis 10 ml mit 200 mM Tris-HCl, pH7.3

Die Reaktion wurde in einer Küvette bei 20°C durchgeführt. Zuerst wurde die 900  $\mu$ l - Substratlösung in die Küvette pipetiert, gefolgt von der 20  $\mu$ l – Probe- Zugabe. Die Extinktionsänderung  $\delta E/\text{min}$  wurde bei 340 nm gemessen.

#### **3.4.2.6.5 Das Leitenzym von Mitochondrien - Cytochrom c- Oxidase**

Die Cytochrom c Oxidasereaktion wird im Abschnitt Material und Methoden, Punkt 3.1.2.2.4.2 beschrieben.

#### **3.4.2.6.6 Das Leitenzym von Plasmamembranen - Alakalische Phosphatase**

Die Stammlösung wurde aus 5 ml Substrat - Lösung, 5 ml Borat-Puffer und 20  $\mu$ l 1 M  $\text{MgCl}_2$  hergestellt. Die Substrat - Lösung bestand aus 16 mM p-Nitrophenylphosphat (Substrat), 0.1 M Natriumborat (pH 9.8), 1 M  $\text{MgCl}_2$  und 0.25 M NaOH.

Zu der 200  $\mu$ l - Stammlösung wurde 50  $\mu$ l Probe (0.1-1 mg/ml Protein) hinzugefügt, danach bei 37°C, 20 Minuten lang inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 600  $\mu$ l 0.25 M NaOH beendet und anschließend 10 Minuten bei 700xg zentrifugiert. Die Absorption wurde bei OD 410 nm messen.

### **3.4.3 Bakterien**

#### **3.4.3.1 Anlegen einer Über-Nacht-Kultur**

In ein Reagenzglas wurden 3-5 ml LB Medium und 100 µg/ml Ampicillin (das Plasmid pQE-80L/Aspartoacylase vermittelt den Bakterien Resistenz gegen Ampicillin) hineingegeben sowie ein Bakterienklon hinzugefügt. Das Reagenzglas wurde verschlossen und über Nacht in ein 37°C- Schüttler gestellt. Diese Kulturen sind bei 4°C einige Tage haltbar.

#### Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte wurde in einem Photometer bei 600 nm anhand der Trübung gemessen. Als Leerwert diente das verwendete Medium. Die Extinktionswerte müssen bei einer Wellenlänge von 600 nm zwischen 0.1 und 0.5 liegen, was der exponentiellen Wachstumsphase der bakteriellen Kultur und einer Zelldichte von ca.  $3-4 \times 10^9$  Zellen pro ml entspricht. Bei der Bestimmung des Bakterienfeuchtgewichts gilt die Faustregel: Ein Liter Über-Nacht-Kultur ergibt 3 g Bakterienfeuchtgewicht.

#### **3.4.3.2 Anlegen einer Bakterienkultur für Plasmid-Präparationen**

In einem mit 2 - 10 ml LB Medium (supplementiert mit geeignetem Antibiotikum) gefüllten Reagenzglas wurde eine Kolonie aus einer frisch angesetzten LB-Platte hineingegeben und für 8 Stunden bei 37° C in einen Schüttelinkubator bei 300 rpm gestellt. Das Animpfen einer Über-Nacht-Kultur (25 bis 500 ml LB mit Antibiotikum) wird mit 1/500 bis 1/1000 Volumen der Starterkultur durchgeführt. Die Kulturflasche muss über ein mindestens 4fach größeres Luftvolumen als das Kulturvolumen verfügen. Zu große Kulturvolumina führen zu Ausbeutenverlust (ineffiziente Lyse, Konkurrenz durch RNA).

Eine Inkubationsdauer von 12-16 Stunden bei 37°C im Schüttler entspricht dem Übergang von logarithmischer zu stationärer Wachstumsphase. Zu diesem Zeitpunkt ist die maximale Zelldichte bei einer niedrigen RNA - Konzentration erreicht. Die optimale Wachstumszeit ist von dem Stamm, dem Plasmidinsert, der Anzahl der Kopien und des Kulturmediums abhängig.

Die Ernte der Bakterien wurde durch 15 Minuten Zentrifugation bei 6000 rpm und 4°C gesammelt. Das Pellet kann bei -20°C mehrere Wochen gelagert werden.

### **3.4.3.3 Klassische Transformation**

Die kompetenten *E. coli* – Bakterien werden bei 4°C aufgetaut. Das Aliquot des Ligationsansatzes (z.B. 5 µl = 1/3 Vol. Ligationsansatz) bzw. 1 ng Plasmid - DNA (auf 10 µl mit H<sub>2</sub>O steril aufgefüllt) wurden dazupipettiert, vorsichtig vermischt und 20 Minuten bei 4°C stehen gelassen. Pro Transformation wurde 1 ml LB-Medium in sterilem Eppendorfröhrchen auf 37°C vorgewärmt. Der Transformationsansatz wurde 45-60 Sekunden bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt und dann zwei Minuten bei 4°C gekühlt. 1 ml auf 37°C vorgewärmtes LB-Medium wurde beigefügt, der Ansatz in Spitzröhrchen überführt und eine Stunde bei 37°C im Schüttelinkubator bei 280 rpm schütteln gelassen. Der Ansatz wurde auf Ampicillin-Platten (je 1/10, 9/10 bzw. 1/100) aufgetragen, bei geöffnetem Deckel trocknen gelassen und bei 37°C über Nacht kultiviert.

### **3.4.3.4 IPTG-Expressionsaktivierung**

*Escherichia coli* BL21 wurde mit dem Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) zur Proteinexpression aktiviert, um grosse Mengen Aspartoacylase zu gewinnen.

Aus einer Petrischale, welche mit dem rekombinanten Plasmid pQE80 – Aspartoacylase transformierte BL21- Bakterien enthielt, wurden Kolonien in 15 ml – Falconröhrchen überführt, welche mit 5 ml vorgewärmtem LB- Medium, 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin gefüllt waren. Die Kolonien wurden über Nacht bei 37°C und 280 rpm, im Schüttelinkubator wachsen gelassen, bis bei der Wellenlänge OD 550 eine Dichte von 0.5 – 0.6 erreicht wurde. Die Expression des Proteins wurde durch die Zugabe von 1 mM IPTG Endkonzentration induziert. Die bakterielle Kultur wurde 4 - 5 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden durch 20 Minuten lange Zentrifugation bei 4.000xg geerntet. Das Pellet wurde eingefroren bzw. weiterverarbeitet.

### **3.4.3.5 Lyse der Bakterien**

Nach der Aspartoacylaseexpression wurden die Bakterien pelletiert und nach einem Waschschrift lysiert. Die pelletierten Bakterien wurden in Lysispuffer aus 100 mM Tris-HCl, pH 7.6, 500 mM NaCl, 1mM β-Mercaptoethanol, 2 µg/ml Aprotinin und 1 mM PMSF im Verhältnis 1 : 10 resuspendiert und 6mal 10 Sekunden mit Ultraschall behandelt. Das Lysat wurde anschließend 30 Minuten bei 14.000xg und 4°C zentrifugiert. Die Aspartoacylase befand sich im Überstand.

## **4 Versuche und Ergebnisse**

Das Enzym L-Aspartat-N-Acetyl-Transferase (ANAT; EC 2.3.1.17) katalysiert die Übertragung eines Acetylrestes von Acetyl-Coenzym A auf L-Aspartat. Der Acyl - Rest in der Thioester-Bindung des Coenzym hat ein hohes chemisches Potenzial und lässt sich daher in exergonen Reaktionen auf andere Moleküle übertragen. Der Ablauf lässt sich durch die spezifische radioaktive Markierung von den Metaboliten verfolgen. Der Nachweis der Enzymaktivität erfolgt in der Regel mit radioaktiv markiertem Aspartat. Acetyliertes Aspartat ( $R_f$ , 0,7 – 0,8) lässt sich vom nicht acetylierten Aspartat ( $R_f$ , 0,2 – 0,3) dünn-schichtchromatographisch trennen. Nach der Dünnschichtchromatographie wird die Radioaktivität von Aspartat und N-Acetyl-Aspartat quantifiziert, so dass die Radioaktivität in einer Berechnung der Enzymaktivität in Einheiten ausgedrückt werden kann.

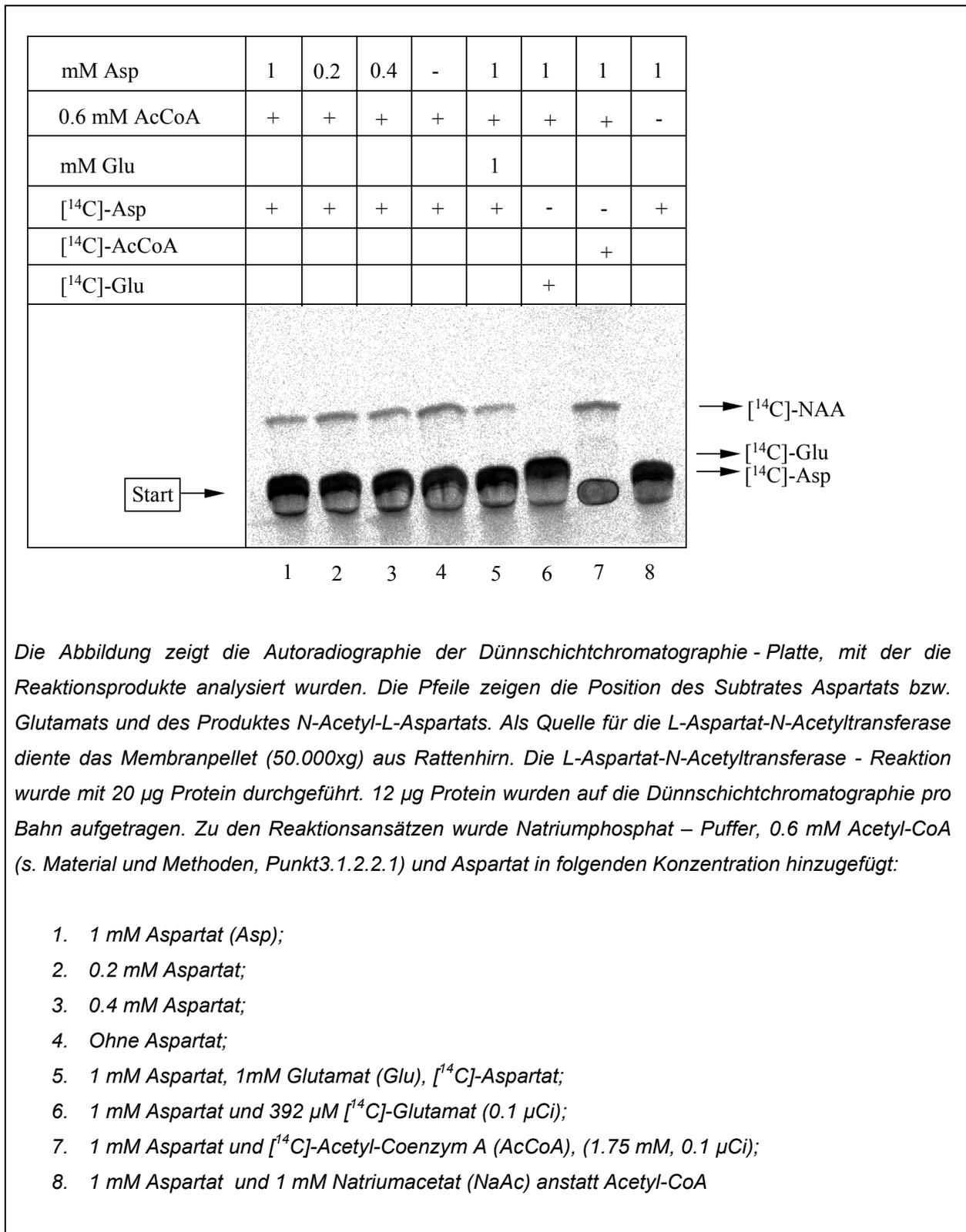
### **4.1 Nachweis der L-Aspartat-N-Acetyltransferase- Reaktion**

Die Spezifität der untersuchten Reaktion kann durch die Substratspezifität (Punkt 4.1.1), durch den Nachweis von Aktivität in verschiedenen Organen (Punkt 4.1.2), durch den spezifischen Enzymabbau des N-Acetyl-L-Aspartats (Punkt 4.1.3) und/oder die Produktinhibition der L-Aspartat-N-Acetyltransferase (Punkt 4.1.4) nachgewiesen werden.

#### **4.1.1 Nachweis der L-Aspartat-N-Acetyltransferase – Reaktion durch die spezifischen Substrate**

Bei Untersuchungen biologischen Materials muss analysiert werden, inwieweit die Nachweisreaktion spezifisch das zu untersuchende Enzym misst. Das Substrat der Acetyltransferase - Reaktion, Aspartat, ist ein weitverbreiteter Metabolit, der an vielen wichtigen biochemischen Reaktionen teilnimmt. Dabei war es wichtig zu zeigen, dass es sich bei dem in der Reaktion gebildeten Produkt tatsächlich um N-Acetyl-Aspartat und nicht um eine andere vom Aspartat abgeleitete Substanz handelt. Dazu wurden verschiedene Ansätze gewählt, bei denen jeweils ein Membranpellet aus Rattenhirnhomogenaten als Enzymquelle diente (s. Abb. 3). Die Ergebnisse zeigen, dass in allen Ansätzen, in denen radioaktives Aspartat und Acetyl-CoA vorhanden ist, eine vom Aspartat unterschiedliche Bande in der Dünnschichtchromatographie zu erkennen ist. Wird nicht radioaktives Aspartat und in der Acetyl-Gruppe radioaktiv markiertes Acetyl-CoA verwendet, so kommt es zur Bildung einer auf gleicher Höhe laufenden Bande. Ohne das Acetyl-Coenzym A als Cosubstrat in der L-Aspartat-N-Acetyltransferase - Reaktion entsteht kein N-Acetyl-L-Aspartat. Bei Einsatz von radioaktiv markiertem Glutamat und Acetyl-CoA ist diese Bande nicht erkennbar (s. Abb. 3, Bahn 6).

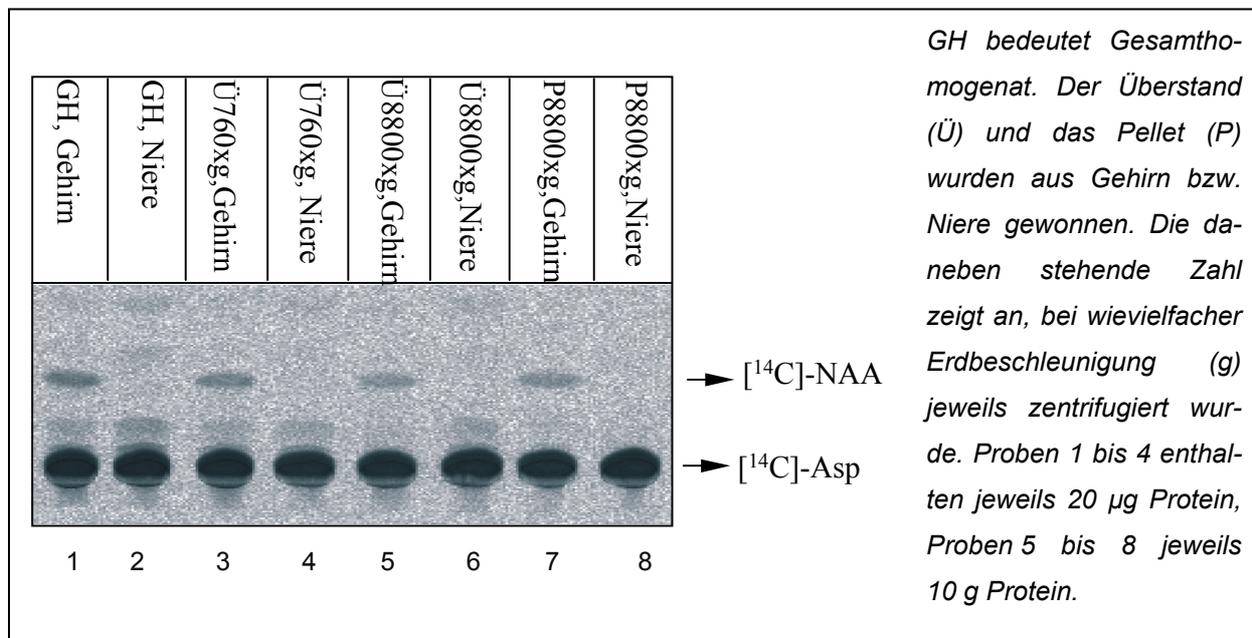
Abbildung 3: Dünnschichtchromatographie zur Bestimmung der L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität zum Nachweis der Spezifität der Nachweisreaktion



## 4.1.2 Nachweis der L-Aspartat-N-Acetyltransferase – Reaktion durch den Nachweis von Enzymaktivität in Organen

Von der L-Aspartat-N-Acetyltransferase ist bekannt, dass sie spezifisch im Gehirn, nicht aber in anderen peripheren Organen exprimiert wird (Truckenmiller und Namboodiri 1985). Aus diesem Grunde wurden Extrakte aus verschiedenen Fraktionen von Gehirn- und Nierenhomogenaten erstellt und als Enzymquelle benutzt. Diese Extrakte wurden jeweils mit [<sup>14</sup>C]-Aspartat und Acetyl-Coenzym A unter den geeigneten Bedingungen inkubiert und anschließend dünnenschichtchromatographisch aufgetrennt. In Abbildung 4 ist zu erkennen, dass auf der Höhe des N-Acetyl-Aspartats laufende Bande nur in Homogenaten aus Gehirn, nicht aber in Homogenaten aus der Niere, zu detektieren ist. Die Untersuchungen, die zum Nachweis der Organ- / Gewebespezifität angestellt wurden, zeigen, dass in der Nachweisreaktion L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität des Gehirns gemessen wird. Keine L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität wurde in Nieren festgestellt.

Abbildung 4: Dünnschichtchromatographie zur Bestimmung der L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität zum Nachweis der Organspezifität der Reaktion



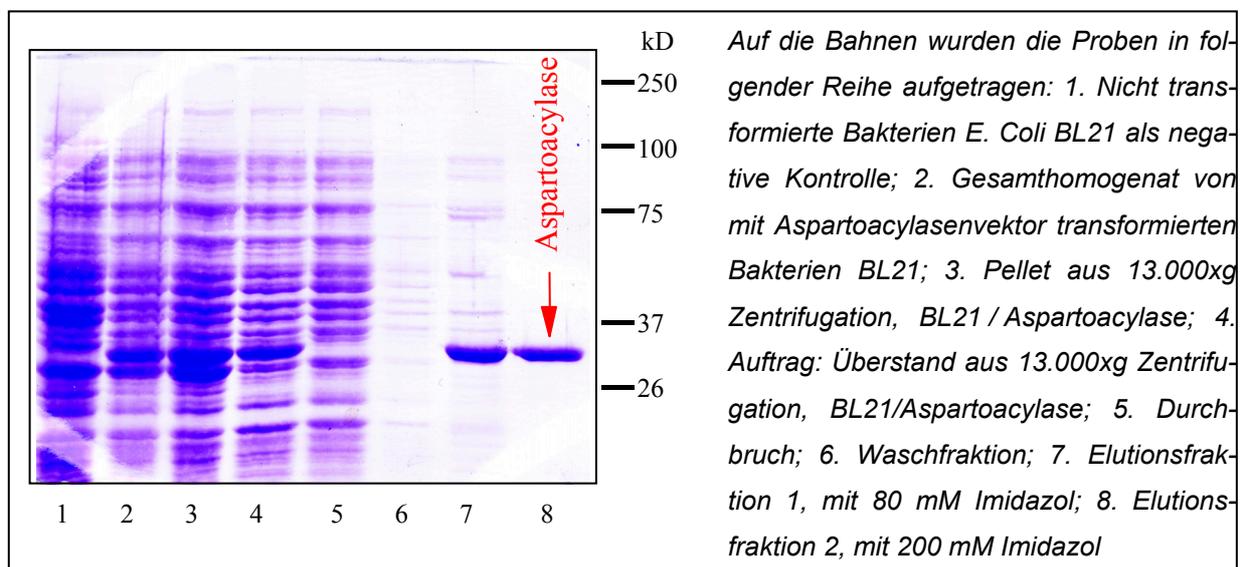
### 4.1.3 Nachweis der L-Aspartat-N-Acetyltransferase- Reaktion mittels Aspartoacylase - Hydrolyse des N-Acetyl-Aspartats

Die Spezifität der L-Aspartat-N-Acetyltransferase – Nachweisreaktion wurde weiter durch Aspartoacylase - Hydrolyse des Enzymproduktes N-Acetyl-L-Aspartat (NAA) nachgewiesen.

#### 4.1.3.1 Aspartoacylase II - Klonierung und - Anreicherung

Zu diesem Zweck wurde die cDNA für die Aspartoacylase II (ASPA) durch PCR amplifiziert und im Plasmid pQE-80L zwischen den Restriktionsstellen für die Enzyme BamH I und Hind III in Richtung 3' von der 6xHis-Tag-Sequenz ligiert. Die Klonierung erfolgte durch Transformation der E. coli DH 5 $\alpha$  in 10  $\mu$ g Ampicillin pro ml LB-Medium. Die DNA wurde aus den Klonen vermehrt, präpariert, sequenziert, und die Sequenzen wurden mit den publizierten Aspartoacylasesequenzen verglichen. Die Baktrien mit der korrekten Sequenz wurden weiter kultiviert. Die Aspartoacylase wurde in E. coli BL21 mittels Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid (IPTG) - Proteinexpressionsaktivierung exprimiert, extrahiert und durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt. Die Elution der Aspartoacylase erfolgte durch Zugabe von Imidazol - Lösungen mit Konzentrationen von 80 bzw. 200 mM. Die Aspartoacylase – Expression und Reinigung wurden in SDS – Polyacrylamid-Gelelektrophorese kontrolliert. Die in Abbildung 5 dargestellten elektrophoretisch getrennten Proteine des Auftrags, des Durchbruchs, der Waschfraktion, der Elutionsfraktionen sowie des nicht transformierten bakteriellen Gesamthomogenats als negative Kontrolle dienen als Nachweis der Aspartoacylaseanreicherung.

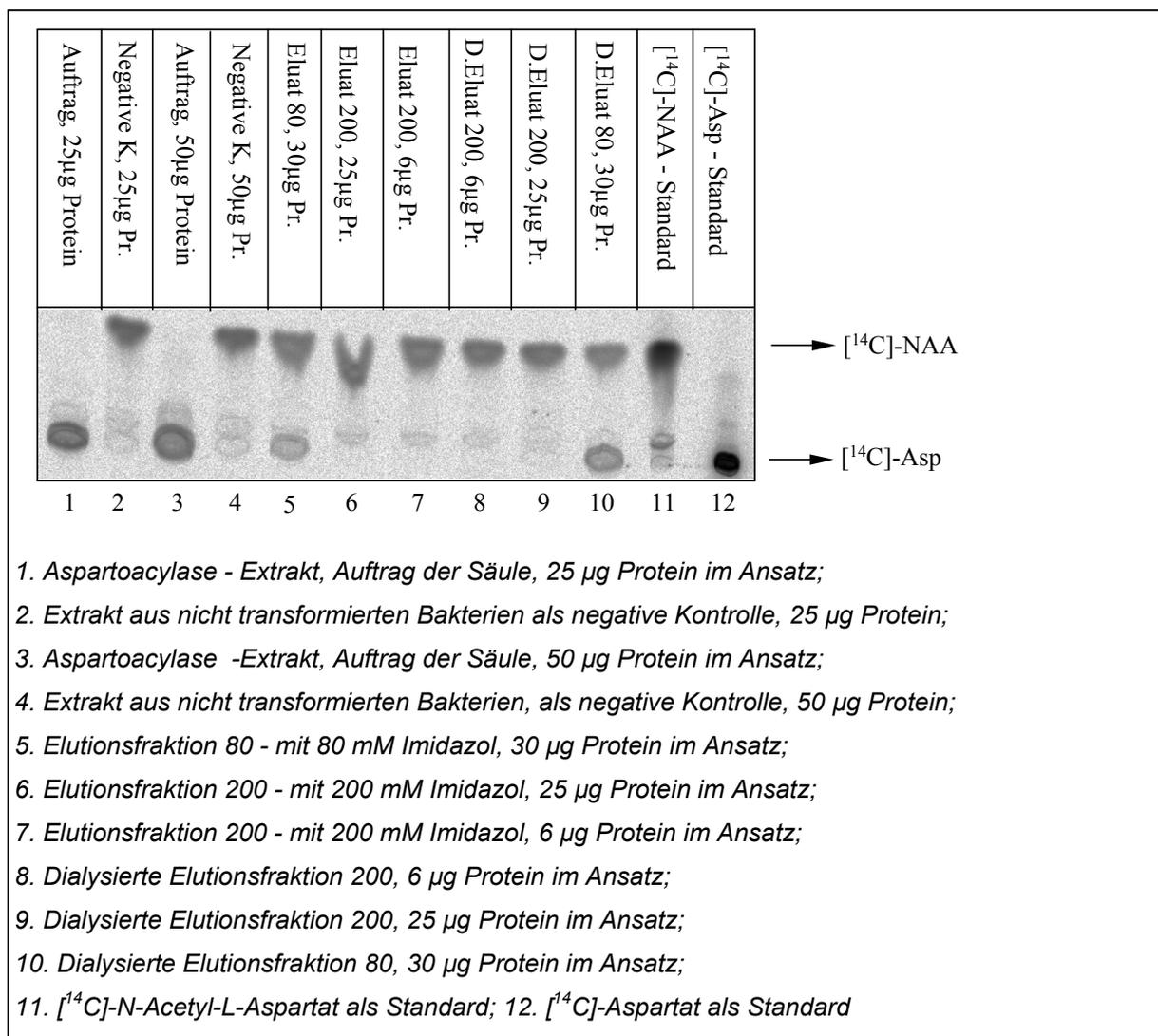
Abbildung 5: 12 % SDS-PAGE - Proteintrennung, Coomassie Brillant Blau – Färbung der Ni-NTA-Chromatographiefraktionen zur Reinigung der Aspartoacylase II



### 4.1.3.2 Aktivität der exprimierten Aspartoacylase

Die Bedingungen der Aspartoacylase – Reaktion wurden etabliert. Die bakteriell exprimierte und anschließend extrahierte Aspartoacylase wurde auf Enzymaktivität überprüft. Das synthetisch hergestellte [<sup>14</sup>C]-N-Acetyl-L-Aspartat wurde nicht nur als Standard bei der Dünnschichtchromatographie, sondern auch als Substrat für die Aspartoacylase - Reaktion verwendet (s. Material und Methoden, Punkt 3.1.2.2.2). Aspartoacylaseaktivität wurde in der Auftragsfraktion und in der 80 mM-Imidazol-Elutionsfraktion nachgewiesen. Die fehlende Enzymaktivität in der 200 mM-Imidazol-Elutionsfraktion basiert nicht auf einer Imidazolhemmung und konnte in weiteren Analysen nicht geklärt werden. Die Hydrolyse des Substrates [<sup>14</sup>C]-N-Acetyl-L-Aspartat und die Zunahme des [<sup>14</sup>C]-Aspartats während der Aspartoacylase - Reaktion sind in Abbildung 6 dargestellt. Die Aspartoacylaseaktivität ist durch das neugebildete [<sup>14</sup>C]-Aspartat als Produkt der Reaktion nachgewiesen.

Abbildung 6: Dünnschichtchromatographie zur Bestimmung der Aspartoacylaseaktivität der Ni-NTA- Sepharose – Fraktionen



Wie auf Abb. 6, Bahn 11, zu erkennen ist, läuft das synthetische [ $^{14}\text{C}$ ]-N-Acetyl-L-Aspartat auf der Dünnschichtchromatographie – Platte auf der selben Höhe wie die in der enzymatischen Reaktion gebildete [ $^{14}\text{C}$ ]-N-Acetyl-L-Aspartat-Bande. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass es sich bei dem gebildeten Produkt um [ $^{14}\text{C}$ ]-N-Acetyl-L-Aspartat handelt. Bei einem Leerwert (Reaktionsansatz ohne Proteinzusatz) oder denaturiertem Hirnextrakt wird kein [ $^{14}\text{C}$ ]-N-Acetyl-L-Aspartat gebildet.

Die Mengen des zur weiteren Untersuchungen benötigten Aspartoacylase - Extraktes wurden im Aspartoacylase - Proteinabhängigkeitstest optimiert (s. Abb. 7 und 8 sowie Material und Methoden, Punkt 3.1.2.2.2).

Die Aspartoacylase - Reaktion wurde mit Proteinmengen des bakteriellen Extraktes von 0 bis 68  $\mu\text{g}$  durchgeführt. 3 mM N-Acetyl-L-Aspartat und 70 mM [ $^{14}\text{C}$ ]-N-Acetyl-L-Aspartat wurden als Substrat eingesetzt. Mit 26  $\mu\text{g}$  Proteinextrakt pro Ansatz wurde das N-Acetyl-L-Aspartat völlig hydrolysiert, wobei die Menge des [ $^{14}\text{C}$ ]-Aspartats als Produkt der Aspartoacylase - Reaktion stark zunahm. 17  $\mu\text{g}$  Protein pro Aspartoacylaseansatz wurden für den weiteren L-Aspartat-N-Acetyltransferase – Produktspezifitätsnachweis verwendet (s. Abb. 8).

Abbildung 7: Dünnschichtchromatographie zur Bestimmung der Aspartoacylaseaktivität in Abhängigkeit vom Proteingehalt des Extraktes

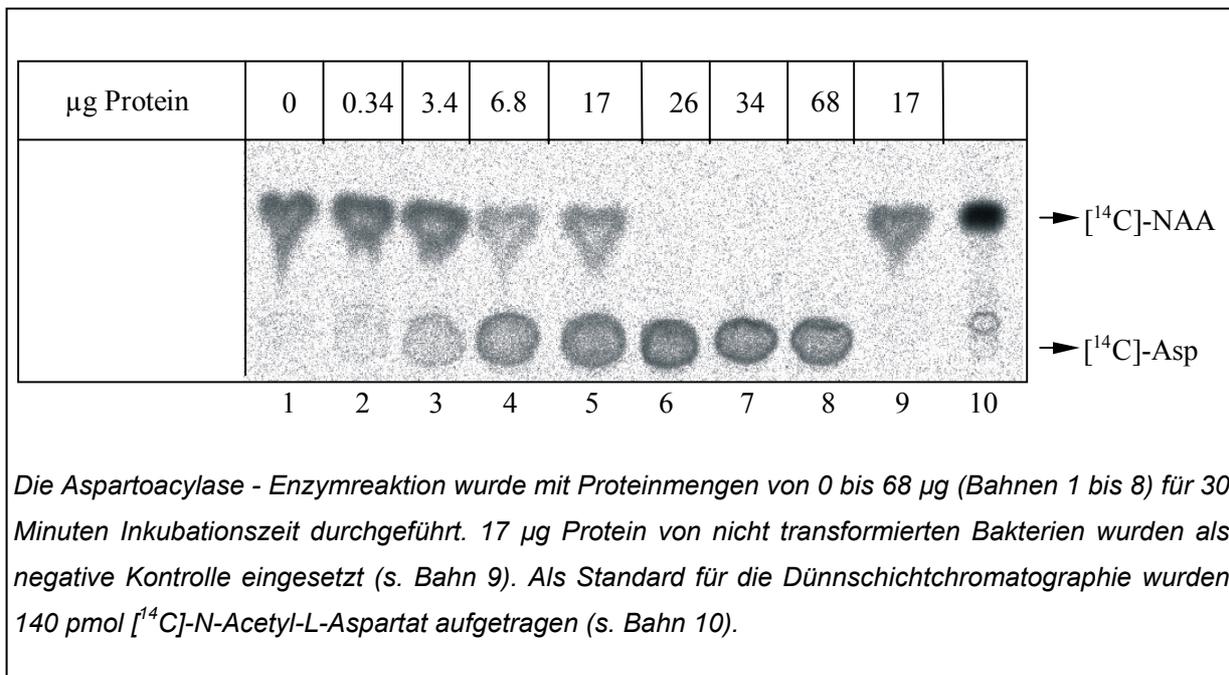
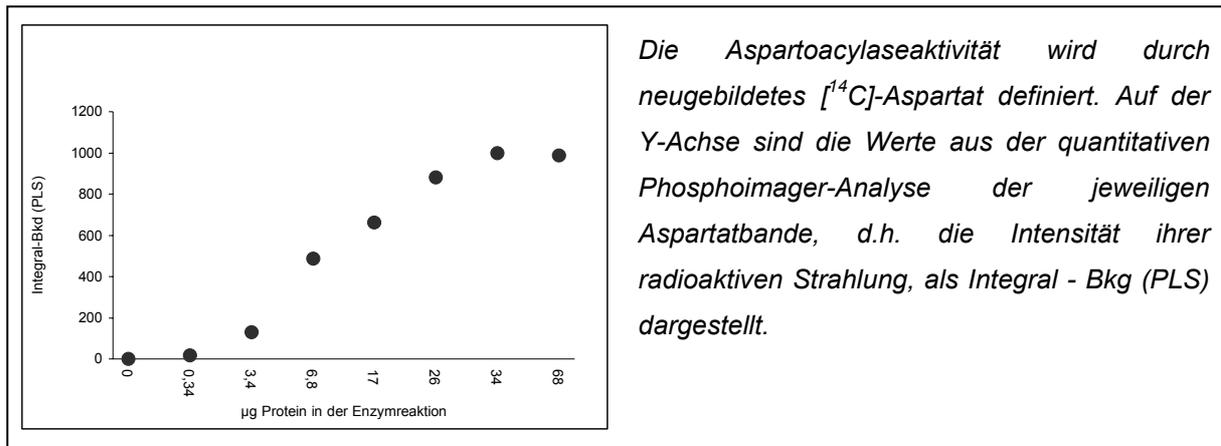


Abbildung 8: Aspartoacylaseaktivität in Abhängigkeit vom Proteingehalt der Probe (grafische Darstellung)



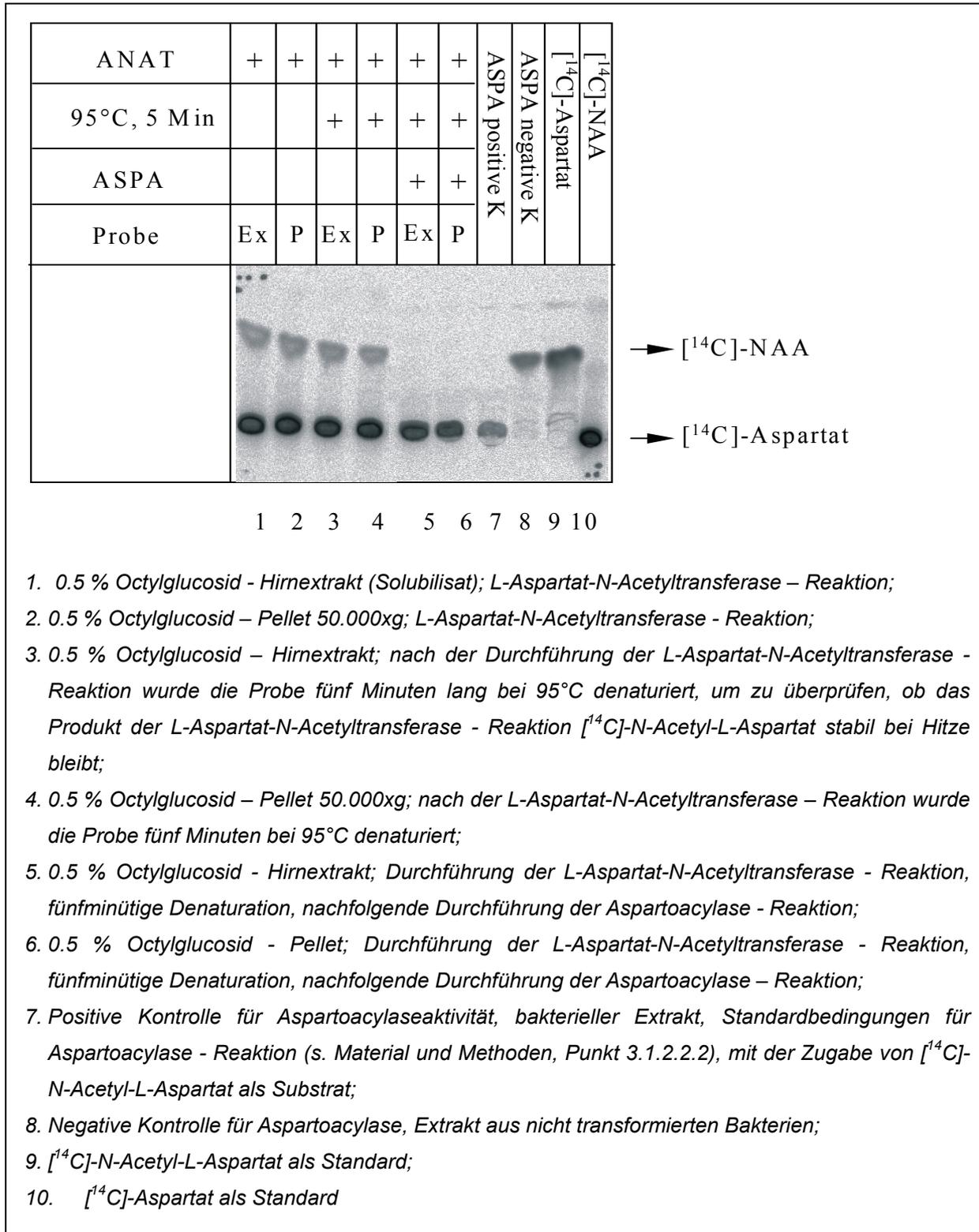
#### 4.1.3.3 Aspartoacylase - Hydrolyse des in L-Aspartat-N-Acetyltransferase – Reaktion gebildeten N-Acetyl-Aspartats

Die Spezifität der L-Aspartat-N-Acetyltransferase – Nachweisreaktion wurde durch die Hydrolyse des Produktes N-Acetyl-L-Aspartat mittels Aspartoacylase nachgewiesen. Das während der L-Aspartat-N-Acetyltransferase - Reaktion gebildete N-Acetyl-L-Aspartat wurde von der Aspartoacylase abgebaut.

Zwei gekoppelte, hintereinander folgende Enzymreaktionen - die L-Aspartat-N-Acetyltransferase-Reaktion (ANAT) und die Aspartoacylase-Reaktion (ASPA) wurden durchgeführt (s. Material und Methoden, Punkt 3.1.2.2.3). Als L-Aspartat-N-Acetyltransferase- Quelle für das Experiment wurden das 0.5 %ige Octylglucosid - Solubilisat bzw. bei der 50.000xg Zentrifugation erhaltenes Membranpellet verwendet (s. Abb. 9). Nach Ablauf der ersten L-Aspartat-N-Acetyltransferase - Reaktion wurden die Proben durch Hitze denaturiert und somit die L-Aspartat-N-Acetyltransferase - Reaktion beendet (s. Abb. 9, Bahnen 3 und 4). Anschließend wurden der Aspartoacylase - Extrakt und die für die Aspartoacylase - Reaktion geeignete Pufferlösung hinzugegeben (s. Abb. 9, Bahnen 5 und 6). Die zweite Aspartoacylase - Reaktion wurde unter den im Kapitel Material und Methoden, Punkt 3.1.2.2.2, beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Als Substrat für die Aspartoacylase diente das in der L-Aspartat-N-Acetyltransferase - Reaktion gewonnene [<sup>14</sup>C]-N-Acetyl-L-Aspartat. Lediglich für die positive Aspartoacylase - Kontrolle wurde das [<sup>14</sup>C]-N-Acetyl-L-Aspartat zusätzlich hinzugefügt (s. Abb. 9, Bahn 7). Die negative Kontrolle für Aspartoacylase - Reaktion wurde mit Extrakt aus nicht transformierten Bakterien

durchgeführt (s. Abb. 9, Bahn 8). Das Experiment endete mit der Trennung der erhaltenen Substanzen auf der Dünnschichtschromatographie – Platte.

Abbildung 9: Dünnschichtchromatographie zur Bestimmung der L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität; Aspartoacylasehydrolyse

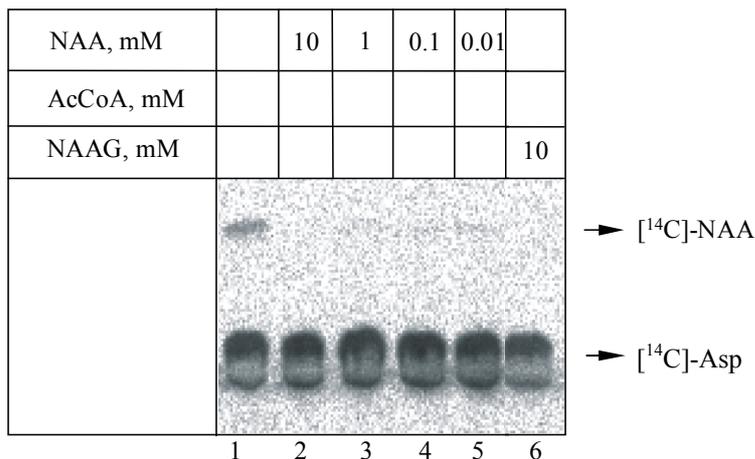


#### 4.1.4 Nachweis der L-Aspartat-N-Acetyltransferase – Reaktion mittels Produktinhibition

Die Produkthemmung dient ebenfalls als ein wichtiger Enzymspezifitätsnachweis. Die Transferaseaktivität wurde durch die Zugabe des Reaktionsproduktes N-Acetyl-L-Aspartat (NAA) beeinflusst. Die Produkthemmung wurde durch eine 30-minütige Vorinkubation des 10 µl- Hirnextraktes (3.5 mg/ml Proteinkonzentration) mit dem N-Acetyl-L-Aspartat in den beschriebenen Konzentrationen und anschließende L-Aspartat-N-Acetyltransferase - Standardreaktion überprüft. In Konzentrationen von 0.01 mM bis 10 mM inhibiert das N-Acetyl-Aspartat sein Enzym (s. Abb. 10, Bahnen 2 bis 5). Aufgrund der Vermutung, dass das N-Acetyl-L-Aspartat ein eventueller Vorläufer des N-Acetyl-Aspartyl-Glutamats (Mehta und Namboodiri 1995) ist, wurde der Einfluss des N-Acetyl-Aspartyl-Glutamats auf die L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität untersucht. Bei der Vorinkubation des Hirnextrakts mit dem N-Acetyl-Aspartyl-Glutamat wurde festgestellt, dass 10 mM N-Acetyl-Aspartyl-Glutamat die Aspartat-N-Acetyltransferase ebenfalls inhibiert (s. Abb. 10, Bahn 6).

Abbildung 10: Dünnschichtchromatographie zur Bestimmung der L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität; Produkthemmung

*Als Material für den Versuch diente Hirnfraktion – Pellet aus 50.000xg Differentialzentrifugation. Nach der Vorinkubation wurde die L-Aspartat-N-Acetyltransferase - Reaktion mit 35 µg Protein 40 Minuten lang durchgeführt. 12 µg davon wurden auf die Dünnschichtchromatographie - Platte aufgetragen.*



*Auf der ersten Bahn ist die positive Kontrolle für ANAT – Reaktion dargestellt. Die jeweiligen untersuchten Variationen wurden mit 10 mM N-Acetyl-L-Aspartat bzw. 1 mM, 0.1mM, 0.01 mM NAA vorinkubiert. Auf Bahn 6 wird das Ergebnis von einer Vorinkubation mit 10 mM N-Acetyl-Aspartyl-Glutamat gezeigt.*

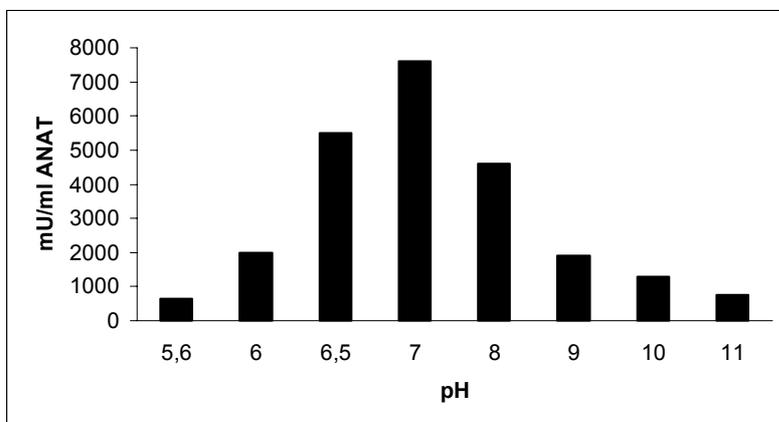
## 4.2 Charakterisierung und Enzymkinetik der Hirn- L-Aspartat-N-Acetyltransferase

Die Kinetik enzymkatalysierter Reaktionen, d.h. die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von den Reaktionsbedingungen, wird von den Eigenschaften des Enzymes bestimmt. Die katalytischen Eigenschaften von Enzymen und damit ihre Aktivität werden von zahlreichen Faktoren beeinflusst, die alle optimiert und kontrolliert werden müssen, damit die Aktivitätsmessungen in sinnvoller und reproduzierbarer Weise durchgeführt werden können. Zu diesen Faktoren gehören physikalische Größen wie Temperatur, chemische Eigenschaften der Lösung wie pH- Wert und Ionenstärke sowie die Konzentration der relevanten Substrate, Cofaktoren und Hemmstoffe.

### 4.2.1 pH- Abhängigkeit der L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität

Die Wirkung von Enzymen, ihre Effizienz und ihre Löslichkeit sind stark von der Konzentration an Wasserstoff - Ionen (pH – Wert) des Mediums abhängig, deshalb wurde die Abhängigkeit der Acetyltransferaseaktivität von dem pH - Wert untersucht (s. Abb. 11). Die L-Aspartat-N-Acetyltransferase ist in den Grenzen von pH 6 bis pH 9 aktiv. Ihr pH – Optimum liegt nahe dem Neutralpunkt, bei pH 7, dem pH - Wert der tierischen Zellen. Dieser Wert bestimmt meist die Maximalgeschwindigkeit des Enzyms. Die verwendeten Pufferlösungen wurden gemäß ihrer Pufferkapazität gewählt (s. Abschnitt Methoden, Punkt 3.1.1.3). Die L-Aspartat-N-Acetyltransferase - Reaktion wurde 40 Minuten lang bei 37°C mit 1 mg/ml Protein durchgeführt.

Abbildung 11: pH - Abhängigkeit der Transferaseaktivität

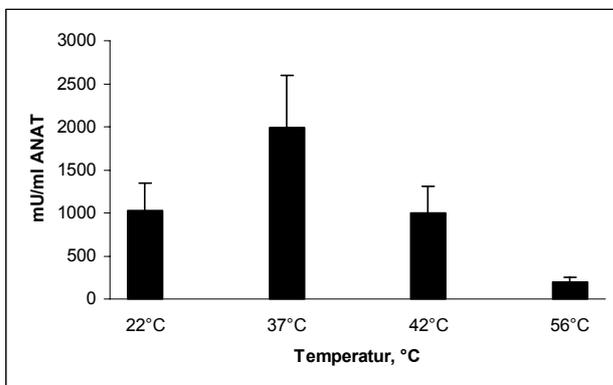


*Hinweis: Die pH - Werte der Pufferlösungen sind identisch mit den gemessenen pH - Werten der Reaktionsansätze.*

#### 4.2.2 Temperaturabhängigkeit der L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität

Die Temperaturabhängigkeit der enzymatischen L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität ist unsymmetrisch. Mit steigender Temperatur wird die Reaktion zunächst durch die gesteigerte Wärmebewegung der Moleküle beschleunigt. Bei einer Temperatur von 42° wird die Acetyltransferase instabil, und ihre Aktivität geht innerhalb eines geringen Temperaturintervalls von 6°C (bei 56°C) durch Denaturierung verloren (s. Abb. 12). Das Temperaturoptimum der L-Aspartat-N-Acetyltransferase liegt bei 37°C.

Abbildung 12: Grafische Darstellung der Temperaturabhängigkeit der L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität

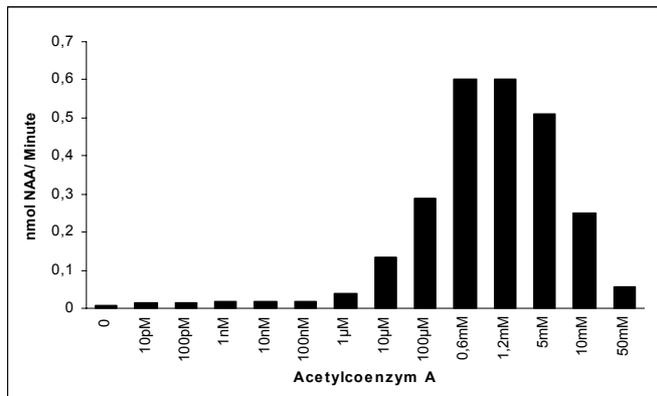


*Die Reaktion wurde 40 Minuten lang unter den Temperaturhöhen 22°, 37°, 42° und 56°C inkubiert. Die Reaktionsansätze enthielten 60 µg Protein.*

#### 4.2.3 Abhängigkeit der L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität von der Konzentration des Cosubstrates Acetyl-Coenzym A

Coenzym A ist ein kompliziert gebautes Nukleotid, dessen Aufgabe darin besteht, Reste aliphatischer Carbonsäuren (Acyl - Reste) zu aktivieren. Durch Verknüpfung der Carboxy-Gruppe der Carbonsäure mit der Thiol - Gruppe des Coenzym entsteht eine Thioester-Bindung (-S-CO-R), in welcher der Acyl - Rest auf hohem chemischen Potential steht. Er lässt sich daher in exergonen Reaktionen auf andere Moleküle (in diesem Fall auf das Aspartat) übertragen. Um die L-Aspartat-N-Acetyltransferase - Reaktionsbedingungen zu optimieren, wurden Konzentrationen des Acetyl-Coenzym A von 0 bis zu 50 mM untersucht (s. Abb. 13). Die Abhängigkeit der Transferaseaktivität von der Acetyl-Coenzym A-Konzentration wurde mit 1 mM Aspartat und 3.7 mg/ml Protein (37 µg Absolutmengen) überprüft und in der Abb. 13 zusammengefasst. Der bestimmte Wert der Michaelis-Konstante beträgt 0.1 mM Acetyl-Coenzym A und ist mit den Literaturwerten vergleichbar.

Abbildung 13: Grafische Darstellung der Abhängigkeit der L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität von den Acetyl-Coenzym A- Konzentrationen

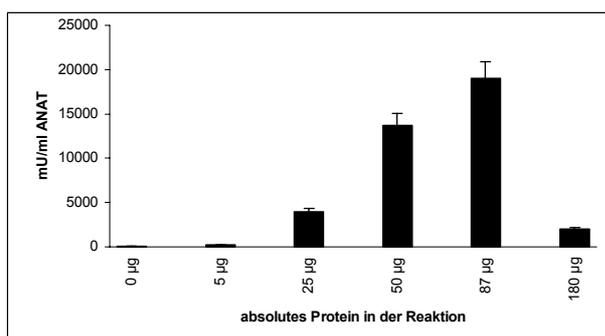


Hinweis: Die Geschwindigkeit der L-Aspartat-N-Acetyltransferase - Reaktion wird durch die Veränderung der Konzentration des Produktes [ $^{14}$ C]-N-Acetyl-L-Aspartat abgebildet. Die Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeit  $V$  erfolgt, indem die Veränderung der Produktkonzentration in nmol NAA durch die Zeit in Minuten dividiert wird ( $V = \delta [P] / \delta t$ ).

#### 4.2.4 Abhängigkeit der L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität von dem Proteingehalt des Hirnextraktes

Die Abhängigkeit der L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität von den Proteinmengen der Probe wurde untersucht. Als Erstes wurde die Proteinkonzentration (mg / ml) des bei 100.000xg-Zentrifugation gewonnenen Pellets bestimmt. Es wurden Proteinmengen vom Nullwert bis 180 µg, entsprechend den jeweiligen Volumina der Pelletfraktion von 0 µl bis 18 µl, auf die Röhrcchen verteilt und mit 50 mM Tris - HCl pH 7,4 bis zu einem Endvolumen vom 20 µl aufgefüllt. Nach Zugabe der Substraten und des Reaktionspuffers wurde die Enzymreaktion unter den im Kapitel Material und Methoden, Punkt 3.1.2.2.1, beschriebenen Standardbedingungen mit 30 Minuten Inkubationszeit durchgeführt. Im Ergebnis konnte die Abhängigkeit der Enzymaktivität vom Proteingehalt bestimmt werden. Bei einer Proteinkonzentration der Hirnmembranfraktion von 8 mg/ml, die 87 µg Protein in der Reaktion entspricht (s. Abb. 14), wurde die maximale Transferaseaktivität (ca. 20.000 mU/ml) gemessen.

Abbildung 14: Abhängigkeit der L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität von dem Proteingehalt der mikrosomalen 100.000xg – Hirnfraktion



#### 4.2.5 L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität in Abhängigkeit von der Dauer der Reaktion

Die Dauer der katalytischen Wirkung der L-Aspartat-N-Acetyltransferase und die Umwandlung des Aspartats in N-Acetyl-Aspartat wurden überprüft. Die unter Standardbedingungen (s. Methoden) durchgeführte Reaktion wurde nach jeweils 10, 30, 120, 240 Minuten beendet (s. Abb. 15). Um die Einwirkung von den im Hirn enthaltenen anderen Enzymen auf das Produkt zu vermeiden, wurde diese Abhängigkeit für jede Fraktion und jedes Material neu bestimmt und die Reaktionsinkubationszeit verändert. Die L-Aspartat-N-Acetyltransferase - Reaktion in dem mikrosomalen 100.000xg – Pellet verläuft bei einer Inkubationszeit von bis zu 20 Minuten linear (s. Abb. 17), während die Dauer der L-Aspartat-N-Acetyltransferase – Reaktion des bei 50.000xg - Zentrifugation gewonnenen Membranpellets eine Linearität bei 30 bis 120 Minuten Inkubationszeit aufweist (s. Abb. 15 und 16).

Abbildung 15: Dünnschichtchromatographie zur Bestimmung des Zusammenhangs zwischen der L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität der 50.000xg-Pellet- Membranfraktion und der Reaktionsdauer

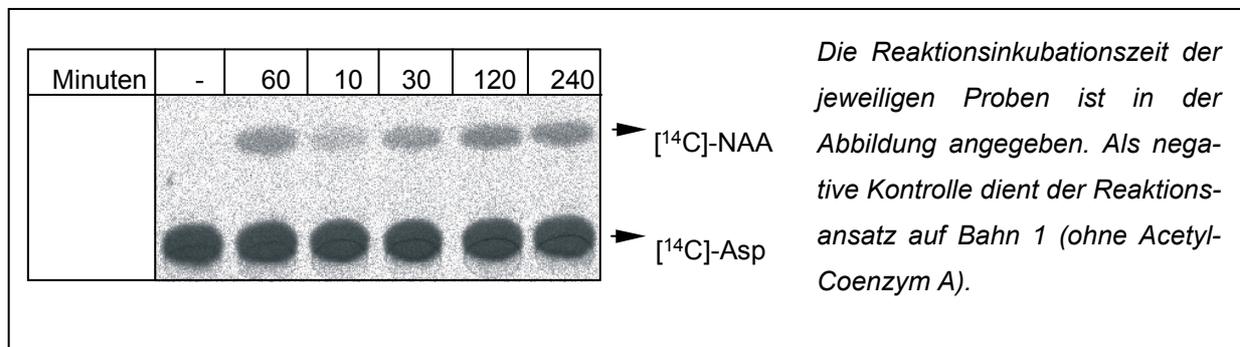
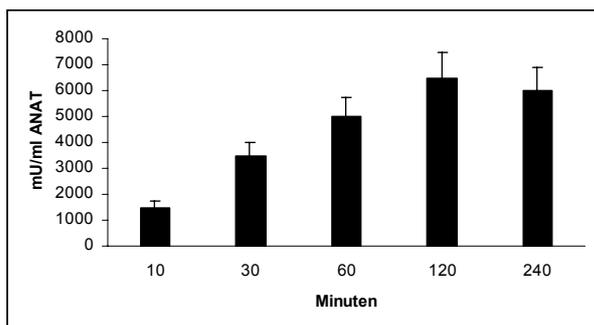
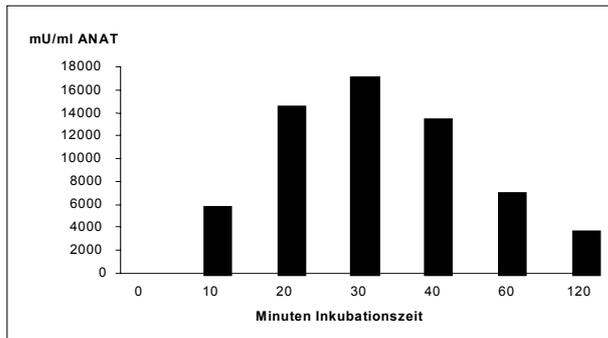


Abbildung 16: Balkendiagramm der L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität der 50.000xg - Hirnmembranfraktion in Abhängigkeit von der Reaktionsdauer



Das im Kapitel Versuche und Ergebnisse, Punkt 4.3, beschriebene Anreicherungsschema für die L-Aspartat-N-Acetyltransferase umfasst die Verwendung der mikrosomalen 100.000xg - Hirnmembranfraktion. Deshalb wurde die optimale Reaktionsdauer dieser Fraktion analysiert und in Abbildung 17 dargestellt.

Abbildung 17: Balkendiagramm der Abhängigkeit der L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität der mikrosomalen (100.000xg) Fraktion von der Reaktionsdauer



*Es wurden L-Aspartat-N-Acetyltransferase - Reaktionen mit einer Dauer von 0 bis zu 120 Minuten untersucht. Der Reaktionsansatz enthielt 50 µg Protein.*

## 4.2.6 Mögliche Hemmstoffe der L-Aspartat-N-Acetyltransferase

Um eine Affinitätschromatographie zur Reinigung der L-Aspartat-N-Acetyltransferase durchführen zu können, wurde der Einfluss der möglichen Hemmstoffe (Inhibitoren) auf die L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität in den nachfolgend beschriebenen Experimenten überprüft.

Als L-Aspartat-N-Acetyltransferase – Hemmstoffe wurden die *Aminosäuren* L-Glutamat, L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Homoserin, Homocystein; *die Substratanaloga* N-Methyl-D-Aspartat, L-Methyl-DL-Aspartat, DL-Threo- $\beta$ -Hydroxy-Aspartat, DL-threo- $\beta$ -Methyl-Aspartat; *Analoga des Übergangszustandes* wie L(+)-2-Aminodiacetat, Iminobutarat, Thiodiglycolicsäure; *die Produktanaloga* N-Acetyl-L-Aspartat, N-Acetyl-Aspartyl-Glutamat sowie *die Metaboliten aus der Gluconeogenese und dem Citrat-Zyklus* L(-)Malat, Succinat, Oxalacetat, 2-Oxoglutarat (alter Name  $\alpha$ -Ketoglutarat) untersucht (s. Abb. 18 und 19).

Die Mitglieder der proteinogenen Aminosäuren - Familien leiten sich von gemeinsamen Vorstufen ab, die alle dem Citrat-Zyklus oder dem katabolen Kohlenhydrat-Stoffwechsel entstammen. Nicht essentiell sind die Aminosäuren, die durch Transaminierung aus 2-Oxosäuren des Intermediär-Stoffwechsels entstehen, sowie deren Amide. Zu diesen Aminosäuren gehören die Glutamat- (abgeleitet von 2-Oxoglutarat) und die Aspartat-Familie (abgeleitet von Oxalacetat). Es wurde festgestellt, dass trotz des gemeinsamen Biosynthesenwegs des Glutamats und Aspartats, das Glutamat die L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität der mikrosomalen Fraktion nicht verändert (s. Versuche und Ergebnisse, Abb. 3). Das N-Acetyl-L-Aspartat als Produktinhibitor und das N-Acetyl-Aspartyl-Glutamat beeinflussen die L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität (s. Versuche und Ergebnisse, Punkt 4.1.4).

Unter den restlichen untersuchten möglichen Inhibitoren wurde kein L-Aspartat-N-Acetyltransferase – Hemmer gefunden, der für die Hemmstoffe - Affinitätsreinigung des Enzyms verwendet werden könnte (s. Abb. 18 und 19).

Abbildung 18: Dünnschichtchromatographie zur Bestimmung von möglichen L-Aspartat-N-Acetyltransferase - Inhibitoren unter den Strukturanalogen des Aspartats und den Metaboliten aus dem Citrat-Zyklus

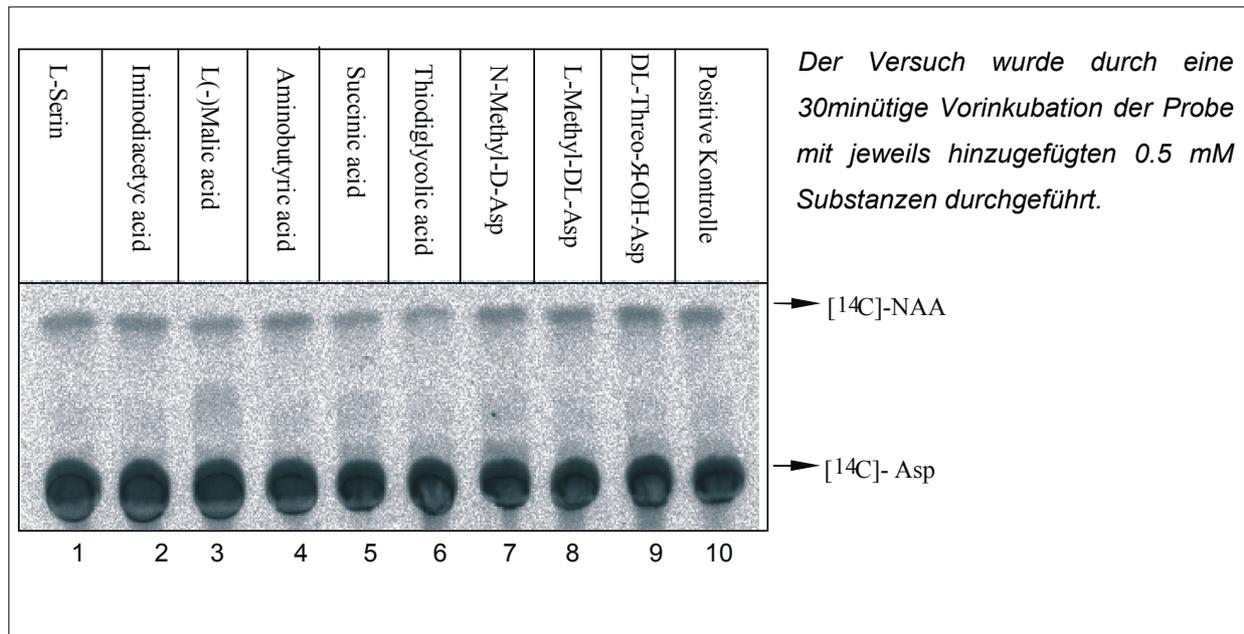
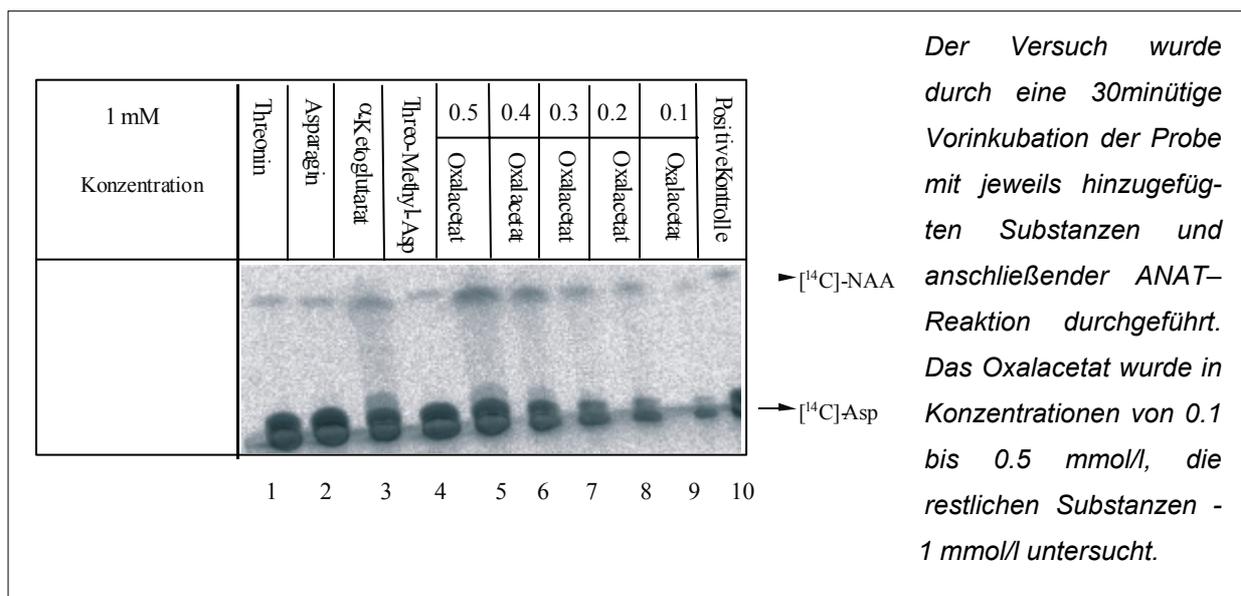


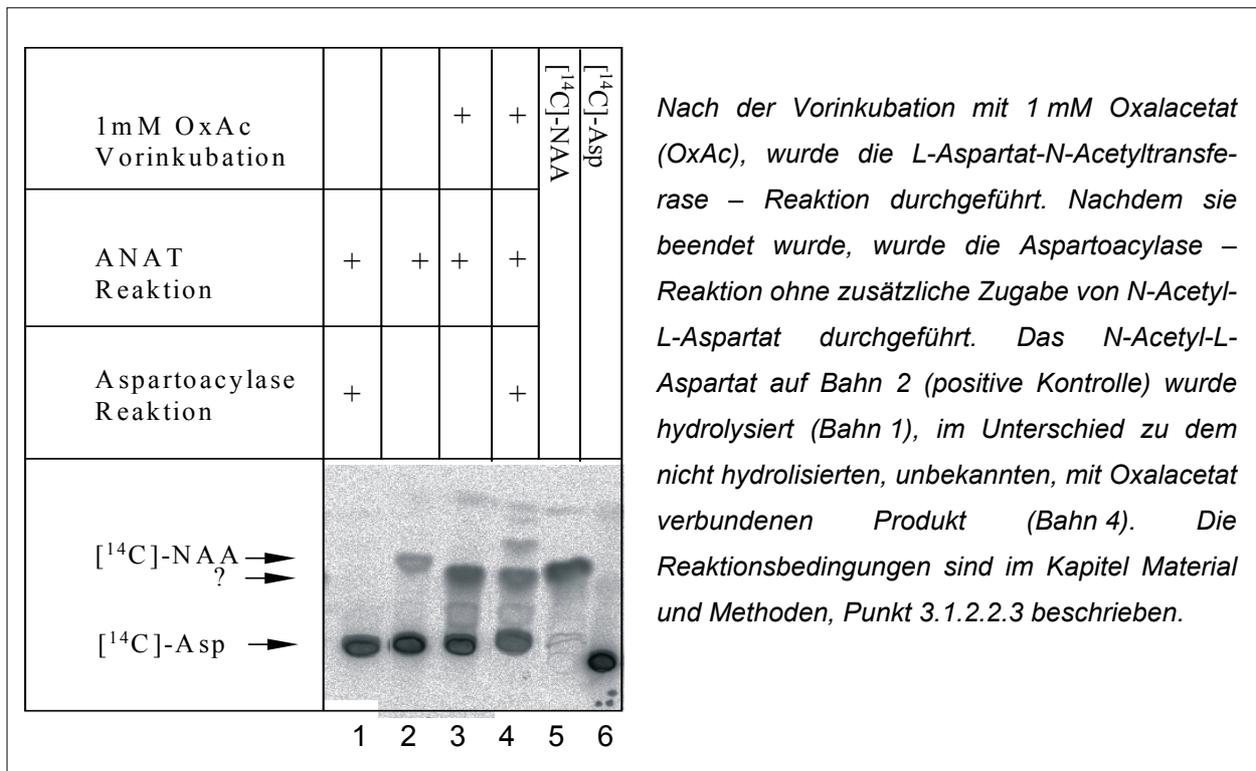
Abbildung 19: Dünnschichtchromatographie zur Bestimmung von möglichen L-Aspartat-N-Acetyltransferase - Inhibitoren unter den Metaboliten aus dem Aminosäurenstoffwechsel und dem Abbauzyklus des Aspartats



#### 4.2.6.1 Einfluss des Oxalacetats auf die L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität

Das Oxalacetat beeinflusste die L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität. Bei 30minütiger Vorinkubation des Hirnextraktes mit dem 1 mM Oxalacetat entstanden ausgeprägte Banden (s. Abb.19, Bahnen 5 bis 9). Es musste daher nachgewiesen werden, dass diese Banden kein N-Acetyl-L-Aspartat darstellen. Das aus der Vorinkubation mit Oxalacetat gewonnene Produkt wird aus enzymkatalysierten Prozessen abgeleitet und ohne eine Enzymquelle nicht gebildet. Es entsteht ohne die Beteiligung des Acetylcoenzyms A und wird nicht gebildet, wenn kein Aspartat als Substrat verwendet wurde. Dies deutet darauf hin, dass das Aspartat in eine andere Substanz umgewandelt wird. Das unidentifizierte Produkt, welches mit einem Rf-Wert von 0.68 auf der Dünnschichtchromatographie - Platte wanderte, konnte in der anschließenden Aspartoacylase – Reaktion nicht hydrolysiert werden (s. Abb. 20). Dies beweist, dass das Produkt unterschiedlich von dem N-Acetyl-L-Aspartat ist und beide Produkte verschiedener Enzymreaktionen sind.

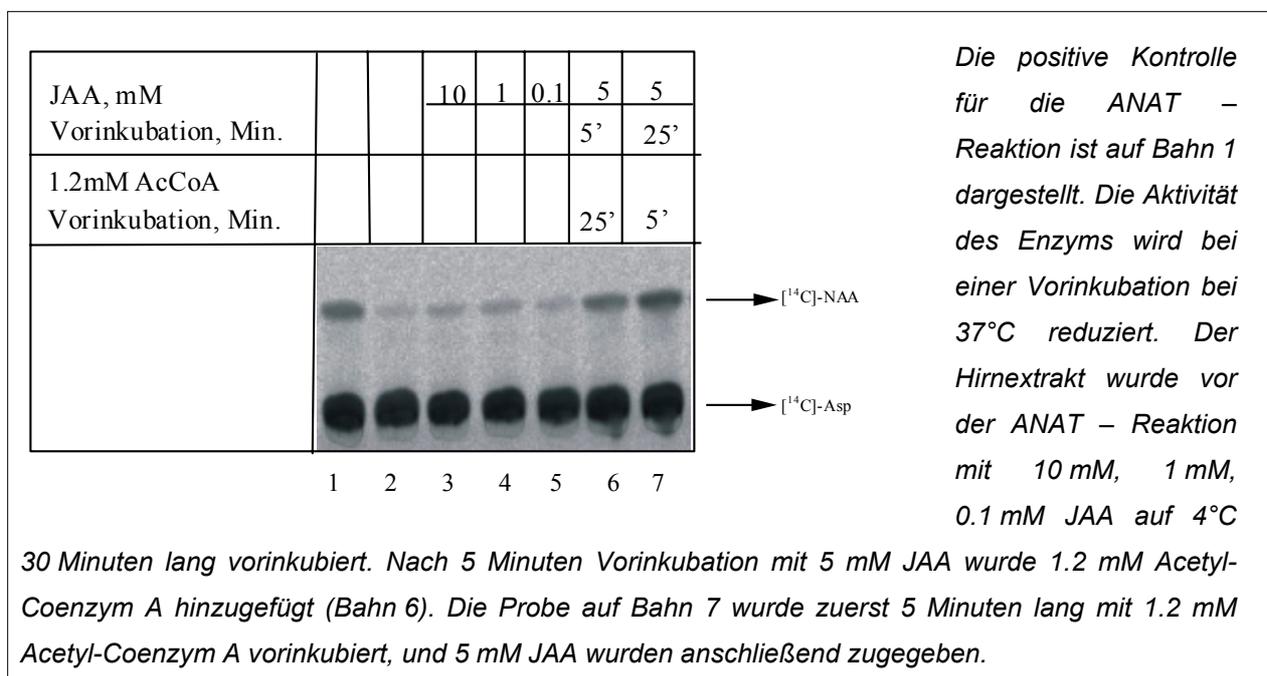
Abbildung 20: Dünnschichtchromatographie zur Bestimmung der L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität; Aspartoacylase – Hydrolyse des N-Acetyl-L-Aspartats



#### 4.2.6.2 Einfluss des Jodacetamids und N-Ethylmaleinimids auf die L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität

Eine kompetitive Hemmung entsteht, wenn Substrat und Inhibitor um die gleiche Bindungsstelle am Enzym konkurrieren. Reagiert ein Hemmstoff mit einer für die Aktivität wichtigen Gruppe, ohne die Substratbindung zu beeinträchtigen, ist der Hemmtyp nicht kompetitiv. Allosterische Inhibitoren binden an separate Bindungsstellen außerhalb des aktiven Zentrums, wodurch es zu einer Konformationsänderung des Enzym-Proteins und zu indirekter Verminderung der Aktivität kommt. Jodacetamid (JAA) und N-Ethylmaleinimid (NEM) wurden als mögliche, nicht kompetitive Inhibitoren untersucht, um die chemische Natur und Konformation der Substratbindungsstelle der L-Aspartat-N-Acetyltransferase zu sondieren. Diese Substanzen reagieren mit den Thiol-Gruppen eines Enzyms und könnten dadurch seine Enzymaktivität verändern. Bei einer Inhibition könnte die L-Aspartat-N-Acetyltransferase mit radioaktiv markiertem N-Ethylmaleinimid oder Jodacetamid markiert und so aus dem Hirnextrakt gereinigt werden. Es wurden Konzentrationen von 0.1 mM bis 10 mM Jodacetamid in einer 30minütigen Vorinkubation mit dem Hirnextrakt bei 4°C sowie die anschließende L-Aspartat-N-Acetyltransferase – Reaktion untersucht (s. Abb. 21), wobei eine geringe Inhibition festgestellt wurde. Die Hemmung wurde von dem vorher bzw. hinterher hinzugefügten und mitinkubierten Acetyl-CoA beeinflusst. Wahrscheinlich blockiert das Acetyl-Coenzym A die Stelle, welche das Jodacetamid bindet. Eine leichte Aktivierung der Transferaseaktivität durch die Zugabe von Acetyl-Coenzym A wurde verzeichnet (s. Abb. 21, Bahnen 6 und 7).

Abbildung 21 Dünnschichtchromatographie zur Bestimmung des Einflusses des Jodacetamides auf die L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität



Da 10 mM N-Ethylmaleinimid (NEM) die L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität inhibierte, wurden weitere Konzentrationsverdünnungen bis zu 0.001 mM NEM und ihren Einfluss auf die Enzymaktivität überprüft. Die geringen N-Ethylmaleinimid - Konzentrationen führten jedoch zu keiner Inhibition der L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität, wenn eine 30minütige Vorinkubation bei 4°C durchgeführt wurde.

Wegen festgestellter unzureichender Inhibition der untersuchten Substanzen wurde als Nächstes die Zellfraktionierung für die Anreicherung der L-Aspartat-N-Acetyltransferase untersucht.

## 4.3 Aufreinigung der Hirn - L-Aspartat-N-Acetyltransferase

Um eine genaue chemische und funktionelle Strukturuntersuchung zu erreichen, ist die Isolierung und Reinigung des einzelnen Proteins die Voraussetzung. In ihrer natürlichen (biologischen) Konformation liegen Proteine als native Proteine vor. Nur die unverletzte Raumstruktur garantiert ihre biologische Funktion.

### 4.3.1 Zellfraktionierung

Unter Zellfraktionierung (Plattner, 2002) versteht man eine Reihe von verschiedenen Verfahrensweisen, um Zellen in ihre Bestandteile zu zerlegen, also bestimmte Organellen und Biopolymeren als Fraktionen von möglichst grosser Reinheit zu isolieren.

Die verwendeten Trennungsverfahren der Zellfraktionierung erlauben die teilweise Anreicherung der L-Aspartat-N-Acetyltransferase aus komplexen, heterogenen Mischungen. Um die optimale Folge von Reinigungsstufen zu etablieren, musste eine Reihe von Vorversuchen vorangestellt werden. Der Fortschritt der Reinigung spiegelt sich in der Zunahme der spezifischen Aktivität des Proteins wieder. Die spezifische Aktivität eines Proteins in einer bestimmten Fraktion wird durch das Verhältnis der gesamten gemessenen biologischen Einheiten zu dem Proteingehalt ausgedrückt. Die Ausbeute in Prozent wird als Quotient der Gesamtaktivität der Fraktion im Ablauf einer bestimmten Fraktionierungsmethode zu der Gesamtaktivität des ursprünglichen Gemisches angegeben. Den Reinigungsfaktor (Enzymanreicherung) gibt man wiederum als Verhältnis der spezifischen Aktivität der gereinigten Fraktion zu der spezifischen Aktivität des Gemisches vor der Reinigungsprozedur (s. Abb. 22 und Tab. 29) an.

Abbildung 22: Ausbeute - und Reinigungsfaktor - Definitionen

$$\text{Ausbeute} = \frac{\text{Gesamtaktivität einer Fraktion}}{\text{Gesamtaktivität des ursprünglichen Gemisches}}$$

$$\text{Reinigungsfaktor} = \frac{\text{Spezifische Aktivität einer bestimmten Fraktion}}{\text{Spezifische Aktivität des Gemisches}}$$

### 4.3.1.1 Homogenisation

Die Isolierung der Zellbestandteile begann mit dem mechanischen Zerkleinern des Hirngewebes. Das anschließende Homogenisieren erfolgte in einem zur Gewebeflüssigkeit isosmotischen Puffer aus Rohrzucker, Tris-HCl - Puffer und einer Mischung verschiedener Proteaseninhibitoren (s. Abschn. Material und Methoden, Punkt 3.4.1.1). Eine 250 mM - Konzentration der Saccharose liefert einen genügenden osmotischen Druck, um Schwellen und Platzen der Partikel zu vermeiden (s. Abschn. Mitochondrienanreicherung) und behindert die Transferaseaktivitätsbestimmung nicht. Die Homogenisierung wurde mit dem Potter- Elvehjem- Homogenisator (einem rotierenden Teflon- Stempel in einem Glaszylinder) bei 800 rpm, acht Mal auf- und ab- angetrieben, durchgeführt. Die in Homogenisationsmedium suspendierten Partikel (Organellen bis Makromolekülen) wurden auf die nachfolgende Zentrifugation vorbereitet.

### 4.3.1.2 Differentialzentrifugation

Die eigentliche Fraktionierung der Zellkomponenten wurde durch Differentialzentrifugation (preparative Ultrazentrifugation) erreicht. Dadurch wurden die Organellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Gestalt und Dichte nacheinander aus der Suspension sedimentiert. Mit zunehmender g-Zahl bei der Zentrifugation wurde das Homogenat in mehrere Pellets und Überstände aufgeteilt.

Das erste Pellet<sub>2000g</sub> (P<sub>2000g</sub>) enthält die Zellen, Zelltrümmer und Zellkerne und wurde durch Zentrifugation bei 2000facher Erdbeschleunigung (2000g x 5 Minuten) gewonnen (s. Abb. 23). Im zweiten Pellet (P<sub>12.500g</sub>) wurden Mitochondrien, Zellmembranen, Lysosomen in 10 minütiger Zentrifugation sedimentiert. Aus diesem Pellet wurden intakte Mitochondrien isoliert (s. Abschnitt 4.3.1.3) und auf Leitenzym - und L-Aspartat-N-Acetyltransferase - Aktivitäten untersucht. Um eine reine, von Mitochondrien freie Mikrosomenfraktion zu erhalten, wurden die Mitochondrien immer durch eine einstündige Zentrifugation bei 12.500xg entfernt. Die bei 100.000xg durchgeführte einstündige Zentrifugation führt zu einer endgültigen Abtrennung aller Membrane und Membranproteine (im Pellet<sub>100.000g</sub>), einschließlich der L-Aspartat-N-Acetyltransferase, von den Cytosolproteinen, die im Überstand verbleiben (s. Abb. 23). Durch diesen Schritt wurden auch die Synaptosomen (in der Regel reichen 50.000xg bis 60.000xg aus) von den anderen Membranorganellen abgetrennt. Der 100.000xg – Überstand zeigte keine L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität.

Die zwei grundsätzlichen Zentrifugationsverfahren, Differentialzentrifugation und Dichtegradienten – Zentrifugation<sup>1</sup>, wurden sowohl für die Zellfraktionierung von Hirngewebe als auch von Zelllinien (s. Abschn. 4.4 – L-Aspartat-N-Acetyltransferase in Zelllinien) eingesetzt.

Da die Anwendung des Homogenisierungsverfahrens und des Differentialzentrifugationsverfahrens bei Untersuchungen an unterschiedlichen Geweben ausschließlich empirisch ist, wurden die Methoden zu unserem Zweck optimiert und angepasst. Um die Beschädigung der Zellorganellen der Gewebe beim Einfrieren zu vermeiden, wurden die Trennungsmethoden immer mit frisch entnommenem Ratten- oder Rinderhirn durchgeführt.

---

<sup>1</sup> – Ultrazentrifugation in übereinander gelegten Saccharose-Lösungen abnehmender Dichte.



### 4.3.1.3 Mitochondrienanreicherung

Normalerweise werden die Mitochondrien durch 15minütige Zentrifugation bei 15.000xg pelletiert. Diese Pellet - Fraktion ist mit Lysosomen und beim Hirn mit Synaptosomen kontaminiert<sup>1</sup>. Da es in der Literatur behauptet wurde (Truckenmiller et al. 1985; Metha et al. 1995), dass die Aspartat-Acetyltransferase ein mitochondriales Enzym ist, wurden Mitochondrien aus Rattenhirn durch Ficoll - Gradienten (s. Abschnitt Methoden, Punkt 3.4.1.5.1) angereichert sowie die Acetyltransferaseaktivität dieser Fraktion und der restlichen Differentialzentrifugationsfraktionen gemessen und verglichen (s. Abb. 24).

Bei der Zellfraktionierung ist die Analyse des Reinheitsgrades der gewonnenen Fraktion von grosser Bedeutung. Durch die Analyse der Aktivitäten organellen-spezifischer Enzyme – Leitenzyme, lässt sich bestimmen, ob die gewünschten Zellorganellen in einer Fraktion enthalten sind oder nicht, sowie ob diese Fraktion frei von anderen Bestandteilen ist. Die festgestellte höchste spezifische Aktivität des Leitenzyms für die inneren mitochondrialen Membranen, Cytochrom c Oxidase, bewies, dass die Prozedur eine angereicherte Mitochondrienfraktion ergibt (s. Abb. 26). Gleichzeitig wurde  $\beta$ -Hexosaminidase als Leitenzym für Lysosomen gemessen (s. Abb. 27). In der Tabelle 28 ist die Zusammenfassung der Ergebnisse der bestimmten Enzymaktivitäten dargestellt. Die Enzymanreicherung und die Kontamination mit anderen Organellen wurden für jede Fraktion bestimmt. Die weitere Arbeitsstrategie baute auf diesen Ergebnissen<sup>2</sup> auf, weil in der Mikrosomenfraktion die höchste spezifische L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität detektiert wurde (s. Abb. 25), anders als die höchsten spezifischen Aktivitäten der zwei Leitenzyme Cytochrom c Oxidase in den isolierten Mitochondrien und  $\beta$ -Hexosaminidase in den mit fast gleicher g-Zahl wie die Mitochondrien pelletierten Lysosomen<sup>3</sup> (s. Abb. 26 und 27).

---

<sup>1</sup> Storrie B. and Madden E. (1990) Isolation of Subcellular Organelles; Met. in Enzym. 182, 203 - 235

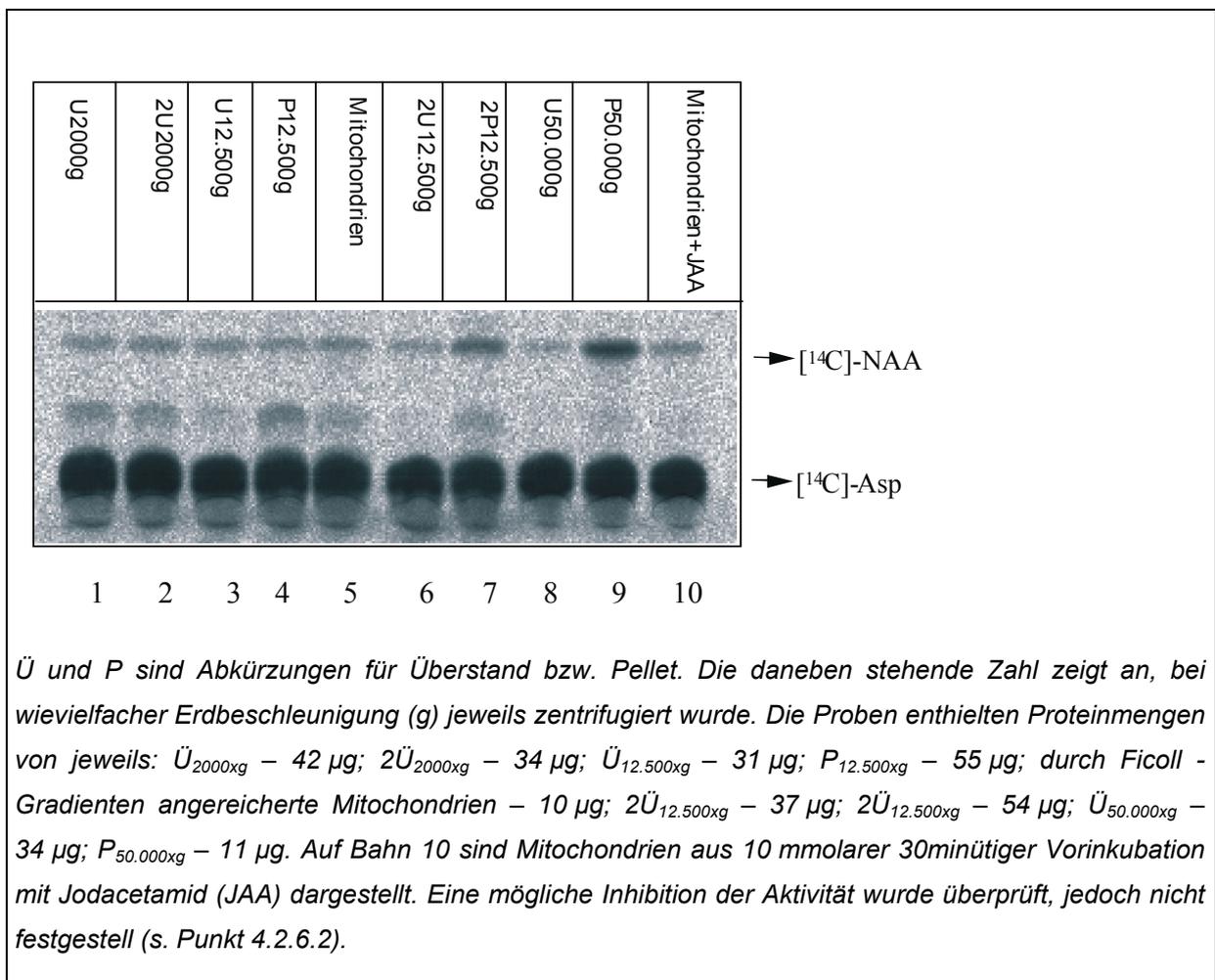
<sup>2</sup> Der Versuch wurde drei Mal wiederholt

<sup>3</sup> In dem Pellet<sub>12.500g</sub> vor und nach der Entfernung der Mitochondrien; Die Lysosomen platzen leicht, so dass ein Hintergrund immer beobachtet wird.

### 4.3.1.3.1 Bestimmung der spezifischen Aktivitäten der Leitenzyme Cytochrom c Oxidase und $\beta$ -Hexosaminidase sowie L-Aspartat-N-Acetyltransferase in Rattenhirn

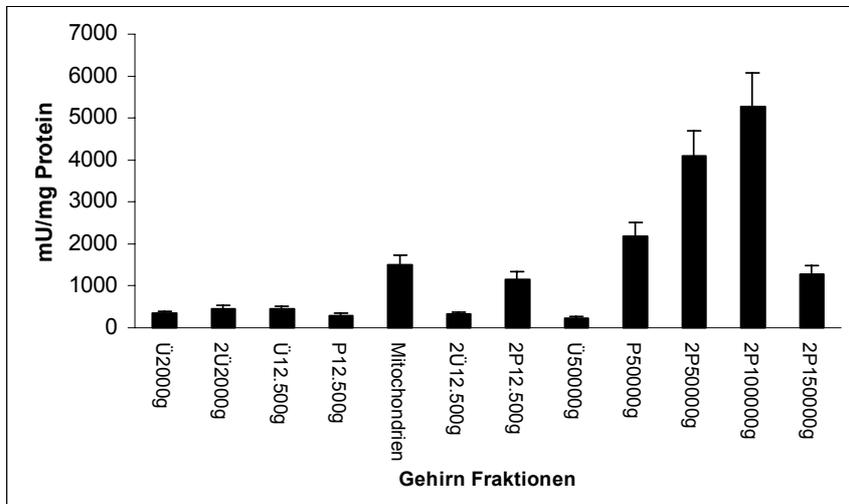
Die L-Aspartat-N-Acetyltransferase - Enzymaktivität und die Proteingehalte wurden in allen Stufen vom Homogenat bis zu den einzelnen subzellulären Fraktionen bestimmt.

Abbildung 24: *Aspartat-N-Acetyltransferase* - Aktivität in den aus der Differentialzentrifugation gewonnenen Fraktionen und in den aus Rattenhirn isolierten Mitochondrien; Dünnschichtchromatographie



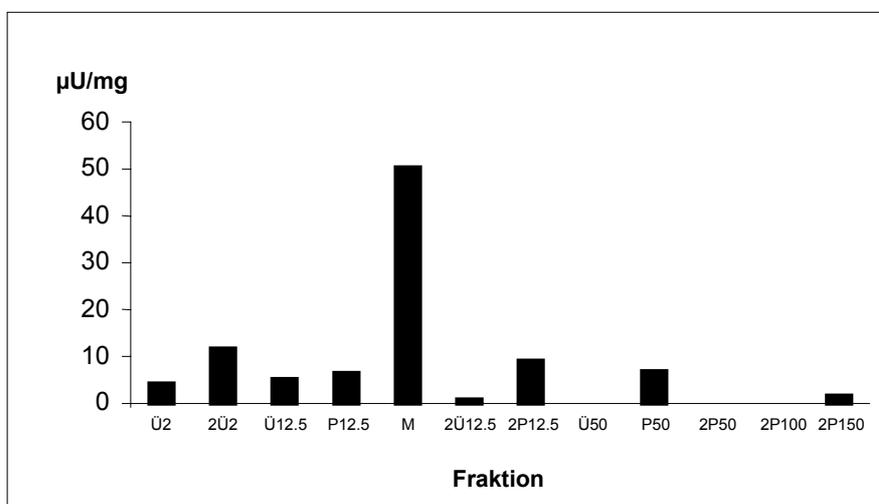
Um eine bessere Trennung der Zellbestandteile zu erreichen, wurde die Differentialzentrifugation bis 150.000xg durchgeführt. Dabei wurde die L-Aspartat-N-Acetyltransferase im Membranpellet nachgewiesen. Die festgestellte Transferaseaktivität wird als spezifische Aktivität in Abbildung 25 dargestellt.

Abbildung 25: Spezifische Aktivität der *L-Aspartat-N-Acetyltransferase* während der Differentialzentrifugation



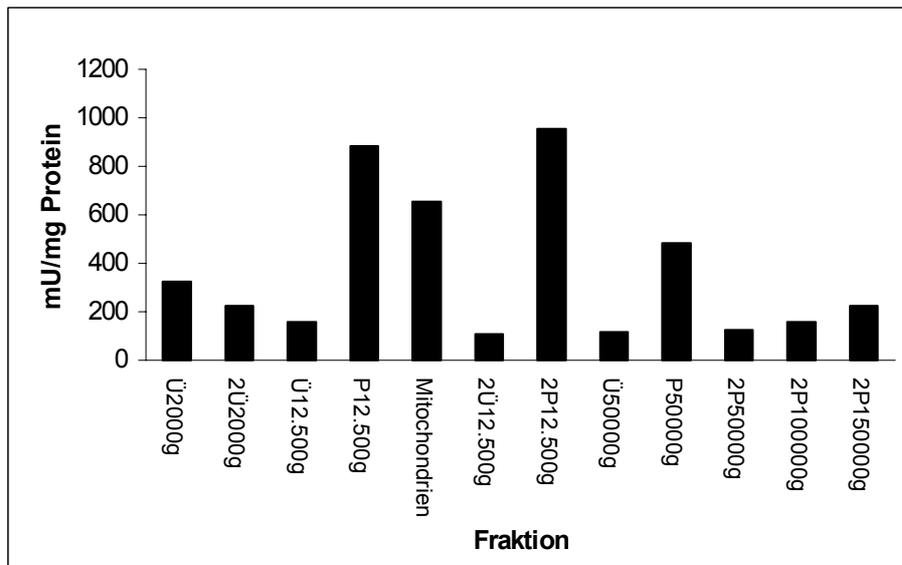
Die Ergebnisse zeigen, dass die höchste spezifische *L-Aspartat-N-Acetyltransferase*aktivität für die Mikrosomenfraktion nachgewiesen wurde, und diese mindestens dreimal höher als die Aktivität in den Mitochondrien war. Die Aktivitätsbestimmung des Leitenzyms Cytochrom c Oxidase (COX) bewies, dass die 100.000xg- Fraktion keine Mitochondrienmembranen enthält, da sie keine Cytochrom c Oxidase - Aktivität aufweist (s. Abb. 26). Erstmals wurde gezeigt, dass die Acetyltransferase nicht in den Mitochondrien, sondern in den Mikrosomen lokalisiert wird.

Abbildung 26: Spezifische Aktivität des Leitenzyms für Mitochondrien – *Cytochrom c-Oxidase*



Die gewonnene Mikrosomenfraktion besteht aus kleinen Membranvesikeln - hauptsächlich Fragmenten des glatten sowie des rauhen Endoplasmatischen Retikulums. Die Mikrosomen können häufig noch Komponente des Golgi- Apparates und vesikulierte Fragmente der Zellmembran als Kontamination enthalten (Plattner 2002). Sie enthalten jedoch keine Mitochondrien (s. Abb. 26) und Lysosomen (s. Abb. 27).

Abbildung 27: Spezifische Aktivität des Leitenzyms für Lysosomen –  $\beta$ -Hexosaminidase



#### 4.3.1.4 Enzymanreicherung während der Zellfraktionierung des Rattenhirns

Die L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität in mU/ml, die Gesamtaktivität der Differentialzentrifugationsfraktionen in Units sowie die spezifischen Aktivitäten der Leitenzyme Cytochrom c Oxidase und  $\beta$ -Hexosaminidase sind in der Tabelle 28 dargestellt, um die Enzymanreicherung während der Zellfraktionierung des Rattenhirns zu veranschaulichen.

Im Idealfall sollte eine Reinigungsstufe die spezifische Aktivität erhöhen, daraus müßte sich ein Reinigungsfaktor grösser als eins und gleichzeitig eine verhältnismäßig hohe Ausbeute ergeben. Es wird empfohlen, eine Stufe mit einem Reinigungsfaktor unter 5 nicht anzuwenden. Der Reinigungsfaktor der L-Aspartat-N-Acetyltransferase in der Mikrosomenfraktion des Rattenhirns ist gleich 15.4 und die Ausbeute beträgt 23 % (s. Tab. 29).

Tabelle 28: Zusammenfassung der Ergebnisse von den gemessenen Enzymaktivitäten der Differentialzentrifugationsfraktionen und der aus *Rattenhirn* angereicherten Mitochondrienfraktionen

Fraktion aus Rattenhirn	ANAT mU/ml	Summe ANAT, U	Spez. ANAT, mU/mg Protein	Spez. COX, µU/mg Protein	Spez. β-Hex mU/mg Protein
Ü <sub>2000xg</sub>	1438	53	342	5	323
2Ü <sub>2000xg</sub>	1575	55	463	12	224
Ü <sub>12.500xg</sub>	1388	44	448	5	157
P <sub>12.500xg</sub>	1638	10	298	7	885
<b>Mitochondrien</b>	<b>1488</b>	<b>2</b>	<b>1503</b>	<b>51</b>	<b>654</b>
2Ü <sub>12.500xg</sub>	1225	34	331	0,8	109
2P <sub>12.500xg</sub>	6237	3	1155	9	953
Ü <sub>50000xg</sub>	775	21	227	0	118
P <sub>50000xg</sub>	14250	3	2192	7	482
2P <sub>50000xg</sub>	4500	6	4090	0	127
<b>2P<sub>100000xg</sub></b>	<b>9500</b>	<b>12</b>	<b>5278</b>	<b>0</b>	<b>160</b>
2P <sub>150000xg</sub>	4875	6	1282	1,6	223

Tabelle 29: L-Aspartat-N-Acetyltransferase - Anreicherung und - Ausbeute während der Zellfraktionierung durch Differentialzentrifugation bei 2.000xg bis 150.000xg und Mitochondrienisolierung

Fraktion aus Rattenhirn	Anreicherung Rf	Ausbeute %
Überstand 2000xg	1	100
2Überstand 2000xg	1,35	100
Überstand 12.500xg	1,31	83
Pellet 12.500xg	0,87	19
<b>Mitochondrien</b>	<b>4,39</b>	<b>4</b>
2Überstand 12.500xg	0,97	64
2Pellet 12.500xg	3,38	6
Überstand 50.000xg	0,66	40
Pellet 50.000xg	6,41	6
2Pellet 50.000xg	11,96	11
<b>2Pellet 100.000xg</b>	<b>15,43</b>	<b>23</b>
2Pellet 150.000xg	3,75	11

### 4.3.1.5 Aufreinigung der L-Aspartat-N-Acetyltransferase aus Rinderhirn

Das für die Reinigungsversuche ursprünglich verwendete Material Rattenhirn wurde durch Rinderhirn ersetzt. Die höchste spezifische Aktivität der aus Rinderhirn gewonnenen mikrosomalen L-Aspartat-N-Acetyltransferase betrug ca. 17.000 mU/mg, ein mindestens dreifach höherer Wert im Vergleich zu der spezifischen Aktivität der aus Rattenhirn gewonnenen L-Aspartat-N-Acetyltransferase, welche eine Aktivität von ca. 5300 mU/mg aufwies. Die L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität wurde für jede in der Differentialzentrifugation gewonnene Fraktion, immer wenn neues Hirn als Anfangsmaterial verwendet wurde, bestimmt (s. Abb. 30). Die stark ausgeprägte L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität erlaubte die weitere Verwendung der mittels Differentialzentrifugation erhaltenen Rinderhirnextrakte in den konventionellen Reinigungsmethoden (s. Abb. 31).

Abbildung 30: Dünnschichtchromatographie zur Bestimmung der L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität der durch Differentialzentrifugation gewonnenen *Rinderhirnfraktionen*

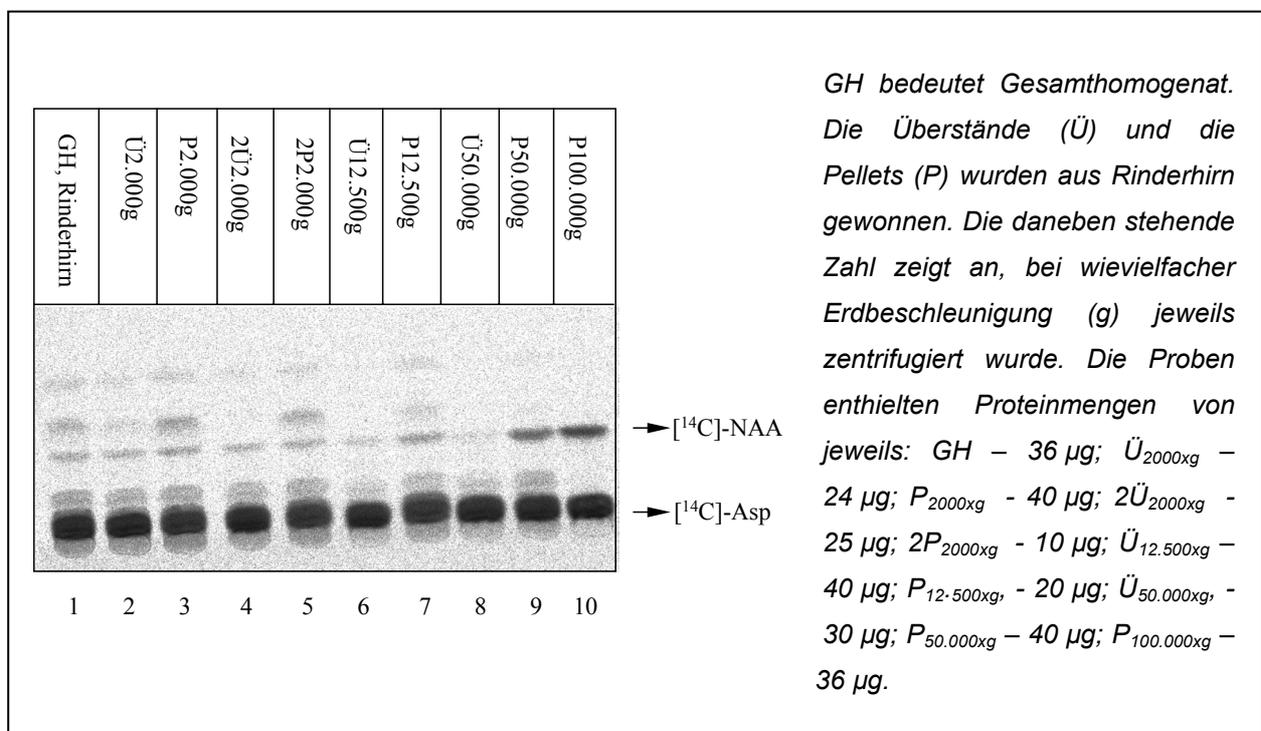
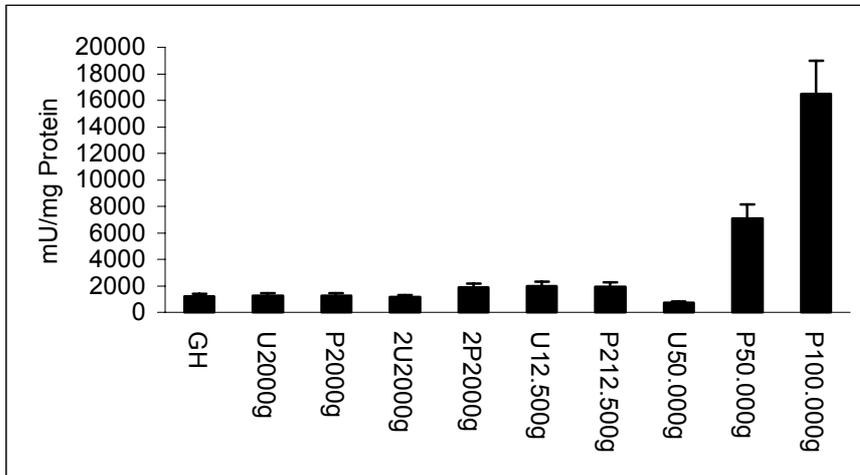


Abbildung 31: Spezifische L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität der in Differentialzentrifugation gewonnenen Rinderhirnfractionen

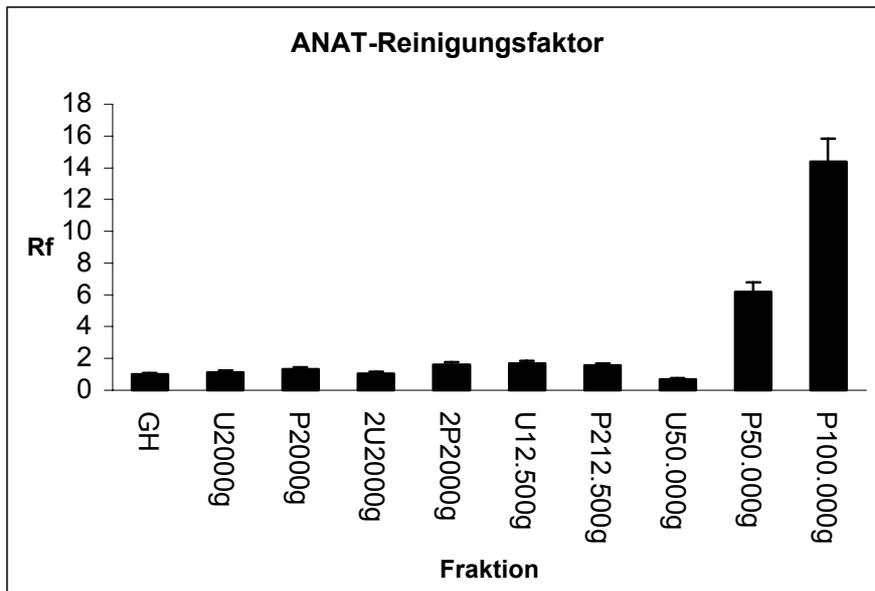


Auf Basis der spezifischen Aktivität (s. Abb. 31) wurde die L-Aspartat-N-Acetyltransferase - Anreicherung berechnet (s. Tab. 32). Die Reinigungsfaktoren der Mikrosomenfraktion bewegten sich in den Grenzen Rf. 12 und Rf. 18. In Abbildung 33 werden die durchschnittlichen Rf- Werte als Balkendiagramm dargestellt.

Tabelle 32: Gesamte und spezifische L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität sowie Reinigungsfaktoren der Rinderhirnfractionen

Fraktion aus Rinderhirn	ANAT mU/ml	Gesamte ANAT Units	Spez. Akt. ANAT mU/mg Protein	Anreicherung Rf
GH	1034	2067	1148	1
Ü <sub>2000xg</sub>	779	1067	1298	1.13
P <sub>2000xg</sub>	1501	946	1500	1.31
2Ü <sub>2000xg</sub>	728	800	1213	1.06
2P <sub>2000xg</sub>	1290	348	1843	1.61
Ü <sub>12.500xg</sub>	388	388	1942	1.69
P <sub>12.500xg</sub>	1779	178	1779	1.55
Ü <sub>50.000xg</sub>	310	311	776	0.68
P <sub>50.000xg</sub>	4955	208	7079	6.17
<b>P<sub>100.000xg</sub></b>	<b>ca. 18000</b>	<b>1800</b>	<b>16532</b>	<b>14.4</b>

Abbildung 33: Anreicherung der L-Aspartat-N-Acetyltransferase aus Rinderhirnfractionen



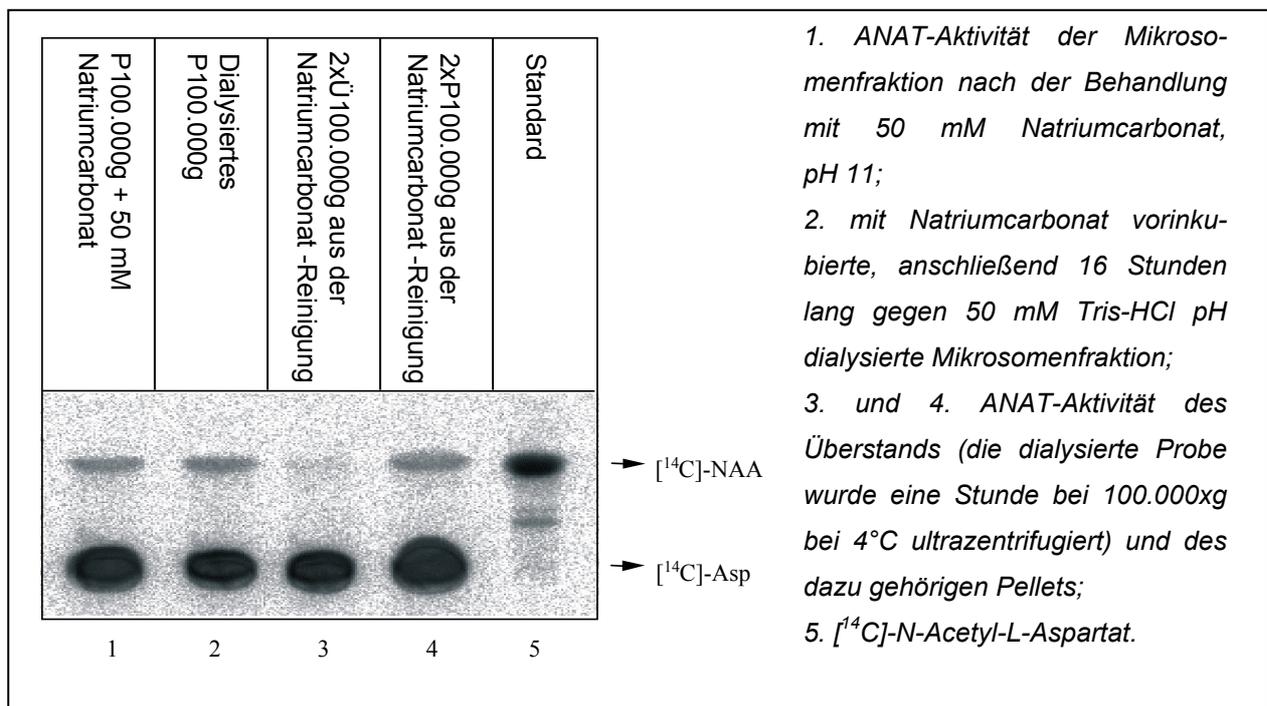
Durch Differentialzentrifugation des Rinderhirnhomogenats wurde eine Anreicherung der L-Aspartat-N-Acetyltransferase in der Mikrosomenfraktion (100.000xg- Pellet) mit Rf ca. 14.4 erreicht. Das vorliegend empfohlene Schema für die Differentialzentrifugation des Gehirns wird in dem Abschnitt Versuche und Ergebnisse, Punkt 5 näher beschrieben.

#### 4.3.2 Reinigung der membranassoziierten Proteine

Periphere Membranproteine lösen sich in Puffern hoher oder niedriger Ionenstärke. Die L-Aspartat-N-Acetyltransferase - reiche Mikrosomenfraktion wurde von den mit Membranen assoziierten Proteinen zusätzlich gereinigt. Dies geschah durch eine einstündige 50 mM-Natriumcarbonat - Vorinkubation ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , pH 11) und anschließende 100.000xg- Zentrifugation. Die Acetyltransferase bleibt im Pellet und stellt einen Beweis für die integrale Membranstruktur des Enzyms dar (s. Abb. 34). Ihre Aktivität wurde durch die Natriumcarbonat - Lösung nicht gestört und eine Dialyse wurde nicht benötigt. Die Entfernung der membranassoziierten Proteine (in dem  $2\ddot{U}_{100.000\text{xg}}$ ) aus der Mikrosomenfraktion erhöht die L-Aspartat-N-Acetyltransferase - Anreicherung bis zu dem Faktor Rf. 26 zu dem Gesamthomogenat. Die spezifische Transferaseaktivität der so gereinigten Mikrosomenprobe betrug ca. 30.000 mU/mg Protein und ergab ein weitere Möglichkeit zur Enzymanreicherung. Das so gewaschene Pellet findet Anwendung als

Anfangsmaterial zur Solubilisierung des Enzyms L-Aspartat-N-Acetyltransferase. Die nach der Natriumcarbonat – Behandlung im 100.000xg – Pellet nachgewiesene L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität beweist, dass die Transferase nicht zu den membranassozierten (peripheren) Proteinen sondern zu den membranintegrierten Proteinen gehört.

Abbildung 34: Dünnschichtchromatographie zur Bestimmung der L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität: Reinigung der mit Membranen assoziierten Proteine aus L-Aspartat-N-Acetyltransferase - reicher Mikrosomenfraktion



### 4.3.3 Solubilisierung des Membranproteins L-Aspartat-N-Acetyltransferase

Um die L-Aspartat-N-Acetyltransferase reinigen zu können, musste sie zuerst mit Hilfe von Detergenzien in eine lösliche Umgebung überführt werden. Der nächste wichtige Schritt zur Aufreinigung des Enzyms war daher die Solubilisierung der L-Aspartat-N-Acetyltransferase aus den Membranen der Mikrosomenfraktion. Als Detergenzien zur Solubilisierung wurden die folgenden auf Grund ihres hydrophoben Teils klassifizierten, molekularen Zwitter<sup>1</sup> *Phenylderivate* – Triton-X-100; *Detergenzien mit aliphatischen Ketten* – Octylglucosid und Lubrol sowie *Steroidgerüste* - Cholat, Deoxycholat, Chaps und Digitonin in verschiedenen Konzentrationen untersucht (s. Abb. 35 und 36).

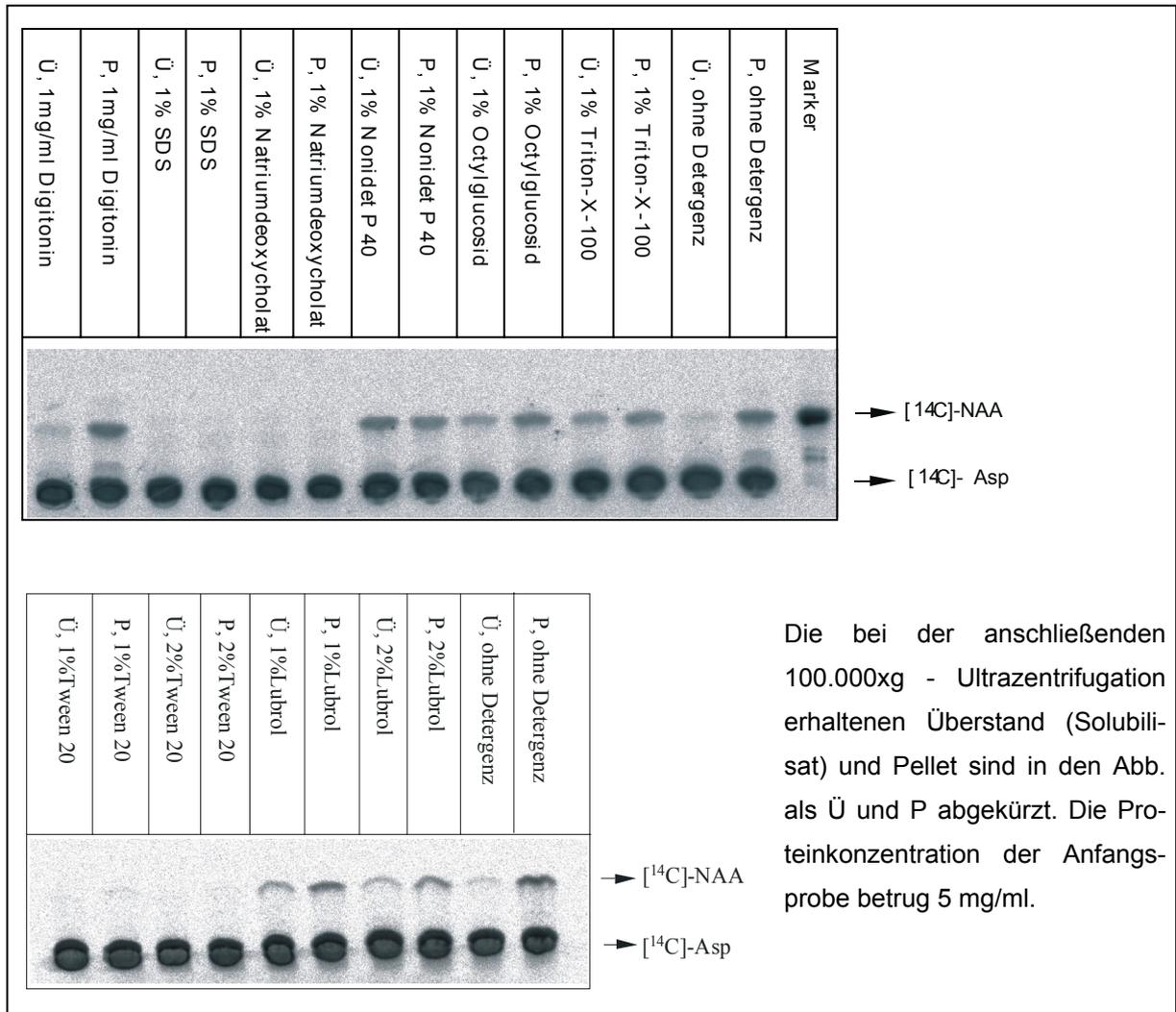
Die durch Zellfraktionierung gewonnene und anschließend von den peripheren Proteinen gereinigte Mikrosomenhirnfraktion wurde in der entsprechenden Detergenzlösung resuspendiert und eine Stunde lang inkubiert. Nach einem weiteren Ultrazentrifugationsschritt bei 100.000xg wurde die Probe in Überstand (Ü) und Pellet (P) abgetrennt. Nach der Extraktion wurden der Proteingehalt und die L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität im Überstand und im Pellet bestimmt. Detergenzien, bei denen sich im Überstand die höchste spezifische Aktivität fand, wurden als geeignet erachtet. Die höchste spezifische L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität (ca. 20.000 mU/mg) konnte bei Solubilisation mit 1 % NP 40 erreicht werden. Diese Aktivität war mit der Aktivität des 1 %igen Octylglucosid - Extraktes vergleichbar. Die Zusammenfassung der Analysen wird in Abbildung 36 dargestellt.

Natriumdeoxycholat, Tween 20 sowie das häufig verwendete Natriumdodecylsulfat (SDS) sind für die Solubilisierung der L-Aspartat-N-Acetyltransferase nicht geeignet (s. Abb. 35 bis 37).

---

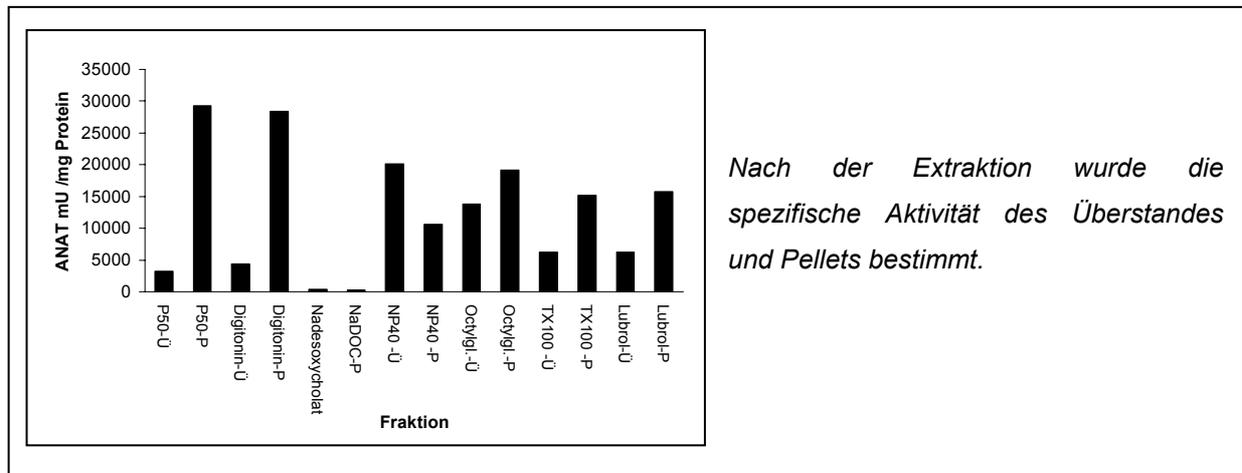
<sup>1</sup> – Zwitter bestehen aus einem hydrophilen und einem hydrophoben Teil.

Abbildung 35: Dünnschichtchromatographie zur Bestimmung der L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität in Gegenwart von Detergenzien



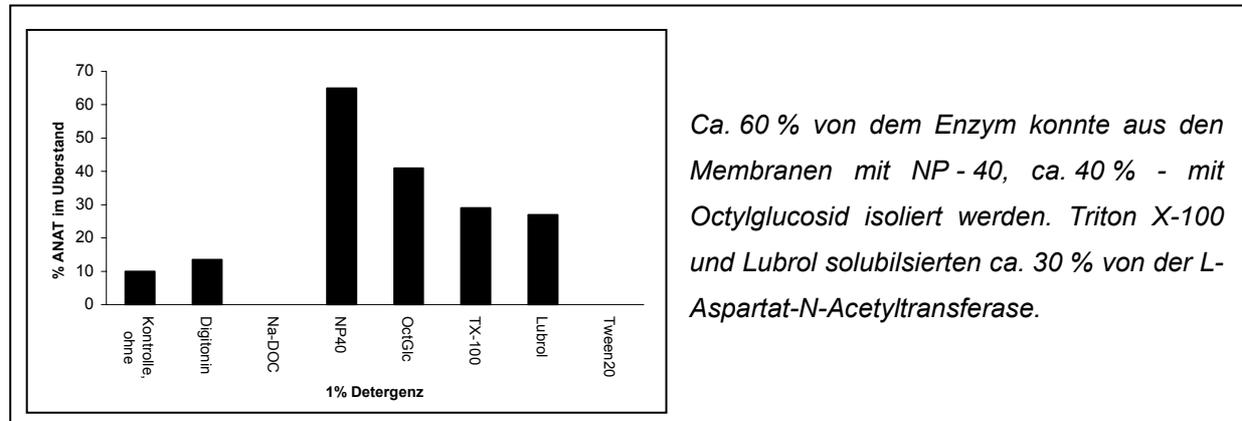
Weil die nichtionischen Detergenzien wie Triton X - 100 und NP 40 sich schwer dialysieren lassen, und Triton-X-100 bei 280 nm absorbiert, was die Proteinquantifizierung stört, wurden zuerst die ionischen Detergenzien Natriumcholat, Octylglucosid und SDS zur L-Aspartat-N-Acetyltransferase – Solubilisierung ausprobiert sowie ihr Einfluß auf die Enzymaktivität analysiert. Die Untersuchung jedes Detergenzes erfolgte in mehreren Vorversuchen (s. Abb. 35 und 36).

Abbildung 36: Spezifische L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität bei der Solubilisierung mit Detergenzien



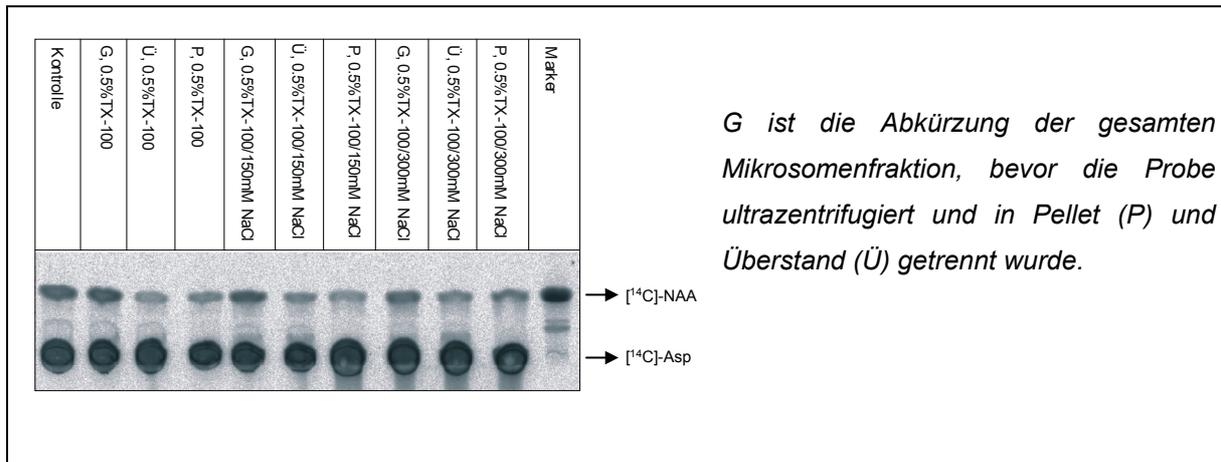
In der folgenden Abbildung wird die Menge (in Prozent) der L-Aspartat-N-Acetyltransferase im Solubilisat, die mit den verschiedenen Detergenzien solubilisiert werden kann, dargestellt.

Abbildung 37: Menge der aus den Mikrosomen im Überstand solubilisierten L-Aspartat-N-Acetyltransferase



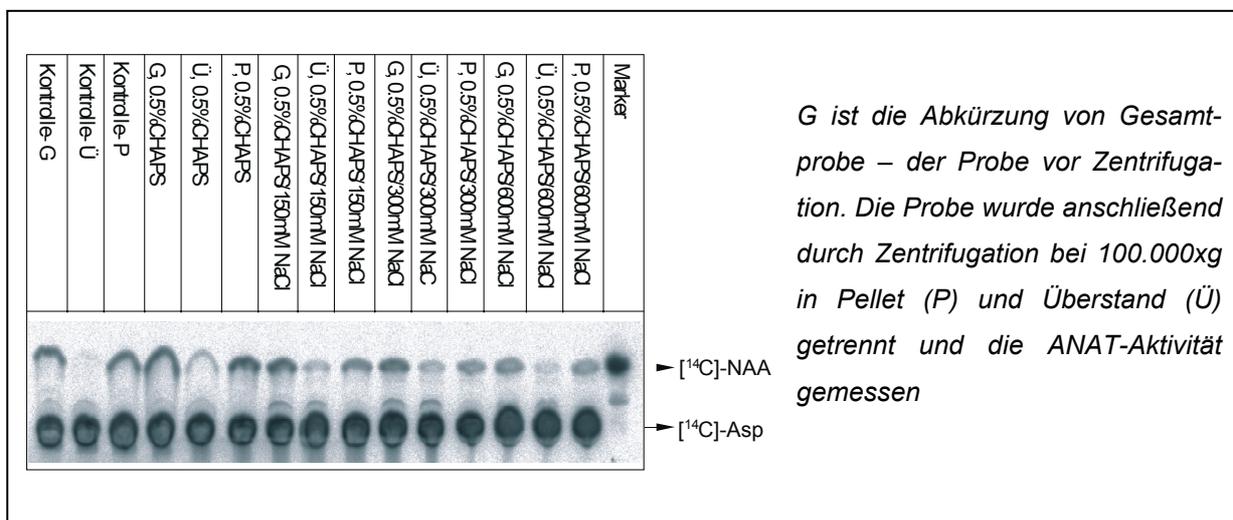
Da die Extraktion von Proteinen nicht nur vom Detergenz, sondern auch vom Salzgehalt abhängt, wurden verschiedene Kombinationen von Triton X - 100 und Chaps in unterschiedlichen Konzentrationen Natriumchlorid - Lösung untersucht. Durch eine Aktivitätsbestimmung der jeweiligen Probe vor bzw. nach der Ultrazentrifugation wurde überprüft, ob die Kombination von Triton X-100 und Salz die L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität der Mikrosomenfraktion behindert (s. Abb. 38). In Gegenwart von 0.5 % Triton X - 100 und 150 mM bis 300 mM Natriumchlorid verringerte sich die Aktivität nicht und verteilte sich zwischen beiden Fraktionen, was eine Solubilisierung der L-Aspartat-N-Acetyltransferase von ca. 40 % ergab.

Abbildung 38: Dünnschichtchromatographie zur Bestimmung der L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität bei Solubilisierung mittels Triton X-100 und Natriumchlorid



Zur Solubilisierung der L-Aspartat-N-Acetyltransferase aus den mikrosomalen Membranen des Rinderhirns wurde ebenfalls 0.5 % Chaps in Kombination mit verschiedenen Konzentrationen Natriumchlorid untersucht. Wenn die Extraktionslösung 0.5 % Chaps und 300 mM Natriumchlorid enthielt, wurde das Enzym von der Mikrosomenfraktion solubilisiert, wobei es eine spezifische Aktivität von 2.500 mU/mg Protein aufwies. Die Aktivität im Überstand war zweimal geringer im Vergleich zu derjenigen der unbehandelten Mikrosomenfraktion (ca. 5.000 mU/mg). Die Kombination von 0.5 % Chaps und 600 mM Natriumchlorid führte zu Aktivitätsverlust im Überstand (s. Abb. 39).

Abbildung 39: Dünnschichtchromatographie zur Bestimmung der L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität bei Solubilisierung mittels Chaps und Natriumchlorid



Die Solubilisierung des Membranproteins L-Aspartat-N-Acetyltransferase erschwert die Feststellung von der L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität. Die spezifische L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität des Solubilisats verringert sich zwei bis dreimal während der Solubilisierung mittels Detergenz und/oder Kombination von Detergenz und Salz.

Für die nachfolgende chromatographische Trennung der L-Aspartat-N-Acetyltransferase von den anderen Proteinen wurden Solubilisate verwendet, die mit den oben beschriebenen, geeigneten Detergenzien (NP 40, Octylglucosid, Chaps, TX - 100) gewonnen wurden.

#### **4.3.4 Konventionelle Reinigung der L-Aspartat-N-Acetyltransferase**

Die konventionellen Reinigungsmethoden sind chromatographische Verfahren, mit deren Hilfe eine oder mehrere biochemische Verbindungen aus einem Gemisch getrennt und gereinigt werden können. Darüber hinaus liefern sie wertvolle Informationen über die Stabilität des gesuchten Proteins, seine Ladung oder Grösse.

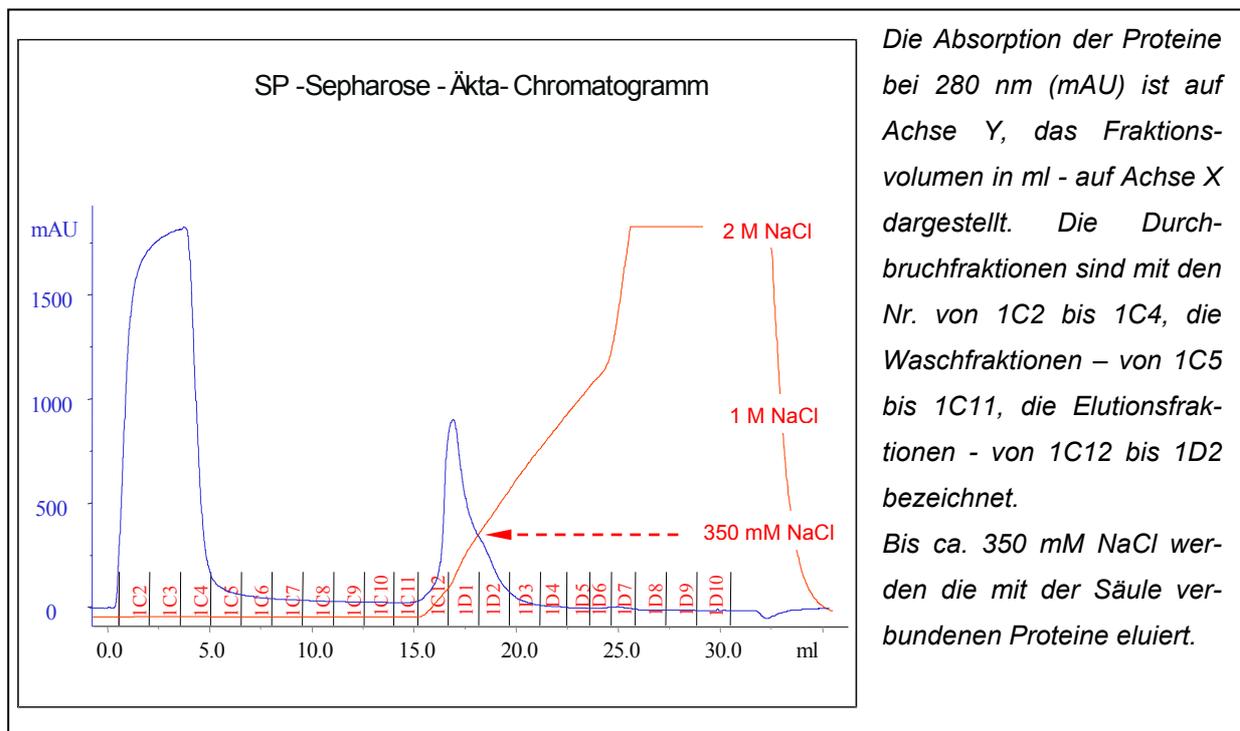
Die durch Differentialzentrifugation erhaltene Membranfraktion (s. Punkt 4.3.1) wurde nach der Reinigung von membranassoziierten Proteinen (s. Punkt 4.3.2) mittels Detergenz solubilisiert (4.3.3) und anschließend chromatographisch gereinigt.

Verschiedene Ionenaustausch- sowie Affinitätschromatographien wurden durchgeführt. Säulen mit Füllungen jeweils aus: Sulfopropyl-Sepharose, Q-Sepharose, Carboxymethyl-Sepharose, Heparin, Concanavalin A wurden verwendet. Als Auftrag der chromatographischen Säulen diente die von membranassoziierten Proteinen gereinigte, solubilisierte, mikrosomale Rinderhirnfraktion. Die Elution der in der stationären Phase der Säulen verbliebenen Verbindungen verlief durch kontinuierliche Erhöhung der Natriumchloridkonzentration (Gradienten – Elution). Die einzelnen chromatographischen Fraktionen wurden weiter auf Enzymaktivität und Proteingehalt untersucht. Das Chromatogramm, die Dünnschichtchromatographie, die berechnete spezifische und gesamte L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität und der Reinigungsfaktor werden nachfolgend einzeln aufgezeigt.

##### **4.3.4.1 Sulfopropyl - Sepharose - Chromatographie**

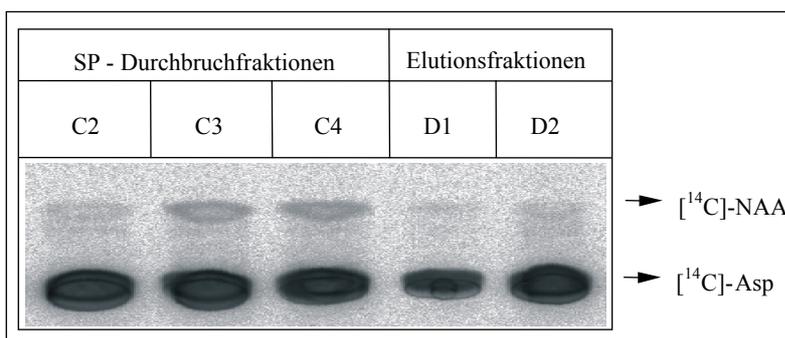
Das grundlegende Prinzip der Ionenaustauscher - Chromatographie besteht in der Wechselwirkung zwischen entgegengesetzt geladenen Partikeln. Eine von den untersuchten Chromatographien war die Sulfopropyl (SP) – Sepharose - Chromatographie. Die Mikrosomenfraktion wurde bis zu einer Konzentration von 5 mg/ml Protein verdünnt und mit 0.5 % Chaps und 300 mM Natriumchlorid solubilisiert. Die Proteinkonzentration des Solubilisats betrug ca. 2 mg/ml. Die Entsalzung der Probe wurde durch Dialyse gegen Tris-HCl pH 7.4 durchgeführt. 3.5 ml Probelösung entsprechend 7 mg Protein wurden auf die 1ml-Sulfopropyl-Sepharose-Säule (SP-) aufgetragen. Der Laufpuffer bestand aus 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 und 0.04 % Chaps. Die Flussrate des Durchbruchs, der Waschfraktionen und der Elutionsfraktionen wurde auf ein ml pro Minute eingestellt (s. Abb. 40).

Abbildung 40: FPLC - Sulfopropyl – Sepharose – Chromatographie



Die Acetyltransferaseaktivität des Auftrags, der Durchbruchfraktionen und der Elutionsfraktionen wurde untersucht und in Abbildung 41 dargestellt.

Abbildung 41: Dünnschichtchromatographie zur Bestimmung der L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität in den Fraktionen der SP-Sepharose – Chromatographie

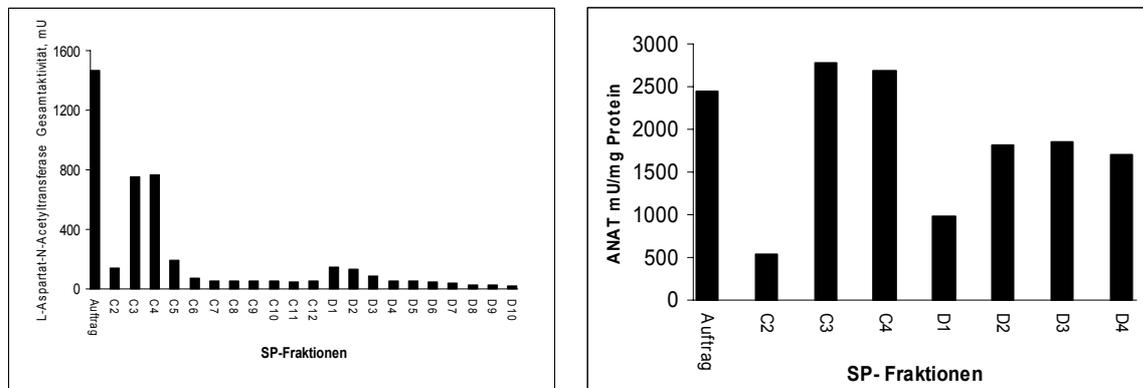


Die L-Aspartat-N-Acetyltransferase zeigte im Durchbruch Aktivität<sup>1</sup>, d.h. die Durchbruchfraktionen C3 und C4, welche das Enzym enthalten, flossen durch den stark sauren Kationenaustauscher und konnten von der funktionellen Gruppe  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{SO}_3^-$  der Sulfopropyl-Sepharose nicht absorbiert werden. In Abbildung 42 werden die gesamte

<sup>1</sup> Die SP- Sepharose - Chromatographie wurde unter verschiedenen Puffer- und pH-Bedingungen mehrmals wiederholt.

und die spezifische L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität der Durchbruchfraktionen C2, C3, C4, und der Elutionsfraktionen D1, D2, D3, D4 dargestellt.

Abbildung 42: Gesamte und spezifische L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität der SP-Sepharose- Fraktionen



Die Anreicherung des Enzyms mittels SP – Sepharose – Chromatographie ist in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst. Im Durchbruch wurde eine Anreicherung der Acetyltransferase mit dem Reinigungsfaktor 1,1 und während der Elution Rf unter 1 (0.7) erreicht.

Tabelle 43: Anreicherung der Acetyltransferase mittels SP- Sepharose – Chromatographie

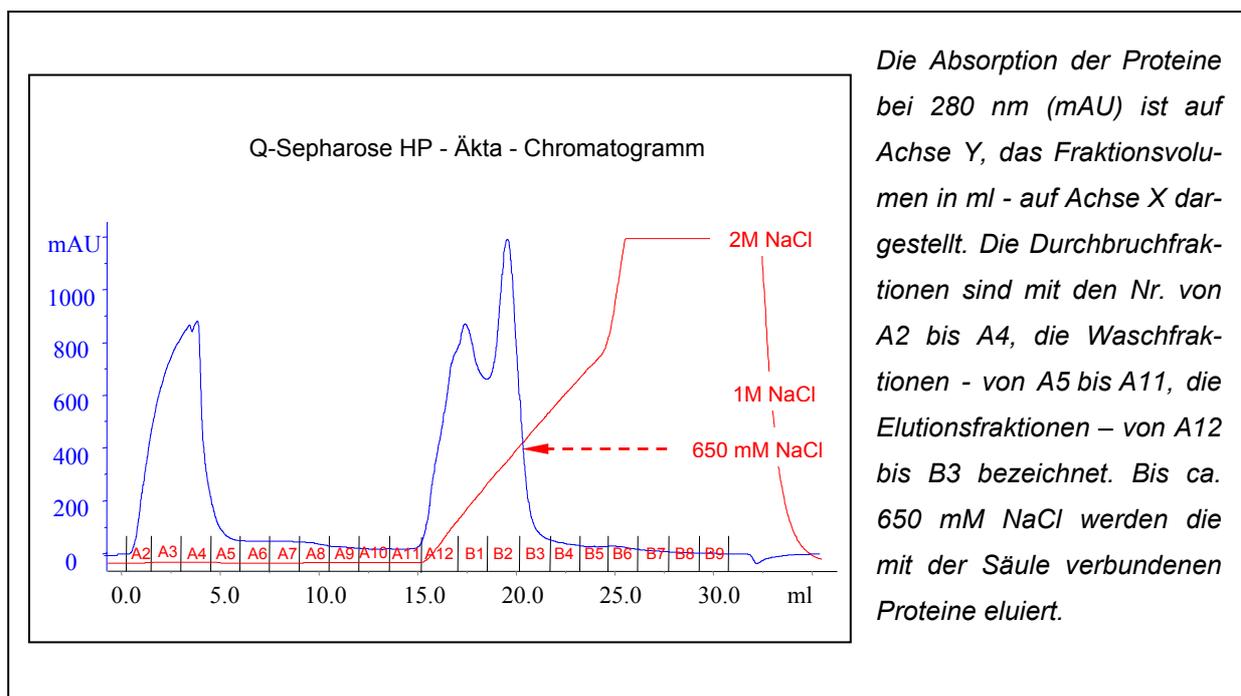
SP - Fraktion:	Spezifische ANAT mU/mg	Rf
Auftrag	2500	1
Durchbruch - C2	600	0,23
Durchbruch - C3	2800	1,12
Durchbruch - C4	2700	1,08
Elution - D1	1000	0,41
Elution - D2	2000	0,8
Elution - D3	2100	0,84
Elution - D4	1900	0,76

Aliquots der Durchbruch- und der Elutionsfraktionen aus der SP-Sepharose- Chromatographie, welche L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität besaßen, sowie der im Abschnitt 4.3.4.2 beschriebenen Q-Sepharosefraktionen wurden durch eine SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) untersucht. Es wurde eine grosse Anzahl anderer Proteine, welche die Acetyltransferase verunreinigen und kontaminieren, festgestellt. Die Sulfopropyl – Sepharose – Chromatographie ist für die Reinigung der L-Aspartat-N-Acetyltransferase nicht geeignet.

### 4.3.4.2 Q- Sepharose - Chromatographie

Die Q - Sepharose – Chromatographie<sup>1</sup> wurde zur Reinigung der L-Aspartat-N-Acetyltransferase von den Mikrosomen durchgeführt. Als Auftrag der 1 ml - Q-Sepharose - Säule diente das mit 0.5 % Chaps und 300 mM Natriumchlorid gewonnene und anschließend dialysierte Solubilisat. 3.5 ml Probelösung entsprechend 7 mg Protein wurden aufgetragen. Der Laufpuffer bestand aus 50 mM Tris-HCl, pH 7.4<sup>2</sup> und 0.04 % Chaps. Die Flussrate des Durchbruchs, der Waschfraktionen und der Elutionsfraktionen wurde auf ein ml pro Minute eingestellt. Die Gradienten – Elution wurde durch kontinuierliche Erhöhung der Natriumchloridkonzentration bis zu 1 mol/l durchgeführt. In der nachfolgenden Abbildung wird der Verlauf der Chromatographie in dem FPLC - Apparat dargestellt und erläutert.

Abbildung 44: FPLC – Chromatogramm der Q- Sepharose - Trennung

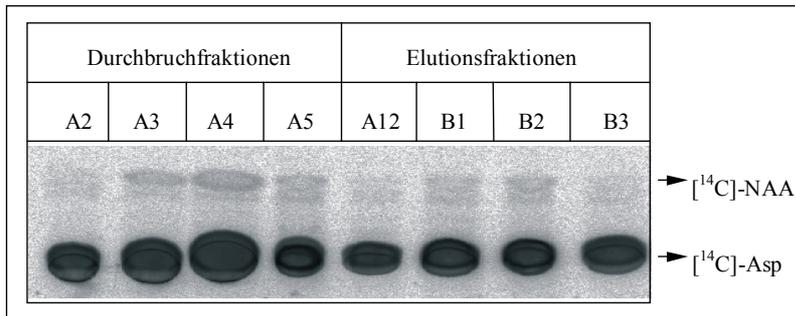


Die Acetyltransferaseaktivität des Auftrags, der Durchbruchfraktionen und der Elutionsfraktionen wurde untersucht und ist in Abbildung 45 dargestellt. Eine Aktivität wurde in den Durchbruchfraktionen A3 bis A5 festgestellt.

<sup>1</sup> Q - Quaternary-Aminogruppen

<sup>2</sup> Der pH - Bereich des Milieus wurde angepasst, um die Anzahl der positiven und negativen Ladungen der Seitenketten an der Oberfläche des Proteinsmoleküls mittels ihrer Dissoziation zu ändern. Die Q-Sepharose ist ein Anionenaustauscher und wird zur Trennung von sauren und neutralen Proteinen eingesetzt.

Abbildung 45: Dünnschichtchromatographie zur Bestimmung der L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität in den Q-Sepharose-Fractionen



Ein Teil der Acetyltransferase verblieb auf der Q- Sepharose – Säule. Die spezifische Aktivität der Elutionsfraktionen A12 bis B2 betrug max. 4.650 mU/mg Protein, was einem niedrigen Reinigungsfaktor entspricht. Die Reinigung der L-Aspartat-N-Acetyltransferase um den Faktor 9 wurde in der A5 - Fraktion erreicht (s. Abb. 46 und Tab. 47).

Abbildung 46: Gesamte und spezifische Aktivität der L-Aspartat-N-Acetyltransferase in den Q-Sepharose-Fractionen

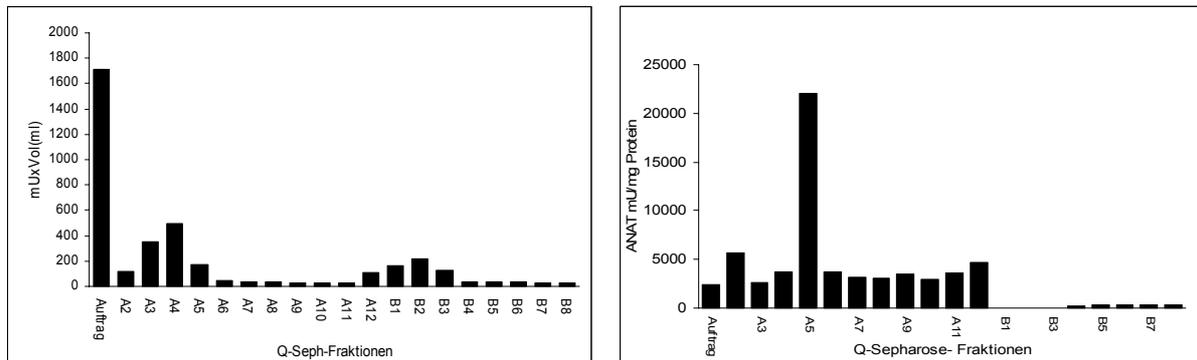


Tabelle 47: Spezifische L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität und Anreicherung des Enzyms mittels Q - Sepharose - Chromatographie

Q-Sepharose-Fraktion	Spezifische ANAT mU/mg	Rf
Auftrag	2450	1
Durchbruch - A2	5690	2,32
Durchbruch - A3	2660	1,09
Durchbruch - A4	3690	1,51
<b>Waschfraktion - A5</b>	<b>22000</b>	<b>8,98</b>
Waschfraktion - A6	3730	1,52
Waschfraktion - A7	3200	1,31
Waschfraktion - A8	3070	1,25
Waschfraktion - A9	3500	1,43
Waschfraktion - A10	2910	1,19
Waschfraktion - A11	3640	1,48

Q-Sepharose-Fraktion	Spezifische ANAT mU/mg	Rf
Elutionsfraktion - A12	4650	1,89
Elutionsfraktion - B1	940	0,39
Elutionsfraktion - B2	1700	0,69
Elutionsfraktion - B3	540	0,22

#### 4.3.4.3 Carboxymethyl - Sepharose - Chromatographie

Die Carboxymethyl - Sepharose- Säule (CM-) als ein schwacher Kationenaustauscher mit funktioneller Gruppe  $-\text{CH}_2\text{COO}^-$  konnte wenig Proteine aus der Mikrosomenhirnfraction absorbieren, wie aus Abbildung 48 ersichtlich. Als Auftrag der 1 ml - CM - Sepharose - Säule diente das mit 0.5 % Chaps und 300 mM Natriumchlorid gewonnene und anschliessend dialysierte Solubilisat (7 mg Protein). Die Acetyltransferase floss zusammen mit den meisten Proteinen durch die Säule. Die im Durchbruch festgestellte Aktivität war sehr gering (s. Abb. 49, 50), was einem nicht ausreichenden Reinigungsfaktor von max. 1,83 entspricht (s. Tab. 51). Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Carboxymethyl - Sepharose - Chromatographie für die Reinigung der L-Aspartat-N-Acetyltransferase nicht geeignet ist.

Abbildung 48: FPLC - CM- Sepharose – Chromatographie

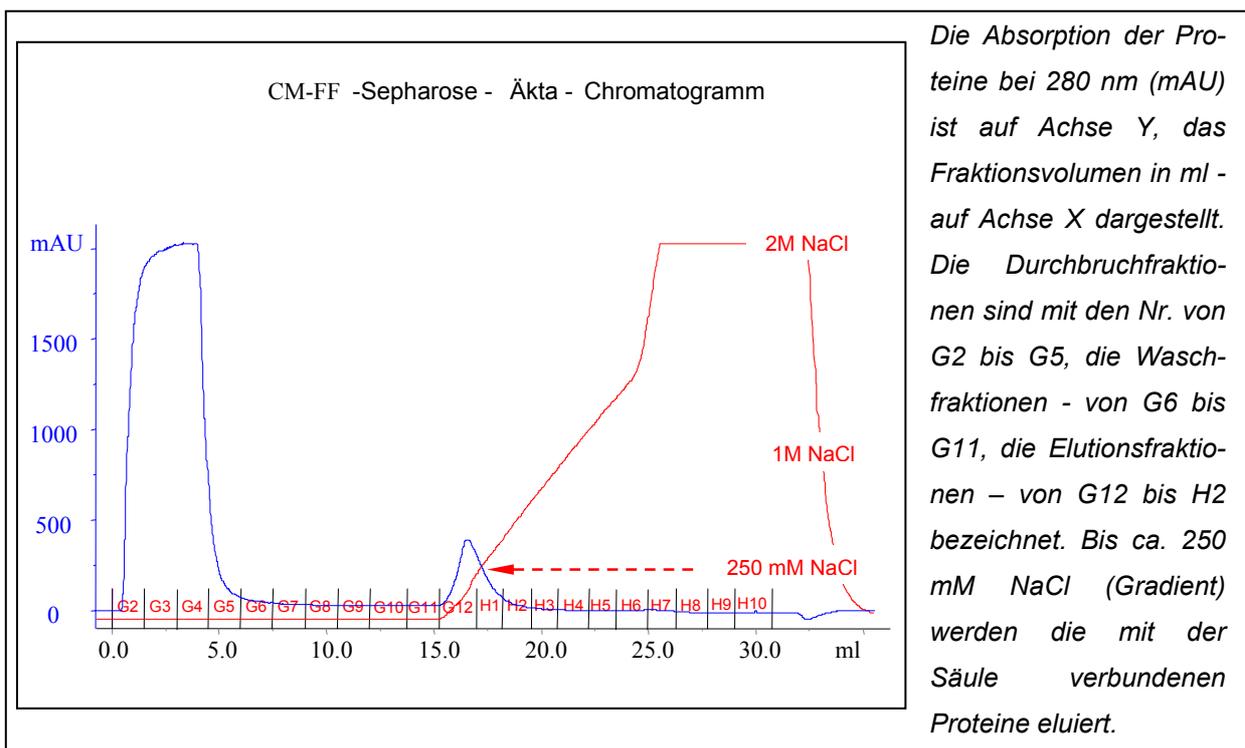


Abbildung 49: L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität der CM – Sepharose - Fraktionen

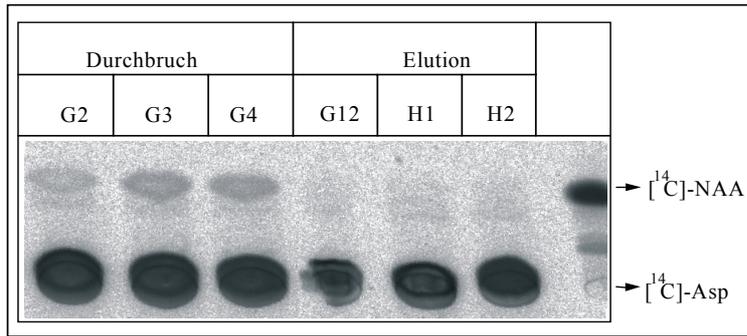


Abbildung 50: Gesamte und spezifische L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität in den CM-Sepharose-Fractionen

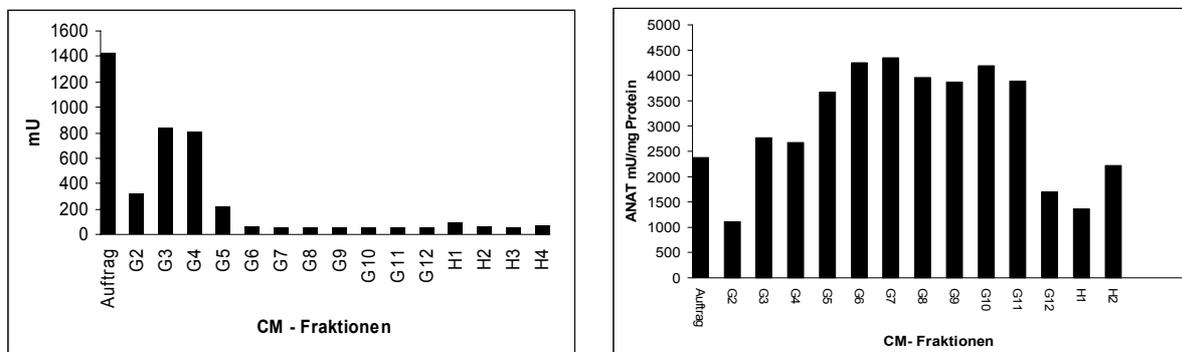


Tabelle 51: Spezifische Aktivität und Anreicherung der L-Aspartat-N-Acetyltransferase in der CM - Sepharose – Chromatographie

CM- Sepharose - Fraktion	Spezifische ANAT mU/mg Protein	Rf
Auftrag	2370	1
Durchbruch - G2	1120	0,47
Durchbruch - G3	2770	1,17
Durchbruch - G4	2670	1,13
Durchbruch - G5	3680	1,55
Waschfraktion - G6	4250	1,79
Waschfraktion - G7	4350	1,83
Waschfraktion - G8	3960	1,67
Waschfraktion - G9	3870	1,63
Waschfraktion - G10	4190	1,77
Waschfraktion - G11	3890	1,64
Elutionsfraktion - G12	1700	0,72
Elutionsfraktion - H1	1360	0,57
Elutionsfraktion - H2	2220	0,94

#### 4.3.4.4 Heparin – Affinitätschromatographie

Die Heparin - Affinitätschromatographie, welche zur Reinigung der Lipoproteinen angewandt wird, unterscheidet sich von den Ionenaustausch - Chromatographien, weil sie die Verbindungen auf Basis spezifischer Wechselwirkungen mit dem Heparin trennt. Für die Anreicherung der L-Aspartat-N-Acetyltransferase diente das mit 0.5 % Chaps und 300 mM Natriumchlorid gewonnene mikrosomale Solubilisat als Säulen - Auftrag. Die Gradienten – Elution erfolgte durch die Steigerung der Konzentration des NaCl. Der Verlauf der Heparin – Säulenchromatographie ist in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

Abbildung 52: FPLC – Heparin – Chromatographie

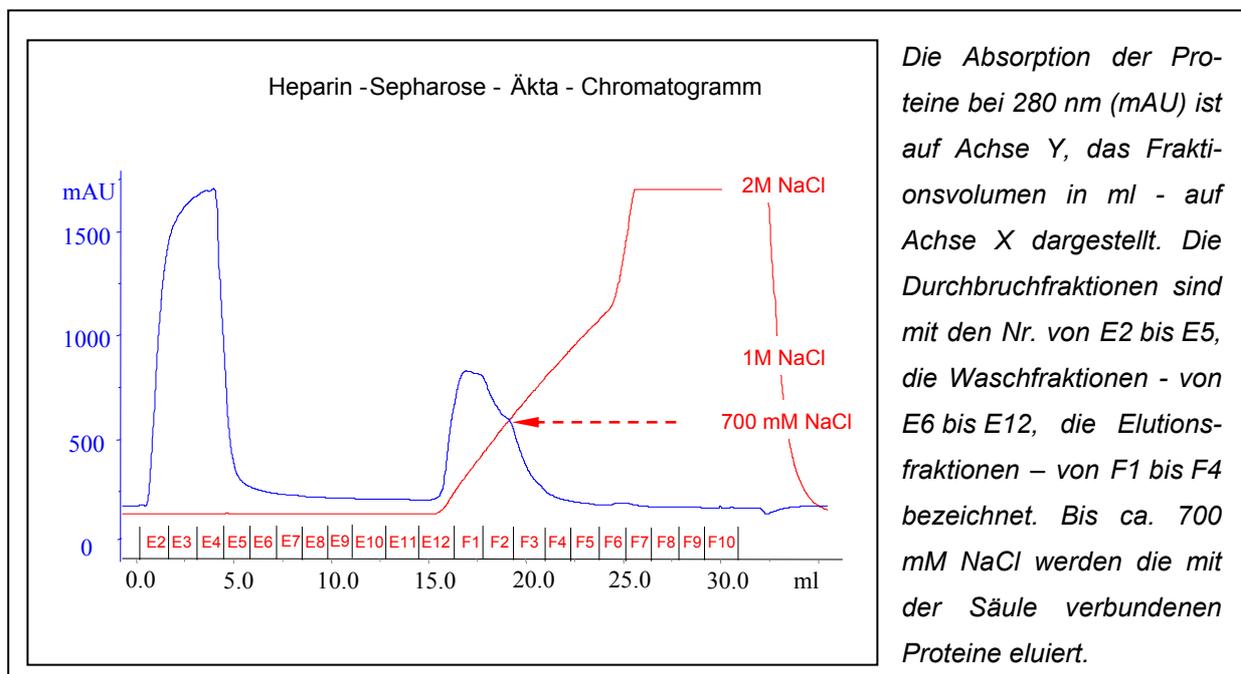
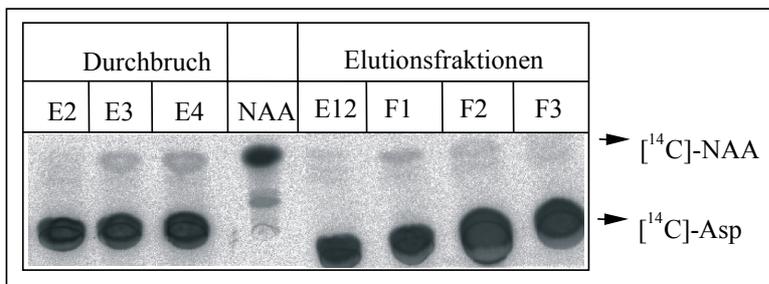


Abbildung 53: Dünnschichtchromatographie zur Bestimmung der L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität in den Heparin-Fraktionen<sup>1</sup>



<sup>1</sup> In der Abbildung werden nur ein Teil der Fraktionen dargestellt. Es wurden jedoch alle Fraktionen auf Transferaseaktivität untersucht.

Die L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität der Heparin - Fraktionen wurde gemessen (s. Abb. 53) und ist in der Abb. 54 dargestellt. Ein Teil von dem Enzym floss durch die Heparin- Säule. Die Waschfraktionen wiesen L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität und zeigten einen Reinigungsfaktor zwischen 1.26 und 2. Als Membranprotein verblieb ein Teil von der Acetyltransferase an der Säule und konnte durch den kontinuierlichen Natriumchlorid - Gradienten von der Säule eluiert werden. Die Enzymanreicherung bezogen auf die Aktivität des Auftrags erreichte in der Elutionsfraktion F4 den Faktor 4,1 (s. Tab. 55).

Abbildung 54: Gesamte und spezifische Aktivität der Acetyltransferase der Heparin – Fraktionen

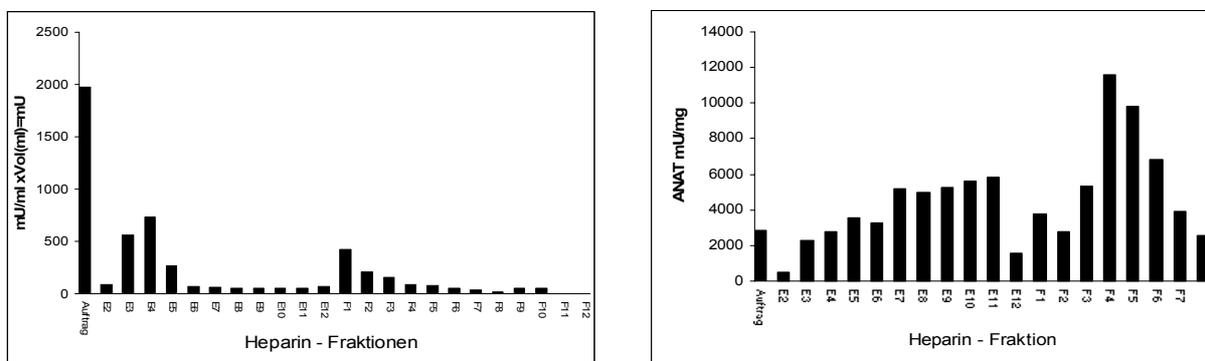


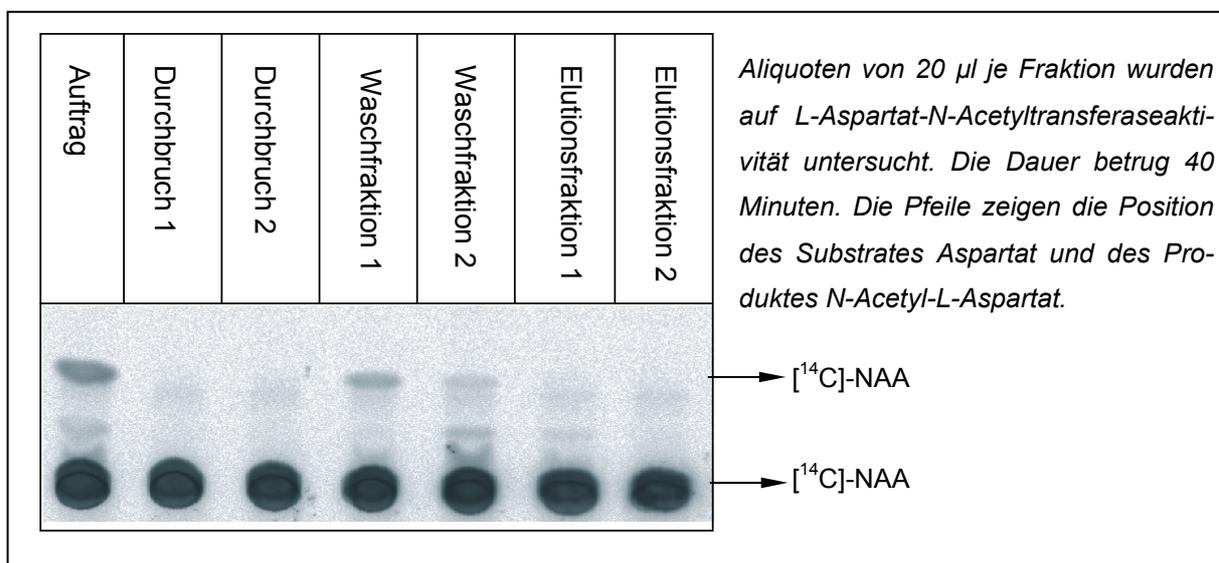
Tabelle 55: Spezifische Aktivität und Anreicherung der Acetyltransferase während der Heparin – Chromatographie

Heparin- Fraktion	Spezifische ANAT mU/mg	Rf
Auftrag	2820	1
Durchbruch - E2	500	0,18
Durchbruch - E3	2260	0,81
Durchbruch - E4	2790	0,99
Waschfraktion - E5	3540	1,26
Waschfraktion - E6	3230	1,15
Waschfraktion - E7	5160	1,83
Waschfraktion - E8	4970	1,77
Waschfraktion - E9	5290	1,88
Waschfraktion - E10	5590	1,99
Waschfraktion - E11	5840	2,08
Waschfraktion - E12	1570	0,56
Elutionsfraktion - F1	3760	1,34
Elutionsfraktion - F2	2780	0,99
Elutionsfraktion - F3	5340	1,90
<b>Elutionsfraktion - F4</b>	<b>11590</b>	<b>4,12</b>
Elutionsfraktion - F5	9820	3,49

#### 4.3.4.5 Lektinchromatographie – Concanavalin A

Die Lektinchromatographie, die zu den Affinitätschromatographien zählt, wurde zur Reinigung der L-Aspartat-N-Acetyltransferase aus Hirnextrakt durchgeführt. Voraussetzung für die Lektinchromatographie ist eine Lektinmatrix, im vorliegenden Fall Concanavalin A, welche reversibel Mono- oder Polysaccharide oder Zuckerreste von Glykoproteinen bindet. Zu der mit 1 % Octylglucosid solubilisierten Mikrosomenfraktion wurden 0.5 mM  $\text{CaCl}_2$  und 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$  nach der Entfernung des Ethylendiamintetraacetat (EDTA) beigefügt, und die 500  $\mu\text{l}$ -Probelösung wurde auf eine ein- ml- Concanavalin A - Säule aufgetragen. Der Startpuffer bestand aus 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.5 M NaCl und 0.04 % OctGlc. Der Bindungspuffer enthielt 1 mM  $\text{CaCl}_2$  und 1 mM  $\text{MgCl}_2$ . Die Elution der Glykoproteine wurde zuerst mit 0.1 M Methylmannosid (Elutionsfraktion 1), danach mit 0.1 M Borat - Puffer pH 6.5 (Elutionsfraktion 2) durchgeführt. Die Chromatographie wurde manuell, bei der optimalen Temperatur von 20°C durchgeführt, und 500  $\mu\text{l}$  - Fraktionen wurden gesammelt und auf Aktivität überprüft (s. Abb. 56). Die Acetyltransferase blieb auf der Säule, löste sich jedoch davon in der Waschfraktion vor Zugabe des Eluentes, der Methylmannosid enthielt, was darauf hinweist, dass das Enzym frei von  $\alpha$ - D-Mannopyranosyl- und/oder  $\alpha$ -D-Glucopyranosyl - Resten ist. Nach Optimierung konnte die Methode für die Trennung der L-Aspartat-N-Acetyltransferase von den Membranglykoproteinen, welche  $\alpha$ -D- Mannose,  $\alpha$ -D- Glucose enthalten, verwendet werden.

Abbildung 56: Dünnschichtchromatographie zur Bestimmung der L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität der Concanavalin A – Fraktionen

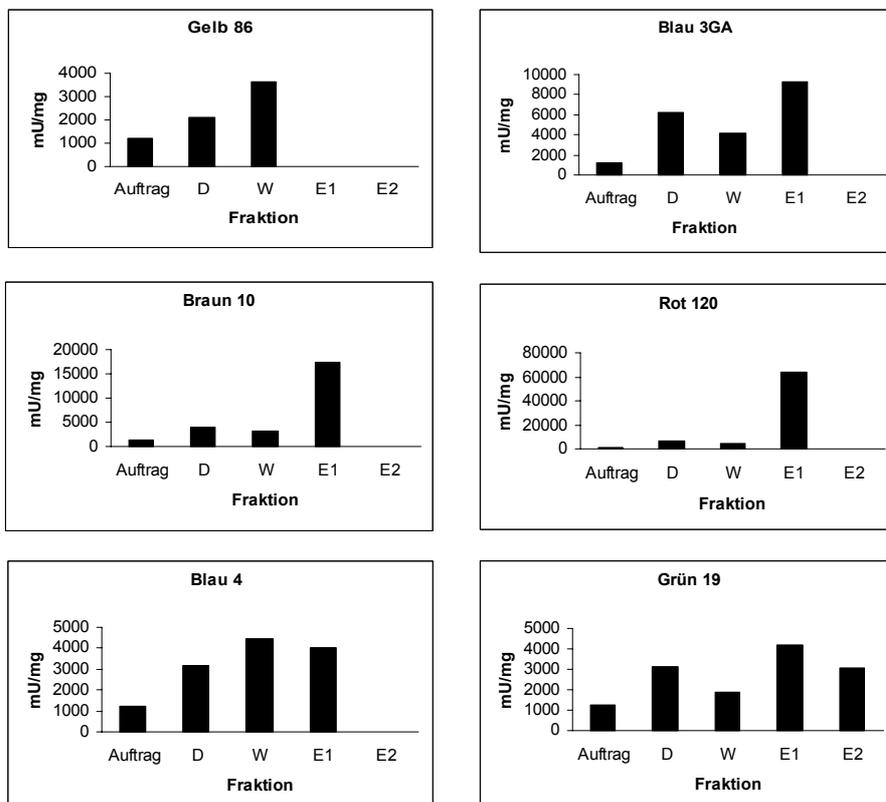


### 4.3.4.6 Reaktivfarbenschromatographie

Proteine mit Affinität zu den Nukleotiden binden bei dieser Methode an den Reaktivfarben. Auf dieser Weise können durch die Reaktivfarbenschromatographie von 5 % bis 60 % der Proteine aus einem Zellextrakt gereinigt werden.

Es wurden sechs Reaktivfarben – Säulen eingesetzt: Gelbe 86-, Blaue 3GA-, Braune 10-, Rote 120-, Blaue 4- und Grüne 19- Säule. Die gewonnenen chromatographischen Fraktionen wurden auf Transferaseaktivität und Proteingehalt untersucht. Ein- ml- Säulen mit den beschriebenen immobilisierten Farben wurden mit der optimalen Menge von 6 - 7 mg Protein geladen. Als Säulenauftrag diente der mit 1 % Octylglucosid solubilisierte Hirnextrakt (50.000xg - Pellet). Nach dem Durchbruch wurde die Säule mit 50 mM Tris-HCl pH 7,4 und 0,04 % Octylglucosid gewaschen. Die anschließende Stufengradientenelution erfolgte durch Zugabe von 300 mM und 600 mM Natriumchlorid. Die Transferase erreichte in der 300 mM - Elutionsfraktion der Blauen 3GA- Säule den Reinigungsfaktor 7,4, in der Roten 120 - Säule den Faktor 51, in der Braunen 10 – Säule den Faktor 14 (s. Abb. 57f.). Die Reaktivfarbenschromatographie eignet sich daher zur Anreicherung der Transferase.

Abbildung 57: Spezifische L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität der Reaktivfarbenschromatographie – Säulen



*D ist die Abkürzung für Durchbruch, W für Waschfraktion. Die erste Elutionsfraktion (E1) des Gradienten wurde mit 300 mM NaCl und die zweite Elutionsfraktion (E2) mit 600 mM NaCl gewonnen.*

Abbildung 58: Spezifische L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität und Reinigungsfaktoren der Reaktivfarbenchromatographie - Fraktionen

Fraktion	Spezifische ANAT, mU/mg	Rf
<b>Auftrag</b>	1234,8	1
<b>Gelb 86</b>		
D	2091,7	1,6
W	3625,5	2,9
E1	0	0
E2	0	0
<b>Blau3GA</b>		
D	6227,3	5,
W	4202,7	3,4
<b>E1</b>	<b>9232,7</b>	<b>7,4</b>
E2	0	0
<b>Braun 10</b>		
D	3887,4	3,1
W	3169,1	2,5
<b>E1</b>	<b>17329,8</b>	<b>14</b>
E2	0	0

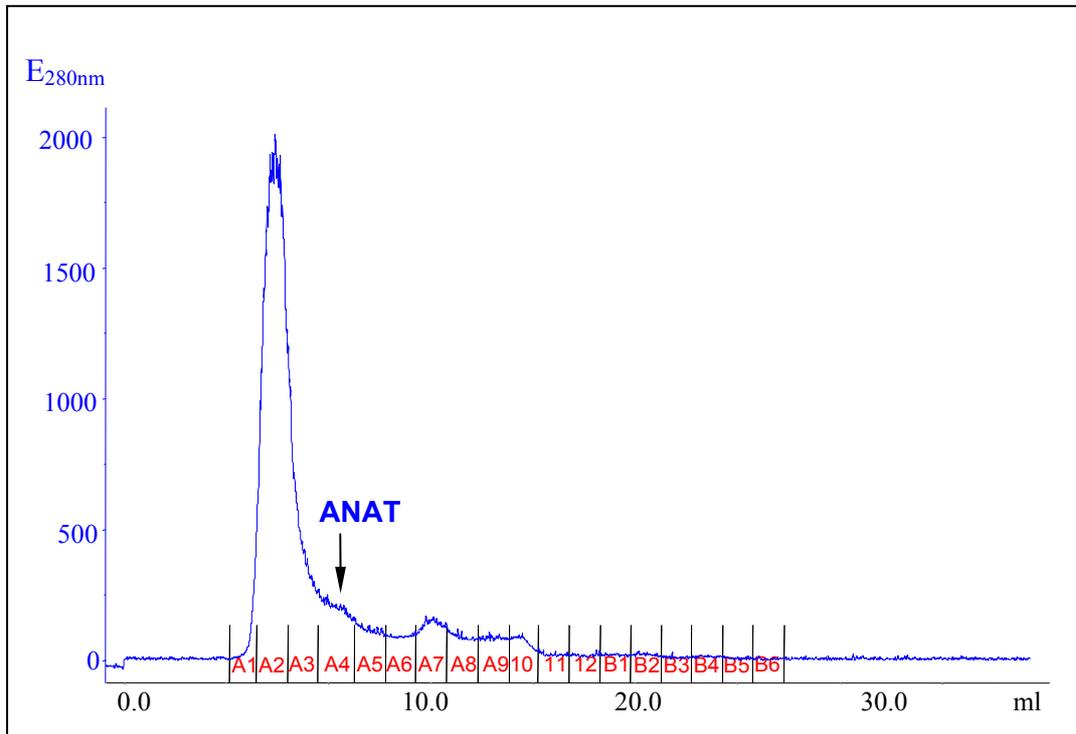
Fraktion	Spezifische ANAT, mU/mg	Rf
<b>Auftrag</b>	1234,8	1
<b>Rot 120</b>		
D	6200,2	5
W	4649,4	3,7
<b>E1</b>	<b>63311</b>	<b>51</b>
E2	0	0
<b>Blau4</b>		
D	3185,8	2,5
W	4448,4	3,6
E1	3998,5	3,2
E2	0	0
<b>Grün19</b>		
D	3131,1	2,5
W	1862,9	1,5
E1	4191,7	3,3
E2	3085	2,4

#### 4.3.4.7 Ausschlusschromatographie

Eine der erfolgreichen Chromatographien für die Trennung und Reinigung der Acetyltransferase aus Hirnextrakt war die Grössenausschlusschromatographie (Gelfiltration). Die polymere organische Substanz des porösen Materials bildet eine dreidimensionale Struktur mit einem Netzwerk von hydrophilen Poren, was die Trennung von Molekülen verschiedener Größe erlaubt.

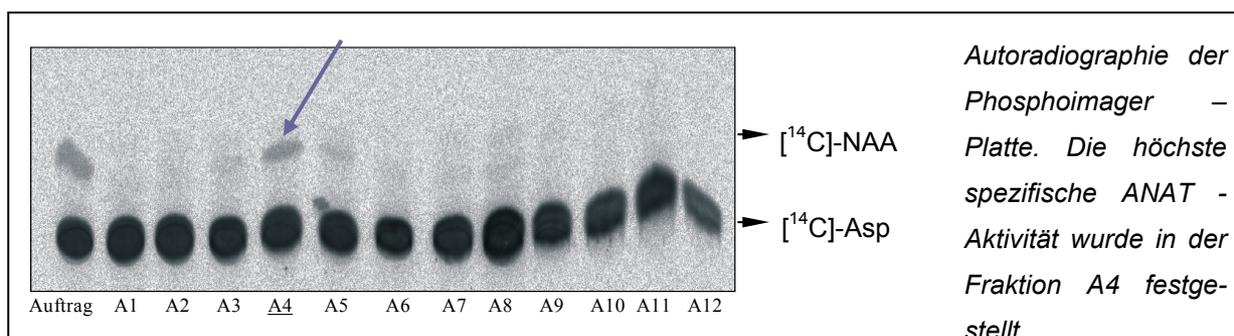
Die Superdextran G-200 - Säule (s. Abschnitt Material und Methoden, Punkt 3.1.2.1.2.1) mit Trennbereich von 5 bis 600 kD wurde verwendet. Die aus der 50.000xg-Differentialzentrifugation gewonnene und mittels 0.5 % Triton X - 100 solubilisierte Membranfraktion, wurde in 1,7 ml 40 mM Natriumphosphat pH 5.8 gelöst und diente als Säulenauftrag. Die Elutionslösung bestand aus 50 mM Natriumphosphat pH 7, 150 mM Natriumchlorid sowie 0.5 % TX-100 und floß durch die Säule mit einer Geschwindigkeit von 0,5 ml pro Minute. Es wurden 1,4-ml- Fraktionen gesammelt. In der nachfolgenden Abbildung ist der Verlauf der Gelfiltration dargestellt.

Abbildung 59: Gelfiltration - Chromatogramm



Das Experiment wurde mehrfach wiederholt, und unter den oben beschriebenen Bedingungen waren die Ergebnisse immer identisch. Die Acetyltransferase wurde von den meisten Proteinen getrennt und floß in der A4 - Fraktion mit dem Reinigungsfaktor 2.1 sowie einer Ausbeute von 49 %. Der Proteingehalt der A4-Fraktion nimmt bei einer Konzentration des Auftrags von 3.3 mg/ml auf 1 mg/ml ab, zeigt jedoch eine hohe spezifische Aktivität von bis zu 1.364 mU/mg Protein.

Abbildung 60: Dünnschichtchromatographie zur Bestimmung der L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität der Gelfiltration – Fraktionen



Die spezifische und gesamte Aktivität jeder Gelfiltration-Fraktion sowie der Reinigungsfaktor und die Ausbeute wurden nach der Quantifizierung des neugebildeten [<sup>14</sup>C]-N-Acetyl-Aspartats berechnet (s. Tab. 61).

Tabelle 61: Spezifische und gesamte L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität sowie Reinigungsfaktoren und Ausbeute

Fraktion	Spezifische ANAT mU/mg	Rf	Gesamte ANAT mU	Ausbeute %
Auftrag	661,5	1	3711	100
A2	376,8	0,6	378	10
A3	326,5	0,5	512	13
<b>A4</b>	<b>1364,6</b>	<b>2,1</b>	<b>1834</b>	<b>49</b>
A5	496,0	0,7	611	15
A6	75,8	0,2	229	6
A7	639,9	0,9	287	7
				Summe 99

Um das Molekulargewicht der Acetyltransferase zu bestimmen wurde eine Kalibrierung der Säule durchgeführt (s. Abschnitt Material und Methoden, Punkt 3.1.2.1.2.1). Dabei wurden folgende Proteine mit ähnlicher Form und bekanntem relativen Molekulargewicht (Standards) verwendet: Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa), Katalase (232 kDa) und BSA (67 kDa). Der Verteilungskoeffizient  $K_d^1$  wurde auf Basis ihrer Elutionsvolumina berechnet. Da die Elutionsvolumina globularer Proteine vorwiegend durch ihren relativen Molekulargewicht determiniert werden, konnte das *relative Molekulargewicht der L-Aspartat-N-Acetyltransferase mit 316,2 kDa* bestimmt werden (s. Tab. 62).

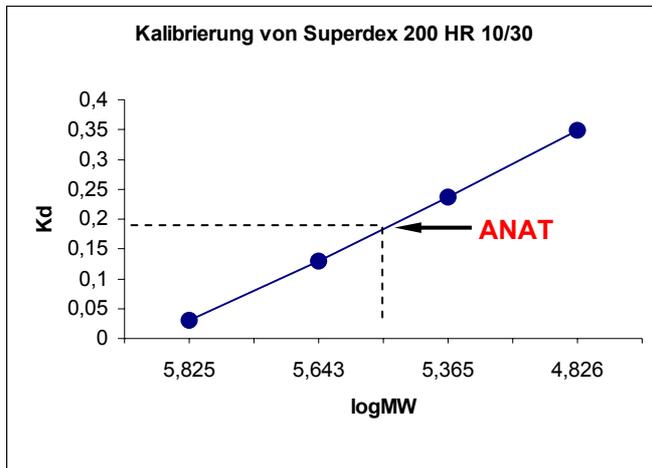
Tabelle 62: Bestimmung des relativen Molekulargewichtes der L-Aspartat-N-Acetyltransferase auf Basis der Verteilungskoeffizienten der Kalibrierungsstandards

Protein	Molekulares Gewicht in Da	Logarithmus von MW <sup>1</sup>	Verteilungs- koeffizient $K_d$
Thyroglobulin	669000	5,83	0,03
Ferritin	440000	5,6	0,13
Katalase	232000	5,37	0,24
BSA	67000	4,82	0,35
<b>ANAT</b>	<b>316228</b>	<b>5,5</b>	<b>0,19</b>

<sup>1</sup> Da die Porengrößen bei allen Molekularsieben nie einheitlich sind und die gelösten Moleküle eines Gemisches verschiedene Größen besitzen, schwanken die  $K_d$ -Werte zwischen 0 und 1, was Trennungen gelöster Moleküle auf einem vorgegebenen Gel auch innerhalb enger Bereiche der molekularen Größe erlaubt.

Die lineare Funktion der Logarithmen der relativen Molekulargewichte und des jeweiligen Verteilungskoeffizienten sind in der Abbildung 63 dargestellt.

Abbildung 63: Logarithmische Abhängigkeit des Molekulargewichts von dem Verteilungskoeffizienten  $K_d$



<sup>1</sup> MW = (engl.) Molecular Weight

## **4.4 Aufreinigung der L-Aspartat-N-Acetyltransferase von eukaryontischen Zelllinien durch diskontinuierliche Dichtegradienten – Zentrifugation**

Diskontinuierliche Gradienten<sup>1</sup> eignen sich für die Trennung ganzer Zellen, subzellulärer Organellen sowie verschiedener Proteine aus tierischen Gewebehomogenaten. Um die Acetyltransferase von den anderen Makromolekülen, die sich in Grösse und Dichte unterscheiden, zu trennen, wurde daher die Dichtegradienten-Ultrazentrifugation eingesetzt. Wegen ihrer höheren Dichte wandern die Teilchen des Extraktes durch die Dichtegradienten – Lösungen solange, bis sie eine Stufe erreichen, in welcher beide Dichte – Grade ausgeglichen sind. Die Wanderungsgeschwindigkeit richtet sich nach dem molekularen Gewicht, der Dauer und der g-Zahl der Zentrifugation.

### **4.4.1. L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität in verschiedenen eukaryontischen Zelllinien**

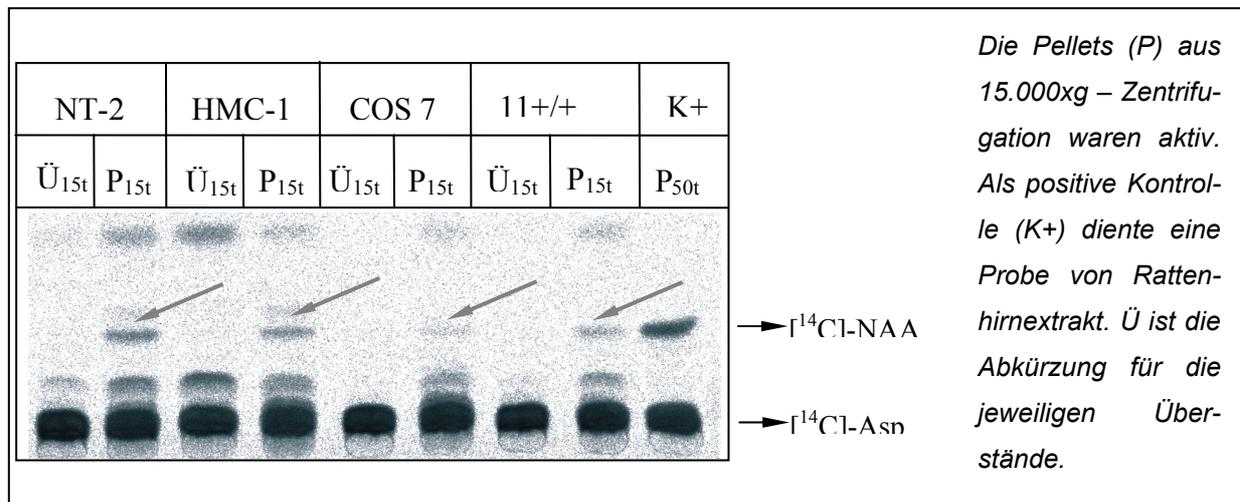
Die L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität musste in den verschiedenen eukaryontischen Zelllinien untersucht werden, um zu überprüfen, ob eine Reinigung der L-Aspartat-N-Acetyltransferase von Zelllinien möglich ist.

Die Zelllinien NT-2 (Neuronenvorläufer), HMC-1 (humane Mastzellen), COS-7 (Nierenzellen) und Zelllinie 11+/+ (Astrocyten) wurden zu diesem Zweck kultiviert und auf L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität untersucht. Die Zellen wurden mit 1xPBS/ 2 mM EDTA geerntet, gewaschen und homogenisiert. Nach einstündiger Zentrifugation bei 15.000xg wurden die Zellhomogenate in Überstände und Pellets getrennt und die L-Aspartat-N-Acetyltransferasereaktion durchgeführt. Als positive Kontrolle diente die Membranfraktion aus Rattenhirn. Die dünnschichtchromatographisch getrennten radioaktiven Produkte sind in Abbildung 64 dargestellt.

---

<sup>1</sup> – Bei dem diskontinuierlichem Gradienten wird das Röhrchen mit einer Lösung von Rohrzucker mit einer von unten nach oben abnehmenden Dichte abgefüllt. 55 % bis 5 % Saccharose-Lösungen wurden eingesetzt.

Abbildung 64: Dünnschichtchromatographie zur Bestimmung der L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität in eukaryontischen Zelllinien



Eine L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität wurde nicht nur in Neuronen, sondern auch in Astrocyten sowie in Mast- und Nierenzellen festgestellt. Dieses Ergebnis relativiert die gängige Annahme, dass L-Aspartat-N-Acetyltransferase ausschließlich in Neuronen vorkommt.

#### 4.4.2 Anreicherung der L-Aspartat-N-Acetyltransferase aus NT-2 Zelllinie durch Dichtegradienten

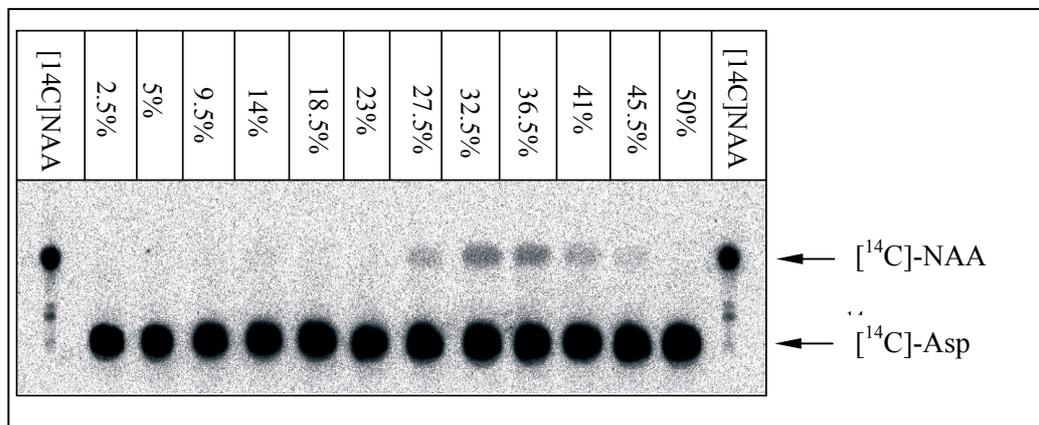
Nachdem die L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität der NT-2-Zellen festgestellt wurde, und in Zusammenhang mit der Behauptung Baslow's (2000), dass das N-Acetyl-L-Aspartat vor allem in Neuronen synthetisiert wird, wurde die Möglichkeit einer Reinigung der Transferase aus den neuronalen Vorläufern NT-2 mit Hilfe von Dichtegradienten untersucht.

Als Auftrag auf dem 11-stufigen - Saccharosegradienten<sup>1</sup> diente 1.4 ml - postnuklearer Überstand (PNS), der aus 15 10-cm-Petrischalen gesammelt wurde. Die NT-2 - Zellen wurden durch zweistündige Gradienten - Ultrazentrifugation im Rotor SW41 (Beckmann) bei 100.000xg in ihren Bestandteilen fraktioniert. In der nachfolgenden Abbildung wird die L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität in den einzelnen Stufen<sup>2</sup> der Dichtegradientenzentrifugation gezeigt.

<sup>1</sup> Die Saccharose, mit abnehmender Konzentration in 4,5 % - Schritten pro Stufe, wurde in 10 mM Tris-HCl pH 7.4 und 1 mM EDTA gelöst.

<sup>2</sup> Das Volumen der jeweiligen Fraktion betrug auf jeder Stufe 1 ml.

Abbildung 65: Dünnschichtchromatographie zur Bestimmung der L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität der Saccharose- Gradienten- Fraktionen von NT-2 Zellen



Die L-Aspartat-N-Acetyltransferase wurde aus NT-2 Zelllinie in 27,5 % bis 41 % Saccharose – Fraktionen angereichert. Die Acetyltransferaseanreicherung aus dem Zellextrakt erreichte in der 32,5 %igen Fraktion den Reinigungsfaktor 18,5 und die L-Aspartat-N-Acetyltransferase der NT-2-Zellen wies eine spezifische Enzymaktivität von 21,2 mU/mg Protein auf (s. Tab. 66).

Tabelle 66: L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität der Saccharose – Gradienten – Fraktionen von NT-2 – Zellen

Fraktion	ANAT mU/ml	Summe ANAT mU	Protein mg/ml	Spezifische ANAT mU/mg	Rf
GH - NT-2	7,5	10,56	6,6	1,14	1
2,5 %	0,6	0,62	2,2	0,09	0,1
5 %	2,8	2,88	2	1,44	1,3
9,5 %	1,29	1,29	1,8	0,72	0,6
14 %	2,59	2,59	1,9	1,37	1,2
18,5 %	1,52	1,52	1,5	1,2	0,9
23 %	1,33	1,33	1,3	1,02	0,9
27,5 %	7,39	7,39	1,2	6,2	5,4
<b>32,5 %</b>	<b>23,22</b>	<b>23,22</b>	<b>1,1</b>	<b>21,1</b>	<b>18,5</b>
36,5 %	21,77	21,77	1,1	20	17,4
41 %	7,792	7,792	0,7	11	9,8
45,5 %	4,26	4,26	0,6	7,1	6,2
50 %	1,34	1,34	0,5	2,7	2,4

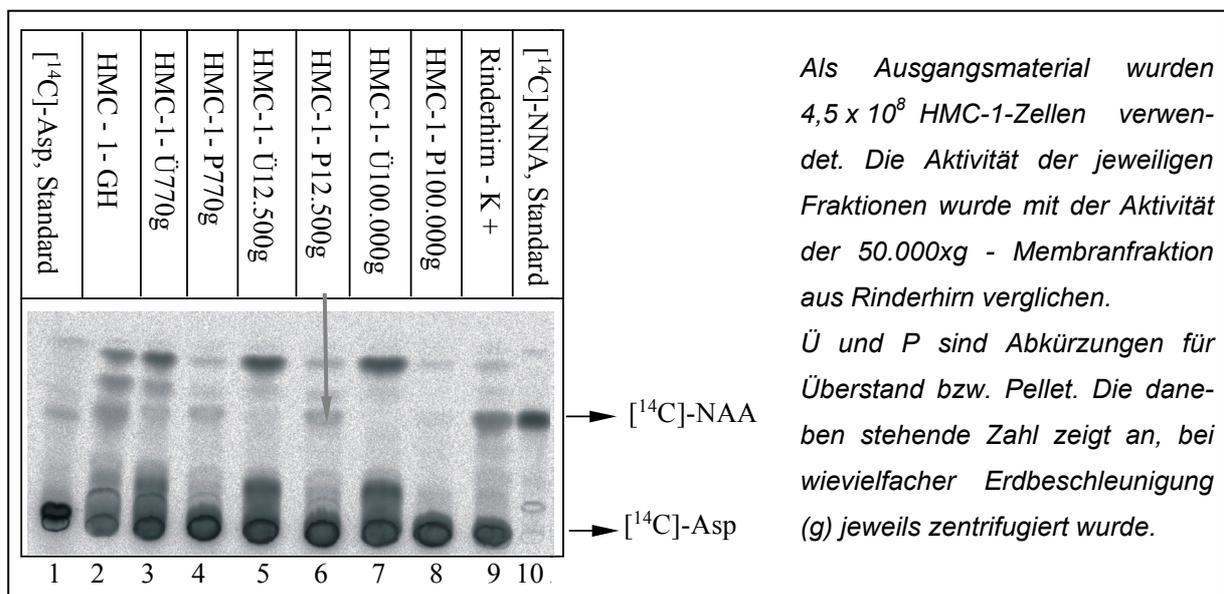
### 4.4.3 Nachweisen der L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität in den Mastzellen

Die in Suspension wachsende Zelllinie HMC-1 wurde kultiviert und in kurzer Zeit eine grosse Menge an humanen Mastzellen produziert. Die Auswahl dieser Kultur für die nachfolgend durchgeführten Untersuchungen wurde durch eine Veröffentlichung über das Vorkommen des N-Acetyl-L-Aspartats in Mastzellen (Burlina et al. 1997), jedoch ohne Information über eine Acetyltransferaseaktivität, beeinflusst.

Wegen des Unterschieds zwischen den beiden untersuchten Zelltypen - Mastzellen und Hirnzellen - musste erneut überprüft werden, ob in den Mastzellen eindeutig N-Acetyl-L-Aspartat gemessen wird. Dies konnte durch die Aspartoacylase - Hydrolyse des während der L-Aspartat-N-Acetyltransferase - Reaktion gebildeten N-Acetyl-L-Aspartats nachgewiesen werden (s. Abschnitt Material und Methoden, Punkt 3.1.2.2.3, sowie Abschnitt Versuche und Ergebnisse, Punkt 4.1.3.3). Das Produkt, welches von Mastzellen produziert wird, ist zweifellos [<sup>14</sup>C]-N-Acetyl-L-Aspartat und wird zur Bestimmung der L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität in der Nachweisreaktion gemessen.

Nachdem die L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität der Mastzellen nachgewiesen wurde, erfolgte die Differentialzentrifugation unter den gleichen Bedingungen wie beim Gehirn. Die Aktivität (s. Abb. 67) jeder Fraktion wurden bestimmt.

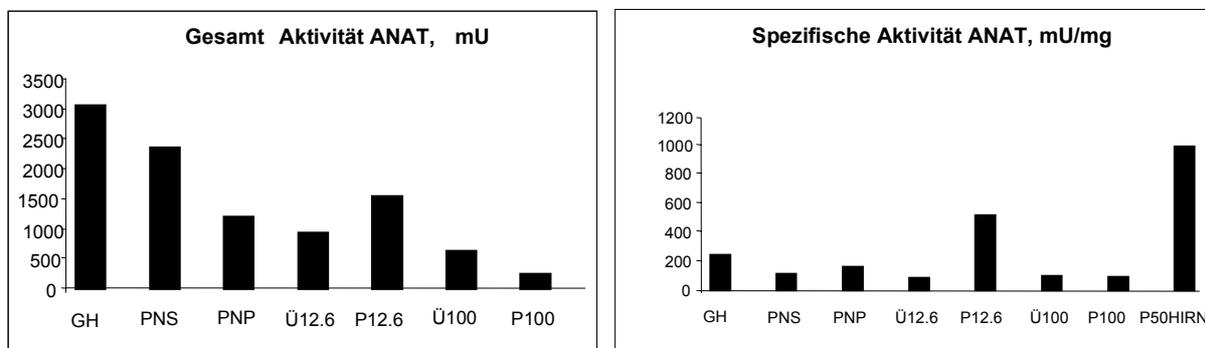
Abbildung 67: Dünnschichtchromatographie zur Bestimmung der L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität der durch Differentialzentrifugation gewonnenen HMC-1-Fraktionen



Bei der Bestimmung der Enzymaktivität fiel auf, dass die höchste spezifische L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität wiederholt in der 12.500xg - Pelletfraktion gemessen wurde und nicht - wie erwartet - in der Mikrosomenfraktion. Dies deutet auf die Existenz von zwei Acetyltransferasen hin, welche in den jeweiligen Geweben voraussichtlich unterschiedlich lokalisiert sind. Die Acetyltransferase, die N-Acetyl-L-Aspartat - Bildung in Mastzellen katalysiert, befindet sich im 12.600xg - Pellet, welches mit Mitochondrien<sup>1</sup> angereichert ist. Sie nimmt an den mitochondrialen Metabolitreaktionen oder an für die Immuneffektoren typischen Reaktionen teil. Die Hirn - Acetyltransferase besitzt auf Grund der besonderen Rolle des Gehirns eine andere Funktion.

Die gesamte in mU und die spezifische in mU/mg Protein Acetyltransferaseaktivität wird in der Abbildung 68 dargestellt. Die spezifische L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität der mitochondrialen HMC-1-Fraktion betrug 500 mU/mg Protein und wurde während der einstündigen Differentialzentrifugation bei 12.600xg erreicht. Dieses Ergebnis ist dreimal geringer im Vergleich zu dem Wert der spezifischen Aktivität der aus dem Gehirn isolierten Mitochondrien (1.500 mU/mg Protein).

Abbildung 68: Gesamte und spezifische L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität von  $4.5 \times 10^8$  HMC-1-Zellen



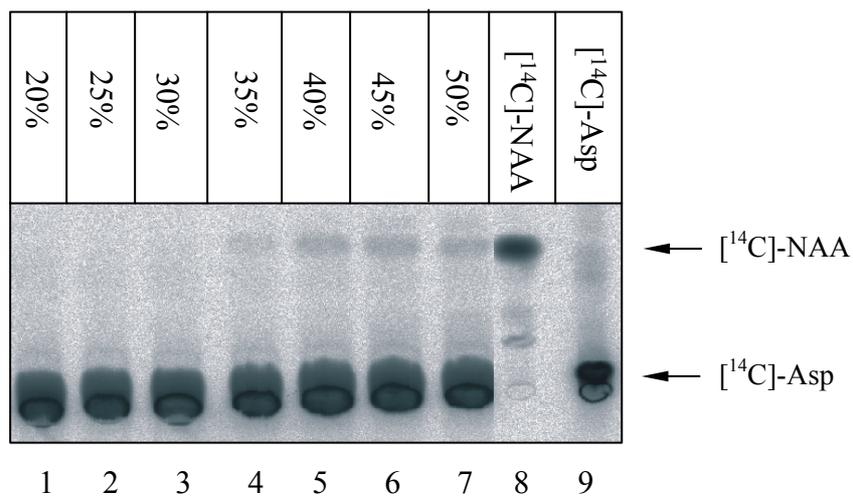
#### 4.4.3.1 Subzelluläre Fraktionierung der HMC-1 – Zellen

Es wurde eine subzelluläre Fraktionierung der HMC-1 – Zellen mittels Saccharose – Dichtegradienten durchgeführt, um die Acetyltransferase – Anreicherung zu überprüfen.  $5.46 \times 10^8$  Zellen wurden aus der Zellkultur entnommen und in 8.5 %iger Saccharose - Lösung (Endvolumen 2.8 ml) homogenisiert. Der postnukleare Überstand, welcher die Zellorganellen Lysosomen, Mitochondrien, Endoplasmatischen Retikulum (ER) und

<sup>1</sup> Das Prinzip der Differentialzentrifugation schließt die Zellkomponenten - Trennung ein, so dass Mitochondrien bereits nach 15 Minuten bei ca. 15.000xg - Zentrifugation im Pellet sedimentiert werden.

Ribosomen enthält, wurde in einem Saccharose - Gradienten (mit von oben nach unten zunehmender Dichte von 1.0218 g/ml bis 1.1867 g/ml) in seine Bestandteile mittels zweistündiger Ultrazentrifugation bei 100.000xg fraktioniert. Die so gewonnenen ein- ml-Saccharose - Fraktionen wurden gesammelt und die Acetyltransferaseaktivität jeder Fraktion bestimmt. (s. Abb. 69).

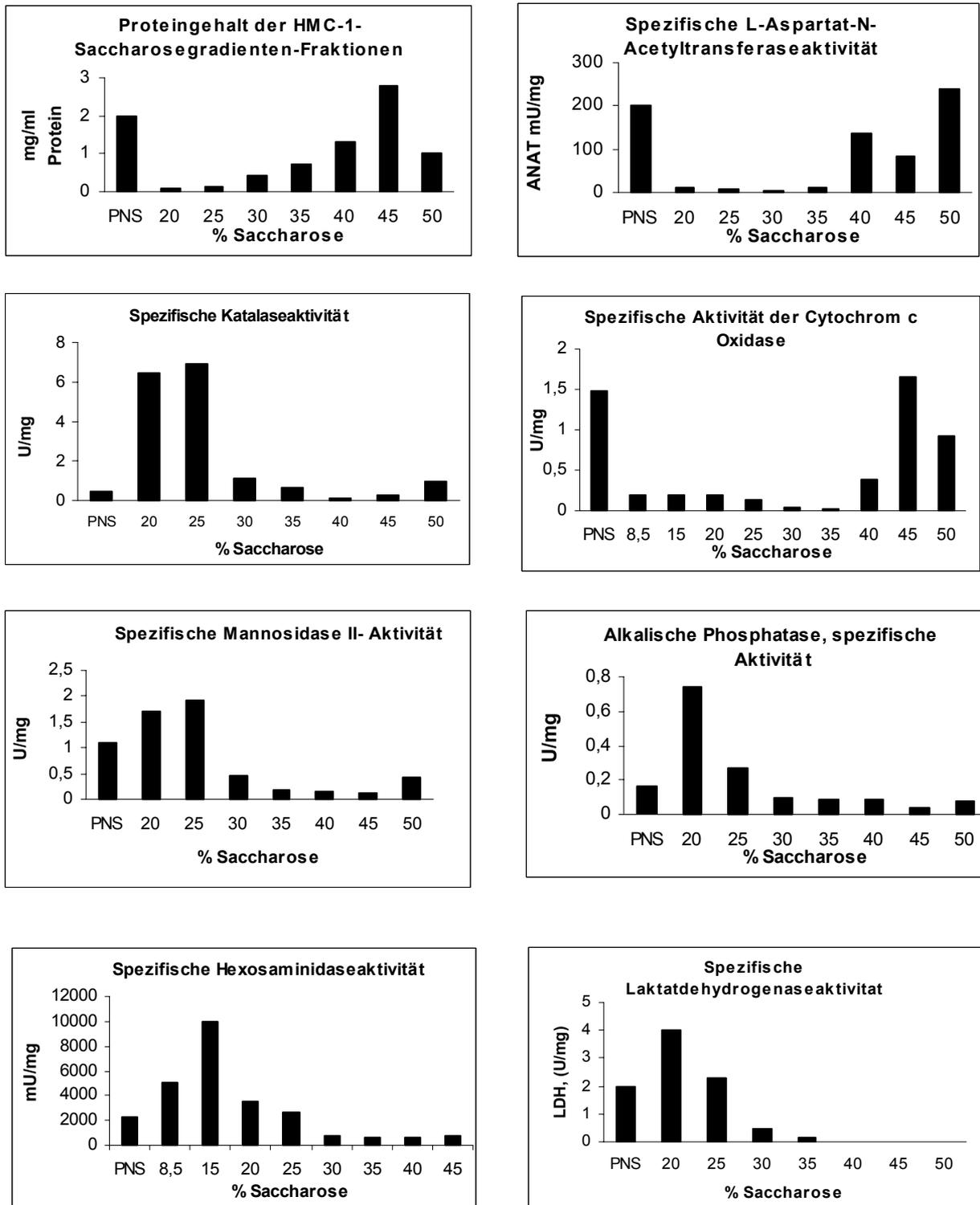
Abbildung 69: Dünnschichtchromatographie zur Bestimmung der L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität der Saccharose – Gradienten - Fraktionen von HMC-1 – Zellen



#### 4.4.3.2 Subzelluläre Lokalisation der L-Aspartat-N-Acetyltransferase in Mastzellen

Bei der Zellfraktionierung ist die Analyse des Reinheitsgrades der gewonnenen Fraktionen von grosser Bedeutung. Ob die Zellorganellen in einer Fraktion enthalten sind, und ob diese Fraktion frei von anderen Bestandteilen ist, lässt sich durch Bestimmung der Aktivitäten der charakteristischen Leitenzyme feststellen. Da die Verteilung der Leitenzyme in der Zelle die Kompartimentierung der von ihnen katalysierten Prozesse widerspiegelt, kann man durch den Nachweis von Transferaseaktivität in der jeweiligen Fraktion die subzelluläre Lokalisation der Acetyltransferase in den Mastzellen ableiten. Daher wurden die Leitenzymaktivitäten für jede Dichtegradienten - Fraktion bestimmt. Die Reaktionsbedingungen sowie die Aktivitätsdefinitionen jedes Leitenzyms sind im Abschnitt Material und Methoden beschrieben. Die für jede Saccharose - Gradienten – Fraktion bestimmten spezifischen Aktivitäten der Leitenzyme, der Proteingehalt sowie die spezifische L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität sind in der Abbildung 70 zusammengefasst.

Abbildung 70: Spezifische ANAT- und Leitenzyme- Aktivitäten der aus der subzellulären Fraktionierung der HMC-1-Zellen mittels Saccharose- Dichtegradienten gewonnenen Fraktionen



Die Organellenanreicherung je Fraktion entspricht der Erhöhung des Reinigungsfaktors des jeweiligen Enzyms (s. Tab. 71).

Tabelle 71: Zellorganellenanreicherung mittels Saccharose-Dichtegradienten von HMC-1-Zellen, Reinigungsfaktoren der Leitenzyme

Fraktion	ANAT	Cytochrom C Oxidase	Alkalische Phosphatase	Katalase	$\beta$ -Hexosaminidase	Laktatdehydrogenase	Mannosidase
20 %	0,05	0,13	<b>5</b>	<b>14</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1,54</b>
25 %	0,03	0,1	<b>1,7</b>	<b>15</b>	1,2	<b>1,15</b>	<b>1,7</b>
30 %	0,01	0,03	0,6	2,4	0,3	0,2	0,42
35 %	0,05	0,02	0,6	1,5	0,3	0,07	0,15
40 %	<b>0,7</b>	<b>0,3</b>	0,5	0,28	0,3	0	0,14
45 %	<b>0,4</b>	<b>1,1</b>	0,2	0,6	0,4	0	0,11
50 %	<b>1,2</b>	<b>0,6</b>	0,5	2,1	0,4	0	0,38
Leitenzym jeweils für:		Mitochondrien	Plasma-membrane	Peroxisomen	Lysosomen	Cytosol	Golgi - Apparat

Die hohen Konzentrationen der Saccharose - Lösungen verursachen hyperosmotische Bedingungen, welche die Organellenmembran beschädigen können, so dass die jeweiligen Enzyme freigesetzt werden und dadurch in mehreren Dichte<sup>1</sup> - Fraktionen gemessen und nachgewiesen werden können. Die höchste spezifische Mannosidaseaktivität in den HMC-1 - Zellen wurde in den 20 %igen bis 25 %igen Saccharose- Fraktionen festgestellt. Bei der selben Dichte der Lösung - 1.072 g/ml bis 1.099 g/ml – wurden die höchsten spezifischen Aktivitäten der Leitenzyme Katalase bzw. Laktatdehydrogenase gemessen. Die höchste spezifische  $\beta$ - Hexosaminidaseaktivität wurde zwischen 1.029 g/ml und 1,055 g/ml bestimmt<sup>2</sup>. Mit Ausnahme des mitochondrialen Leitenzyms waren die höchsten spezifischen Aktivitäten der untersuchten Leitenzyme verschieden von derjenigen der L- Aspartat-N-Acetyltransferase. Die höchste spezifische L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität der HMC-1-Zellen wurde in den 40 %- bis 50 %igen Saccharose – Dichtegradienten – Fraktionen nachgewiesen und betrug ca. 150 bis 220 mU/mg Protein. Dies entspricht einer Dichte des Gradienten von 1.156 g/ml bis 1.187 g/ml und dem Reinigungsfaktor 1,2. Der Reinigungsfaktor der Cytochrom c Oxidase in der 45 %igen Fraktion wurde auf 1,1 bestimmt. Die Mitochondrien der HMC-1-Zellen wurden in einer Dichte von 1.166 g/ml in stark angereicherter Form von den restlichen Organellen abgetrennt. Die höchste spezifische L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität der 40 %- bis 50 %igen Fraktionen korrespondiert mit der höchsten spezifischen Cytochrom c Oxidaseaktivität der selben Fraktionen. Durch den Nachweis der höchsten spezifischen Transferaseaktivität in der Fraktion mit der höchsten spezifischen Aktivität des mitochondrialen Leitenzyms Cytochrom c Oxidase kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die L-Aspartat-N-Acetyltransferase subzellulär in den Mitochondrien der Mastzellen lokalisiert ist.

<sup>1</sup> Die Dichte jeder Fraktion wurde mittels Refraktometrie bestimmt.

<sup>2</sup> In den 8,5 und 15 %- Fraktionen wurden die Aktivitäten aller Leitenzyme und der ANAT gemessen. Aufgrund der negativen Ergebnisse wurde auf eine graphische bzw. tabellarische Darstellung verzichtet.

## 5 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Seit fast vierzig Jahren versuchen Wissenschaftler das Enzym L-Aspartat-N-Acetyltransferase zu isolieren, bisher jedoch nur mit begrenztem Erfolg und mit zum Teil mehrdeutigen Ergebnissen, denn bis heute wurde keine Anreicherung der L-Aspartat-N-Acetyltransferase mit einem für eine anschließende Aminosäuresequenzierung ausreichend hohen Reinigungsfaktor erreicht, was zur Feststellung der Primärstruktur des Enzyms und somit der unbekanntenen Nukleotidsequenzen seines Gens eine Voraussetzung ist.

Das Erarbeiten eines Reinigungsprotokolls für die L-Aspartat-N-Acetyltransferase begründete die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit. Dazu wurde eine Nachweisreaktion etabliert, die auf der Übertragung eines Acylrestes auf [ $^{14}\text{C}$ ] - Aspartat und anschließender dünnschichtchromatographischen Trennung von Substrat und Produkt basiert.

Die Dürftigkeit der vorhandenen Informationen über das Enzym prägte die ursprüngliche Richtung der Versuche, die **Spezifität der Nachweisreaktion** zu bestimmen (s. Abschnitt Versuche und Ergebnisse, Punkt 4.1). Die Substrate der Reaktion Aspartat und Acetylcoenzym A sind direkt wie indirekt an vielen Reaktionen beteiligt (zum Beispiel an Transaminierungsreaktionen, und dadurch am Citratzyklus). Deshalb musste nachgewiesen werden, dass durch die N-Acetyl-L-Aspartat-Nachweisreaktion eindeutig L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität gemessen wird. Es musste ausgeschlossen werden, dass keine Produkte anderer Reaktionen, an denen das radioaktiv markierte Aspartat beteiligt sein könnte, gemessen werden. Die Nachweise basieren darauf, dass bei Fehlen von Acetylcoenzym A bzw. beim Einsetzen von [ $^{14}\text{C}$ ]-Glutamat statt [ $^{14}\text{C}$ ]-Aspartat kein [ $^{14}\text{C}$ ]-N-Acetyl-L-Aspartat als Produkt gebildet wird. Hingegen entsteht [ $^{14}\text{C}$ ]-N-Acetyl-L-Aspartat, wenn radioaktiv markiertes Acetylcoenzym A in der Acetyl-Gruppe anstelle von radioaktivem Aspartat verwendet wird (s. Abb. 3). Das in der enzymkatalytischen Reaktion gebildete Produkt wandert auf der Dünnschichtchromatographie - Platte auf der selben Höhe wie das chemisch synthetisierte [ $^{14}\text{C}$ ]-N-Acetyl-L-Aspartat (s. Abb. 6). Die Spezifität der L-Aspartat-N-Acetyltransferase – Nachweisreaktion wurde zusätzlich durch die Hydrolyse des Produktes N-Acetyl-L-Aspartat mittels Aspartoacylase nachgewiesen. Das während der L-Aspartat-N-Acetyltransferase - Reaktion gebildete [ $^{14}\text{C}$ ]-N-Acetyl-L-Aspartat wurde von der rekombinanten Aspartoacylase in einer anschließenden Reaktion hydrolysiert. Um die Messung von N-Acetyl-L-Aspartat zu verifizieren wurden Verfahren zu Klonierung, Sequenzierung und Exprimierung des N-Acetyl-L-Aspartat abbauenden Enzyms Aspartoacylase durchgeführt. Schließlich dient die gewebespezifische Expression im Gehirn

bzw. die Produktinhibition der Enzymaktivität ebenfalls als Hinweis auf Spezifität der gemessenen L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität.

Bei der **Optimierung der Reaktionsbedingungen** wurde festgestellt, dass der lineare Bereich der Funktion zwischen dem Proteingehalt der Probe (s. Abb. 14) bzw. der Inkubationszeit (vgl. Abb 16 und 17) und der L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität für die verschiedenen Diffezentialzentrifugationsfraktionen variiert. Eine optimale Aktivität wurde erreicht, wenn ca. 90 µg Protein in der mikrosomalen L-Aspartat-N-Acetyltransferase - Reaktion eingesetzt wurden. Mit steigender L-Aspartat-N-Acetyltransferaseanreicherung in der mikrosomalen Fraktion, wird die Linearität in Richtung niedrigere Zeitwerte verändert, wahrscheinlich bedingt durch den geringeren Inhalt an anderen Enzymen in der Probe. Die L-Aspartat-N-Acetyltransferase - Reaktion in dem mikrosomalen 100.000xg – Pellet verläuft bei einer Inkubationszeit von bis zu 20 Minuten linear (s. Abb. 17), während die Dauer der Reaktion des bei 50.000xg - Zentrifugation gewonnenen Membranpellets eine Linearität bei 30 bis 120 Minuten Inkubationszeit aufweist (s. Abb. 16). Auf dieser Tatsache basierte die Bestimmung der Linearfunktionswerte für jede untersuchte Fraktion sowie die Darstellung im Abschnitt Charakterisierung des Enzyms (Punkt 4.2.5 und 4.2.6). Darüber hinaus wurde während der Optimierung der L-Aspartat-N-Acetyltransferase – Reaktion die Konzentration der relevanten Substrate optimiert sowie festgestellt, dass das pH - Optimum des Enzyms im Unterschied zum alkalischen pH - Optimum der Enzymen von dem Mitochondrieninneren bei 7 liegt<sup>1</sup> und dass das Enzym bei einem Temperaturoptimum von ca. 37°C aktiv ist.

Die Schwierigkeit bei der Reinigung eines nicht isolierten Enzyms besteht darin, dass lediglich aus dem Nachweis seiner Aktivität auf sein Vorkommen geurteilt werden kann. Die Auswahl der möglichen Methoden wird zusätzlich dadurch eingeschränkt, dass Verfahren, die auf dem Gebrauch von denaturierenden Substanzen (z.B. Harnstoff) in hohen Konzentrationen basieren, wie die Isoelektrische Fokussierung, ungeeignet für die Untersuchung des Enzyms sind. Gleichzeitig lassen sich membrangebundene Proteine generell schwierig reinigen, da sie während des Solubilisierungsverfahrens ihre Aktivität teilweise oder vollständig verlieren. Die Reinigung eines Hirnenzyms durch die konventionellen Reinigungsmethoden wird zusätzlich durch die Heterogenität des Hirngewebes sowie durch das Vorkommen großer Mengen Myelin erschwert. Um diese Schwierigkeiten zu vermeiden, wurde das relativ schnelle Verfahren zur Reinigung des Enzyms aufgrund seiner radioaktiven Markierung durch mögliche **Hemmstoffe als Strukturanalogen** des Aspartats überprüft. Es wäre vorstellbar, einen geeigneten Inhibitor

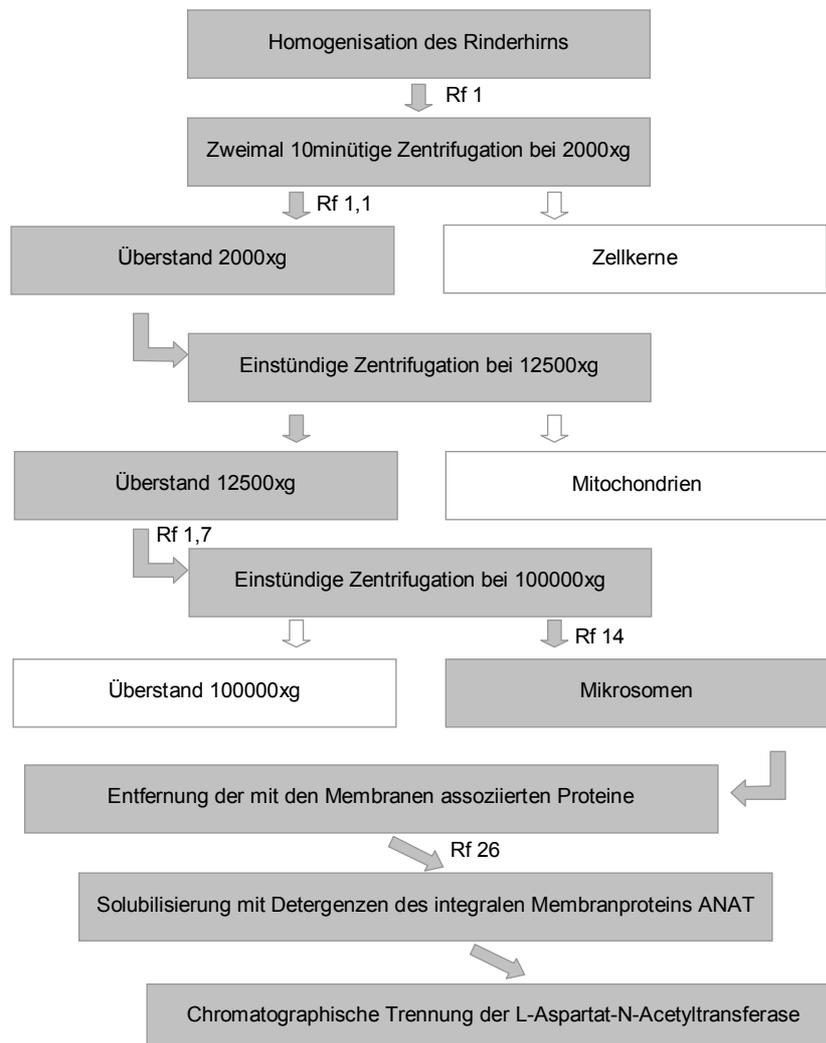
---

<sup>1</sup> Dies ist ein Hinweis, dass das Enzym nicht typisch mitochondriales Enzym ist. Es wurde festgestellt, dass die Acetyltransferase in den Grenzen von pH 6 bis pH 9 aktiv ist.

zu entdecken, mit dessen Hilfe die Transferase in einer anschliessenden Affinitätschromatographie - Reinigung abgetrennt werden könnte. Unter den untersuchten Hemmstoffen wurde jedoch kein Inhibitor der L-Aspartat-N-Acetyltransferase gefunden. Während der Untersuchungen wurde festgestellt, dass das Oxalacetat das Registrieren des Produkts erschwert, da wahrscheinlich auf Basis der Transaminierungsprozesse ein anderes Produkt entsteht (s. Abb. 19 und 20). Es wird auch ohne die Beteiligung des Acetylcoenzyms A jedoch immer unter Teilnahme von Aspartat gebildet, was darauf hindeutet, dass das Aspartat in eine andere radioaktiv markierte Substanz umgewandelt wird (s. Abschnitt Versuche und Ergebnisse, Punkt 4.2.6.1). Es wurde nachgewiesen, dass das daraus entstandene Produkt, welches auf der Dünnschichtchromatographie – Platte mit einem Rf - Wert von 0.68 wandert, ein von N-Acetyl-L-Aspartat unterschiedliches Produkt ist und von der Aspartoacylase nicht abgebaut werden kann. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die auf Abb. 19 sichtbaren verstärkten Banden keiner Stimulation der L-Aspartat-N-Acetyltransferase durch das Oxalacetat gleichzusetzen sind und noch einmal die Notwendigkeit der im Abschnitt Spezifität diskutierten Kontrollen bestätigt.

Im Rahmen des gegenwärtigen Projektes wurden die Möglichkeiten zur konventionellen Reinigung des Enzyms detailliert untersucht und verifiziert. Es wurde die subzelluläre Fraktionierung des Nervengewebes mittels Differentialzentrifugation (s. Abb. 72), Reinigung der membranassoziierten Proteine, Solubilisierung und anschliessender chromatographischer Trennung untersucht, wodurch die L-Aspartat-N-Acetyltransferase partiell gereinigt werden konnte.

Abbildung 72: Anreicherung der L-Aspartat-N-Acetyltransferase; Reinigungsfaktoren und – Schritte



Während der Zellfraktionierung des Hirngewebes wurden bei dem Einsatz von **präparativer Ultrazentrifugation** interessante Ergebnisse erhalten und das Enzym als membrangebundenes Protein der bei 100.000xg – Zentrifugation gewonnenen Mikrosomenfraktion bestimmt. Es wurde zum ersten Mal bewiesen, dass das Enzym sich *in den Mikrosomen* des Gehirns, d.h. in den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums, befindet<sup>1</sup>. Die höchste spezifische L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität der Mikrosomen erreichte den Reinigungsfaktor 14 bis 18.

<sup>1</sup> Die Mikrosomenfraktion besteht aus kleinen Membranvesikeln - hauptsächlich Fragmenten des glatten sowie des rauen Endoplasmatischen Retikulums. Die Mikrosomen können häufig noch Komponente des Golgi- Apparates und vesikulierte Fragmente der Zellmembran als Kontamination enthalten.

Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass die L-Aspartat-N-Acetyltransferase kein membranassoziiertes, sondern ein *membranintegriertes mikrosomales Protein* ist, da das Enzym nach dem Waschen mit Natriumcarbonat – Salzlösung nicht gelöst wird und in der Pelletfraktion verbleibt (s. Abb. 34). Nach **Entfernung der peripheren Membranproteine** erhöht sich die Anreicherung der L-Aspartat-N-Acetyltransferase auf den Rf 26. Dies entspricht ca. 30.000 mU/mg, welches mindestens 30 bis 60mal höher als die bis dahin für die Mitochondrien des Nervengewebes veröffentlichten ca. 500 mU/mg ist (Moffett et al. 1991; Simmons et al. 1991; Moffett und Namboodiri 1995).

Bisher wurde die L-Aspartat-N-Acetyltransferase für ein spezifisches *mitochondriales Enzym* im Gehirn gehalten. In den Mitochondrien wurde bei den Versuchen lediglich eine geringe Anreicherung (Rf. 4,4) der L-Aspartat-N-Acetyltransferase erreicht (s. Abb. 25 bis 29). Die L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität der aus Hirn in Ficollgradienten – Zentrifugation angereicherten und mithilfe der Leitenzymaktivitätsbestimmung nachgewiesenen Mitochondrien erreichte bis zu 1.500 mU/mg Protein.

Wie das N-Acetyl-L-Aspartat aus den Mitochondrien ins Cytosol transportiert wird, ist nicht ausreichend erforscht, vermutlich ist der natriumabhängige Dicarboxylat – Transporter daran beteiligt. Im Cytosol des Nervengewebes befinden sich jedoch ca. 80 % von dem zellulären N-Acetyl-L-Aspartat (Metha und Namboodiri 1995).

Gleichzeitig wurde eine Acetyltransferaseaktivität erstmalig *in den eukaryontischen Zelllinien* Astrocyten (11+/-) bzw. Nierenzellen (Cos 7) nachgewiesen, über die bisher angenommen wurde, dass sie keine L-Aspartat-N-Acetyltransferase enthalten (s. Abb. 64). Das Vorhandensein des N-Acetyl-L-Aspartats in Mastzellen (Burlina et al. 1997) bestimmte die Durchführung von Untersuchungen zur Feststellung von L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität in den HMC-1 – Zellen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Transferaseaktivität in den mitochondrialen und nicht in den mikrosomalen Fraktionen von Mastzellen nachgewiesen (s. Abb. 67).

Die *Zusammenfassung* der Ergebnisse deutet auf die Existenz von *zwei Acetyltransferase-Isoenzymen* hin, welche in den jeweiligen Geweben / Organen voraussichtlich unterschiedlich lokalisiert sind: ein typisches für das Nervengewebe, enthalten in den Mikrosomen der Neuronen, und ein zweites, welches wahrscheinlich in den meisten Geweben repräsentiert ist und an den mitochondrialen biochemischen Reaktionen teilnimmt. Die in den neuronalen Vorläufern NT-2 - Zellen registrierte sowohl mikrosomale als auch mitochondriale Acetyltransferaseaktivität erlaubt zusätzlich die Vermutung, dass es eine *L-Aspartat-N-Acetyl-*

*transferasefamilie* gibt, deren Mitglieder das Aspartat ausgehend vom Acetylcoenzym A in unterschiedlichen Kompartimenten kovalent modifizieren.

Es sind weitere Acetyltransferasen bekannt, welche in unterschiedlichen Geweben bzw. Organen im Körper vorkommen. Ein Beispiel dafür ist das acetylierende Enzym N-Acetyl-Glutamat-Synthetase. Es besitzt eine nachgewiesene Hirn- und Leberlokalisation (Colombo et al. 1982, Caldovic et al. 2002a), jedoch unterschiedliche Funktionen im jeweiligen Organ. Trotz Klonierung des Gens für die Glutamat–N-Acetyl–Synthetase 2002 wurde kein DNA - Homolog für die L-Aspartat-N-Acetyltransferase gefunden (Caldovic et al. 2002a, Madhavarao et al 2002). Das Scanning von cDNA – Bibliotheken auf der Suche nach Homologen unter den bereits bekannten Transferaseenzymen wäre eine weitere Möglichkeit, die Nucleotid – Sequenz der L-Aspartat-N-Acetyltransferase zu bestimmen.

Als integrales Protein musste die L-Aspartat-N-Acetyltransferase aus den gewonnenen mikrosomalen Membranen **solubilisiert** werden. Eine Reihe Solubilisierungsversuche auf Basis von Detergenz- und Salz – Kombinationen wurde durchgeführt, um optimale Solubilisierungsbedingungen zu finden. Das mikrosomale Solubilisat wurde anschließend Ionenaustauscherchromatographien, Heparin – und Reaktivfarben - Affinitätschromatographien sowie Gelfiltration unterzogen. Durch die Verwendung der untersuchten Detergenzien Triton X – 100, Nonidet P 40, Octylglucosid und Chaps kann die L-Aspartat-N-Acetyltransferase entweder nicht solubilisiert werden oder die Aktivität im Solubilisat sinkt mindestens um das zwei- bis dreifache (s. Abb. 36) ab. Dadurch wird ein Ausgangsmaterial mit relativ niedrigerer Aktivität gewonnen, welcher als Auftrag bei den anschließenden **konventionellen Reinigungsmethoden** dient. Die ebenfalls niedrige Aktivität in den einzelnen chromatographischen Fraktionen führt zu einem entsprechend niedrigem Reinigungsfaktor und einer geringen Ausbeute. Die Reaktivfarben -, die Q - Sepharose - und die Grössenausschluss - Chromatographien bieten dennoch Aussicht auf Erfolg (s. Tab. 73).

Abbildung 73: Anreicherung der L-Aspartat-N-Acetyltransferase pro geeignetes Reinigungsverfahren

Reinigungsverfahren	Höchst erreichter Rf.
Reaktivfarbenschromatographie – Rot 120	51
Reaktivfarbenschromatographie – Braun 10	14
Q - Sepharose - Chromatographie	9
Heparin - Chromatographie	4
Ausschlusschromatographie – Superdextran G 200	2
<i>Alle weiteren verwendeten Chromatographien ergaben einen niedrigeren Reinigungsfaktor und werden daher nicht als geeignet angesehen.</i>	
Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation von NT-2-Zellen	19

Der höchste Reinigungsfaktor 51 wurde durch *die Rote 120 – Reaktivfarben – Affinitätschromatographie* gewonnen (vgl. Abb. 57 und 58). *Die Brane 10 – Reaktivfarbenchromatographie* ergab den hohen Faktor 14. Mittels der *Q-Sepharose-Chromatographie* wurde ein Rf. 9 erreicht, der jedoch nicht in Zusammenhang mit einer Absorption an Säulen steht, sondern in der Waschfraktion gemessen wurde. Durch *Gelfiltration* und anschließende Kalibrierung der Superdexsäule konnte ein relatives Molekulargewicht der L-Aspartat-N-Acetyltransferase von 316,2 kDa bestimmt werden (s. Tab. 62 und Abb. 63). Das hohe Molekulargewicht weist darauf hin, dass das Enzym ein großes Protein oder in einem Multimerkomplex eingebunden ist. Ein Reinigungsschema könnte durch die Kombination von *Reaktivfarbenchromatographie* und *Gelfiltration* zu einem Reinigungsfaktor von ca. 100 führen, welcher wahrscheinlich für eine anschließende Untersuchung der Aminosäuresequenz durch Massenspektrometrie (Maldi - TOF) nicht ausreichen würde. Dies macht die Suche nach wirksameren Reinigungsverfahren erforderlich, indem weitere Solubilisierungsmittel sowie andere Methoden zur Erhöhung der L-Aspartat-N-Acetyltransferaseaktivität und/oder zur Registrierung der Aktivität im Solubilisat geprüft bzw. entwickelt werden. Eine Markierung des Enzyms könnte seine Abgrenzung von den restlichen mikrosomalen Proteinen beispielsweise durch den Einsatz von Gefrierbruch – und Gefrierätzmethode der angereicherten Mikrosomenfraktion und Transmissions – Elektronmikroskopie ermöglichen.

Das Gehirn enthält N-Acetyl-L-Aspartat in millimolaren Konzentrationen. Diese Substanz wird seit Jahren in der klinischen MR - Spektrometrie (Magnetische Resonanz) als Indikator für neuronale Integrität verwendet. Nach dem Stand der einschlägigen Veröffentlichungen ist von einem Einfluss der L-Aspartat-N-Acetyltransferase auf den richtigen Verlauf der Hirnprozesse auszugehen. Eine der vielfach erwähnten Funktionen des N-Acetyl-L-Aspartats besteht in seiner Rolle als Neurotransmitter. Daher könnte das N-Acetyl-L-Aspartat in die Reihe der im Zentralnervensystem häufig vorkommenden Transmitterstoffe Glutamat,  $\gamma$ -Aminobutyrat (GABA) und Glycin eingegliedert werden (Baslow 2000, Metha und Namboodirii 1995). In diesem Zusammenhang lässt sich vermuten, dass die mikrosomale L-Aspartat-N-Acetyltransferase an der Produktion der Neurotransmitter beteiligt sein könnte. Gleichzeitig wird angenommen, dass das N-Acetyl-L-Aspartat als Vorläufer des im Nervensystem der Säugetiere am häufigsten vorkommenden Neurotransmitterpeptids N-Acetyl-Aspartyl-Glutamat (NAAG) dient (Cangro et al. 1987). Jedoch muss erwähnt werden, dass das synthetisierende Enzym, die Synthesemechanismen und –Lokalisation bis heute unbekannt bleiben. Es wird vermutet, dass das Produkt N-Acetyl-Aspartyl-Glutamat den N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) – Neurotransmitter - Rezeptor des Glutamats aktiviert (Faull et al. 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass beide mögliche Neurotransmitter N-

Acetyl-L-Aspartat und N-Acetyl-Aspartyl-Glutamat die Transferase inhibieren (s. Abb. 10) und dass Glutamat kein Substrat der L-Aspartat-N-Acetyltransferase ist. Weiteren Untersuchungen würden die Rolle der L-Aspartat-N-Acetyltransferase im Aspartat- und N-Acetyl-Aspartyl-Glutamat- Metabolismus beleuchten.

Über die konkreten Untersuchungen hinaus kann angenommen werden, dass sich die L-Aspartat-N-Acetyltransferase im Laufe der Evolution der Spezifizierung der Hirnfunktionen anpasste und neue Lokalisationen und Aufgaben übernahm. Dafür spricht das Vorkommen von N-Acetyl-L-Aspartat auch bei Arten mit einem primitiveren Nervensystem als das der Säugetiere, zum Beispiel bei Fischen. Die vielfältigen Funktionen des Enzymprodukts N-Acetyl-Aspartat als ein Neurotransmitter, Osmolyt, Aspartatspeichermolekül und/oder Acetyl-donor bei der Fettsäuren- oder Myelinsynthese (Chakraborty et al. 2001), begründen die enorme Bedeutung der Acetyltransferase für die normale Hirnfunktion und die neurologische Gesundheit des Menschen.

Weitere Erforschungen der L-Aspartat-N-Acetyltransferase, das Klonen ihres Gens und die Modellierung einer Knockout – Maus würden dazu beitragen, die materielle Basis der Hirnprozesse und deren Physiologie zu klären, neurodegenerative Krankheiten wie Multiple Sklerose, Schizophrenie, Morbus Alzheimer, Huntington's Krankheit besser zu interpretieren und neue erfolgreiche Interventionsstrategien und Behandlungen zu entwickeln.

## 6 Abkürzungen

A	Ampere
Ac	Acetat
ANAT	L-Aspartat-N-Acetyltransferase
ASA	Arylsulfatase A
Asp	Aspartat
ASPA	Aspartoacylase II
bp	base pare (Basenpaare)
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
ca.	Circa
c DNA	komplementäre DNA
COX	Cytochrom c- Oxidase
CD	Canavan disease
cpm	Impulse pro Minute
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothretol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Etidiumbromid
Ex.	Extrakt
GH	Gesamthomogenat
Glu	Glutamat
β- Hex	β- Hexosaminidase
HPLC	high performance liquid chromatography
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPTG	Isopropyl- β- D- Thiogalaktopyranosid
kD	kilo- Dalton
Km	Michaelis- Konstante
LB	Luia- Bertani bakterielles Medium
LDH	Laktatdehydrogenase
M	Mitochondrien
mA	mili Ampere

MALDI	matrix- assisted laser- desorption ionisation
MALDI-TOF	matrix- assisted laser- desorption ionisation time of flight
MG	Molekulargewicht
Min	Minute
NAA	N-Acetyl-L-Aspartat
NaAc	Natriumacetat
NAAG	N- Acetyl- Aspartyl- Glutamat
NAG	N-Acetyl-L-Glutamat
NADPH	Reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NaPh	Natriumphosphat
Ni- NTA	Nickel- Nitritriaessigsäure
NP-40	Nonidet P-40
NPAG	p-NPAG : para-Nitrophenyl-N-Acetyl- -D-Glucosaminid
OctGlc	Octylglucosid
OD	Optische Dichte
OxAc	Oxalacetat
P	Pellet
PBS	Phosphatpufferierte Kochsalzlösung
PEG	Polyethylenglycol
Pen / Strep	Penicillin und Streptomycin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNP	Postnukleares Pellet
PNS	Postnukleares Supernatant
PCR	Polymerase Chain Reaction
rcf	relative centrifuge force, (g )
Rf	Reinigungsfaktor
Rf	Relative Laufstrecke (bei der Dünnschichtchromatographie)
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek.	Sekunde
Std.	Stunde
TAE	Tris- Acetat- EDTA- Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethyldiamin
TFA	Trifluoracetat
Tris	Tris (Hydroxymethyl)- Aminomethan

tRNA	Transfer- RNA
TX-100	Triton X-100
Ü	Überstand
U	Unit
ü.N.	über Nacht
V	Volt
v/v	Volumenverhältnis
Vol.	Volumen
w/v	Gewicht zu Volumen

## 7 Literaturverzeichnis

- Arion W. (1989) Measurement of Intactness of Rat Liver Endoplasmatic Reticulum; *Met. in Enzym.* 174, 58 - 67
- Baslow M. H. (2003) N-Acetyl-L-Aspartate in the Vertebrate Brain: Metabolism and Function; *Neurochem. Res.* 28 (6), 941 – 953
- Baslow M. H., Suckow R.F. and Hungund B. I. (2000) Effects of ethanol and alcohol dehydrogenase inhibitors on the reduction of N-acetylaspartate levels of the brain mice in vivo: a search for substances that may have therapeutic value in the treatment of Canavan disease; *J. Inherit. Metab. Dis.* 23, 684 - 692
- Baslow M. H. (2000) Function of N-Acetyl-Aspartate and N-Acetyl-L-Aspartylglutamate in the Vertebrate Brain: Role in Glial Cell-Specific Signalling; *J. Neurochem.* 23 (7), 453 - 459
- Baslow M. H. (1997) A Review of Phylogenetic and Metabolic Relationships Between the Acylamino Acids, N-Acetyl-L-Aspartic Acid and N-Acetyl-L-Histidine, in the Vertebrate Nervous System; *J. Biochem.* 68 (4), 1335 - 1344
- Bates T. E., Strangward M., Keelan J., Davey G. P., Munro P. M. G. and Clark J. B. (1996) Inhibition of N-acetylaspartate production: implications for <sup>1</sup>H MRS studies in vivo; *Neuroreport* 7, 1397 - 1400
- Bhakoo K. K. and Pearce D. (2000) In vitro Expression of N-Acetyl Aspartate by Oligodendrocytes: Implication for Proton Magnetic Resonance Spectroscopy Signal in Vivo; *J. Neurochem.* 74, 254 – 262
- Bogonez E. and Koshland D. E. (1985) Solubilization of a vectorial transmembrane receptor in functional form: Aspartate receptor of chemotaxis; *J. Biochem.* 82, 4891 - 4895
- Burlina A. P., Ferrari V., Facci L., Skaer S. D. and Burlina A. B. (1997) Mast Cells Contain large Quantities of Secretagogue - Sensitive N-Acetylaspartate; *J. Neurochem.* 69 (3), 1314 - 1317
- Burri R., Steffen C., Herschkowitz N. (1991) N-Acetyl-L-Aspartate is a Major Source of Acetyl Groups for Lipid Synthesis during Rat Brain Development; *Dev. Neurosci.* 13, 403 - 411
- Caldovic L., Morizono H., Panglao M. G., Gallegos R., Yu X., Shi D., Malamy M. H., Allewell N. M. and Tuchman M. (2002a). Cloning and expression of the human N-acetylglutamate synthase gene; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 299, 581 - 586
- Cangro C. B., Namboodiri M. A., Sklar L. A., Corigliano-Myrphy A. and Neale J. H. (1987) Immunohistochemistry and biosynthesis of N-acetylaspartylglutamate in spinal sensory ganglia; *J. Neurochem.* 49, 1579 - 1588
- Chakraborty G., Mekala P., Yahya D., Wu G. and Ledeen R. W. (2001) Intraneuronal N-acetylaspartate supplies acetyl groups for myelin lipid synthesis: evidence for myelin - associated aspartoacylase; *J. Neurochem.* 78, 736 - 745
- Clarke J. B. (1998) N-Acetylaspartate: a marker for neuronal loss or mitochondrial dysfunction; *Dev. Neurosci.* 20, 271 – 276
- Clarke D. D., Greenfield S., Dicker E., Tirri L. J., and Ronan E. J. (1975) A relationship of N-acetylaspartate biosynthesis to neuronal protein synthesis; *J. Neurochem.* 24, 479 - 485

- Colombo J. P., Krähenbrühl S., Bachmann C., (1982) N-Acetylglutamat Synthetase: Enzym Assay in Human Leber; *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 20, 325 - 329
- D'Adamo A. F., Gidez L. I. and Yatsu F. M. (1968) Acetyltransport mechanism. Involvement of N-Acetylaspartic acid in de novo fatty acid biosynthesis in the developing rat brain; *Exp. Brain Res.* 5, 267 – 273
- D'Adamo A. F., Smith J. C. and Woiler C. (1973) The occurrence of N-acetylaspartate amidohydrolase (aminoacylase II) in the developing rat; *J. Neurochem.* 20, 1275 - 1278
- Demougeot C., Garnier P., Mossiat C., Bertrand N., Giroud M., Beley A. and Marie C. (2001) N-Acetylaspartate, a marker of both cellular dysfunction and neuronal loss: its relevance to studies of acute brain injury; *J. Neurochem.* 77, 408 – 415
- Dunlop D. S., Hale D. M. and Lajtha A. (1992) Decreased brain N-acetylaspartate in Huntington's disease; *Brain Res.* 580, 44 - 48
- Faull K. F., Rafie R., Pascoe N., Marsh L., Pfefferbaum A. (1999) N-acetylaspartic acid (NAA) and N-acetylaspartylglutamic acid (NAAG) in human ventricular, subarachnoid, and lumbar cerebrospinal fluid; *Neurochem. Res.* 24 (10), 1249 - 1261
- Fink D. J. (2000) Gene therapy for Canavan disease? *Ann. Neurol.* 48 (1), 9 - 10
- Foster A. C., Willis C. L., Tridgett R. (1990) Protection Against N-methyl-D-aspartate Receptor-Mediated Neuronal Degeneration in Rat Brain by 7-chlorokynurenate and 3-amino-1-hydroxypyrrolid-2-one, Antagonists at The Allosteric Site for Glycine; *Eur. J. Neurosci.* 2 (3), 270 - 277
- Goldstein F. B. (1959) Biosynthesis of N-Acetyl-L-Aspartic Acid; *J. Biol. Chem.* 234 (10), 2702 - 2706
- Goldstein F. B. (1969) The Enzymatic Synthesis of N-Acetyl-L-Aspartic Acid by Subcellular Preparations of Rat Brain; *J. Biol. Chem.* 224 (15), 4257 – 4260
- Goldstein F. B. (1976) Amidohydrolases of brain: Enzymatic hydrolysis of N-acetyl-L-aspartate and other N-acyl-L-amino acids; *J. Neurochem.* 26, 45 - 49
- Grodd W., Krageloh-Mann I., Petersen D., Trefz F. K. and Harzer K. (1990) In vivo assessment of N-acetylaspartate in brain in spongy degeneration (Canavan's disease) by proton spectroscopy; *Lancet.* 336, 437 – 438
- Grodd W., Krageloh-Mann I., Klose U. and Sauter R. (1991) Metabolic and destructive brain disorders in children: Findings with localised proton MR spectroscopy; *Radiology* 181, 173 – 181
- Grossmann R. I., Lenkinski R. E., Ramer K. N., Gonzales - Scarano F. and Cohen J. A. (1992) MR proton spectroscopy in multiple sclerosis; *AJNR* 13, 1535 - 1543
- Hickman A. B., Namboodiri M. A., Klein D. C. and Dyda F. (1999) The Structural Basis of Ordered Substrate Binding by Serotonin N-Acetyltransferase: Enzyme Complex at 1.8 Å Resolution with a Bisubstrate Analogous; *Cell* 97, 316 - 369
- Himmelhoch R. (1990) Enzyme Purification and Related Techniques, Chromatography of Proteins on Ion – Exchange Adsorbents; *Met. in Enzym.* XXII, 273 - 286
- Hjelmeland L. and Chrambach A. (1984) Solubilisation of Functional Membrane Proteins; *Met. in Enzym.* 104, 305 - 317

- Huang W., Wang H., Kekuda R. et al. (2000) Transport of N-Acetylaspartate by the Na<sup>+</sup>- Dependent High-Affinity Dicarboxylate Transporter NaDC3 and Its Relevance to the Expression of the Transporter in the Brain; *J. Pharm. and Exper. Therapeutics* 295 (1), 392 - 403
- Jung R. E., Brooks W., Yeo R. A. Chiulli S. J., Weers D. C. and Sibitt W. L. (1999b) Biochemical markers of intelligence: a proton MR spectroscopy study of normal human brain; *Proc. R. Soc. Lond. B* 266, 1375 - 1379
- Kaul R., Guang P., Gao K., Balamurugan and Malton R. (1993) Cloning of the human aspartoacylase cDNA and a common missense mutation in Canavan disease; *Nature Genetics* 5, 118 - 123
- Knaap M. S., Grond J., Luyten P. R., Hollander J. A. D., Nauta J. J. P. and Valk J. (1992) <sup>1</sup>H and <sup>31</sup>P magnetic resonance spectroscopy of brain in degenerative cerebral disorders; *Ann. Neurol.* 31, 202 - 211
- Knizley H. (1967) The enzymatic synthesis of N-acetyl - L- aspartic acid by a water - insoluble preparation of a cat brain acetone powder; *J. Biol. Chem.* 242, 4619 - 4622
- Madhavarao C. N., Hammer J. A., Quarles R. H., and Namboodiri M. A. (2002) A radiometric assay for aspartoacylase activity in cultured oligodendrocytes; *Anal. Biochem.* 308, 314 - 319
- Metha V., Namboodiri M. A. (1995) N-Acetylaspartate as an acetyl source in the nervous system; *Mol. Brain Res.* 31, 151 - 157
- Miller S. L., Daikhin Y., and Yudkoff M. (1996) Metabolism of N-Acetyl-L-Aspartate in Rat Brain; *Neurochem. Res.* 21 (5), 615 - 618
- Moffett J. R. and Namboodiri M. A. (1995) Differential distribution of N-acetylaspartylglutamate and N-acetylaspartate immunoreactivities in the rat brain; *J. Neurocytol.* 24, 409 - 433
- Moffett J. R., Namboodiri M. A., Cangro C. and Neal J. H. (1991) Immunochemical localisation of N-acetylaspartate in rat brain; *Neuroreport* 2, 131 - 134
- Moreno A., Ross B. D., Bluml S. (2001) Direct determination of the N-acetyl-L-aspartate synthesis rate in the human brain by (13)C MRS and (1-(13)C)glucose; *J. Neurochem.* 77(1), 347 - 350
- Namboodiri M. A., Corigliano-Murphy A., Jiang G., Rollag M., Provencio I. (2000) Murine aspartoacylase: cloning, expression and comparison with the human enzyme; *Mol. Brain Res.* 77, 285 - 289
- Norton W. (1974) Biomembranes: Isolation of Myelin from Nerve Tissue; *Met. in Enzym.* XXXI, 435 - 444
- Patel T. B. and Clark J. B. (1979) Synthesis of N-Acetyl-L-Aspartate by Rat Brain Mitochondria and its Involvement in Mitochondrial / Cytosolic Carbon Transport; *J. Biochem.* 184, 539 - 546
- Plattner H., *Lehrbuch in Zellbiologie, Auflage 2002*
- Rehm H., *Der Experimentator: Proteinbiochemie / Proteomics, Auflage 2002*
- Reiland J. (1990) Enzyme Purification and Related Techniques, Gelfiltration; *Met. in Enzym.* XXII, 287 - 232
- Simmons M. L., Frondoza C. G. and Coyle J. T. (1991) Immunocytochemical Localization of N-Acetyl-L-Aspartate with Monoclonal Antibodies; *Neurosci.* 45 (1), 37 - 45
- Stevens H., Jakobs C., de Jager A. E., Conningham R. T., Korf J. (1999) Neurone-specific enolase and N-acetyl-aspartate as potential peripheral markers of ischaemic stroke; *Eur. J. Clin. Invest.* 29 (1), 6 - 11

- Storrie B. and Madden E. (1990) Isolation of Subcellular Organelles; *Met. in Enzym.* 182, 203 - 235
- Tallan H. H. (1957) Studies on the distribution of N-acetyl-L-aspartic acid in brain; *J. Biol. Chem.* 224, 41 – 45
- Tallan H. H., Moore S. and Stein W. H. (1956) N-Acetyl-L-aspartic acid in brain; *J. Biol. Chem.* 219, 257 – 264
- Taylor D. L., Davies S. E. C., Obrenovitch T. P., Doheny M. H., Patsalos P. N., Clark J. B. and Symon L. (1995) Investigation into the role of N-acetylaspartate in cerebral osmoregulation; *J. Neurochem.* 65, 275 - 281
- Thomas T. and Mark G. N. (1990) Purification of Membrane Proteins; *Met. in Enzym.* 182, 499 - 520
- Truckenmiller M. E., Namboodiri M. A., Brownstein M. J., and Neale J. H. (1985) N-Acetylation of L-Aspartate in the Nervous System: Differential Distribution of a Specific Enzyme; *J. Neurochem.* 45, 1658 - 1662
- Tsai G. and Coyle J. T. (1995) N-Acetyl-L-Aspartate in Neuropsychiatric Disorders; *Progress in Neurobiol.* 46, 531 - 540

Herzlichen Dank meinem wissenschaftlichen Betreuer Herrn Prof. Dr. Gieselmann für die gemeinsame Tätigkeit, die Aufmerksamkeit und die kompetenten Anweisungen. Ich danke Herrn Dr. Ekhardt und speziell Herrn Norbert Rösel für die Hilfe während der alltäglichen Laborarbeit sowie der ganzen Arbeitsgruppe für die wissenschaftlich – kreative Atmosphäre. Ich danke ebenfalls Herrn Dr. Kappler und Herrn Tomberg (Verantwortlicher für die FPLC – Anlage), die mich bei den chromatographischen Versuchen unterstützt haben. Herzlichen Dank Frau Gotcheva-Höhne für die Hingabe bei der sprachlichen Korrektur der vorliegenden Arbeit.