

**Die Biosynthese und der Transport von
N-Acetylaspartylglutamat und
N-Acetylaspartylglutamylglutamat**

Dissertation

zur

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Julia Aletta Kathrina Lodder-Gadaczek

Bonn März 2013

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

1. Gutachter: PD Dr. Matthias Eckhardt
 2. Gutachter: Professor Dr. Christoph Thiele
- Tag der Promotion: 14. Juni 2013
Erscheinungsjahr: 2013

Meiner Familie

Das schönste Glück des denkenden Menschen ist,
das Erforschliche erforscht zu haben und das Unerforschliche zu verehren.

(Johann Wolfgang von Goethe)

Kurzzusammenfassung

N-Acetylaspartylglutamat (NAAG) ist eines der höchst konzentrierten Neuropeptide im Nervensystem von Säugetieren. Neben der postulierten Rolle als Agonist für den Typ II metabotropen Glutamatrezeptor 3. Zusätzlich dient es als Transportmittel für freies Glutamat und als molekulare Wasserpumpe. Der NAAG Metabolismus ist bis jetzt nicht vollständig aufgeklärt. Die NAA Synthase (Nat8l) katalysiert die N-Acetylierung von Aspartat zu N-Acetylaspartat (NAA). NAAG wird in spezifischen Neuronen durch eine Synthetase in einer Kondensationsreaktion aus NAA und Glutamat synthetisiert. NAAG wird aus den Synapsen durch synaptische Vesikel freigesetzt. Die Aufnahme in die synaptischen Vesikel findet durch einen bisher unbekanntem Transporter statt. NAAG wird dann extrazellulär durch Glutamat Carboxypeptidase II (GCP-II) hydrolysiert.

Es sind zwei NAAG-Synthetasen bekannt, die Synthetase I (NAAGS-I) und die Synthetase II (NAAGS-II). In dieser Arbeit wurde die Funktion der NAAGS-II genauer untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die NAAGS-II neben NAAG ein weiteres, bisher noch nicht beschriebenes Peptid, das N-Acetylglutamylglutamat (NAAG₂) synthetisiert. NAAG₂ konnte mit einer neu etablierten massenspektrometrischen Methode im murinen Nervensystem nachgewiesen und quantifiziert werden. Die Menge an NAAG₂ ist dabei um ein zehn- bis zwanzigfaches niedriger als die Menge an NAAG. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass in den NAAGS-II defizienten Mäusen kein NAAG₂ mehr vorhanden ist. In altersabhängigen Studien konnte nachgewiesen werden, dass sich die Expression der Synthetasen unterscheidet. Die NAAGS-I spielt eine größere Rolle im embryonalen und frühen postnatalen Alter, wohingegen die NAAGS-II erst im Alter von 10 Tage alten Tieren an Bedeutung gewinnt. Dieses zeigt sich auch in den Konzentrationen der Peptide im Vergleich von wt und NAAGS-II defizienten Tieren.

Patienten mit der SALLA Erkrankung, die durch eine Mutation im SLC17A5 Gen hervorgerufen wird, zeigen erhöhte Konzentrationen von NAAG im Liquor. Das Gen SLC17A5 kodiert Sialin, den lysosomalen Transporter für N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure). Da gezeigt wurde, dass Sialin in synaptischen Vesikeln vorkommt, es den vesikulären Transport von Aspartat und Glutamat katalysiert und in der SALLA Erkrankung eine Erhöhung an NAAG zu finden ist, stellte sich die Frage ob Sialin auch den vesikulären Transport von NAAG katalysieren könnte. Es wurde der Transport von NAAG in Mikrovesikel von wildtyp und Sialin defizienten Mäusen untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass NAAG ATP-abhängig nur in wildtyp Vesikel transportiert wird. Es konnte außerdem mit einem Zelltransportversuch und Transportversuchen mit Sialin haltigen Proteoliposomen gezeigt werden, dass NAAG nur in Anwesenheit von Sialin aufgenommen wird. Damit wurde gezeigt, dass Sialin höchstwahrscheinlich der NAAG Transporter für die Aufnahme in synaptische Vesikel ist.

In dieser Arbeit konnten wichtige Aspekte des postulierten trizellulären Metabolismus von NAAG aufgeklärt werden.

Abstract

N-acetylaspartylglutamate (NAAG) is an abundant neuropeptide in the mammalian brain, present in micromolar to millimolar concentrations. In addition to its role as a neuropeptide as agonist at group II metabotropic glutamate receptor 3 a number of functions have been proposed. For example as a non-excitotoxic transporter for glutamate or as a molecular waterpump in neurons. The NAAG metabolism is still not completely clarified. NAA synthase (Nat8l) catalyzes the N-acetylation of aspartate, forming N-acetylaspartate (NAA). NAAG is synthesized in specific neurons by a synthetase catalyzing a condensation of NAA and glutamate. Afterwards it is released from nerve terminals via synaptic vesicles. The uptake into synaptic vesicles occurs by an unknown transporter. NAAG is then degraded extracellularly by glutamate carboxypeptidase II (GCP-II), liberating NAA and glutamate. Two different NAAG synthetases have been identified before: The synthetase I (NAAGS-I) encoded by the ribosomal modification protein RimK-like family member B (RimklB) and the synthetase II (NAAGS-II) encoded by RimklA.

This work shows, that NAAGS-II synthesizes NAAG and in addition the tripeptid N-acetylaspartylglutamylglutamate (NAAG₂), which is the first description of NAAG₂ in the vertebrate nervous system. With a new mass spectrometry method detection and quantification of NAAG₂ in the murine nervous system was possible. The concentration of NAAG₂ is 10 - 20fold lower compared to the concentration of NAAG. Experimental findings show that NAAG₂ is not present in NAAGS-II deficient mice. In age-dependent studies differences in the expression of NAAGS-I and NAAGS-II were detected. NAAGS-I has the highest expression during the embryonic and early postnatal development and NAAGS-II expression is higher in older animals.

Patients with SALLA disease caused by a mutation in the SLC17A5 gene, have an abnormal biochemical concentration of NAAG in the cerebrospinal fluid. The SLC17A5 gene encodes for sialin, the lysosomal transporter of N-acetylneuraminic acid (sialic acid). As it has been shown that the sialic acid transporter is present in synaptic vesicles, it catalyzes the vesicular transport of aspartate and glutamate and because of the different levels of NAAG in SALLA disease, the question whether SLC17A5 is the above mentioned transporter responsible for transport of NAAG into synaptic vesicles is addressed. The investigation of the transport of NAAG into synaptic like microvesicles from wt and sialin deficient mice was carried out. Only an ATP dependent uptake of NAAG by wt vesicles is detectable. The uptake of NAAG in cells expressing sialin and in reconstituted proteoliposomes containing sialin could be observed. With these experiments it can be indicated that sialin is most likely the synaptic vesicle transporter for NAAG.

Taken together this work clarifies different aspects of the postulated metabolism of NAAG.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	N-Acetylaspartylglutamat und der postulierte trizelluläre Metabolismus	1
1.2	Die NAAG Synthetasen	3
1.2.1	NAAGS-I	3
1.2.2	NAAGS-II	3
1.3	Veränderungen im NAAG-Spiegel in neurodegenerativen Erkrankungen	4
1.4	Neuroprotektive Funktion von NAAG	5
1.5	Weitere Funktionen von NAAG	5
1.6	Ziel der Arbeit	6
2	Materialien	7
2.1	Geräte	7
2.2	Verbrauchsmaterialien	8
2.3	Chemikalien	9
2.3.1	Reagenzien für Klonierungen	9
2.3.2	Reagenzien für Standards	9
2.3.3	Enzyme und besondere Reagenzien	9
2.3.4	radioaktive Substanzen	9
2.3.5	Standards für quantitative Massenspektrometrie	10
2.3.6	Reagenziensätze	10
2.4	Antikörper	10
2.4.1	Primärantikörper	10
2.4.2	Sekundärantikörper	11
2.5	Verwendete Mauslinien	11
2.6	Verwendete Zelllinien	11
2.7	Verwendete Bakterienstämme	12
2.8	Primer	12
2.9	Plasmide	12
2.10	Medien, Puffer und Lösungen	13
2.10.1	Standardlösungen und Puffer	13
2.10.2	spezielle Puffer	15
2.10.3	Lysepuffer für Zellen	15
2.10.4	Lösungen für Immunofluoreszenz	15
2.10.5	Puffer für Analytik	15
2.10.6	Standardmedien für die Zellkultur	15

3 Methoden	17
3.1 Zellkultur	17
3.1.1 Auftauen und Einfrieren von Kulturzellen	17
3.1.2 Teilen von Kulturzellen	17
3.1.3 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung	17
3.1.4 Transfektion von Kulturzellen	18
3.2 Primärkulturen	18
3.2.1 Isolation von primären corticalen Neuronen	18
3.2.2 Isolation von Astrozyten	18
3.2.3 Neuronen- Astrozytenmischkulturen	19
3.2.4 Neurotoxischer Assay	19
3.3 Immunofluoreszenz	20
3.4 Arbeiten mit DNA	20
3.4.1 Transformation chemisch kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA	20
3.4.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	20
3.4.3 Spaltung von Plasmiden mittels Restriktionsendonukleasen	20
3.4.4 Gelextraktion	21
3.4.5 PCR-Produkt-Aufreinigung	21
3.4.6 Ligation	21
3.5 Isolation von gemonischer DNA aus Mausgewebe	21
3.6 Genotypisierung	21
3.6.1 Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	21
3.6.1.1 Genotypisierung der NAAGS-II ko Mäuse	22
3.6.1.2 Genotypisierung der Sialin-defizienten Mäuse	22
3.6.2 Agarosegelelektrophorese	22
3.7 Arbeiten mit Proteinen	22
3.7.1 Proteinkonzentrationsbestimmung	22
3.7.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	23
3.7.3 Färben von SDS-Gelen	23
3.7.4 Western-Blot nach dem semi-dry-Verfahren und Detektion der Proteine	23
3.8 Analytische Verfahren zur Bestimmung der Peptide	24
3.8.1 Probenvorbereitung für HPLC- und ESI-Messungen	24
3.8.1.1 Proben aus Zellen	24
3.8.1.2 Proben aus Mausgewebe	24
3.8.1.3 Direkt verwendbare Proben	24
3.8.2 HPLC-Messung	24
3.8.3 ESI-Messungen	24
3.8.3.1 Verwendete Methode	25
3.9 Arbeiten mit RNA	25
3.9.1 Isolation von RNA aus Mausgewebe	25
3.9.2 RNA Aufreinigung	25
3.9.3 cDNA Synthese	25
3.9.4 Real-time PCR	26
3.10 Isolierung von Mikrovesikeln aus Mäusegehirn	26
3.10.1 Transport in Mikrovesikel	27
3.11 Gewinnung von Liquor aus Mäusen	28

3.12	Radioaktive Versuche	28
3.12.1	Metabolische Markierung von Zellen	28
3.12.1.1	Trennung der Peptide über TLC	28
3.12.2	Produktion von [¹⁴ C]-NAAG und [¹⁴ C]-NAAG ₂	29
3.12.3	Synthese von radioaktivem [¹⁴ C]-NAA, [¹⁴ C]-NAAG und [¹⁴ C]-NAAG ₂	29
3.12.4	Saure Hydrolyse von NAAG und NAAG ₂	29
3.12.5	Verdau mit Carboxypeptidase Y	29
3.12.6	Verdau mit Glutamat-Carboxypeptidase II	29
3.12.7	Transport durch Pept2 (Oligopeptidtransporter 2)	29
3.12.8	Sialin Zelltransportversuche	30
3.13	Rekonstitution	30
3.13.1	Gewinnung der H ⁺ -ATPase	30
3.13.2	Gewinnung von Sialin und VGlut2	32
3.13.3	Rekonstitution	33
3.13.4	Rekonstitution: Transportversuche	33
4	Untersuchung der NAAG	
	Synthetase II	35
4.1	Identifizierung von NAAG ₂	36
4.1.1	Metabolische Markierung von transfizierten Zellen	36
4.1.2	Nachweis und Identifizierung von asu-NAAG	36
4.1.3	Hydrolyse und Verdau von X	38
4.1.4	Vergleichende dünnschichtchromatographische Analyse von X und NAAG ₂	39
4.2	Untersuchung von NAAG ₂ in transfizierten Zellen	40
4.3	Untersuchungen zum Metabolismus von NAAG ₂	42
4.3.1	Nachweis von NAAG ₂ in Mausgewebe	42
4.3.2	Hydrolyse von NAAG ₂ und NAAG durch GCPII und GCPIII	43
4.3.2.1	Hydrolyse durch GCPII	43
4.3.2.2	Hydrolyse durch GCPIII	44
4.3.3	Transport von NAAG ₂ und NAAG durch Pept2	45
4.4	NAA, NAAG und NAAG ₂ im zentralen und peripheren Nervensystem	46
4.5	Altersabhängige Verteilung von NAAG und NAAG ₂	48
4.6	Untersuchungen zu neuroprotektiven Eigenschaften von NAAG in Primärkulturen	50
4.7	Untersuchungen in anderen Tiermodellen	52
4.7.1	Untersuchung in ASPA defizienten Mäusen	52
4.7.2	Untersuchung in Nat8L ko Tieren	53
5	Sialin als NAAG Transporter	54
5.1	Transport von NAAG in synaptische Vesikel	54
5.2	Aufnahme von NAAG durch Sialin im <i>in vitro</i> Zellversuch	56
5.3	Untersuchung des Transports in Mikrovesikel von Sialin defizienten Mäusen	57
5.4	Untersuchungen zu Sialinsäure Speichererkrankungen	58
5.4.1	Untersuchung der Sialin defizienten Mäuse	59
5.4.2	Patientenmutationen im <i>in vitro</i> Versuch	60
5.5	Rekonstitution von Sialin und VGlut2 in Proteoliposomen	61

5.5.1	Aufreinigung der H ⁺ -ATPase aus <i>E. coli</i>	61
5.5.2	Aufreinigung von Sialin und VGlut2 aus Insektenzellen	63
5.5.3	Rekonstitution von Sialin und VGlut2 in Proteoliposomen	64
5.5.4	Transportversuche mit rekonstituierten Proteinen	65
5.5.4.1	Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit des Transport von NAAG und Aspartat	65
5.5.4.2	Kontrollversuche	66
5.5.4.3	Transport und Inhibition	66
6	Diskussion	69
6.1	Untersuchung der NAAG Synthetase II	69
6.2	Sialin als NAAG Transporter	74
7	Zusammenfassung	78
8	Danksagungen	81
	Anhang	82
A	Plasmidkarten der neu generierten Konstrukte	82
B	ESI-MS Spektrum von NAAG₂-Standard	85
	Literaturverzeichnis	86

Abbildungsverzeichnis

1.1	Kondensationsreaktion von NAA und Glutamat zu NAAG	1
1.2	Postulierter Metabolismus von NAAG	2
3.1	Fließschema zur Isolation von Mikrovesikeln	27
4.1	Western Blot und Immunofluoreszenz der NAAGS-II	35
4.2	Metabolische Markierung von Zellen	36
4.3	Synthese von asu-NAAG	37
4.4	HPLC-Messung von asu-NAAG	37
4.5	HPLC-Messung in transfizierten Zellen	38
4.6	ESI-MS von asu-NAAG in Zellextrakten	38
4.7	Saure Hydrolyse und CPY Verdau von NAAG und X	39
4.8	UV-Adsorption von X	40
4.9	ESI-MS Detektion von NAAG ₂ in transfizierten Zellen	41
4.10	Quantifizierung von NAAG und NAAG ₂ in transfizierten Zellen	42
4.11	Nachweis von NAAG ₂ im Ischiassnerv	43
4.12	Hydrolyse durch GCPII	44
4.13	Immunpräzipitation von GCPIII	45
4.14	Abbau durch GCPIII	45
4.15	Transport durch Pept2	46
4.16	Quantifizierung von NAA, NAAG und NAAG ₂ im Gewebe	47
4.17	Altersabhängige Verteilung von NAAG und NAAG ₂	48
4.18	Quantitative Real-time PCR von Maus cDNA verschiedener Altersstufen	49
4.19	Mikroskopische Aufnahmen von wt Neuronen- und wt Mischkulturen	51
4.20	Sterberate von neurotoxisch behandelten Neuronen- und Mischkulturen	52
4.21	Untersuchung von ASPA defizienten Mäusen	53
4.22	Untersuchung der Peptide in Nat8L ko Mäusen	53
5.1	Western Blot der Anreicherung der Mikrovesikel aus Mausgewebe.	54
5.2	Transport von NAAG in Mikrovesikel	55
5.3	Michaelis-Menten-Plot der Aufnahme von NAAG und Aspartat in Vesikel	56
5.4	in vitro Versuch zur Aufnahme von NAAG in Sialin überexprimierende Zellen	56
5.5	Aufnahme von NAAG bei verschiedenen Kalium-Konzentrationen	57
5.6	Transport in Mikrovesikel von Sialin defizienten Mäusen	58
5.7	Quantitative Bestimmung von NAAG, NAAG ₂ und NAA in Sialin defizienten Mäusen	59
5.8	Expression von NAAGS-I/-II, Nat8L und GCPII in den Sialin defizienten Mäuse	60
5.9	Western Blot und Immunofluoreszenz der Sialinvarianten	60

5.10	Zellversuch zum Transport von NAAG im mutierten Sialin	61
5.11	Coomassie Gel der Aufreinigung der H ⁺ -ATPase aus <i>E. coli</i>	62
5.12	Aufreinigung von Sialin und VGlut2 aus Insektenzellen	63
5.13	Nile Red Färbung von Proteoliposomen	64
5.14	Exemplarische Western Blots der Rekonstitution	65
5.15	Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit von NAAG und Aspartat beim Transport in Sialin-Proteoliposomen	66
5.16	Transport von Sialinsäure und Glutamat	67
5.17	Transport und Inhibition von NAAG und Aspartat in Sialin haltige Proteoliposomen	67
7.1	Trizellulärer Metabolismus von NAAG	78
A.1	Plasmidkarte von pProtA-GCPIII	82
A.2	Plasmidkarte von pEGFP-Pept2	83
A.3	Plasmidkarte von pEGFP-SLC_human	83
A.4	Plasmidkarte von pEGFP-SLC_murin	84
A.5	Plasmidkarte von pUltraBac-Sialin_human	84
A.6	Plasmidkarte von pUltraBac-VGlut2_murin	84
B.1	ESI-MS Spektrum von NAAG ₂ Standard	85

Tabellenverzeichnis

2.1	Primer für Klonierungen	12
2.2	Plasmide und Vektoren	13
3.1	<i>Real-time</i> PCR Primer	26
5.1	Rekonstitutionsansätze	64

Abkürzungsverzeichnis

μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
2-PMPA	2-(Phosphonomethyl)pentan-1,5-diolsäure
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
Asp	Aspartat
Aspa	Aspartoacylase
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
ca.	circa
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	dATP + dCTP + dGTP
DO	Desoxyglucose
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
ECL	verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	verstärkt grün fluoreszierendes Protein
ESI/MS	Electron spray ionisation + Fragmentierung
et al.	et altera
FCCP	Carbonylcyanid-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazon
FCS	Fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GCPII	Glutamat-Carboxypeptidase II

Abkürzungsverzeichnis

Glu	Glutamat
h	Stunde
HAc	Essigsäure
HPLC	high performance liquid chromatography
IMAC	Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
kDA	Kilo-Dalton
ko	Knockout
l	Liter
LB-Medium	..	Luria-Bertani-Medium
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
NAA	N-Acetylaspartat
NAAG	N-Acetylaspartyglutamat
NAAG ₂	N-Acetylaspartyglutamylglutamat
NAAGS-I	NAAG Synthetase I
NAAGS-II	NAAG Synthetase II
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
TBS	Tris-gepufferte Saline
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan
UV	Ultraviolett
WB	Western-Blot
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

Kapitel 1

Einleitung

1.1 N-Acetylaspartylglutamat und der postulierte trizelluläre Metabolismus

N-Acetylaspartylglutamat (NAAG) ist eines der meist vertretenen Neuropeptide im menschlichen Gehirn. Es kommt in millimolaren Konzentrationen im zentralen und peripheren Nervensystem von Säugetieren vor. Die Entdeckung von NAAG fand in den 1960er Jahren statt. Es konnte zuerst in Gehirngewebe von Kaninchen und Pferden¹, als auch in Rinderhirn² nachgewiesen werden. Das NAAG möglicherweise als Neurotransmitter fungiert, wurde zwischen 1985 und 2000 mehrere Male gezeigt³. Die Verteilung von NAAG im Nervensystem wurde in verschiedenen Organismen untersucht. NAAG wurde dabei in Ratten⁴⁻⁶, Amphibien⁷, Katzen⁸, Menschen⁹ und anderen Primaten¹⁰ nachgewiesen. Durch immunhistochemische Färbungen mit spezifischen Antikörpern konnte NAAG unter anderem in Ganglienzellen⁵, in Pyramidalzellen des Neocortex, des basalen Vorderhirns und des Hippocampus und in Interneuronen der kortikalen Regionen nachgewiesen werden⁶. Es wurde außerdem in GABAergen Interneuronen und in Neuronen gefunden, die eine Vielzahl von Transmittern verwenden, wie Glutamat, Serotonin, Dopamin und Acetylcholin^{5,6}. NAAG konnte in synaptischen Vesikeln nachgewiesen werden^{11,12}. Die Calcium-abhängige Freisetzung von NAAG konnte zuerst in Synaptosomen und in Neuronen auf Gewebeschnitten gezeigt werden^{13,14}.

Der Metabolismus von NAAG verläuft trizellulär in Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten und ist damit der einzig bekannte Metabolismus, der alle drei Zelltypen zur Vollendung braucht¹⁵ (siehe Abbildung 1.2). Die Biosynthese von NAAG aus N-Acetylaspartat (NAA) und Glutamat (Glu) in einer ATP-verbrauchenden Kondensationsreaktion (siehe Abbildung 1.1) durch die Wirkung eines Enzyms konnte schon in den 1980ern von Cangro *et al.*⁴ gezeigt werden.

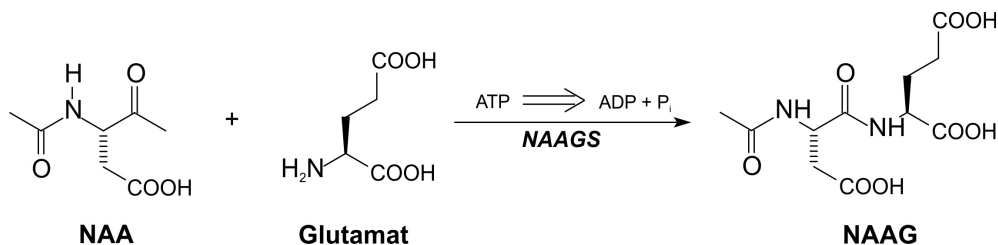


Abbildung 1.1: Kondensationsreaktion von NAA und Glutamat zu NAAG. NAAG wird durch eine Kondensationsreaktion von NAA und Glutamat (Glu) in einem ATP verbrauchenden Prozess gewonnen. Das daran beteiligte Enzym ist die NAAG-Synthetase (NAAGS). (Anmerkung: Die Bezeichnung Synthetase, wenn auch veraltet, wurde beibehalten, da dies die ursprüngliche Bezeichnung des Enzyms war.)

NAA wird in Neuronen durch ein membrangebundenes Enzym, die L-Aspartat N-Acetyltransferase (Nat8L, NAA Synthase) aus Acetyl-CoA und L-Aspartat synthetisiert^{16,17}. Dass die Synthese von NAAG Ribosomenunabhängig erfolgt, wurde durch Versuche mit Inhibitoren der ribosomalen Proteinsynthese bestätigt^{4,18}. Die Inhibitoren zeigten keinen negativen Einfluss auf die Synthese von NAA, im Gegenteil, es wurde eine Zunahme detektiert. Diese wurde darauf zurück geführt, dass Glutamat durch die Inhibition der Proteinbiosynthese in größeren Mengen der Synthese von NAA zur Verfügung stand⁴. Das Enzym, welches damals nicht weiter charakterisiert werden konnte, wurde als N-Acetylaspartylglutamat Synthetase (NAAGS) bezeichnet. Heute ist bekannt, dass zwei Synthetasen für die Produktion von NAAG zuständig sind. Durch die Identifizierung zweier Gene, die zu anderen Peptidsynthetasen homolog sind, konnte die NAAGS-I und die NAAGS-II als Dipeptidsynthetasen für NAAG durch verschiedene Untersuchungen bestätigt werden¹⁹⁻²¹. NAA wird an synaptischen Nervenendigungen, vermutlich aus synaptischen Vesikeln, in einem Calcium-abhängigen Prozess freigesetzt^{11,22}. Der Transport in die synaptischen Vesikel ist bisher noch unbekannt und wird wahrscheinlich durch einen bisher noch nicht identifizierten Transporter reguliert. NAA kann durch Glutamat-Carboxypeptidase II oder III (GCPII, GCPIII), membrangebundene Peptidasen, die hauptsächlich von Astrozyten und Neuronen exprimiert werden, zu Glutamat und NAA hydrolysiert werden (siehe Review²³⁻²⁵). GCPII hat dabei die höhere Aktivität und kontrolliert überwiegend den Abbau von NAA im zentralen Nervensystem. Dieses konnte zum ersten Mal 1984 von Riveros und Orrego gezeigt werden²⁶. Das entstandene Glutamat wird von Neuronen und Astrozyten aufgenommen, das freigesetzte NAA kann durch den Natrium-abhängigen Dicarboxylat Transporter (NaDC3) in Gliazellen aufgenommen werden²⁷. NAA kann nach Freisetzung aus den Neuronen an den Typ-II metabotropen Glutamatrezeptor 3 an Neuronen und Astrozyten binden^{3,28}. In Oligodendrozyten erfolgt die Deacetylierung von NAA zu L-Aspartat und Acetat mit Hilfe der Aspartoacylase (ASP) ^{29,30} (siehe Abbildung 1.2). Das entstandene Acetat wird möglicherweise für die Lipidsynthese in myelinisierenden Oligodendrozyten benötigt^{31,32}. NAA kann ebenfalls von Astrozyten aufgenommen werden. Es konnte gezeigt werden, dass corticale Astrozyten in Zellkultur die Möglichkeit besitzen, NAA in niedrigen Konzentrationen zu synthetisieren¹⁸. NAA wird ebenfalls von Gliazellen aufgenommen³³, zum Beispiel über den Oligopeptidtransporter Pept2³⁴.

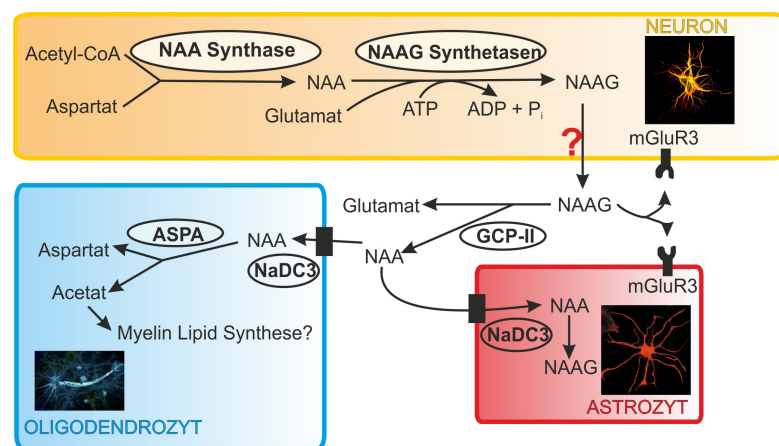


Abbildung 1.2: Postulierter Metabolismus von NAAG. NAA wird durch die NAA Synthase (Nat8L) aus Acetyl-CoA und Aspartat synthetisiert. Aus NAA und Glutamat wird in einer ATP-abhängigen Kondensationsreaktion NAAG durch die NAAG Synthetasen NAAGS-I und NAAGS-II produziert. NAAG wird wahrscheinlich durch einen noch nicht identifizierten Transporter in synaptische Vesikel transportiert und von dort Calcium-abhängig freigesetzt. NAAG kann dann an die metabotropen Glutamatrezeptoren binden und durch Glutamat-Carboxypeptidase II oder III (GCPII oder GCPIII) hydrolysiert werden. Das entstandene NAA kann vom NaDC3 Transporter (Dicarboxylat Transporter) in Oligodendrozyten und Astrozyten transportiert werden. In Oligodendrozyten wird NAA von der Aspartoacylase (ASP) in Acetat und Aspartat umgewandelt. Die Aufnahme von NAAG in Gliazellen erfolgt wahrscheinlich durch den Oligopeptidtransporter Pept2.

1.2 Die NAAG Synthetasen

Kleine Peptide können ribosomal über die Proteolyse von Proteinvorläufermolekülen gebildet werden. Bekannt ist aber auch ein nichtribosomaler Weg über Peptidsynthetasen. Dies ist vor allem aus Bakterien und Pilzen bekannt³⁵, die Peptide mit antibiotischen oder cytostatischen Eigenschaften synthetisieren (Peptidantibiotika). Diese Organismen verknüpfen direkt die Aminosäuren in einem ATP-abhängigen Prozess, in dem die Peptidbindung durch eine Kondensationsreaktion in einer katalytischen C-Domäne gebildet wird³⁶.

In Säugern sind nur wenige Peptidsynthetasen bekannt. Am besten untersucht ist die Biosynthese und Funktion von Glutathion. Die Enzyme dieser Synthese sind γ -Glutamylcystein-Synthetase und die Glutathion-synthetase³⁷. Der Mechanismus beruht dabei auf zwei aufeinander folgenden Kondensationsreaktionen, in denen die Aminosäuren verknüpft werden. Andere nichtribosomal synthetisierte Dipeptide sind Carnosin (β -Alanin-L-Histidin), Kyotorphin (L-Tyrosin-L-Arginin) und N-Acetylaspartylglutamat (NAAG), die im Nervensystem von Säugern nachgewiesen wurden. Alle hier aufgeführten Peptidsynthetasen haben die Gemeinsamkeit, dass sie eine ATP-grasp-Domäne besitzen, um ATP binden zu können³⁸. Außerdem besitzen alle bekannten Peptidsynthetasen hohe Sequenzübereinstimmungen. Durch BLAST Suche konnten im Säuger genom zwei neue Gene identifiziert werden, die homolog zu bekannten Dipeptidsynthetasen sind. Die Gene RimklB und RimklA (rimK-like family member B and A). Es wurden hohe Übereinstimmungen der Aminosäuresequenzen in allen Wirbeltieren gefunden^{19,20}. RimklB (NAAGS-I) konnte von uns als NAAG Synthetase identifiziert werden¹⁹, Collard *et al.* konnten außerdem zeigen, dass auch RimklA eine NAAG Synthetase (NAAGS-II) ist und das RimklB neben NAAG hauptsächlich β -Citrylglutamat (BCG) synthetisiert²¹.

1.2.1 NAAGS-I

Die NAAGS-I, kodiert durch RimklB, konnte als NAAG- und BCG-Synthetase als cytosolisches Protein identifiziert werden^{19,21}. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass es in Maus und Mensch zwei Varianten der mRNA gibt, die sich im C-Terminus unterscheiden¹⁹. Die NAAG Synthetase I (NAAGS-I) produziert neben dem NAAG auch β -Citrylglutamat (BCG)²¹. Für BCG ist beschrieben, dass es vor allem im embryonalen Stadium und im frühen postnatalen Stadium vorkommt und danach abnimmt³⁹. Ihm wird eine protektive Rolle bei oxidativem Stress zugeschrieben, da es Eisen komplexiert und dadurch die Inhibition von Eisen-abhängiger Synthese Sauerstoffhaltiger Substanzen katalysiert⁴⁰. Es gibt hohe Expressionsmengen der NAAGS-I im gesamten zentralen Nervensystem, im adulten Tier findet man aber die höchste Expression im Hoden. Da im Hoden die Expression der Nat8L nicht detektiert werden kann²⁰, lässt sich daraus ableiten, dass dort die Synthese von BCG entscheidend ist. Es konnten hohe Mengen an BCG im Hoden nachgewiesen werden³⁹, ein Vorkommen von NAAG wurde bisher nicht beschrieben. In der Leber kann keine NAAGS-I gefunden werden. NAAGS-I wird im Nervensystem in Neuronen des Neocortex, des Mittelhirns, in der grauen Substanz des Stammhirns und in Purkinje Zellen des Kleinhirns gefunden¹⁹. Diese hohe Expression stimmt mit den hohen Konzentrationen von NAAG in diesen Hirnregionen überein⁴¹. Die Produktion von NAAG durch NAAGS-I konnte durch Massenspektrometrie¹⁹ und einem Aktivitätsversuch mit aufgereinigtem Protein aus *E.coli* nachgewiesen werden²¹. Hierbei wurde gezeigt, dass die Produktion von BCG durch NAAGS-I um ein Vielfaches höher ist als die Synthese von NAAG.

1.2.2 NAAGS-II

Die NAAGS-II, kodiert durch RimklA, konnte ebenfalls als NAAG Synthetase identifiziert werden. Im Aktivitätsassay wurde gezeigt, dass auch sie BCG produziert, aber dass die Produktion von NAAG um

das mindestens 75-fache höher ist²¹. Im Gegensatz zur NAAGS-I, die großflächig verteilt im gesamten Gehirn gefunden wird, ist die Expression der NAAGS-II punktueller. Hohe Expressionsmengen findet man im Rückenmark, im Stammhirn, in den tiefen Kernen des Kleinhirns und in Bereichen der Medulla und des Mittelhirns, zum Beispiel in der "Substantia nigra"²⁰. Die Verteilung der beiden Synthetasen unterscheidet sich zum Teil beträchtlich²⁰. Die NAAGS-II wird im Gegensatz zur NAAGS-I nur schwach im Neokortex exprimiert. Während im Kleinhirn die NAAGS-I vor allem in Purkinje Zellen gefunden wird, befindet sich die NAAGS-II in den tiefen Kernen. Das Expressionsmuster im zentralen Nervensystem stimmt mit immunhistochemischen Untersuchung zur Verteilung von NAAG überein³². Im Hoden wird im Gegensatz zur NAAGS-I nur wenig NAAGS-II exprimiert. Für NAAGS-II wird postuliert, dass es die NAAG Menge in bestimmten Bereichen des zentralen und peripheren Nervensystems absichern und gegebenenfalls erhöhen soll ohne die BCG Synthese anzuregen²⁰. Dieses könnte Effekte in verschiedenen Stoffwechselwege haben, zum Beispiel im Krebszyklus oder in der Fettsäuresynthese²⁰. NAAGS-II defiziente Mäuse wurden am Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Bonn von Ivonne Becker generiert⁴².

1.3 Veränderungen im NAAG-Spiegel in neurodegenerativen Erkrankungen

In der Canavan Krankheit führt das Fehlen der Aspartoacylase zu einer Akkumulation von NAA und auch zum Teil von NAAG^{43,44}. Erhöhte NAA und NAAG Mengen konnten im Urin von Patienten und auch im Liquor nachgewiesen werden. In 32 von 48 Patienten mit Canavan Krankheit wurden erhöhte Mengen an NAAG gefunden⁴⁴. Die Erhöhung an NAAG im Urin und Liquor kann auf eine verstärkte Abgabe von NAAG vom Gehirn zum Beispiel durch Degeneration von Neuronen zurückzuführen sein⁴⁴. In einigen Leukodystrophien wurde bei Patienten eine Erhöhung des NAAG Niveaus im Liquor gefunden. In der Pelizaeus-Merzbacher Krankheit, bedingt durch einen Defekt im Proteolipid Protein (PLP) und der Pelizaeus-Merzbacher ähnlichen Krankheit, bedingt durch eine Mutation im Connexin 47 Gen⁴⁵, findet man erhöhte Konzentrationen an NAAG im Liquor. Die Erhöhung an NAAG in der Pelizaeus-Merzbacher Krankheit findet man fast ausschließlich in Patienten bei denen eine Duplikation des PLP1 Gens vorliegt⁴⁶. Ebenfalls erhöhte Mengen an NAAG werden in der SALLA Erkrankung gefunden⁴⁷. Diese Krankheit wird durch eine Mutation im Sialin Gen SLC17A5 bewirkt. Alle vier Krankheiten zeigen als Phänotyp eine starke Hypomyelinisierung. Ob die Pathogenese der Erkrankungen auch auf die erhöhten NAAG Mengen zurückzuführen ist, konnte noch nicht geklärt werden.

Reduzierte Mengen an NAAG konnten in verschiedenen Krankheiten gezeigt werden. In der amyotrophischen lateralen Sklerose (ALS) gibt es verringerte Mengen an NAAG im Rückenmark⁴⁸, dies wird aber wahrscheinlich durch eine erhöhte Aktivität an GCPII bedingt, welches zur verstärkten Freisetzung von excitotoxischen Glutamat und damit zum Zelltod von Motorneuronen führt. Dieser Effekt kann durch die Gabe von GCPII Inhibitoren reduziert werden und führt zu einer Verbesserung der Symptome. Reduzierte Mengen an NAAG werden auch in Alzheimer Patienten und in Patienten mit Chorea Huntington gefunden. In der Alzheimer Erkrankung können sowohl reduzierte Mengen an NAAG und NAA, sowie eine verringerte Aktivität an GCPII in der Amygdala, im Hippocampus, im Cortex und im Nucleus caudatus und im Putamen nachgewiesen werden. Die stärkste Reduzierung ist dabei in der Amygdala und im Putamen messbar⁴⁹. In Patienten mit Chorea Huntington wird eine Verminderung an NAAG in allen Hirnregionen gefunden, besonders ausgeprägt im Nucleus caudatus, Putamen und temporalen Cortex⁴⁹. Vermutlich geht dieser Effekt aber einher mit neuronalen Verlusten in diesen Krankheiten⁴⁹. Ein erniedrigter Gehalt an NAAG konnte außerdem bei Krankheitsbildern gezeigt werden, bei denen es zu einer axonalen Degeneration kommt⁵⁰.

1.4 Neuroprotektive Funktion von NAAG

Wie oben erwähnt, gibt es verschiedene Krankheiten bei denen erniedrigte NAAG Mengen gefunden werden, dies könnte ein Grund für der Pathogenese der Krankheiten sein. Hierfür spricht, dass eine Erhöhung an NAAG bedingt durch die Hemmung von GCPII/III neuroprotektiv ist⁵¹⁻⁵³. NAAG wird durch die Peptidasen GCPII und GCPIII hydrolysiert^{25,54,55}. Diese sind Zink-Metallopeptidasen und Enzyme der Transferrin Familie. Die Sequenzähnlichkeit zwischen beträgt GCPII und GCPIII beträgt 70%. GCPII wird fast ausschließlich in Gliazellen exprimiert, während GCPIII mehr in Neuronen exprimiert wird^{24,25}. Ältere Arbeiten zeigen aber auch eine Expression von GCPII in Neuronen⁵⁶. In den meisten Untersuchungen zur neuroprotektiven Rolle von NAAG werden Inhibitoren von GCPII und GCPIII verwendet. Dies führt zu einer Erhöhung des NAAG Spiegels und zu einer verminderten Glutamat Freisetzung. Einer der meist verwendeten Inhibitoren für beide Enzyme ist 2-(Phosphonomethyl)-Glutarsäure (2-PMPA)²⁵. NAAG werden agonistische Eigenschaften für den präsynaptischen metabotropen Glutamatrezeptoren mGlu₃^{28,57} zugeschrieben. Aktivierte mGlu₃-Rezeptoren reduzieren den cAMP-Spiegel durch ein inhibitorisches G-Protein in Neuronen und Astrozyten, wodurch die Ausschüttung von klassischen Neurotransmittern wie Glutamat oder GABA gehemmt wird⁵⁸. Dies kann die neuroprotektiven Eigenschaften von NAAG erklären. Es gibt aber auch Arbeiten die zeigen, dass die Verunreinigung an Glutamat im kommerziell erhältlichen NAAG die Aktivierung erzeugt^{59,60}. Die physiologischen Funktionen von NAAG sind bis heute nicht vollständig geklärt. Viele Untersuchungen beruhen auf den neuroprotektiven Eigenschaften des NAAG durch die Aktivierung des mGlu₃ Rezeptors. Eine direkte Erhöhung des NAAG Spiegels oder indirekte Erhöhung durch Inhibition von GCPII führt bei induzierter Neurotoxizität zu einer Verbesserung. Als Beispiele seien hier genannt: Die Erhöhung an NAAG hat neuroprotektive Eigenschaften bei induzierter Neurotoxizität in Kleinhirn-Neuronen durch Hypoxia, Glutamat, NMDA oder Veratidrin⁵¹. Die Neuroprotektion von NAAG konnte ebenfalls in Neuronen-Glia-Mischkulturen gezeigt werden, in denen durch KCN und Desoxyglucose oxidativer Stress ausgelöst wurde⁵². In Schwann-Zellen-Spinalganglion-Mischkulturen konnte durch Gabe von 2-PMPA Neuroprotektion gegen hohe Glucosekonzentrationen gezeigt werden. Die Neuroprotektion kann durch die Gabe eines mGlu₃ Rezeptor Antagonisten aufgehoben werden, kann aber auch durch direkte Gabe von NAAG ausgelöst werden⁵³. Die positive Wirkung von NAAG auf verschiedene Krankheitssymptome konnte verschiedene Male gezeigt werden. Die Verbesserung von Diabetes Symptome konnte schon 2002 von Zhang *et al.* gezeigt werden: Die Gabe von NAAG Peptidase Inhibitoren führte bei Ratten mit Typ I Diabetes zu reduzierten Symptomen bei Hyperalgesie und verbesserten Funktionen der Nerven^{61,62}. Die Inhibition von GCPII und GCPIII führt in Tiermodellen zu einer Reduzierung von Schizophrenie Symptomen^{63,64}. Im Phenycyclidin oder Dizocilpin Tiermodell wird der Fluss von Dopamin und Glutamat im frontalen Cortex stimuliert. Dies geschieht durch die antagonistischen Eigenschaften der Substanzen an NMDA Rezeptoren. Da NAAG die Neurotransmitter Abgabe reduziert, wurde die GCPII Inhibition in diesen Tiermodellen getestet. Sämtliche motorischen Symptome konnten reduziert werden.

1.5 Weitere Funktionen von NAAG

Es werden weitere Eigenschaften für NAAG beschrieben. Zum Einem wird NAAG die Möglichkeit zugeschrieben, Glutamat in gebundener Form durch den Extrazellulärraum zu transferieren⁶⁵. Dies wäre ein Weg um die excitotoxischen Eigenschaften großer Mengen freien Glutamats zu umgehen. Zum Anderem wird eine mögliche weitere Rolle als molekulare Wasserpumpe postuliert⁶⁶. Neuronen sind nicht selbständig befähigt Wasser durch die Plasmamembran zu transportieren, sie exprimieren keine Aquaporine (Wasserkanäle) und formen keine "gap junctions" mit Gliazellen um Wasser zu transportieren⁶⁶. Für den Transport von Wasser in und aus Neuronen sind diese auf Cotransport von Wasser durch Wasser komplexierende

Substrate angewiesen. Diese Substanzen, die befähigt sind Wasser entgegen dem osmotischen Druck durch die Plasmamembran zu transportieren, werden “molekulare Wasserpumpen” genannt⁶⁶. NAAG ist neben NAA befähigt, gebundenes Wasser durch die Plasmamembran von Neuronen zu transportieren, dabei komplexiert es 53 Wassermoleküle, NAA kann 32 Wassermoleküle binden. Im Extrazellularraum können bei der Hydrolyse von NAAG zu NAA 21 Wassermoleküle freigesetzt werden. Diese können als freies Wasser von den Aquaporinkanälen (AQP4) in Astrozyten und vaskulären Endothelzellen aufgenommen werden. Da NAA zehnmal schneller synthetisiert und freigesetzt werden kann als NAAG⁶⁷, wird ihm die größere Rolle als molekulare Wasserpumpe zugeschrieben⁶⁶.

1.6 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit sollte der postulierte trizelluläre Metabolismus von NAAG weiter untersucht werden. Durch eine vollständige Aufklärung des Metabolismus ist es möglich, genauere Aussagen zu den physiologischen Funktionen des Neuropeptids zu machen. Hierzu wurde ein Schwerpunkt auf die Untersuchungen der NAAGS-II gelegt: Diese enthielten die Identifizierung eines weiteren Peptids das von der NAAGS-II synthetisiert wird und die möglichen Funktionen dieses Peptids. Es wurden quantitative Analyse von NAA und NAAG im gesamten murinen Nervensystem, vor allen Dingen im Vergleich zwischen wildtyp und NAAGS-II defizienten Tieren durchgeführt. Außerdem wurden mögliche altersabhängige Unterschiede in der Expression der NAAGS-I und NAAGS-II und die damit verbundene mögliche Veränderung des NAAG Spiegels untersucht, sowie die Verteilung von NAA und NAAG und die Expression der Synthetasen in Mausmodellen verschiedener Krankheiten, in denen eine Veränderung des NAAG Niveaus in Patienten beschrieben wurde (Canavan Krankheit, SALLA Erkrankung). Desweiteren wurde ein Kandidat als Transporter für NAAG in synaptischen Vesikel untersucht. Hierfür wurden Transportversuche mit Mikrovesikeln aus Mäusen, sowie in vitro Transportversuche in Zellen etabliert. Außerdem wurde das zu untersuchende Enzym in großen Mengen exprimiert, aufgereinigt und in Proteoliposomen rekonstituiert. Auch hiermit wurden Transportversuche unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt.

Kapitel 2

Materialien

2.1 Geräte

- Agaroseelektrophoresekammern, BioRad (Hercules, CA, USA)
- Brutschrank Forma Scientific, Thermo Electron (Dreieich, Deutschland)
- Elektrophoresekammer Mini Protean 3 Gelkammer, BioRad (Hercules, CA, USA)
- Elisa Reader Tecan Multifunction Microplate Reader XFluor 4, Tecan (Männedorf, Schweiz)
- Entwicklermaschine Agfa Curix C60, Agfa Health Care GmbH (Bonn, Deutschland)
- ESI-MS HCT ultra, Bruker Daltonics (Billerica, MA, USA)
- Heißluftinkubator Heraeus Instruments T 6120, Heraeus Holding GmbH (Hanau, Deutschland)
- Heizblock, Stuart Scientific (Newcastle, UK)
- Heizblock, Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
- HPLC 1200 Series, Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
- HPLC Säule organic acid resin (250x4 mm), CS Chromatographie Service GmbH (Langerwehe, Deutschland)
- HPLC Säule Nucleosil 120-5 C18 (250x4 mm) Machery Nagel (Düren, Deutschland)
- Magnetrührer Ikamag RET, Ika-Werke (Staufen, Deutschland)
- Mini-Protean II Multiscreen Apparatus, BioRad (Hercules, CA, USA)
- Mikroskope
 - Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axiovert 100M, AxioCam HRm, Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)
 - Lichtmikroskop Zeiss Telaval 31, Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)
 - Lichtmikroskop Zeiss, Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)
- PCR-Gerät T3 Thermocycler, Biometra (Göttingen, Deutschland)
- pH-Meter 646 Digital, Knick (Berlin, Deutschland)

- Schüttelinkubator, New Brunswick Scientific (Edison, New Jersey, USA)
- Speed Vac SC100, Savant AG (Basel, Schweiz)
- Spektralphotometer DU640, Beckmann (München, Deutschland)
- Spektralphotometer Biophotometer, Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
- Sterilbank Lean Air Technik (JA Woerden, Niederlande)
- Ultraschallwasserbad Branson (Branson, Danbury, USA)
- Ultraschallstab UP50H, Dr. Hielscher Ultrasonics GmbH (Teltow, Deutschland)
- Ultraturax T25 Janke & Kunkel IKA-Labortechnik (Staufen, Deutschland)
- UV-Handlampe Konrad Benda Laborgeräte und UV-Strahler (Wiesloch, Deutschland)
- UV-Transilluminator Gel Doc 2000, BioRad (Hercules, CA, USA)
- Vortexer Unimag Zx3 Classic, UniEquip (Martinsried, Deutschland)
- Waagen
 - Analysenwaage CP 124S-OCE, Sartorius (Göttingen, Deutschland)
 - PC 4400, Mettler (Giessen, Schweiz)
- Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q plus, Millipore (Billerica, MA, USA)
- Wasserbad 1083, GFL (Burgwedel, Deutschland)
- Semi-dry Western-Blot Transblot SD cell, BioRad (Hercules, CA, USA)
- Zentrifugen
 - Zentrifuge 5810R, Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
 - Tischzentrifuge 5415 D, Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
 - Tischzentrifuge 5417 R, Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
 - Tischzentrifuge Heraeus Pico17, Thermo Scientific (St.Leon-Roth, Deutschland)
 - Ultrazentrifuge OptimaTM L-80 XP, Beckmann Coulter (Krefeld, Deutschland)
- Zählkammer für eukaryote Zellen (Neubauer), Brand GmbH & Co KG (Wertheim, Deutschland)

2.2 Verbrauchsmaterialien

Die Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland), Greiner bio-one (Frickenhäusen, Deutschland) und BD (Beckton Dickinson, CA, USA) bezogen. Materialien für die Western-Blot Analyse kamen von der Firma Schleicher & Schüll (Dassel, Deutschland).

- Silicagel 60 HPTLC Platten (Merck, Darmstadt, Deutschland)

2.3 Chemikalien

Alle verwendeten Verbrauchskemikalien wurden von den Firmen Fluka Chemikalien Sigma-Aldrich (München, Deutschland), Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland), Bio-Rad (Hercules, CA, USA), Roche-Applied-Science (Mannheim, Deutschland), und Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

2.3.1 Reagenzien für Klonierungen

- Restriktionsendonukleasen, Thermo Scientific (St.Leon-Roth, Deutschland)
- T4-DNA-Ligase & Puffer, Thermo Scientific (St.Leon-Roth, Deutschland)
- Klenow-Fragment & Puffer, Thermo Scientific (St.Leon-Roth, Deutschland)
- Red Taq ReadyMixTM, PCR Reaktionsmix, Sigma Aldrich (München, Deutschland)
- Phusion Taq Polymerase, Finnzymes (Espoo, Finnland)
- Phusion Taq Polymerase, Thermo Scientific (St.Leon-Roth, Deutschland)

2.3.2 Reagenzien für Standards

- N-Acetyl-L-asparaginsäure (NAA), Fluka Chemikalien, Lot: 442784/1 (München, Deutschland)
- N-Acetyl-L-glutaminsäure (NAG), Fluka Chemikalien, Lot: 339555/1 (München, Deutschland)
- N-Acetylaspartylglutamat (NAAG), Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
- N-Acetylaspartylglutamylglutamat (NAAG₂), PANATEcs GmbH (Tübingen, Deutschland)

2.3.3 Enzyme und besondere Reagenzien

- Rekombinante, Hexahistidine-getaggte Glutaminsäure-Carboxypeptidase II (GCP-II), R+D Systems (Minneapolis, MN, USA)
- Carboxypeptidase Y, Roche (Mannheim, Deutschland)
- 2-PMPA, Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA)
- Desoxyglucose, Sigma-Aldrich (München, Deutschland)

2.3.4 radioaktive Substanzen

- [¹⁴C]-L-Asparat (215 mCi/mmol), Hartmann Analytic (Braunschweig, Deutschland)
- [¹⁴C]-L-Glutamat (260 mCi/mmol), Perkin Elmer
- [¹⁴C]-N-Acetylaspartylglutamat, [1-¹⁴C]-Ac-Asp-Glu-OH (2,8 mCi/mmol), Hartmann Analytic (Braunschweig, Germany)
- [¹⁴C]-N-Acetylaspartylglutamylglutamat, [1-¹⁴C]-Ac-Asp-Glu-Glu-OH (4,2 mCi/mmol), Hartmann Analytic (Braunschweig, Germany)
- [¹⁴C]-Essigsäureanhydrid (55mCi/mmol), Hartmann Analytic (Braunschweig, Germany)
- [³H]-Sialinsäure (N-Acetyl-Neuraminsäure), Hartmann Analytic (Braunschweig, Germany)

2.3.5 Standards für quantitative Massenspektrometrie

- [1,2,3,4-¹³C]- N-Acetylaspartat, Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
- [¹³C]-NAAG and [¹³C]-NAAG₂, markiert am Aspartat, PANATecs GmbH (Tübingen, Deutschland)

2.3.6 Reagenziensätze

- BioRad DC Protein Assay, BioRAD (Hercules, CA, USA)
- ECL, Thermo Scientific (St.Leon-Roth, Deutschland)
- QIAQuick Gel Extraktion, Qiagen (Hilden, Deutschland)
- QIAQuick PCR Purification, Qiagen (Hilden, Deutschland)
- QIA-Plasmid Mini Kit, Qiagen (Hilden, Deutschland)
- QIA-Plasmid Midi Kit, Qiagen (Hilden, Deutschland)
- Qiagen RNA-clean-up Mini-Kit, Qiagen (Hilden, Deutschland)
- Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit, Sigma-Aldrich (München, Deutschland)

2.4 Antikörper

2.4.1 Primärantikörper

- Anti-Flag-M2 (mouse), Sigma Aldrich (München, Deutschland), Verdünnung: 1:5000 (Western Blot), 1:500 (Immunofluoreszenz)
- IgG Agarose Beads (mouse), Sigma Aldrich (München, Deutschland) (Immunpräzipitation)
- Anti-GFP, polyklonal (rabbit), Abcam (Cambridge, MA, USA) Verdünnung: 1:5000 (Western Blot)
- Anti-Synaptophysin (mouse), Merck/Millipore (Darmstadt, Germany) Verdünnung: 1:2000 (Western Blot)
- Anti-Na⁺/K⁺-ATPase (mouse), Developmental Studies Hybridoma Bank (University of Iowa) Verdünnung: 1:1000 (Western Blot)
- Anti-LampII (rabbit), Developmental Studies Hybridoma Bank (University of Iowa) Verdünnung: 1:100 (Western Blot)
- Anti-EEA1 N19 (early endosome marker) (donkey), Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA) Verdünnung: 1:1000 (Western Blot)
- Anti-Neurofilament hc (chicken), Millipore (Darmstadt, Germany), Verdünnung: 1:100 (Immunofluoreszenz)
- Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) (mouse), Millipore (Darmstadt, Germany), Verdünnung: 1:100 (Immunofluoreszenz)

2.4.2 Sekundärantikörper

- Peroxidase-conjugated goat anti-mouse, Dianova (Hamburg, Deutschland), Verdünnung: 1:5000 (Western Blot)
- Peroxidase-conjugated goat anti-rabbit, Dianova (Hamburg, Deutschland), Verdünnung: 1:5000 (Western Blot)
- Peroxidase-conjugated goat anti-guinea pig, Dianova (Hamburg, Deutschland), Verdünnung: 1:5000 (Western Blot)
- HRP-conjugated donkey anti-goat, Millipore (Darmstadt, Germany), Verdünnung 1:5000 (western Blot)
- Alexa Fluor 546 goat anti-mouse, Invitrogen (San Diego, CA, USA), Verdünnung 1:400 (Immunofluoreszenz)
- Alexa Fluor 488 goat anti-mouse, Invitrogen (San Diego, CA, USA), Verdünnung 1:400 (Immunofluoreszenz)
- Alexa Fluor 546 goat anti-chicken, Invitrogen (San Diego, CA, USA), Verdünnung 1:400 (Immunofluoreszenz)
- Cy3 goat anti rabbit, Abcam (Cambridge, MA, USA), Verdünnung 1:400 (Immunofluoreszenz)

2.5 Verwendete Mauslinien

- C57BL/6J, Charles River Germany (Sulzfeld, Germany)
- Sialin defiziente Mäuse (Slc17a5^{tm1Lex}/Mmnc), Mutant Mouse Regional Resource Centers (MMRRC; <http://www.mmrrc.org/>)
- NAAGS-II defiziente Mäuse, generiert von Ivonne Becker⁴², Rückkreuzung auf C57BL/6J
- ASPA defiziente Mäuse (C57BL/6J-Aspa^{nu7}/J), The Jackson Laboratory (Sacramento, CA, USA)
- NAA Synthase defiziente Mäuse, generiert im Institut für Biochemie und Molekularbiologie

2.6 Verwendete Zelllinien

- CHO-K1 (chinese hamster ovary)
- HEK 293 (human embryonic kidney)
- HEKT 293 (human embryonic kidney) und “SV40 large T-Antigen”
- Sf9 (*Spodoptera frugiperda*)
- High-FiveTM BTI-TN-5B1-4 (*Trichopulsia ni*)

2.7 Verwendete Bakterienstämme

- *E. coli* XL1 blue: chromosomaler *E. coli* Genotyp *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac* [F' *proAB lacIqZΔM15 Tn10* (Tetr)]
- *E. coli* BL21: chromosomaler Genotyp *ompT*, *hsdS_B(r_B-r_B-)*, *dcm*, *gal* [λ DE3]
- *E. coli* DK8: ATPase defizienter Stamm

2.8 Primer

Aufgeführt werden die Primer, die für Klonierungen von neuen Plasmiden verwendet wurden.

Tabelle 2.1: Primer für Klonierungen

Gen	Primer 1	Primer 2
NAAGS-I	CATTGTTGTGGGAGGTCGTCTT	GATAGCCAGCTGCTTTCCTTG
Pept2-1	CAGCGAGCAGCCCCTCTCTT	GCCAGGGGTCAGTCTCCATCCA
Pept2-2	GCGCTGCAACTGCAAATGCCA	CGGTCTTCTACCTCTCCATCAATGC
EGFP-Pept2	GCTCCGGACTIONGAGGAGAGAGAGAGTAAGGAGC	
GCPIII	CGAATTCCGAAACAACACTACTTCTGCTGGTTATCATC	GATCGACCTCAGGCTATAACACATTGGTCAGTGT
GCPIII Insert	GCTTTACAGGAAGTGAATATTC	
SLC17A5-murin	TAATACTCGAGAGGCCCTGCTTCGGGGTCCGGC	TGGCTCTAGAGTTTCTGTGTCCGTGGTGGTCAC
SLC17A5-human	AAGTCTCGAGAGGTCTCCGGTTCGAGACCT	ATCGTCTAGATCAGTGTCTGTGTCCATGGTGA
SLC17A5-L22/23A-murin	TGCCGGGGTGCTGTCCGAGCTCT	CCGGGCGCCCGGCAGACCGAGCA
SLC17A5-L22/23A-human	TGCAGGCGTGCCGTCCGTGCTCT	GCTCCGGGGCCCCACGGGCCGA
SLC17A5-R39C-human	TGTTACAACCTTAGCAATTTTG	AGCAGAGCAGCACACTGGAG
SLC17A5-H183R-human	CGTGCATGCCATGTGGTCTT	GCTGGAAATGTAACACCCTC

2.9 Plasmide

Aufgeführt werden die Plasmide, die nicht neu kloniert wurden:

Tabelle 2.2: Plasmide und Vektoren

Plasmid	Kodierung
pFlag-BC052	NAAGS-I
pFlag-BC057	NAAGS-II
pFlag-Nat8L	NAA-Synthase
pcDNA3-NADC3	NADC3-Transporter
pEGFP-BC057	NAAGS-II
pEGFP-BC052	NAAGS-I
pEGFP-C3	EGFP

2.10 Medien, Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen werden, wenn nicht anders beschrieben, mit tridestilliertem Wasser (Millipore-Wasser) angesetzt. (Aufreinigung nach Millipore: Entfernung von mindestens: 99% aller anorganischen Salze, 99% aller gelösten organischen Verbindungen, 99% aller Partikel, 99% aller Mikroorganismen)

2.10.1 Standardlösungen und Puffer

10x PBS	100 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 1,5 M NaCl 25 mM KCl pH = 7,4
10x SDS-Laufpuffer	250 mM Tris Base 1,9 M Glycin 1% SDS pH = 8,6
Sammelgelpuffer	500 mM Tris-HCl pH = 6,8
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl pH = 8,8
4x Probenpuffer (Lämmli)	8% SDS 40% Glycerol 240 mM Tris-HCl pH = 6,8 4% β -Mercaptoethanol
Blotpuffer	48 mM Tris-Base

Kapitel 2. Materialien

	39 mM Glycin 0,037% SDS 20% Methanol pH = 8,5
10x TBS	10 mM Tris-HCl pH = 8,0 1,5 M NaCl
TBS/T	1x TBS 0,05 % Tween
Milchpuffer	5% Milchpulver in TBS/T
Ponceau-S-Lösung	0,2% Ponceau-S 3% Trichloressigsäure
50x TAE-Puffer	2,5 M Tris-HCl 250 mM EDTA 1 M Natriumacetat pH = 8.0 (Eisessig)
L(IV)-Puffer	0,25 mM Bromphenolblau 30% Glycerin 10 mM Tris-HCl pH = 7,0
Agarosegele	0,5-2% Agarose gelöst in 1x TAE
Ethidiumbromidlösung	5mg/ml Stammlösung
LB-Medium	1% NaCl 1% Hefeextrakt 0,5% Trypton pH = 7,0, autoklavieren mit Ampicillin: 0,1mg/ml Ampicillin mit Kanamycin: 0,1 mg/ml Kanamycin
Agarplatten	1,5% Agar LB-Medium mit Ampicillin: 0,15 mg/ml Ampicillin

mit Kanamycin:

2.10.2 spezielle Puffer

Spezielle Puffer für bestimmte Versuche werden mit ihrer Zusammensetzung im Methodenteil aufgeführt.

2.10.3 Lysepuffer für Zellen

Lysierungspuffer	20 mM Tris-HCl pH = 8,0 5 mM EDTA 50 mM NaCl 1% Triton-X 100 1 mM PMSF
------------------	--

2.10.4 Lösungen für Immunofluoreszenz

Waschpuffer	1x PBS
Fixierlösung	4% Paraformaldehyd lösen in 1x PBS bei 75 C pH = 7,4 (NaOH)
Permeabilisierungspuffer	0,3% TritonX-100 in 1x PBS
Blockpuffer	1% BSA in 1x PBS

2.10.5 Puffer für Analytik

Homogenisierungspuffer	90% Methanol 10% Wasser (HPLC-Qualität)
HPLC Laufmittel	0,05% Ameisensäure in Wasser (HPLC-Qualität)
ESI-Puffer	0,05% Ameisensäure in Wasser (HPLC-Qualität)

2.10.6 Standardmedien für die Zellkultur

Zellkulturmedium für CHO-K1-Zellen	DMEM-Hams-F12 (Gibco) 5% FCS 1% L-Glutamin 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
Einfriermedium für CHO-K1-Zellen	DMEM-Hams-F12 (Gibco, Invitrogen) 5% FCS 1% L-Glutamin

	100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 10% DMSO
Zellkulturmedium für HEK293-Zellen	DMEM-GlutaMax (Gibco, Invitrogen) 10% FCS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
Einfriermedium für HEK293-Zellen	DMEM-GlutaMax (Gibco, Invitrogen) 10% FCS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 10% DMSO
serumfreies Medium für Transfektion	Optimem (Gibco, Invitrogen) 1% L-Glutamin
Insektenzellmedium	(Gibco, Invitrogen)
HighV Express Medium	(Gibco, Invitrogen)

Weitere verwendete Medien werden im Methodenteil aufgeführt.

Kapitel 3

Methoden

3.1 Zellkultur

Die Kultivierung adhärenter Säugerzellen erfolgt in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂. Insektenzellen werden bei 27 - 28°C und 5% CO₂ ohne Wasserdampf kultiviert. Alle Arbeiten mit Kulturzellen werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt und es werden ausschließlich sterile Verbrauchsmaterialien verwendet. Alle Puffer, Medien und Lösungen werden vor Gebrauch auf die entsprechende Temperatur erwärmt.

3.1.1 Auftauen und Einfrieren von Kulturzellen

Um Zelllinien in Kultur zu nehmen, werden die Zellen aus dem N₂-Tank aufgetaut, in 37°C warmes Medium überführt und für fünf Minuten bei 200 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird in warmem Wachstumsmedium resuspendiert und in einer Kulturflasche oder Schale ausplattiert.

Zum Einfrieren von Zellen werden diese mit 1-2 ml Trypsin behandelt, um sie vom Flaschenboden zu lösen, in frischem Wachstumsmedium aufgenommen und anschließend für 5 Minuten bei 1000 g zentrifugiert. Das Pellet wird anschließend im Einfriermedium resuspendiert. Die Zellen werden bei -80°C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.1.2 Teilen von Kulturzellen

Zum Passagieren von Kulturzellen wird das alte Medium entfernt und die Zellen werden nach einmaligem Waschen mit 1x PBS mit 2 ml Trypsin von der Kulturschale abgelöst. Durch Zugabe von FCS-haltigem Medium wird die Ablösung durch Trypsin inhibiert und die Zellen können je nach Bedarf verdünnt werden. Durch Zugabe von frischem Medium können die Zellen direkt in neuen Kulturflaschen ausplattiert werden.

3.1.3 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung

Die Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung erfolgt nach dem Ablösen der Zellen. Die Zellen werden mit Trypanblau versetzt und in einer Neubauerzählkammer gezählt. Abgestorbene Zellen werden blau gefärbt. Die Zahl der Zellen berechnet sich durch:

$$2 \cdot \frac{N_{Zellen}}{N_{Grossquadrate}} \cdot 10^4 = \frac{N_{Zellen}}{ml} \quad (3.1)$$

3.1.4 Transfektion von Kulturzellen

Die transiente Transfektion der HEK 293 und HEKT 293 Zellen erfolgt nach der CaPO₄-Methode⁶⁸. Die Transfektion von CHO-K1 Zellen erfolgt mit dem ExGene 500 Reagenz (Fermentas, St.Leon-Roth, Deutschland) oder TurboFect (Thermo scientific, St.Leon-Roth, Deutschland) nach Angabe des Herstellers.

3.2 Primärkulturen

3.2.1 Isolation von primären corticalen Neuronen

Für die Isolation von primären corticalen Neuronen werden Embryonen am Tag E14,5 entnommen. Nach Abtrennen der Köpfe und Entnahme des Gehirns werden von den beiden Hemisphären die Hirnhäute entfernt. Das präparierte Gewebe wird mit kaltem HBSS Puffer gewaschen und anschließend mit 0,025% Trypsinlösung für 12 Minuten bei 37°C inkubiert. Der Verdau wird mit Trypsininhibitor (Sigma) gestoppt. Das Gewebe wird anschließend mit einer 5ml Vollpipette im Komplettmedium homogenisiert. Die Zellen werden ausgezählt und auf PLL beschichteten Platten in Komplettmedium ausgesät.

Komplettmedium	Neurobasalmedium (Gibco, Invitrogen) 1% L-Glutamin 2fach B27 supplements 50 U/ml Penicillin 50 µg/ml Streptomycin
HBSS	Hanks Balanced salt solution 50 U/ml Penicillin 50 µg/ml Streptomycin
Trypsinlösung	0,025% Trypsin 0,02% EDTA in 1x PBS
Trypsininhibitor	1x Trypsininhibitor(Sigma) 1% BSA Verhältnis 3:1
PLL	Poly-L-lysin (Sigma) in 1xPBS

Die primären corticalen Neuronen könne bis zu 4 Wochen in Kultur gehalten werden. Mediumwechsel erfolgt nach Bedarf zu 50%.

3.2.2 Isolation von Astrozyten

Die Astrozyten werden aus Mischkulturen aus den Gehirnen von P0 - P2 Tieren gewonnen. Hierfür werden die Gehirne entnommen, die Hirnhäute entfernt und das Gewebe zerkleinert. Nach Verdau des Gewebes mit Papain für 30 min bei 37°C und stoppen mit Medium wird das Gewebe zuerst mit einer 5ml Vollpipette und anschließend mit einer ausgezogenen Pasteurpipette homogenisiert. Das Homogenat wird über einen

100 μm Zelltrenner gegeben und in PLL beschichteten T-75 Flaschen ausgesät. Die Zellzahl beträgt dabei ungefähr 6 Millionen Zellen pro Flasche. Der erste Mediumwechsel erfolgt nach 24 h, danach wird alle drei Tage das Medium zur Hälfte gewechselt. Die Oligodendrozyten können nach 10 - 14 Tagen zum ersten Mal abgeschlagen werden. Dieses erfolgt dann alle drei Tage, insgesamt viermal. Durch anschließendes Passagieren der Astrozyten werden alle anderen Zelltypen entfernt, es bleiben 95% reine Astrozytenkulturen über. Diese können alle 7 Tage 1:5 passagiert werden.

Komplettmedium	DMEM GlutaMax (Gibco, Invitrogen) 50 U/ml Penicillin 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin 10 % FCS
Papainlösung	0,2% Papain in 1x PBS
PLL	Poly-L-lysin (Sigma) in 1xPBS

3.2.3 Neuronen- Astrozytenmischkulturen

Die Astrozyten werden 24 - 48 h vor Neuronenisolation in 6-well Platten ausgesät, so dass sie eine Konfluenz von 20% haben. Die Neuronen werden direkt auf dem Astrozytentepich ausgesät, dabei wird das Medium gegen das Neurobasal-Komplettmedium ausgetauscht. Nach 3 Tagen wird die Proliferation durch 10 μM Cytosin Arabinosid gestoppt. Der Mediumwechsel erfolgt anschließend alle 2 - 3 Tage zu 50%. Die Zellen können so bis zu drei Wochen in Kultur gehalten werden.

3.2.4 Neurotoxischer Assay

Die Neuronen- oder Astrozyten-Neuronen-Mischkulturen werden 8-10 Tage nach ihrem Entstehen dem Neurotoxizitätsassay unterzogen. Hierfür wird das Medium gegen HEPES-Puffer ausgetauscht und es erfolgt die Zugabe von 10 mM Desoxyglucose und 5 mM Kaliumcyanid oder 100 μM NMDA, sowie 10 μM 2-PMPA. Die Inkubation erfolgt für 20 min bei 37°C. Anschließend werden die Zellen vorsichtig gewaschen und für 24 h im konditioniertem Medium regeneriert, bei Behandlung mit 2-PMPA wird zusätzlich 2-PMPA in das Medium gegeben. Nach 24 h erfolgt die LDH-Messung mit dem Lactat Dehydrogenase Aktivitäts Assay nach Angaben des Herstellers (Sigma Aldrich, München, Deutschland). Es werden für jede Messung je 100 μl Medium oder Zellysate verwendet. Die Detektion erfolgt in einer 96-well Platte bei 505 nm mit dem Tecan Reader.

HEPES-Puffer	120 μM NaCl 5,4 μM KCl 0,8 μM MgCl_2 1,8 μM CaCl_2 20 mM HEPES
--------------	--

3.3 Immunofluoreszenz

Für die Immunofluoreszenz werden die Zellen auf 13 mm Deckgläser in 24-well-Platten ausgesät und transfiziert. 24-48 Stunden nach Transfektion werden die Zellen einmal mit 37°C warmen 1x PBS gewaschen und anschließend für 10 Minuten mit 37°C warmen 4%igen PFA fixiert und erneut gewaschen. Zum Permeabilisieren der Zellmembran werden die Zellen für fünf Minuten mit 0,3% TritonX-100 inkubiert und erneut gewaschen. Das Blockieren unspezifischer Bindungsstellen erfolgt mit 1%igem BSA bei Raumtemperatur für eine Stunde. Der erste Antikörper wird entsprechend seiner Verdünnung in 1%igem BSA gelöst und die Zellen werden damit für 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit 1x PBS werden die Zellen mit dem in 1%igem BSA gelösten Sekundärantikörper und DAPI zur Kernfärbung im Dunkeln für eine Stunde behandelt. Abschließend werden die Zellen viermal mit 1x PBS und dann mit Millipore-Wasser gewaschen um Salzreste zu entfernen. Zum Fixieren der Deckgläser auf den Objektträgern wird ProLong Gold (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

3.4 Arbeiten mit DNA

3.4.1 Transformation chemisch kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA

Für die Transformation werden 100 μ l chemisch kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut. Es werden 5 μ l Ligationsansatz (oder 1 μ l Plasmid-DNA zur Retransformation) zu den Bakterien gegeben, vorsichtig gemischt und für zehn Minuten auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wird dann einem Hitzeschock unterzogen (42°C, 30 sek) und anschließend sofort für zwei Minuten auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 1 ml Medium werden die Bakterien in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und für 30 Minuten bei 37°C schüttelnd inkubiert. 100 μ l der Bakterienkulturen werden auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.4.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Gewinnung von Plasmid-DNA erfolgt aus den zuvor transformierten Bakterienkulturen mit Hilfe der entsprechenden Quiagen-Kits nach Angaben des Herstellers.

3.4.3 Spaltung von Plasmiden mittels Restriktionsendonukleasen

Mit der Restriktionsspaltung können gezielt Fragmente aus Plasmid-DNA entnommen werden, die für Klonierungen oder Identifizierung von Plasmid-DNA verwendet werden können.

Restriktionsansatz

1 - 2 μ g DNA

2 μ l 10x Puffer

0,5 μ l Enzym (5 units)

ad 20 μ l Millipore-Wasser

Die Inkubationszeit der Restriktion beträgt 60 - 90 Minuten, die Temperatur ist dabei abhängig vom eingesetzten Enzym. Diese können durch Hitzeschock inaktiviert werden. Abschließend wird die Restriktion durch Agarosegelelektrophorese überprüft und weiterverarbeitet.

3.4.4 Gelextraktion

Die Gelextraktion erfolgt nach dem Standardprotokoll für das DNA-Extraction-Kit von Qiagen.

3.4.5 PCR-Produkt-Aufreinigung

Die Aufreinigung von PCR-Produkten oder das Entfernen von Pufferrückständen aus Restriktionsansätzen erfolgt durch das "PCR-Purification Kit" von Qiagen nach Standardprotokoll des Herstellers.

3.4.6 Ligation

Bei der Ligation können durch einen Restriktionsverdau linearisierte DNA-Fragmente verknüpft werden. Die Ligation kann sowohl bei kompatiblen überhängenden (sticky), als auch bei glatten (blunt) Enden erfolgen. Der Ligationsansatz kann über eine vorgegebene Menge an Vektor-DNA berechnet werden.

$$\frac{Vektor[ng] \cdot Insert[kb]}{Vektor[kb]} \cdot \begin{cases} 10 & \text{blunt end} \\ 4 & \text{sticky end} \end{cases} = Insert[ng] \quad (3.2)$$

Hinzu kommen außerdem:

4 μ l T4-DNA-Ligase-Puffer
1 μ l T4-DNA-Ligase (1 u/ μ l)
ad 20 μ l Millipore-Wasser.

Der Ligationsansatz wird für zwei Stunden bei RT inkubiert.

3.5 Isolation von genomischer DNA aus Mausgewebe

Für die Genotypisierung von Mäusen wird eine 0,2-0,5 cm lange Schwanzspitze verwendet. Diese wird über Nacht in 750 μ l Lysepuffer plus 5 μ l Proteinase K Lösung (20 mg/ml) bei 56°C lysiert. Das Lysat wird mit 500 μ l 6N NaCl versetzt und weitere 5 min bei 56°C geschüttelt. Haare und unlösliche Zellrückstände werden durch Zentrifugieren (10.000 x g, 10 min) abgetrennt. 800 μ l des reinen Überstandes werden mit 400 μ l Isopropanol versetzt und anschließend zentrifugiert (12.000 x g, 20 min, 4°C). Die gefällte DNA (als weißes Pellet sichtbar) wird mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach Trocknung für etwa 15 min bei RT erfolgt die Zugabe von mindestens 200 μ l HPLC-H₂O zur Lösung der DNA. Für PCR Analysen werden 1-2 μ l dieser Lösung eingesetzt.

3.6 Genotypisierung

Ausgangsmaterial für die folgenden Nachweise ist genomische DNA, die entsprechend der zuvor beschriebenen Methode isoliert wurden.

3.6.1 Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit der Polymerase-Ketten-Reaktion können definierte DNA-Bereiche exponentiell vervielfältigt werden. Für die Genotypisierungen wird der REDTaq Ready Mix der Firma Sigma verwendet. In dem Mix befindet sich die Taq-Polymerase, dNTPs und der benötigte Puffer. Die Primer werden nach Herstellerangaben angesetzt (100pmol/ml) und auf 10 pmol/ml verdünnt.

3.6.1.1 Genotypisierung der NAAGS-II ko Mäuse

Reaktionsansatz	Methode
10 μ l REDTaq Mix	98 C, 5 min, initiale Denaturierung
2 μ l BC057-ko-for1 (10 pmol/ml)	98°C, 30 sek, Denaturierung
1 μ l BC057-ko-rev1 (10 pmol/ml)	60°C, 45 sek, annealing Temperatur
1 μ l IRES-rev1 (10 pmol/ml)	72°C 45 sek Extension
3 μ l H ₂ O	72°C 5 min
3 μ l DNA	4°C ∞
	Zyklen: 30
Primer BC057-ko-for1	ACCCCAGAGGCAGAGGATCG
Primer BC057-ko-rev1	CAAGCGGCAGCCCAGCTTCT
Primer IRES-rev1	ACGTGGCACTGGGGTTGTGC

Die erwarteten PCR-Produkte liegen bei 639 bp (wt) und bei 916 bp (ko).

3.6.1.2 Genotypisierung der Sialin-defizienten Mäuse

Reaktionsansatz	Methode
10 μ l REDTaq Mix	98 C, 5 min, initiale Denaturierung
1,5 μ l Sia-wt1 oder Sia-ko1 (10 pmol/ml)	98°C, 30 sek, Denaturierung
1,5 μ l Sia-wt2 oder Sia-ko2 (10 pmol/ml)	58/62°C, 30 sek, annealing Temperatur
4 μ l H ₂ O	72°C 45 sek Extension
3 μ l DNA	72°C 5 min
	4°C ∞
	Zyklen: 30
Primer Sia-wt1	GCTGGTGACACACATCTTGC
Primer Sia-wt 2	CCGCTTCGGTCTGCCGG
Primer Sia-ko1	GCAGCGCATCGCCTTCTATC
Pimer Sia-ko2	CTAAGCGGAACCTGGCG

Die erwarteten PCR-Produkte liegen bei 322 bp (wt) und bei 450 bp (ko).

3.6.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient zum Auftrennen von Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe. Durch Größenmarker können die DNA-Fragmente zugeordnet werden. Die Detektion erfolgt mit Ethidiumbromid als interkalierendem Farbstoff, mit dem die DNA durch einen UV-Transilluminator sichtbar wird. Die Proben werden durch Zugabe von L(IV)-Puffer beschwert, auf das Gel aufgetragen und bei 100 - 120 V für 30 - 45 Minuten elektrophoriert.

3.7 Arbeiten mit Proteinen

3.7.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen wird mit dem BioRad DC Assay System nach Lowry⁶⁹ durchgeführt. Zur Erstellung der Kalibriergeraden werden BSA-Standards mit folgenden Konzentrationen herge-

stellt: 2 mg/ml, 1,5 mg/ml, 1,0 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,2 mg/ml und 0 mg/ml. In einem Mikroplate Reader wird die Extinktion bei $\lambda = 750$ nm gemessen. Alle durchgeführten Proteinbestimmungen beziehen sich auf Dreifachbestimmungen.

3.7.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) handelt es sich um eine Methode, die denaturierte Proteine durch Elektrophorese nach ihrer Größe auftrennt. Zur Probenvorbereitung werden die gelösten Proteine mit entsprechender Menge an 4-fach Lämmli-Puffer versetzt. Dieser enthält Glycerin zum Beschweren der Proben, einen Überschuss an SDS und Reduktionsmittel (β -Mercaptoethanol, DTT, DTE). Die Proben werden für unter Standardbedingungen 5 Minuten auf 95 °C erhitzt, um Sekundär- und Tertiärstrukturen durch Zerstörung von Wasserstoffbrückenbindungen aufzubrechen. Zur Auftrennung werden die denaturierten Proben auf ein diskontinuierliches Gel aus Polyacrylamid geladen, das in den Elektrolyten eingelegt ist. Das Gel besteht aus einem niederprozentigen Trenngel mit pH = 8,8 und einem höherprozentigen Sammelgel mit pH = 6,8. Bei einer elektrischen Spannung von 100-200 V werden die Proben im Gel getrennt. Als Größenmarker wird der Prestained Page Ruler (S0671) von Fermentas (Thermo scientific, St.Leon-Roth, Deutschland) verwendet.

3.7.3 Färben von SDS-Gelen

Zum Anfärben der Proteine werden die Gele für 2 - 12 Stunden in colloidale Coomassie-Färbelösung unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Entfärben werden die Gele anschließend in Entfärberlösung inkubiert.

3.7.4 Western-Blot nach dem semi-dry-Verfahren und Detektion der Proteine

Beim Western-Blot wird ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt. Somit wandern die Proteine aus dem Gel auf eine Membran (Nitrocellulose). An der Membranoberfläche bleiben sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften. Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Die Proteinbanden können nun auf der Membran mit Hilfe spezifischer Antikörper identifiziert werden. Spezifische Antikörper (monoklonal oder polyklonal) binden das passende Protein auf der Membran. Unspezifisch gebundene Antikörper werden durch Waschschritte entfernt. Für den Western-Blot wird ein SDS-Gel auf mit Blotpuffer getränktem Whatmanpapier und auf die getränkte Nitrocellulosemembran gelegt und mit getränktem Whatmanpapier bedeckt, der Aufbau erfolgt auf der Anode. Nach Anschluss der Kathode wird das Gel mit einer Stromstärke von 0,8 mA pro cm² für 60 - 80 Minuten geblotet. Anschließend kann der Transfer der Proteine auf die Membran mit Ponceau-S-Lösung überprüft werden. Um unspezifische Bindungen auf der Membran zu blockieren, wird diese entweder für 60 - 90 Minuten bei Raumtemperatur oder bei 4°C ÜN mit 4% Milch in TBS/T unter Schütteln inkubiert. Anschließend wird die Membran einmal mit TBS/T gewaschen und für 90 Minuten mit dem verdünnten Primärantikörper (in 4% Milch) bei Raumtemperatur oder ÜN bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS/T für jeweils zehn Minuten wird die Membran für 45 Minuten mit dem verdünnten Sekundärantikörper inkubiert und anschließend wie oben beschrieben gewaschen.

An Peroxidase gekoppelte Zweitantikörper werden mit verstärkter Chemilumineszenz detektiert. Dazu wird die Membran in ECL-Lösung (Thermo Scientific, St.Leon-Roth, Deutschland) für eine Minute inkubiert. Durch Auflegen eines Filmes wird dieser belichtet und kann danach entwickelt werden. Die Entwicklungszeit ist dabei abhängig vom Antikörper und variiert zwischen 30 Sekunden und 10 Minuten.

3.8 Analytische Verfahren zur Bestimmung der Peptide

3.8.1 Probenvorbereitung für HPLC- und ESI-Messungen

Die Präparation der Proben für die analytischen Messungen erfolgt in modifizierter Form nach Bjartmar et al.⁵⁰. Den Proben wird schon während der Extraktion der isotope markierte Standard in entsprechenden Mengen zugeführt ("spiking" Methode) um zu gewährleisten, dass eventuelle Verluste miteinkalkuliert werden können.

3.8.1.1 Proben aus Zellen

Die transfizierten Zellen werden mit 1x PBS gewaschen und direkt mit -20°C kaltem 90%igen Methanol extrahiert. Die Zellsuspension wird anschließend bei 17.000 g für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird für Western-Blot-Analysen und Proteinbestimmungen verwahrt. Der Überstand, in dem sich überwiegend kleine Peptide befinden, wird zuerst in der *Speed Vac* getrocknet, um das Methanol zu entfernen und anschließend in 300 μ l - 500 μ l Millipore-Wasser aufgenommen und durch starkes Schütteln gelöst. Die Proben können danach direkt vermessen werden.

3.8.1.2 Proben aus Mausgewebe

Nach Präparation von Mäuse werden die Gewebeproben bei -80°C eingefroren. Für die Homogenisierung werden diese Proben mit 500-1000 μ l -20°C kaltem 90%igen Methanol versetzt und mit dem Ultraturax auf Eis zerkleinert. Das Homogenat wird für 20 min bei 21.000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird für die Proteinbestimmung verwahrt, der Überstand wird in der *Speed Vac* getrocknet. Nach Aufnahme in Wasser (100 μ l - 500 μ l) werden die Extrakte durch verwirbeln und Ultraschallbehandlung gelöst und für mindestens eine Stunde bei RT inkubiert. Direkt vor der Messung werden die Proben für 20 Minuten bei 21.000 x g zentrifugiert, um entstandene Aggregate zu entfernen.

3.8.1.3 Direkt verwendbare Proben

Direkt verwendbare Proben wie CSF oder Blutserum werden mit isotope markierten Standard versetzt und auf das gewünschte Probenvolumen mit Millipore-Wasser vermischt, so können sie direkt injiziert werden.

3.8.2 HPLC-Messung

Die HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) ist ein chromatographisches Trennverfahren, bei dem die zu untersuchenden Substanzen mit einem Fließmittel, der mobilen Phase, über eine Trennsäule, der stationären Phase, gegeben werden⁷⁰. Verwendet wird hier eine "organic acid"-Trennsäule auf Polymerbasis (PS-DVB). Die Proben werden hierbei nach Anzahl der "sauren" Gruppen getrennt. Als mobile Phase wird H₂O mit 0,05% Ameisensäure bei einer Flussrate von 0,5 ml/min verwendet. Die Detektion der Substanzen erfolgt mittels UV-Absorption bei 214 nm. Die Retentionszeit der zu untersuchenden Substanz kann durch Messung eines Standards bestimmt werden. Die HPLC dient zur Vortrennung der zu messenden Substanzen.

3.8.3 ESI-Messungen

Das Prinzip eines Massenspektrometers beruht auf der Trennung des Masse/Ladungsverhältnisses ionisierter Proben⁷¹. Bei der Elektrospray-Ionisierung handelt es sich um eine sanfte Methode der Ionenerzeugung, bei der sehr sensitiv Moleküle und nicht-kovalente Aggregate ionisiert werden können. Die Detektion erfolgt als Quasimolekül-Ionen ($[M+H^+]$ bei positiver Spannung; $[M-H^+]$ bei negativer Spannung) oder als

Adduktionen mit Bestandteilen des Eluenten oder der Matrix ($[M+Na^+]$ oder $[M-Na^+]$)⁷². Für Peptide, die kleiner als 1 kDa sind, dominieren die einfach geladenen und bei Peptiden ab ca. 2 kDa die zweifach geladenen Ionen.

3.8.3.1 Verwendete Methode

Die Messung der Proben erfolgt über eine Tandem LC/MS Methode. Die vorbereiteten Proben (siehe oben) werden über den Autosampler direkt in die HPLC injiziert und nach Trennung zur Ionenfalle weitergeleitet. Die ESI/MS Messung erfolgt im negativ Ionisierungs Modus mit Auto/MS Fragmentierung der entsprechenden Massen nach Messung des Gesamtspektrums. Als Trockengas wird N_2 bei $330^\circ C$ verwendet, das Kollisionsgas besteht aus Helium mit 3% Argon, Die Kapillarspannung beträgt 4.000 V. Das Fragmentierungsmuster kann zur Strukturaufklärung und zur Identifizierung von Substanzen genutzt werden. Die Quantifizierung im Massenspektrum erfolgt über die Messung einer isotopenmarkierten Standards in definierter Menge und dem Vergleich der Intensitäten im linearen Bereich mit der entsprechenden Probe.

3.9 Arbeiten mit RNA

3.9.1 Isolation von RNA aus Mausgewebe

Zur Gewinnung von RNA werden 100 mg Gewebe in je 1ml Trizol im Ultraturrax homogenisiert und anschließend mit einer 21G Nadel supendiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min werden die Proben 10 min bei $12.000 \times g$, $4^\circ C$ zentrifugiert. Der Überstand wird mit $100 \mu l$ BCP pro ml Trizollösung gemischt und für 60 sec gevortext. Zum Trennen der Phasen wird erneut bei $12.000 \times g$, $4^\circ C$ für 10 min zentrifugiert. Die wässrige Lösung wird anschließend mit dem doppelten Volumen an Isopropanol gemischt. Nach Inkubation für 20 min bei RT wird für 20 min bei $12.000 \times g$, $4^\circ C$ zentrifugiert. Die gewonnene RNA ist nach der Zentrifugation als weißes Pellet sichtbar. Nach Waschen mit 75% Ethanol wird die RNA an der Luft getrocknet und anschließend in Wasser gelöst ($100-200 \mu l$). Dafür wird zuerst 15 min bei RT inkubiert und anschließend für 15 min bei $60^\circ C$. Die gelöste RNA kann bei $-80^\circ C$ gelagert werden.

3.9.2 RNA Aufreinigung

Die gewonnene RNA (siehe oben) wird mit dem Quiagen "RNA-clean-up" Mini-Kit nach Angaben des Herstellers gereinigt. Die RNA wird mit $50 \mu l$ Wasser eluiert.

3.9.3 cDNA Synthese

Die cDNA Synthese erfolgt mit der aufgereinigten RNA (siehe oben). $5 \mu g$ RNA werden mit Wasser auf $10 \mu l$ aufgefüllt und mit $1 \mu l$ Oligo-dT-Primer ($50 \mu M$) gemischt und für 10 min bei $65^\circ C$ inkubiert. Die Proben werden anschließend auf $4^\circ C$ abgekühlt und anschließend mit dem Reaktion-Mix gemischt und für 2 min bei $42^\circ C$ inkubiert.

Reaktions-Mix	1 μl H_2O
	4 μl 5x 1 st Strand Puffer
	2 μl 0,1 mM DTT
	1 μl 10 mM dNTPs

Nach Abkühlen auf $4^\circ C$ wird 1 μl SuperscriptII (Sigma) pro Reaktionsansatz hinzugegeben und für 60 min bei $42^\circ C$ inkubiert. Nach einer abschließenden Inkubation für 15 min bei $72^\circ C$ kann die synthetisierte cDNA

Tabelle 3.1: *Real-time* PCR Primer

Gen	Primer 1	Primer 2
NAAGS-I	CATTGTTGTGGGAGGTCGTCTT	GATAGCCAGCTGCTTTCCTTG
NAAGS-II	CCTATGGTGGGCACGAAGAC	CACATCATGGCGGACTAGGT
Nat8L	GGGGGTGGGGGTGTCCTGAG	TTGGGCCCCCAGCCTGTCTT
GCPII	ACAAACGCTGTTGGCCTTCCAAGT	AGCAAAGCCAGGTCCCACGTTG
MBP	GACCATCCAAGAAGACCCAC	GCCATAATGGGTAGTTCTCGTGT
PLP	TGAGCGCAACGGTAACAGG	GGGAGAACACCATACATTCTGG
Ubiquitin C	AGGCAAGACCATCACCTTGGACG	CCATCACACCCAAGAACAAGCACA

1:10 mit Wasser verdünnt werden. Für Real-time-PCR werden 5 μ l cDNA eingesetzt.

3.9.4 Real-time PCR

Die Real-Time PCR wird mit Hilfe des SYBR Mixes durchgeführt. Die erhaltenen Ct Werte werden mit Ubiquitin als Housekeeping-Gen normalisiert. Die Auswertung erfolgt mit der $2^{-\Delta ct}$ -Methode. Folgende Primer werden verwendet (siehe Tabelle 3.1).

3.10 Isolierung von Mikrosvesikeln aus Mäusegehirn

Die Präparation von Mikrosvesikeln erfolgt in modifizierter Form nach Hell et al.^{73,74}. Pro Präparation werden 5 g Mausgehirn (entspricht 10-12 Hirnen) verwendet. Die gefrorenen Gehirne werden unter flüssigem Stickstoff gemörsert bis ein feines Pulver entsteht. Das Gewebepulver wird in 35 ml Homogenisierungspuffer aufgenommen und mit einem Glas-Teflon-Potter homogenisiert (15x). Das Homogenat wird anschließend bei 47.000 x g, 4°C für 10 min sedimentiert. Der Überstand Ü1 wird im Anschluss erneut zentrifugiert (120.000 x g, 4°C, 40 min) um die Membranfraktionen abzutrennen. Der entstandene Überstand Ü2 wird auf ein Sucrosekissen (70% Sucrose) geschichtet (2 ml Sucrose und 9 ml Überstand) und bei 250.000 x g und 4°C für 2 h zentrifugiert. Die angereicherten synaptischen Vesikel befinden sich im Pellet. Diese werden in 0,5 ml Standard-SV-Puffer pro Fraktion resuspendiert. Zum Abtrennen unlöslicher Fragmente wird abschließend eine Zentrifugation bei 27.000 x g (4°C, 10 min) durchgeführt. Vom Überstand wird eine Proteinbestimmung durchgeführt. Die Qualität der Anreicherung wird über Western Blot Analysen gegen Na⁺/K⁺-ATPase, als Membranmarker, gegen EEA1 als endosomaler Marker und Synaptophysin als Marker für synaptische Vesikel überprüft. Es wurden außerdem Proteomik-Analysen durchgeführt und mit dem Proteom von synaptischen Vesikeln aus Ratten verglichen. Die Vesikel können in gebrauchsfertigen Aliquots bei -80°C gelagert werden.

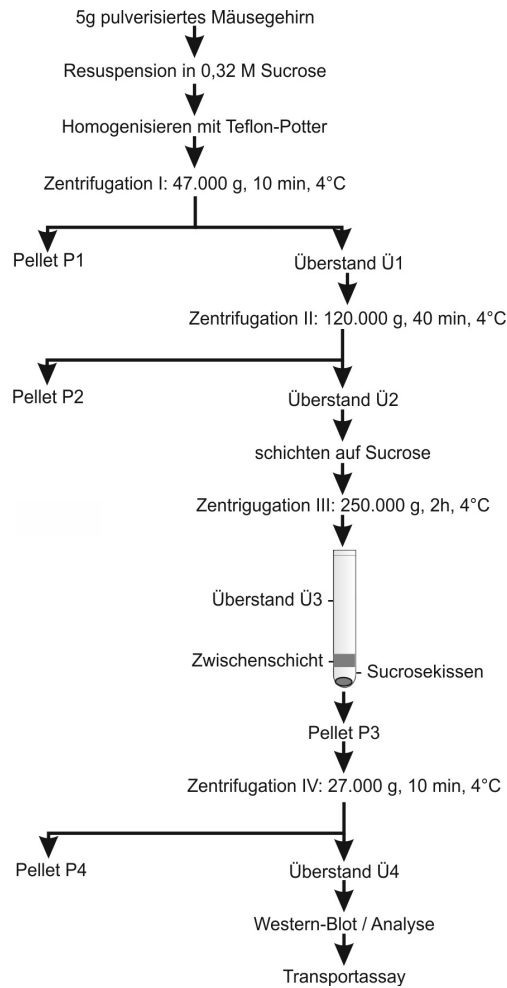


Abbildung 3.1: Fließschema zur Isolation von Mikrovesikeln

Homogenisierungspuffer

0.32 M Sucrose
 10 mM HEPES-KOH pH = 7,3
 1 μ /ml Pepstatin A
 1 μ /ml Leupeptin

Standard-SV-Puffer

0.32 M Sucrose
 4 mM KCl
 10 mM HEPES-KOH pH = 7,3

3.10.1 Transport in Mikrovesikel

Die isolierten, synaptische Vesikel enthaltende, Mikrovesikel (SV) werden in Standard-SV-Puffer auf eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml verdünnt. 100 μ l werden für 5 min bei 32°C vorinkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 50 μ l Standard-SV-Puffer mit verschiedenen Mengen der [¹⁴C]-markierten Peptide und Aminosäuren (NAAG, NAAG₂, NAA, Aspartat, Glutamat), 10 mM MgCl₂ und 6 mM ATP gestartet. Wenn beschrieben, werden außerdem folgende Substanzen hinzugefügt (angegeben in Endkon-

zentrationen): Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazon (FCCP) (20 μM), Gramicidin D (40 μM), N-acetylneuramisäure(Neu5Ac) (133 μM , 500 μM , or 5 mM), Glutaminsäure (200 μM), NAAG (166 μM), Asparaginsäure (166 μM). Die Reaktion wird nach 10 Minuten Inkubationszeit bei 32°C durch Zugabe von 1 ml kaltem Standard-SV-Puffer gestoppt, direkt über eine Nitrocellulosemembran (Porengröße: 0,45 μm) gefiltert und mit 12 ml kaltem Standard-SV-Puffer gewaschen. Die gebundene Radioaktivität wird durch Flüssigszintillation gemessen. Als Kontrollen wurden Reaktionsansätze ATP oder Kurzinkubation (10 sek) auf Eis verwendet.

Standard-SV-Puffer	0.32 M Sucrose
	4 mM KCl
	10 mM HEPES-KOH pH = 7,3

3.11 Gewinnung von Liquor aus Mäusen

Für die Entnahme von Liquor werden die Tiere anästhesiert. Die Präparation erfolgt unter einem binokularen Mikroskop. Zunächst wird die Haut über dem Nacken entfernt. Subkutanes Gewebe und Muskelmasse werden vorsichtig mit einer Pinzette entfernt bis die klare, helle Membran, die die Cisterna Magna bedeckt, sichtbar ist. Eine Microkapillare wird in die Cisterna Magna eingeführt. Dafür wird die Membran punktiert. Der Liquor wird durch Kappilarkräfte aufgesaugt. Das Gewebe darunter sollte nicht verletzt werden, da der Liquor dann mit Blut verunreinigt werden kann. Die Flüssigkeit kann bei -20°C gelagert werden. Die Menge liegt bei ungefähr 5-10 μl Liquor pro Maus.

3.12 Radioaktive Versuche

3.12.1 Metabolische Markierung von Zellen

Zur Untersuchung der Produktion von NAAG und weiteren Substanzen durch die NAAG Synthetasen und zur Gewinnung von Peptiden wurde die metabolische Markierung von transfizierten Zellen verwendet. Die Zellen werden in 6-well Platten ausgesät und nach 24 Stunden transient transfiziert. Hierzu werden die Flag-Plasmide beider Synthetasen und die Plasmide von Nat8L oder NaDC3 transfiziert. Die Zellen werden 12 - 24 h nach Transfektion mit [^{14}C]-Glutaminsäure (bei Transfektion mit Nat8L) oder mit [^{14}C]-NAA (bei Kotransfektion von NaDC3) für 8 - 12 h markiert. Nach Trennung über einen Kationentauscher erfolgt eine Peptidextraktion mit 90%igem Methanol. Die Proben werden für 10 min bei 12.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde getrocknet und in 20%igen Ethanol aufgenommen. Die Proben können anschließend analysiert werden.

3.12.1.1 Trennung der Peptide über TLC

Die aufbereiteten, in 20%igen Ethanol aufgenommenen, Extrakte können dünnschichtchromatographisch getrennt werden. Nach Aufbringen auf eine HPTLC Platte und Trennung durch Laufmittel (CHCl_3 :HAc:H $_2$ O 9:5:1) können die radioaktiven Substanzen (NAAG, NAAG $_2$, NAA) durch einen Bioimager Screen (Fuji) visualisiert werden. Zur Trennung von Aminosäuren wurde das Laufmittel n-Butanol:HAc:H $_2$ O 12:3:5 verwendet.

3.12.2 Produktion von [^{14}C]-NAAG und [^{14}C]-NAAG₂

Für die Darstellung von [^{14}C]-NAAG und [^{14}C]-NAAG₂ werden Zellen mit pFlag-NAAGS-II und pcDNA3-NaDC3 transfiziert und mit [^{14}C]-NAA markiert. Nach präparativer, dünnschichtchromatographischer Trennung ($\text{CHCl}_3\text{:Ac:H}_2\text{O}$ 9:5:1) der Peptide, werden die entsprechenden Banden von der TLC gekratzt, in Wasser gelöst und mit Flüssigszintillation die Aktivität bestimmt.

3.12.3 Synthese von radioaktivem [^{14}C]-NAA, [^{14}C]-NAAG und [^{14}C]-NAAG₂

Für die Synthese der radioaktivem Peptide wird [^{14}C]-markiertes Essigsäureanhydrid zur N-Acetylierung verwendet. Dieses wird in wässriger Umgebung mit einem molaren Überschuss der entsprechenden Peptide (Glu-Asp, Glu-Glu-Asp und im Fall von NAA, Asp) umgesetzt, hierbei erfolgt die Reaktion für 30 min bei RT stark schüttelnd (Vortexer) bis keine Phasentrennung mehr sichtbar ist. Die entstandene Essigsäure wird über Vakuumtrocknung entfernt und die Aktivität wird mit Flüssigszintillation bestimmt. Zur Darstellung von [^{14}C]-NAA wurde auch [^{14}C]-Asp verwendet und mit Essigsäureanhydrid (im Überschuss) umgesetzt.

3.12.4 Saure Hydrolyse von NAAG und NAAG₂

Zur Trennung der Peptide in ihre Aminosäuren wird eine saure Hydrolyse durchgeführt. Hierfür werden die Peptide mit 10-fachen Überschuss an 6N HCl bei 110°C im für 2 h hydrolysiert. Die Reaktionslösung wird anschließend Vakuum getrocknet und nach Aufnahme in 20% Ethanol werden die entstandenen Aminosäuren dünnschichtchromatographisch (n-Butanol:HAc:H₂O 12:3:5) getrennt und mit dem Bioimager Screen detektiert.

3.12.5 Verdau mit Carboxypeptidase Y

Zur Spaltung der Peptide werden diese mit Carboxypeptidase Y bei 37°C für 1 h verdaut (50 mM Citratpuffer pH = 6). Das Reaktionsgemisch wird Vakuum getrocknet und die Produkte werden nach dünnschichtchromatographischer Trennung ($\text{CHCl}_3\text{:HAc:H}_2\text{O}$ 9:5:1) mit dem Phosphoimager Screen detektiert.

3.12.6 Verdau mit Glutamat-Carboxypeptidase II

Zur spezifischen Hydrolyse der Peptide (NAAG, NAAG₂) wird die Glutamat-carboxypeptidase II (GCPII) verwendet. Die GCPII ist eine Carboxypeptidase die Peptide spezifisch vor (oder nach) Glutaminsäure schneidet. Es werden jeweils 50 μl GCPII-Lösung (0,75 μg GCPII in 50 mM HEPES, 100 mM NaCl pH = 7,4) mit unterschiedlichen Mengen an Peptid (0-20 μM) bei 37°C inkubiert. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten (0 - 240 Minuten) werden 10 μl Probe abgenommen und die Reaktion durch Hitzeschock gestoppt. Je 5 μl werden auf eine Silicagel 60 HPTLC Platte aufgetragen und die Substanzen werden in n-Butanol:Ac: H₂O 12:3:5 und anschließend in $\text{CHCl}_3\text{:HAc:H}_2\text{O}$ 9:5:1 getrennt. Die Mengen der Peptide nach der Hydrolyse werden mit einem Bioimager Screen detektiert und mit der Aida Software (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt, Deutschland) quantifiziert.

3.12.7 Transport durch Pept2 (Oligopeptidtransporter 2)

Für den Pept2 Transport werden HEKT 293-Zellen mit dem pEGFP-Pept2 Plasmid (oder pcDNA3-NADC3) transfiziert und 24 h nach Transfektion wird das Medium gegen Transportpuffer ausgetauscht. Es folgt die Inkubation mit den Peptiden bei 37°C für 30 min im Transportpuffer. Die Zellen werden anschließend gewaschen und mit 90%igem Methanol extrahiert oder mit 1% SDS lysiert. Die Radioaktivität der Extrakte wird entweder mit Flüssigszintillation bestimmt oder das Peptidextrakt wird Vakuum getrocknet

und dünn-schichtchromatographisch ($\text{CHCl}_3:\text{HAc}:\text{H}_2\text{O}$ 9:5:1) getrennt. Die Signale werden anschließend mit einem Phosphoimagerscreen detektiert.

Transportpuffer	25 mM Mes-Tris pH = 6,0
	140 mM NaCl
	5,4 mM KCl
	1,8 mM CaCl_2
	0,8 mM MgSO_4
	5 mM Glucose

3.12.8 Sialin Zelltransportversuche

HEKT 293 Zellen werden in beschichteten 6-well-Platten mit den Plasmiden der Sialinkonstrukte oder EGFP als Kontrolle transient transfiziert (CaPO_4 -Methode). 24h nach Transfektion wird das Medium abgenommen, die Zellen mit Krebs-Ringer-Lösung gewaschen und für 45 min bei 37°C mit ^{14}C -NAAG (80 nmol pro well) in Krebs-Ringer-Lösung inkubiert. Die Reaktion wird durch Waschen der Zellen mit entsprechender Krebs-Ringer-Lösung gestoppt. Der letzte Waschschrift wird durch Flüssigszintillation gemessen. Es werden nur Zellen verwendet bei denen der letzte Waschschrift unter 60 cpm liegt um Signale durch Oberflächenkontamination auszuschließen. Die Zellen werden mit 90% Methanol extrahiert. Das Peptidextrakt wird unter Vakuum getrocknet und in 20% Ethanol aufgenommen. Es werden immer die Extrakte von 2 6-wells vereint und in 20 μl Etanol aufgenommen. Das Peptidextrakt wird dünn-schichtchromatographisch getrennt ($\text{CHCl}_3:\text{HAc}:\text{MeOH}$ 9:5:1) und mit dem Bioimager Screen detektiert.

Krebs-Ringer-Lösung	120 mM NaCl oder KCl
	4,7 mM KCl oder NaCl
	2,2 mM CaCl_2
	1,2 mM MgCl_2
	10 mM HEPES pH = 7
	0,18% Glucose
	± 10 mM Glycylglycin pH = 9
	± 10 mM MES pH = 5,5

3.13 Rekonstitution

3.13.1 Gewinnung der H^+ -ATPase

Die Expression der H^+ -ATPase erfolgte in dem H^+ -ATPase defizienten *E. coli* Stamm DK8. Dieser wurde mit dem Vektor pSK11 transformiert. Hierbei handelt es sich um einen *e. coli* Expressionsvektor in den das unc Operon (ATPase Operon) mit einem N-terminaler His-Tag inkloniert ist. Für die Expression werden die Bakterien in Minimalmedium heran gezogen. Als Antibiotikum wird Ampicillin verwendet.

Minimalmedium (Tanaka <i>et al.</i>)	34 mM KH_2PO_4
	64 mM K_2HPO_4
	0,3 mM MgSO_4

10 mM Imidazol
in Isolationsmedium

Elutionspuffer
1% Octyl- β -D-glucopyranosid
100 mM Imidazol
in Isolationsmedium

3.13.2 Gewinnung von Sialin und VGlut2

Sialin und VGlut2 wurde als pUltra-Bac Plasmid (mit einem zusätzlichen EGFP unter einem zweiten Promoter) kloniert und in DH10bac zur Gewinnung von Bacmid DNA transformiert. Alle Schritte erfolgen nach dem Protokoll von Invitrogen. Die Bacmid DNA wird mittels CellFECTINTM Reagenz in SF9 Zellen transfiziert, 72 h nach Transfektion werden die Viren aus den Überständen der Zellen gewonnen. Die Titerbestimmung (pfu/ml) der Viren erfolgt über das EGFP Protein. Hierzu werden verschiedene Verdünnungen 10^{-3} - 10^{-7} des Virusüberstandes auf HighFive Zellen in 96-well Platten gegeben und 48 h nach Zugabe durch Fluoreszenzmikroskopie überprüft. Der Titer entspricht der Virusverdünnung bei der noch 50 % der Zellen eine Infektion zeigen. Zur Bestimmung der MOI (*Multiplicity of infection*) wird der Virus in verschiedenen Konzentrationen und für verschiedene Zeiträume (24 - 96 h) auf HighFive Zellen gegeben und die beste Expression des Proteins wird quantitativ über Western Blot Signal gegen das His-Tag des Proteins bestimmt. Für Sialin und VGlut2 wurden eine MOI von 3,5 und eine Expressionszeit von 48-72 h ermittelt. Nach Infektion der Zellen mit Virus werden die Zellen geerntet und bei 1000 x g für 10 Minuten pelletiert. Die Zellpellets können so bei -80°C aufbewahrt werden. Zur Aufreinigung der Proteine werden die Zellpellets (Zellen aus 15-20 10 cm Schalen) in 12 ml Resuspensionspuffer resuspendiert und mit dem Ultraschallstab (Amplitude 100, cycle 100 für 6 Minuten auf Eis unter mehrmaligem Schütteln beschallt. Zur Sedimentation der Zelltrümmer wird die Lösung bei 1000 x g, 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird bei 160.000 x g, 4°C für eine Stunde ultrazentrifugiert um die Membranfraktion zu erhalten. Die Membranfraktion (Pellett) wird in Solubilisierungspuffer resuspendiert (maximal 2 mg Protein pro ml) und 30 Minuten bei 4°C schüttelnd inkubiert. Es erfolgt anschließend eine Ultrazentrifugation bei 260.000 x g, 4°C für 30 min.

Resuspensionspuffer
20 mM TRIS-HCl pH 8
0,1 M Kalium-Acetat
10 % (v/v) Glycerin
0,5 mM DTT
10 μ g/ml Pepstatin und Leupeptin

Solubilisierungspuffer
20 mM MOPS-TRIS pH 7
10 % (v/v) Glycerin
10 μ g/ml Pepstatin und Leupeptin
2 % Octyl- β -D-glucopyranosid

Der Überstand wird mit 250 μl , in Waschpuffer äquilibrierten, Co^{2+} -Beads ÜN bei 4°C drehend inkubiert. Das Gemisch wird auf eine leere Säule gegeben, mit 15 ml Waschpuffer gewaschen und mit 5 ml Elutionspuffer in Fraktionen à 500 μl eluiert. Die Aufreinigung wird anschließend mit einem Coomassiegel und Western Blot überprüft.

Waschpuffer	20 mM MOPS-TRIS pH 7 20 % (v/v) Glycerin 5 mM Imidazol 1 % Octyl- β -D-glucopyranosid
-------------	--

Elutionspuffer	20 mM MOPS-TRIS pH 7 20 % (v/v) Glycerin 100 mM Imidazol 1 % Octyl- β -D-glucopyranosid
----------------	--

3.13.3 Rekonstitution

Für die Rekonstitution wird zuerst Phosphatidylcholin in Chloroform gelöst und großflächig mittels eines Rotationsverdampfers eingeeengt. Das Lipid wird dann in Resuspensionspuffer mit einer Endkonzentration von 10 mg/ml wieder aufgenommen und so lange auf Eis beschallt (Ultraschallstab, Amplitude 100, cycle 100) bis die Lösung klar ist. Die Stocklösung kann aliquotiert bei -20°C gelagert werden. Für die Rekonstitution werden 0,5 mg (50 μl) Lipid verwendet. Es werden 40-100 μg aufgereinigtes Sialin mit 90 μg H^+ -ATPase und 0,5 μg Lipid gemischt. Bei -80°C für 10 Minuten eingefroren, direkt wieder aufgetaut (im 37°C Wasserbad) und mindestens 30-fach mit Rekonstitutionspuffer unter Schwenken verdünnt. Im Anschluss erfolgt eine Ultrazentrifugation bei 200.000 x g, 4°C für eine Stunde. Das Liposomenpellet wird in 200-400 μl Rekonstitutionspuffer (ohne DTT) wieder aufgenommen, beschallt bis die Lösung klar ist und in Aliquots von 15-20 μl bei -80°C gelagert.

Resuspensionspufferspuffer Lipide	20 mM MOPS-TRIS pH 7 0,5 mM DTT
-----------------------------------	------------------------------------

Rekonstitutionspuffer	20 mM MOPS-TRIS pH 7 0,1 M Kalium-Acetat 5 mM Magnesium-Acetat \pm 0,5 mM DTT
-----------------------	--

3.13.4 Rekonstitution: Transportversuche

Für die Transportversuche mit Aspartat, Glutamat und NAAG werden 3-5 μg Proteoliposomen in 200-400 μl Rekonstitutionspuffer (siehe oben) und 4 mM KCl verdünnt und für 2 min bei 27°C vorinkubiert. Danach werden 2 mM ATP zugegeben und für weitere 2 min inkubiert, die Reaktion wird dann durch

Kapitel 3. Methoden

Zugabe von [^{14}C]-Aspartat, [^{14}C]-Glutamat oder [^{14}C]-NAAG in verschiedenen Konzentrationen gestartet. Zu verschiedenen Zeitpunkten (1, 3, 5 min) werden je 100 μl Probe entnommen und über eine Sephadex G50 Säule gegeben. Der Durchfluss wird anschließend durch Flüssigszintillation gemessen. Als Leerwert wird radioaktive Substanz über die Sephadex-Säule gegeben und gemessen, als negativ Kontrolle wird ATP weggelassen. Für die Aufnahme von Sialinsäure werden die Proteoliposomen in MES-Puffer verdünnt, die Reaktion durch Zugabe an Sialinsäure gestartet und die Aufnahme wie oben detektiert.

MES-Puffer

- 40 mM MES-TRIS pH 5,6
- 0,1 M Kalium-Acetat
- 5 mM Magnesium-Acetat
- 4 mM KCl

Kapitel 4

Untersuchung der NAAG Synthetase II

Wie einleitend beschrieben, existieren zwei bekannte Synthetasen zur Darstellung von NAAG. Da die Synthetase I schon vorher hinlänglich untersucht worden ist^{75, 19}, sollte hier ein Schwerpunkt auf die genauere Untersuchung der Synthetase II gelegt werden. Die Untersuchungen umfassen die biochemische Charakterisierung zur Rolle im Metabolismus und die Untersuchung der synthetisierten Peptide im zentralen und peripheren Nervensystem von Mäusen, sowie Analysen in dem ko Mausmodell der Synthetase II. NAAGS-II wird in allen Säugerarten gefunden, außerdem auch in *Xenopus tropicalis*. Sie ist in allen Spezies hochkonserviert. In den meisten "Nicht-Säuger" Genomen sind fast nur homologe Sequenzen zur NAAGS-I zu finden¹⁹. NAAGS-II wird in Zellen cytosolisch exprimiert. Der Western Blot der Fraktionierung von Zellhomogenaten, die mit pFLAG-NAAGS-II transfiziert wurden, zeigt ein Signal für das FLAG-Protein im Sediment (1000 x g Pellet (P)) und in der cytosolischen Fraktion (Cyt.), aber nicht in der Membranfraktion (Mem.) (siehe Abbildung 4.1 A). In der Kontrolle, in denen die Zellen mit pcDNA3 transfiziert wurden, gibt es kein Signal. Die Immunofluoreszenz von Zellen, die mit pEGFP-NAAGS-II transfiziert wurden, zeigen ein cytosolisches Signal in der ganzen Zelle (siehe Abbildung 4.1 B).

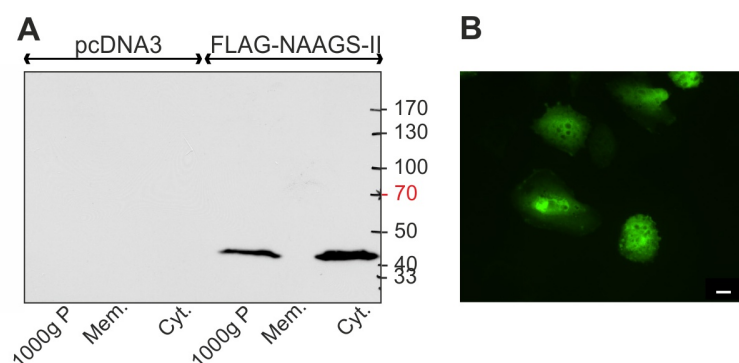


Abbildung 4.1: Western Blot und Immunofluoreszenz der NAAGS-II. Gezeigt sind der Western Blot der fraktionierten Zellhomogenate von HEK-293T Zellen, die transient mit pFLAG-NAAGS-II oder, als Kontrolle, mit pcDNA3 transfiziert wurden (A) und die Immunofluoreszenz von CHO-K1 Zellen, die mit pEGFP-NAAGS-II transfiziert wurden (B). (Abbildung entnommen und modifiziert aus Lodder-Gadaczek *et al.*, 2011²⁰)

4.1 Identifizierung von NAAG₂

4.1.1 Metabolische Markierung von transfizierten Zellen

Da eine Reinigung von löslichem, aktiven NAAGS-II Protein aus *E. coli* nicht möglich war, da das Protein in unlöslichen "inclusion bodies" vorlag, konnten keine Enzymaktivitätstests mit nativem Protein durchgeführt werden. Zur Untersuchung der Aktivität von NAAGS-II wurde deshalb die metabolische Markierung von transfizierten Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden transient mit den Plasmiden der Synthetasen und dem NaDC3 Transporter transfiziert und anschließend über Nacht mit radioaktiv markiertem [¹⁴C]-NAA behandelt. Nach Peptidextraktion mit 90%igem Methanol konnten die markierten Substanzen dünn-schichtchromatographisch (Laufmittel: CHCl₃: HAc: H₂O [9:5:1; v/v/v]) untersucht werden.

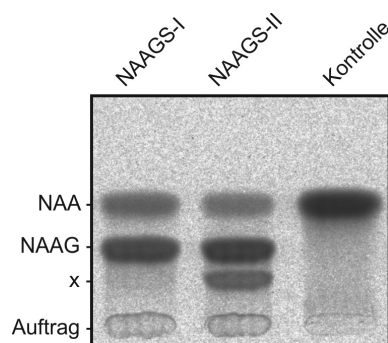


Abbildung 4.2: Metabolische Markierung von Zellen. CHO-K1 Zellen wurden transient mit dem Plasmid für den NAA Transporter (NaDC3) und den Plasmiden für die Synthetasen oder einem irrelevanten Plasmid (Kontrolle) transfiziert. Nach metabolischer Markierung mit [¹⁴C]-NAA für 16 h wurden die Zellen mit Methanol extrahiert, die Extrakte getrocknet und dünn-schichtchromatographisch (Laufmittel: CHCl₃: HAc: H₂O [9:5:1; v/v/v]) analysiert. Im Gegensatz zur NAAGS-I produziert die NAAGS-II eine weitere, NAA-haltige Substanz (X) neben dem Hauptprodukt NAAG. (Abbildung entnommen und modifiziert aus Lodder-Gadaczek *et al.*, 2011²⁰)

Das Bandenmuster in Abbildung 4.2 zeigt, dass die NAAGS-II neben dem Hauptprodukt NAAG noch eine weitere Substanz (X) synthetisiert, die nicht von der NAAGS-I gebildet wird. Im gezeigten Versuch wurden die Plasmide der Synthetasen zusammen mit dem NAA Transporter transfiziert und mit [¹⁴C]-NAA markiert. Dieses lässt darauf schließen, dass es sich bei der unbekannt Substanz um eine NAA haltige Substanz handeln muss.

4.1.2 Nachweis und Identifizierung von asu-NAAG

In der Literatur wird von Brovia *et al.*⁷⁶ beschrieben, dass eine cyclische Form von NAAG auch im murinen Nervensystem zu finden ist. Es wurde untersucht ob asu-NAAG (N-Acetylsuccinimidylglutaminsäure) auch durch die Synthetasen produziert wird und es sich hierbei eventuell um die noch nicht bekannte Substanz X handelt, die von NAAGS-II synthetisiert wird.

Zuerst wurde NAAG in einer intramolekularen Kondensationsreaktion zu asu-NAAG umgewandelt (Abbildung 4.3) und dieses dünn-schichtchromatographisch nachgewiesen. Auf der HPTLC konnten nach Auftragung und dünn-schichtchromatographischer Trennung (Laufmittel: CHCl₃: HAc: H₂O [9:5:1; v/v/v]) bei einer UV-Adsorption von 215 nm zwei Banden detektiert werden (nicht gezeigt). Zur genaueren Untersuchung wurde nach den Angaben von Brovia *et al.*⁷⁶ eine HPLC-Messung durchgeführt. Hierzu wurde eine Nucleosil-Säule verwendet. Als mobile Phase wurde 50 mM KH₂PO₄ (pH = 3) mit einer Flussrate von 0,7 ml/min und einer Laufzeit von 20 min verwendet. Detektiert wurde mit UV bei 214 nm. NAAG konnte nach 8,5 min detektiert werden, NAA nach 5,2 min und asu-NAAG nach 14,8 min (Abbildung 4.4 A). Zur Über-

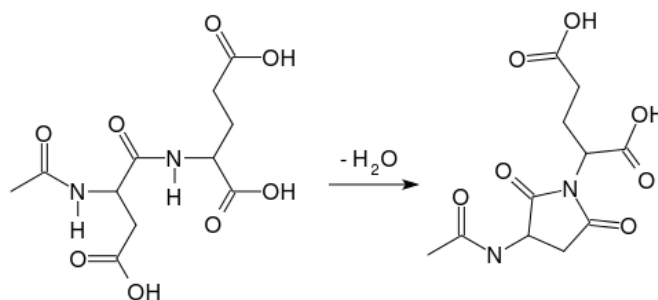


Abbildung 4.3: Synthese von asu-NAAG. In einer intramolekularen Kondensationsreaktion wird ein Wassermolekül abgespalten und NAAG zu einem Imid zyklisiert. Die Synthese erfolgt bei 110°C für 2h.

prüfung der Synthese wurde außerdem die Rückreaktion durch Zugabe von 225 mM Natrium-Boratlösung (pH = 10,2) über Nacht bei 37°C durchgeführt. Hierbei bildet sich neben dem NAAG in α -Form auch β -NAAG. Nach vollständiger Umsetzung erhält man einen Doppelpeak (8,2 und 8,7 min) für β - und α -NAAG. In Abbildung 4.4 B wurden die Produkte der Rückreaktion (grün) im HPLC-Spektrum zusätzlich eingezeichnet. Konzentrationsabhängig verschieben sich die Signale leicht im Spektrum, deswegen liegen NAAG (rot) und das entstanden α -NAAG nicht exakt übereinander.

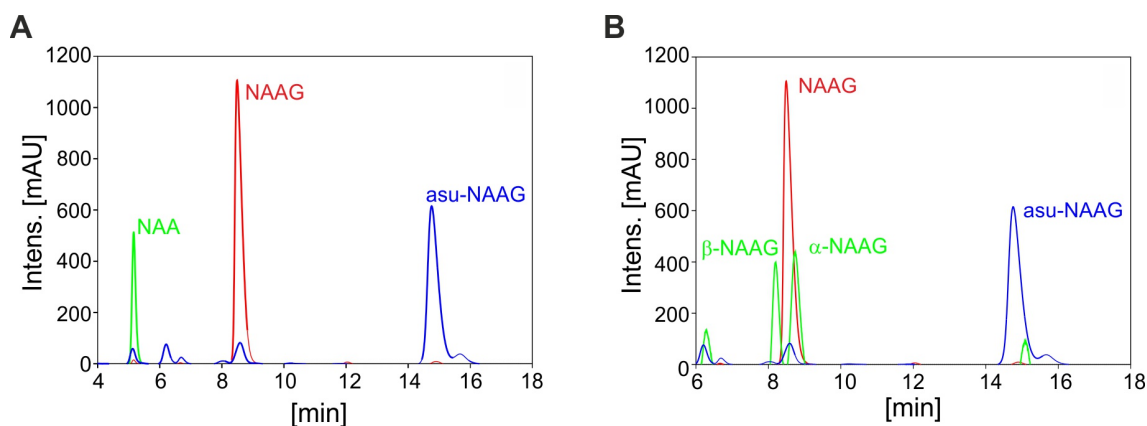


Abbildung 4.4: HPLC-Messung von asu-NAAG. Im linken Spektrum (A) sind NAAG, NAA und asu-NAAG in gleichen Konzentrationen gemessen. Im rechten Spektrum (B) sind zusätzlich die Produkte β - und α -NAAG (grün) der Rückreaktion von asu-NAAG eingezeichnet.

Im HPLC-Spektrum von Peptidextrakten aus Zellen, die transient mit den Plasmiden der Synthetasen NAAGS-I oder NAAGS-II und NaDC3 transfiziert wurden konnten nach Markierung mit [^{14}C]-NAA über Nacht keine Unterschiede im Spektrum identifiziert werden (Abbildung 4.5). Für die Versuche wurden gleiche Zellzahlen verwendet. Die Menge an asu-NAAG, falls vorhanden, muss so gering sein, dass sie nicht detektiert werden konnte. Zur Überprüfung wurden die Proben, nach der Messung mit NAAG und asu-NAAG dotiert (rot) und erneut vermessen. Die gemessenen HPLC-Spektren lassen außerdem darauf schließen, dass es sich bei X nicht um asu-NAAG handelt, da dort kein Signal gemessen werden konnte und das X chemisch so ähnlich zu NAAG sein muss, dass es keine oder kaum Unterschiede im HPLC-Spektrum macht. Dies bedeutet dass die Ladungsverhältnisse nicht stark von denen von NAAG abweichen dürfen. Auch im ESI-MS Spektrum der Peptidextrakte aus Zellen, die transient mit Plasmiden für NAAGS-I oder NAAGS-II und Nat8L transfiziert wurden, konnten keine Unterschiede bezüglich der Synthese von asu-NAAG gefunden werden (Abbildung 4.6). Die Masse von $m/z = 285$ ist in beiden Peptidextrakten gleich

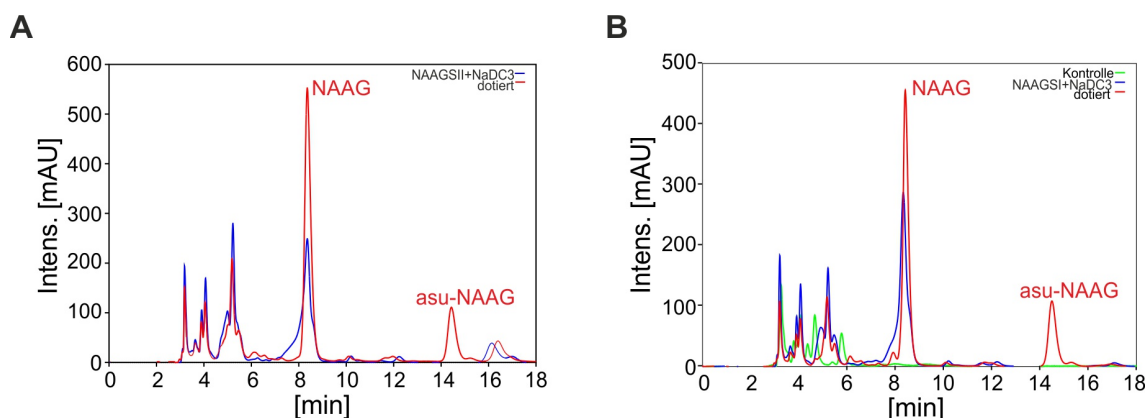


Abbildung 4.5: HPLC-Messung in transfizierten Zellen. Peptidextrakte von transfizierten Zellen mit den Plasmiden für NAAGS-I (B) und II (A) und NaDC3 wurden nach Markierung mit NAA mit HPLC vermessen (blau). Zur Überprüfung wurden die Proben mit NAAG und asu-NAAG dotiert (rot). In B) ist zusätzlich das Spektrum vom Peptidextrakt untransfizierter Zellen zu sehen (grün).

vertreten und entspricht zum größten Teil nicht zyklisiertem NAAG - H₂O. Dies tritt als Nebenprodukt bei der ESI-MS Messung auf und ist auf die Ionisierung der Probe zurückzuführen. Es entspricht außerdem dem Hauptprodukt der Fragmentierung von NAAG. Da asu-NAAG dieselbe Masse hat, ist nur eine Unterscheidung über HPLC möglich. Die gezeigten Ergebnisse zur Untersuchung von asu-NAAG deuten darauf hin, dass es sich bei X nicht um dieses Peptid handelt.

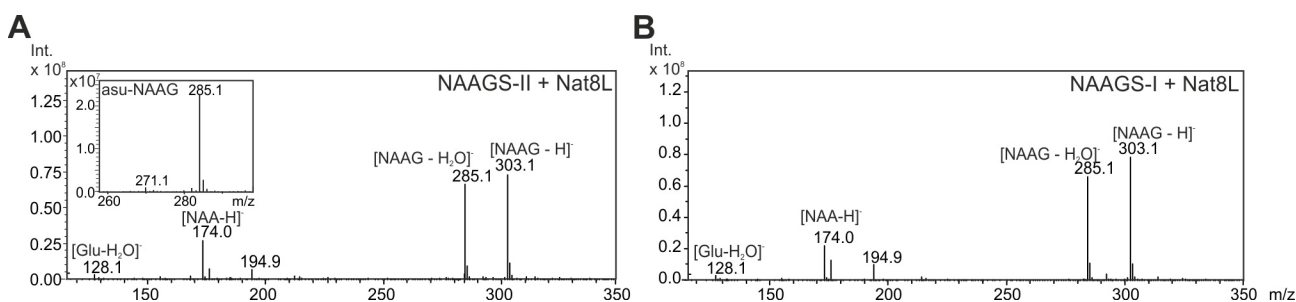


Abbildung 4.6: ESI-MS von asu-NAAG in Zellextrakten. ESI-Spektren von Zellextrakten transfizierter Zellen, die NAAGS-II (A) und die NAAGS-I (B) und die NAA Synthase (Nat8L) exprimieren. Es wurden gleiche Zellzahlen verwendet. Die Signale von NAAG, NAAG-H₂O und NAA, sowie von Glu-H₂O sind deutlich zu erkennen. Zwischen den Spektren gibt es in dem gezeigten Massenbereich keine Unterschiede im Muster und Intensitätsverhältnissen der Signale.

4.1.3 Hydrolyse und Verdau von X

Um die unbekannte Substanz X weiter zu untersuchen, wurde diese präparativ aus der metabolischen Markierung (siehe Methodenteil) zusammen mit NAAG gewonnen. Zur weiteren Untersuchung wurde zuerst eine saure Hydrolyse beider Substanzen durchgeführt. Um enthaltene Aminosäuren identifizieren zu können, wurden hierfür NAAG und X aus der metabolischen Markierung von Zellen isoliert, die mit dem Plasmiden für die NAAGS-II und die NAA-Synthase transfiziert wurden und mit [¹⁴C]-Glutamat markiert wurden. So wurde gesichert, dass jede enthaltene Aminosäure detektiert werden kann. Zur Trennung der Aminosäuren wurde das Hydrolyseprodukt dünnenschichtchromatographisch in einem Laufmittel aus n-Butanol: HAc: H₂O [12:3:5; v:v:v] analysiert. Die TLC zeigt die gleichen Banden, die den Aminosäuren Glutamat und Aspartat zugeordnet werden können, für X wie auch für NAAG (siehe Abbildung 4.7 A). Auffällig war hierbei, dass die Intensität der Glutamatbande bei der Hydrolyse von X stärker war als bei

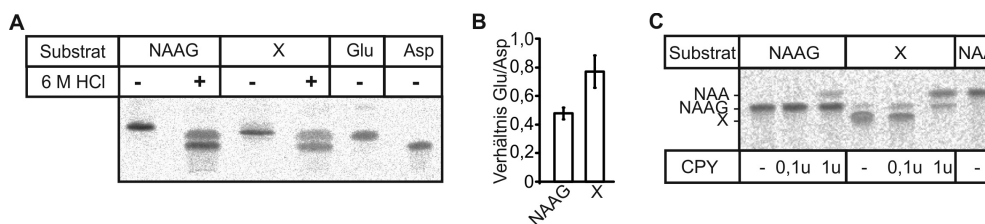


Abbildung 4.7: Saure Hydrolyse von NAAG und X. A) Exemplarische TLC der sauren Hydrolyse von NAAG und X. NAAG und X wurden mit 6M HCl bei 110°C sauer hydrolysiert (+) und die entstandenen Aminosäuren wurden dünn-schichtchromatographisch (n-Butanol:Ac: H₂O 12:3:5) getrennt. Die Aminosäuren beider Substanzen haben das gleiche Laufverhalten wie Aspartat und Glutamat. Das Signal für Glutamat nach Hydrolyse von X scheint im Gegensatz zu dem Signal von hydrolysiertem NAAG verstärkt zu sein. B) Quantitative Auswertung der Verhältnisse von Aspartat und Glutamat in NAAG und X (Mittelwert +/- SD (n = 4) aus vier unabhängigen Experimenten. C) Sowohl NAAG als auch X wurden in Citratpuffer mit verschiedenen Mengen an CPY (0,1 und 1 unit) verdaut und die Produkte dünn-schichtchromatographisch analysiert. Die TLC zeigt NAA als Produkt von NAAG und NAAG und NAA als Produkte von X. (Abbildung entnommen und modifiziert aus Lodder-Gadaczek *et al.*, 2011²⁰)

NAAG. Aufgrund dessen wurden die Banden für Aspartat und Glutamat in vier unabhängigen Versuchen quantifiziert. Das Verhältnis von Glutamat zu Aspartat zeigt für X einen größeren Wert als für NAAG, dieses zeigt, dass X verhältnismäßig mehr Glutamat enthält als NAAG (siehe Abbildung 4.7 B). Dies war ein erstes Indiz dafür, dass es sich bei X eventuell um ein N-acetyliertes Tripeptid mit einem Aspartat- und zwei Glutamat-Resten handelt. Um diese Hypothese weiter zu untersuchen, wurden mit NAAG und X verschiedene Behandlungen mit Carboxypeptidase Y (CPY) durchgeführt. NAAG und X wurden hierbei aus der metabolischen Markierung von Zellen gewonnen, die mit den Plasmiden für NAAGS-II und NaDC3 transfiziert und mit [¹⁴C]-NAA wurden. CPY schneidet Peptide unspezifisch nach jeder Aminosäure. Der enzymatische Verdau mit verschiedenen Konzentrationen an CPY zeigte nach dünn-schichtchromatographischer Trennung NAA als Produkt für NAAG und NAAG und NAA als Produkte für X (Abbildung 4.7 C). Durch die Behandlung von X mit 0,1 unit CPY wurden nur NAAG gebildet, erst hohe Konzentrationen an CPY (1 unit) führten zu einer Bildung von NAA. Glutamat konnte aufgrund der Markierung mit [¹⁴C]-NAA nicht detektiert werden. Dieses lässt darauf schließen, dass X aus einem NAAG mit einer zusätzlichen Glutamat besteht. Es wurde daraufhin untersucht, ob es sich bei dem zweiten Produkt der NAAGS-II um das Tripeptid N-Acetylaspartylglutamylglutamat (NAAG₂) handelt.

4.1.4 Vergleichende dünn-schichtchromatographische Analyse von X und NAAG₂

Um die Hypothese zu beweisen, dass es sich bei X um das Tripeptid NAAG₂ handelt, wurde das Peptid synthetisiert. Das synthetisierte Peptid und Peptidextrakt von Zellen, die mit den Plasmiden für NAAGS-II und NaDC3 transfiziert und mit [¹⁴C]-NAA markiert wurden, wurden dünn-schichtchromatographisch aufgetrennt (CHCl₃:HAc:H₂O [9:5:1; v:v:v]) und mit dem Bioimager und bei einer UV-Absorption von 200 nm detektiert. In der Abbildung 4.8 ist zu sehen, dass X und NAAG₂ das gleiche Laufverhalten zeigen.

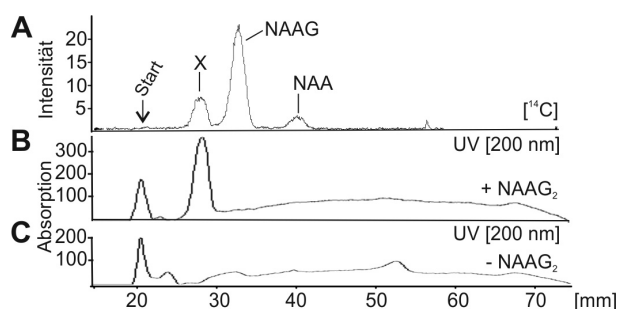


Abbildung 4.8: UV-Adsorption von X. Die dünnstschichtchromatographische Trennung von Peptidextrakten von Zellen, die mit den Plasmiden für NAAGS-II und NaDC3 transfiziert und mit $[^{14}\text{C}]$ -NAA markiert wurden (A), wurde mit einem Bioimager sichtbar gemacht. Im Vergleich wurde ein UV-Scan bei 200 nm in Gegenwart (B) und Abwesenheit (C) von synthetischen NAAG₂ gemacht. X und NAAG₂ zeigen das gleiche Laufverhalten. (Modifiziert nach Lodder-Gadaczek *et al.*, 2011²⁰)

4.2 Untersuchung von NAAG₂ in transfizierten Zellen

Zur weiteren Charakterisierung von NAAG₂ als weiteres Produkt der NAAGS-II wurde untersucht, ob sich das Tripeptid auch in ESI-MS Messungen der Peptidextrakte von transfizierten Zellen wiederfinden lässt. Gezeigt sind die ESI-MS Spektren der Peptidextrakte von transfizierten Zellen, die die NAAGS-II (A) oder NAAGS-I (B) und Nat8L exprimieren (Abbildung 4.9). Es wurden gleiche Zellzahlen verwendet. Die Masse von $m/z = 432$, die der theoretisch berechneten Masse von $[\text{M}-\text{H}^+]$ von NAAG₂ entspricht, ist nur im Peptidextrakt der NAAGS-II zu finden. Das Fragmentierungsmuster entspricht dem des NAAG₂-Standards (siehe Anhang B.1) und ist in Abbildung 4.9 C strukturell aufgeschlüsselt. Auch hier wird vom Peptid zuerst das Wasser der sauren Gruppen abgespalten, wie auch bei NAAG. Als Ionisierungsprodukt erhält man außerdem NAAG-H₂O ($m/z = 285$). NAAG₂ konnte nur in Peptidextrakten von Zellen nachgewiesen werden, die die NAAGS-II exprimieren und NAA enthalten. Zur Quantifizierung der Mengen an NAAG und NAAG₂ in transfizierten Zellen wurden HEK 293 Zellen mit den Plasmiden für die NAAGS-II und Nat8L oder NaDC3 transfiziert. Im Fall von NaDC3 exprimierenden Zellen wurde 10 mM NAA in das Kulturmedium gegeben. Die methanolischen Extrakte wurden 48 h nach Transfektion präpariert und mit HPLC/ESI-MS vermessen (Abbildung 4.10). NAAG wurde durch das UV-Signal der HPLC mit einem externen Standard quantifiziert, NAAG₂ über ESI-MS ($m/z = 432$) mit einem synthetischen externen Standard. Das Detektionsminimum für NAAG lag bei $0,006 \mu\text{mol/g}$ Protein, für NAAG₂ bei $0,5 \text{ nmol/g}$. Zur Quantifizierung wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt und ausgewertet. Als Kontrolle wurde das Plasmid für NAAGS-II alleine transfiziert und es konnte kein NAAG detektiert werden. In Zellextrakten von Zellen, die NAAGS-I und Nat8L exprimieren, konnte kein Signal für NAAG₂ detektiert werden. Die Quantifizierung zeigt, dass in Zellextrakten die Menge an NAAG₂ viel niedriger ist als die Menge an NAAG. Dies bedeutet, dass NAAG das Hauptprodukt der NAAGS-II ist. Auffällig war bei dieser Versuchsreihe, dass es eine gegensätzliche Verteilung von NAAG und NAAG₂ bei den unterschiedlichen Transfektionen gibt. Bei einem großem Angebot an NAA (durch Transfektion mit NaDC3 und Zugabe von 10 mM NAA ins Medium, vergleiche Abbildung 4.10 C) wurde im Vergleich mit einem kleineren Angebot an NAA (durch Synthese in der Zelle) mehr NAAG, aber weniger NAAG₂ gebildet.

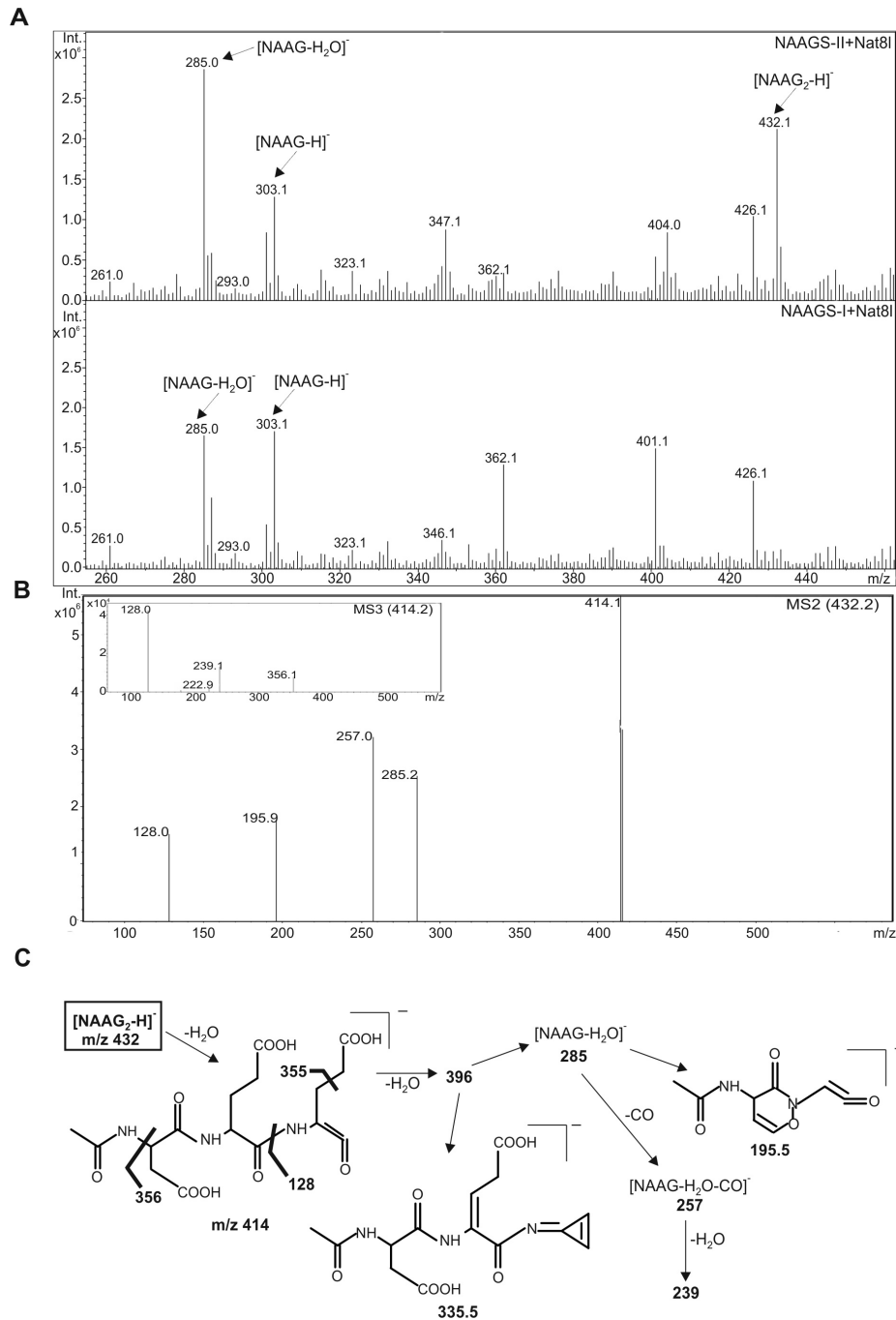


Abbildung 4.9: ESI-MS Spektrum von Peptidextrakten transfizierter Zellen zur Identifizierung von NAAG₂. Die Peptidextrakte von HEK 293 Zellen, die mit den Plasmiden für die NAAGS-II und I und Nat8L transfiziert wurden, wurden mittels ESI-MS vermessen. Im Spektrum der NAAGS-II (A) ist eine Masse von $m/z = 432$ zu detektieren, die im Spektrum von NAAGS-I (B) fehlt. Dieses Signal entspricht der berechneten Masse von $[M-H]^+$ von NAAG₂. Das gezeigte Fragmentierungsmuster entspricht dem Fragmentierungsmuster des NAAG₂ (C) und stimmt mit der Fragmentierung des NAAG₂ Standards überein (siehe Anhang B.1). (Modifiziert nach Lodder-Gadaczek *et al.*, 2011²⁰)

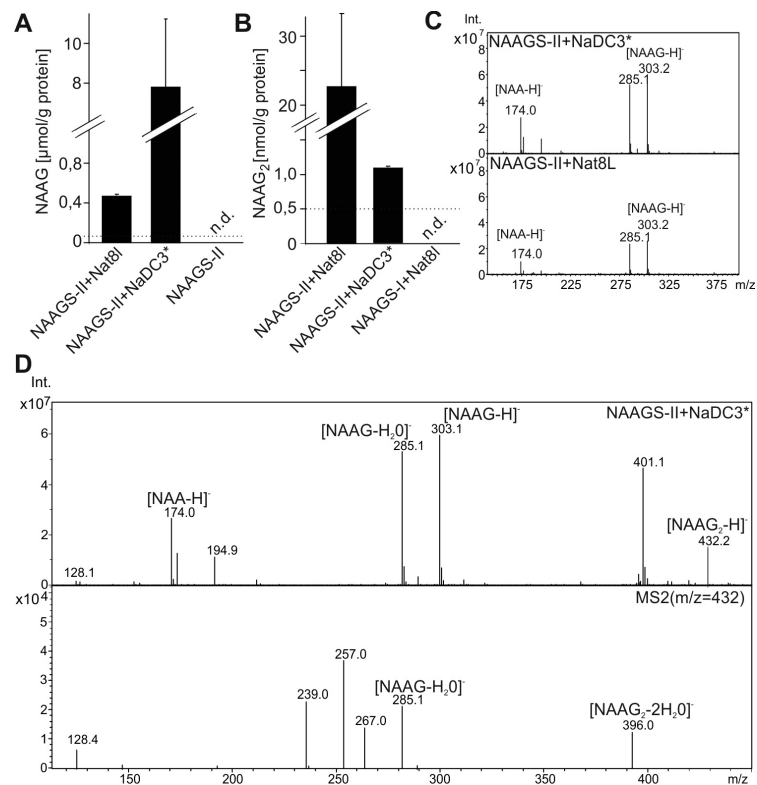


Abbildung 4.10: Quantifizierung von NAAG und NAAG₂ in transfizierten Zellen. Quantifizierung von NAAG (A) und NAAG₂ (B) in Peptidextrakten von transfizierten Zellen. Die HEK 293 Zellen wurden entweder mit den Plasmiden für die NAAGS-II und Nat8L oder NaDC3 transfiziert und mit 10 mM NAA (*) im Medium inkubiert (C,D). Im Vergleich wird mehr NAA von den Zellen aufgenommen, als durch Nat8L synthetisiert wird (C). Die Fragmentierung von NAAG₂ stimmt mit den vorherigen Versuchen überein (D). Die Quantifizierung wurde bei NAAG über das UV-Signal der HPLC mittels externem Standard, für NAAG₂ durch das Signal im ESI/MS-Spektrum durchgeführt. Die Werte entsprechen den Mittelwerten mit Standardabweichungen aus drei unterschiedlichen Versuchen (n = 3, Mittelwert +/- SD). Die gestrichelten Linie in A) und B) entsprechen dem Detektionsminimum. (Modifiziert nach Lodder-Gadaczek *et al.*, 2011²⁰)

4.3 Untersuchungen zum Metabolismus von NAAG₂

4.3.1 Nachweis von NAAG₂ in Mausgewebe

Zur Untersuchung, ob NAAG₂ eine physiologische Rolle zugeschrieben werden kann, wurde zuerst untersucht ob sich NAAG₂ im Mausgewebe finden lässt. Hierzu wurden Peptidextrakte von verschiedenen Geweben angefertigt und mit ESI-MS gemessen. Ionen mit einem m/z-Wert von 432 wurden dabei fragmentiert. Leberextrakt wurde als Negativkontrolle verwendet, da dort kein NAAG zu finden ist. Wie die ESI-MS Messung des Peptidextrakts von Ischiasnerven im Vergleich mit dem der Leber zeigt, kann ein m/z = 432 für [NAAG₂-H⁺] neben NAAG (als [NAAG-H⁺] und [NAAG-H₂O]) detektiert werden (Abbildung 4.11 A). Die Fragmentierung zeigt dasselbe Muster wie in Peptidextrakten von Zellen, die mit NAAGS-II und Nat8L transfiziert wurden und stimmt mit dem NAAG₂-Standard überein (Abbildung 4.11 B). NAAG₂ kann im gesamten zentralen und peripheren Nervensystem von Mäusen gefunden werden (vergleiche Abschnitt 4.4).

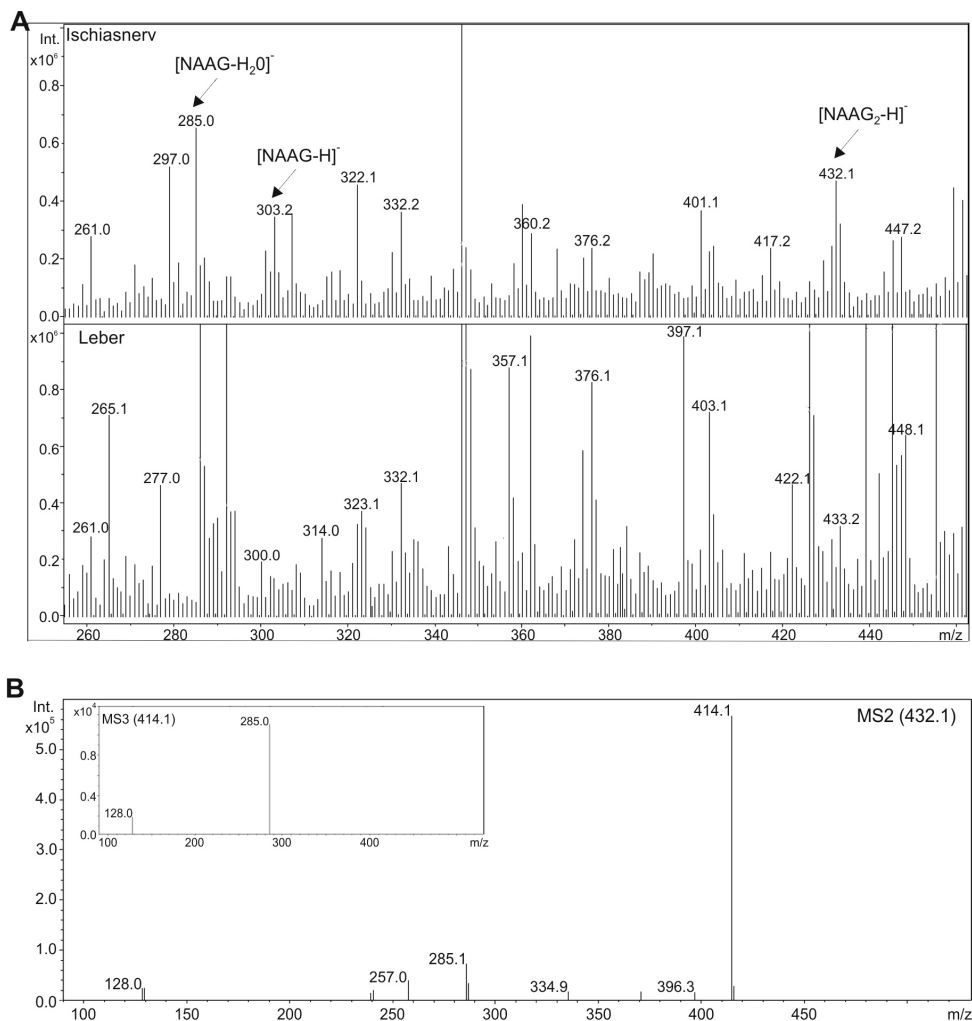


Abbildung 4.11: Nachweis von NAAG₂ im Ischiasnerv. ESI-MS Spektrum von Peptidextrakten aus Ischiasnerv und Leber. Ein $m/z = 432$ für NAAG₂ wird im Peptidextrakt von Ischiasnerven gefunden, nicht aber im ESI-MS Spektrum der Leber (A). Die Fragmentierung (B) zeigt dasselbe Muster wie die Fragmentierung vom NAAG₂-Standard und von Peptidextrakten aus Zellen die mit NAAGS-II und Nat8L transfiziert wurden (Abbildung 4.9). Das $m/z = 414$ entspricht dabei [NAAG₂-H₂O], $m/z = 396$ [NAAG₂-2H₂O] und $m/z = 285$ [NAAG-H₂O].

4.3.2 Hydrolyse von NAAG₂ und NAAG durch GCPII und GCPIII

Bekannt ist, dass die Glutamatcarboxypeptidasen II und III befähigt sind NAAG zu Glutamat und NAA zu hydrolysieren. Dabei hat GCPII die höhere Aktivität^{77, 54, 56}. Dieser Prozess dient einem kontrollierten Abbau von NAAG im zentralen Nervensystem. Hier wurde untersucht, ob auch NAAG₂ ein spezifisches Substrat der Carboxypeptidasen ist.

4.3.2.1 Hydrolyse durch GCPII

Die Hydrolyse der Peptide durch GCPII wurde durch dünn-schichtchromatographische Trennung der Hydrolyseprodukte und anschließender Quantifizierung der Signale analysiert. Verwendet wurden für die Versuche präparativ aufgereinigtes NAAG und NAAG₂, welche durch metabolische Markierung mit [¹⁴C]-NAA von Zellen gewonnen wurden, die mit den Plasmiden für NAAGS-II und NaDC3 transfiziert wurden. Für die Bestimmung enzymkinetischer Parameter wurden Messungen mit verschiedene Mengen an NAAG und

NAAG₂ gemacht (0-50 μM). Diese waren mit einer konstanten Menge an radioaktiver Substanz gemischt. Nach Inkubation bei 37°C wurden Aliquots der Reaktion zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen, die Reaktion durch Erhitzen gestoppt und die Proben auf eine TLC aufgetragen. Nach dünn-schichtchromatographischer Trennung (Laufmittel CHCl₃: HAac: H₂O [9:5:1; v/v/v]) konnten die Signale quantifiziert werden.

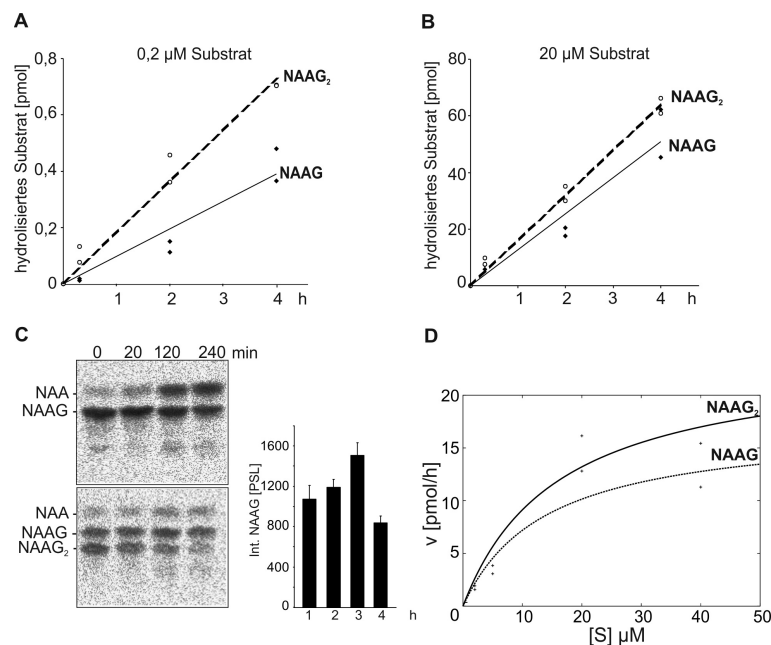


Abbildung 4.12: Hydrolyse durch GCPII. Gezeigt sind die kinetischen Eigenschaften der Hydrolyse von NAAG und NAAG₂. Zu sehen ist die Zunahme an hydrolysiertem Substrat über die Zeit bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen. Hierbei zeigen NAAG und NAAG₂ ähnliches Verhalten (A,B). Der Screen der TLC nach dünn-schichtchromatographischer Trennung der Hydrolyseprodukte zeigt den Abbau von NAAG und NAAG₂ über die Zeit und die Quantifizierung von NAAG im Abbau von NAAG₂ (n = 4, Mittelwert +/- SD) (C). Der Michaelis-Menten-Plot (D) zeigt ähnliche Substrateigenschaften von NAAG und NAAG₂ (n = 2, Mittelwert +/- SD). Der ermittelte K_M und V_{max} -Wert für NAAG betragen 14 μM und 17 pmol/h und für NAAG₂ 16 μM und 23 pmol/h. (Teile der Abbildung entnommen und modifiziert aus Lodder-Gadaczek *et al.*, 2011²⁰)

Es ist ein deutlicher Abbau von NAAG und NAAG₂ über die Zeit zu sehen (Abbildung 4.12 C). Dabei entsteht aus NAAG₂ zuerst NAAG und dann NAA, wie die Quantifizierung des NAAG im NAAG₂ Abbau über die Zeit zeigt (Abbildung 4.12 C). Dies konnte auch schon in den Versuchen mit CPY gezeigt werden (vergleiche Abschnitt 4.1.3). Die zeitliche Auftragung bei verschiedenen Konzentrationen stellt einen konstanten Abbau von NAAG und NAAG₂ (Abbildung 4.12 A,B) dar. Der Michaelis-Menten-Plot der Hydrolyse (Abbildung 4.12, D) zeigt ähnliche kinetische Eigenschaften von NAAG und NAAG₂. Die Bestimmung des K_M - und V_{max} -Wertes ergibt ähnliche Werte für NAAG und NAAG₂. Berechnet aus dem Michaelis-Menten Plot ergibt sich der K_M und V_{max} -Wert für NAAG zu 14 μM und 17 pmol/h und für NAAG₂ zu 16 μM und 23 pmol/h.

4.3.2.2 Hydrolyse durch GCPIII

Für die Untersuchungen zur Hydrolyse von NAAG und NAAG₂ durch GCPIII wurde zuerst GCPIII als pProtA-Plasmid kloniert. Hierfür wurde die entsprechende Gen-Sequenz aus Maus cDNA amplifiziert und in einen pProtA-Vektor kloniert. HEK 293 Zellen wurden anschließend transient mit dem Plasmid transfiziert und das Protein ProtA-GCPIII aus dem Zelllysate mit IgG-Sepharose immunpräzipitiert (Abbildung 4.13). Das präzipitierte Protein wurde so direkt für die Hydrolyse verwendet. Hierfür wurde die Sepharose in

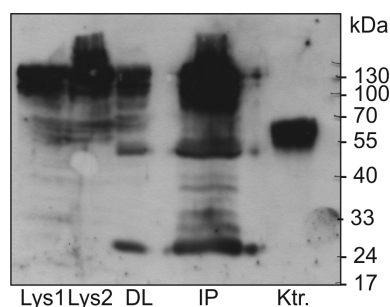


Abbildung 4.13: Immunpräzipitation von ProtA-GCPIII mittels IgG-Sepharose. Zur Aufkonzentrierung von GCPIII wurde dieses als pProtA-Plasmid in HEK-293 eingebracht und anschließend über IgG-Sepharose präzipitiert. Gezeigt sind 10% der Lysate von zwei verschiedenen Transfektionen (Lys 1 und 2), die für die IP gemischt wurden, 20% des Überstands nach Präzipitation (DL) und 10% des Präzipitats. Als positiv Kontrolle (Ktr.) wurde Medium von ProtA-CST (Cerebrosid Sulfotransferase) exprimierenden und sekretierenden Zellen (bekommen von Isabell Zech) verwendet.

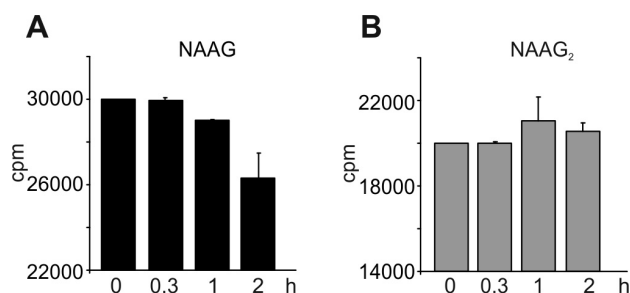


Abbildung 4.14: Abbau von NAAG und NAAG₂ durch GCPIII. Immunpräzipitiertes GCPIII wurde mit NAAG (A) oder NAAG₂ (B) inkubiert und anschließend wurde der Überstand dünn-schichtchromatographisch analysiert. Hiefür wurden immer 10% des Überstands zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen, getrocknet und aufgetragen. Der Abbau der Peptide wurde über die Abnahme des Signals über die Zeit quantifiziert. Hiefür wurden die Signale mit der AIDA software quantifiziert und durch die eingesetzten Mengen auf die cpm umgerechnet (n = 3, Mittelwert +/- SD). Es wurden insgesamt für jeden Versuch 300.000 cpm NAAG und 200.000 cpm NAAG₂ verwendet.

Puffer aufgenommen, die radioaktiv markierten Peptide wurden zugegeben und nach Inkubation bei 37°C wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben des Überstands abgenommen, getrocknet und dünn-schichtchromatographisch untersucht. Die Abnahme des Signals wurde dabei quantifiziert. Es wurden für jeden Versuch Peptidmengen mit 300.000 cpm Aktivität für NAAG und 200.000 cpm für NAAG₂ eingesetzt. Die Auswertung zeigt (Abbildung 4.14), dass kein oder nur sehr wenig NAAG₂ durch GCPIII abgebaut wird. Der Abbau von NAAG liegt nach 2 h bei ungefähr 7 - 10%. Die Hydrolyse von NAAG durch GCPIII ist uneffektiver als durch GCPII (nach 2 h bei 15 - 20%).

4.3.3 Transport von NAAG₂ und NAAG durch Pept2

Pept2 ist ein hoch-affiner, Transporter für Di- und Tripeptide mit geringer Kapazität, im Gegensatz zu Pept1, der gering affin ist, aber eine hohe Kapazität aufweist. Pept2 wird überwiegend in der Niere exprimiert und dient zum Transport von Peptiden aus dem tubulären Lumen. Es wurde gezeigt, dass der Transporter aber auch im zentralen Nervensystem exprimiert wird^{34,78,79}. Für NAAG ist bekannt, dass es durch Pept2 transportiert werden kann⁸⁰. Hier wurde untersucht, ob auch NAAG₂ ein Substrat von Pept2 ist.

Zuerst wurde die cDNA des Transporters kloniert. Aufgrund der Größe wurde dies in zwei Teil-PCRs gemacht. Nach Isolation der einzelnen Fragmente, wurden diese in einer neuen PCR mit den äußeren Primern zu einem Fragment fusioniert. Die Pept2 cDNA wurde zuerst in einen pBlueskript-Vektor kloniert und

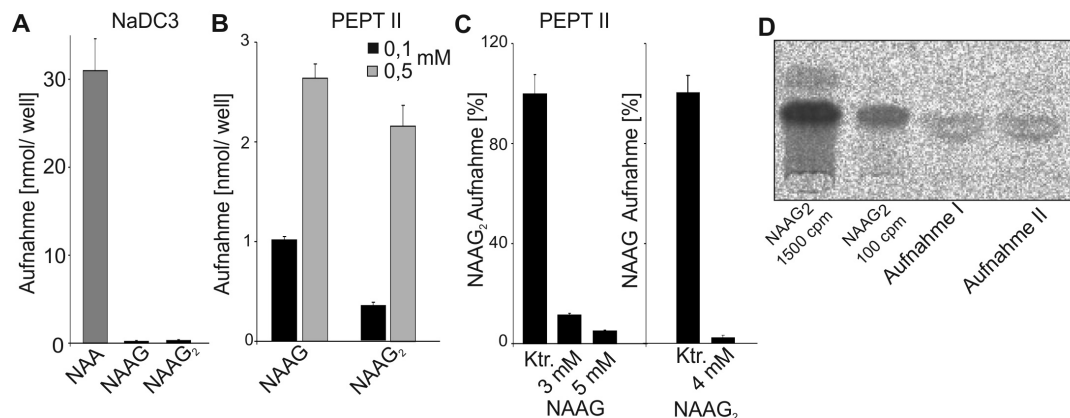


Abbildung 4.15: Transport durch Pept2. Gezeigt ist die Quantifizierung durch Flüssigszintillation nach Transport der Substrate in die Zellen. (A) Transport von NAA durch NaDC3. NAAG und NAAG₂ werden nicht transportiert. (B) Transport von NAAG und NAAG₂ durch Pept2. Die Aufnahme beider Peptide ist konzentrationsabhängig und vergleichbar. (C) Die NAAG₂ Aufnahme kann durch Zugabe von NAAG inhibiert werden und umgekehrt. Die Kontrollen entsprechen dabei der Aufnahme des entsprechenden [¹⁴C]-Peptids in die Pept2 exprimierenden Zellen und diese Menge wurde dabei auf 100% gesetzt. Alle gezeigten Ergebnisse stammen aus vier unabhängigen Experimenten (n = 4, Mittelwert +/- SD). (D) TLC von Peptidextrakten der Zellen nach Aufnahme von NAAG₂. Es wurde NAAG₂ Standard in unterschiedlichen Mengen (Spur 1 und Spur 2) und Peptidextrakte von Pept2 exprimierenden Zellen aufgetragen, die mit NAAG₂ behandelt wurden. Zu sehen sind die Extrakte aus zwei verschiedenen Experimenten (Spur 3 und Spur 4). Das NAAG₂ wurde während des Versuchs nicht zu NAAG degradiert. (Modifiziert nach Lodder-Gadaczek *et al.*, 2011²⁰)

anschließend in einen pEGFP Vektor umklontiert. Für den Transportassay wurden HEKT 293 Zellen mit pEGFP-Pept2 oder pcDNA-NaDC3 transient transfiziert. Nach 20 h wurden die Zellen in einem sauren oder neutralen Puffer mit den Substraten inkubiert, und die Aufnahme der Peptide wurde im Lysat der Zellen durch Flüssigszintillation gemessen oder dünnschichtchromatographisch dargestellt. Als Kontrolle konnte gezeigt werden, dass der NaDC3-Transporter nur NAA transportiert (Abbildung 4.15 A). Pept2 ist in der Lage, sowohl NAAG als auch NAAG₂ zu transportieren (Abbildung 4.15 B). Der Transport von NAAG₂ kann durch größere Mengen an NAAG konzentrationsabhängig inhibiert werden, sowie der Transport von NAAG durch große Mengen an NAAG₂ (Abbildung 4.15 C). Mit der TLC konnte gezeigt werden, dass NAAG₂ durch Pept2 aufgenommen wird und nicht ein Abbauprodukt, dass aus degradiertem NAAG₂ entstehen könnte (Abbildung 4.15 D). Die gezeigten Ergebnisse beziehen sich auf vier unterschiedliche Experimente (n = 4, Mittelwert +/- SD).

4.4 NAA, NAAG und NAAG₂ im zentralen und peripheren Nervensystem

Zur weiteren Charakterisierung einer physiologischen Rolle von NAAG₂ wurde untersucht, in welchen Mengen NAAG₂ im zentralen und peripheren Nervensystem zu finden ist. Zusätzlich wurde untersucht, ob NAAG₂ in NAAGS-II ko Mäusen tatsächlich nicht synthetisiert wird und welche Unterschiede es in der Menge von NAAG und NAA in wt, heterozygoten und ko Mäusen gibt. Über die ESI-MS Messungen (Abbildung 4.16 D) kann durch die Dotierung der Peptidextrakte mit einer definierten Menge ¹³C-markierten Standard, sehr exakt die Menge an Peptiden in den Proben bestimmt werden (*“Spiking”*). Hierbei werden die Signalintensitäten der Peptide mit denen der Standards verglichen und die Mengen über die vorgegebene

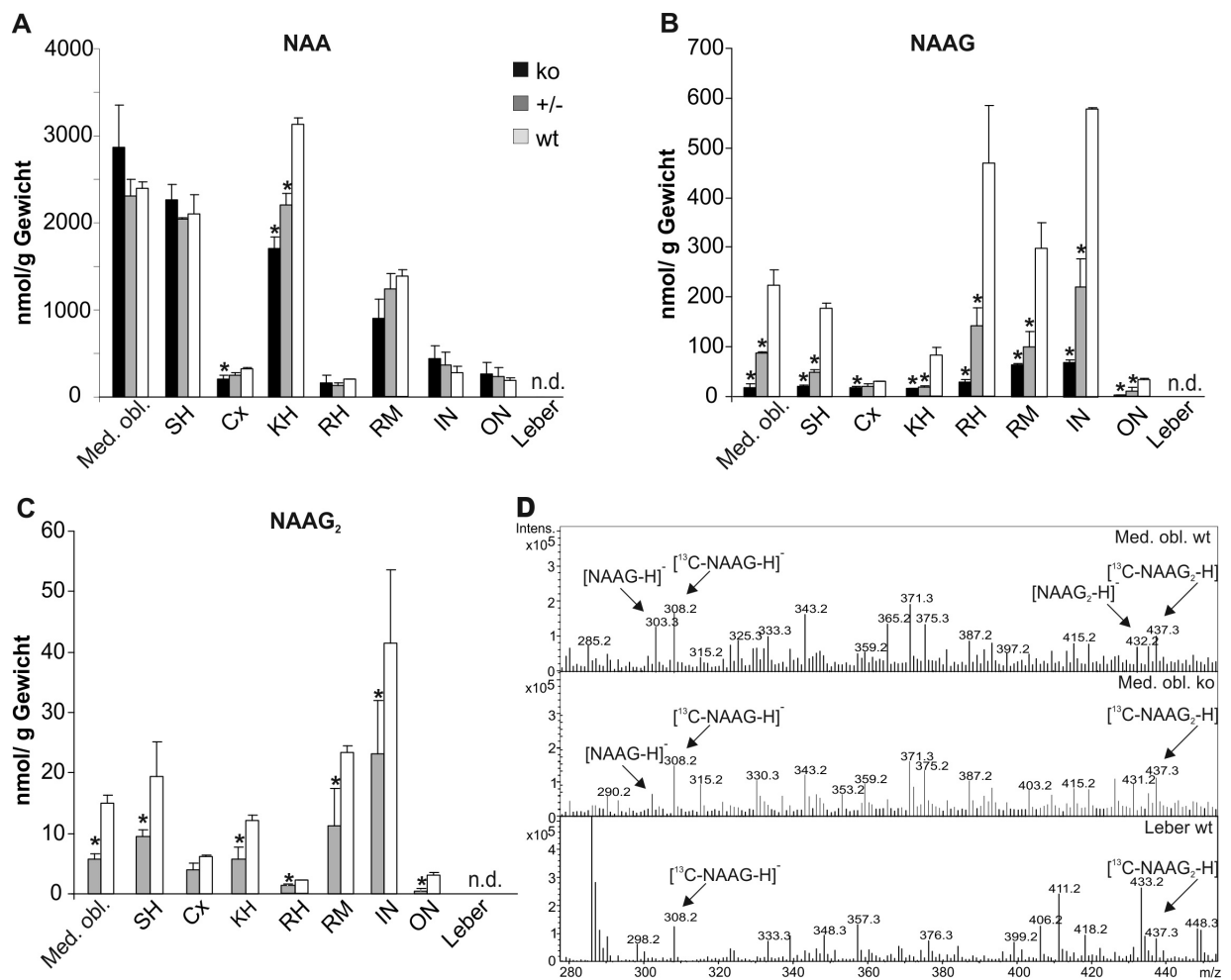


Abbildung 4.16: Quantifizierung von NAA, NAAG und NAAG₂ im Gewebe. Durch ESI-MS Messungen der Peptidextrakten von verschiedenen Geweben in adulten Tieren (6-7 Monate, Weibchen) mit den verschiedenen Genotypen (je Genotyp n = 3) wurde durch den Vergleich mit internem Standard eine Quantifizierung von NAA (A), NAAG (B) und NAAG₂ (C) durchgeführt. Bei der NAAG₂ Messung ist die Quantifizierung in NAAGS-II ko Tieren nicht gezeigt, da NAAG₂ nicht detektiert werden konnte (siehe auch D). Es wurden Medulla oblongata (Med. obl.), Stammhirn (SH), Cortex (Cx), Kleinhirn (KH), restliches Gehirn (RH), Rückenmark (RM), Ischiasnerv (IN), optischer Nerv (ON) und Leber untersucht. NAA ist dabei in den NAAGS-II ko Tieren im Cortex und im Kleinhirn verringert, NAAG im gesamten Nervensystem um 70%. NAAG₂ ist in NAAGS-II ko Tieren nicht mehr zu detektieren, in heterozygoten Mäusen liegt die Verringerung bei 50%. Gezeigt sind die Mengen aus drei verschiedenen Tieren pro Genotyp (n = 3, Mittelwert +/- SD). Signifikante Veränderungen gegenüber den Mengen im wt sind mit * gekennzeichnet (Student'scher t-Test, p < 0,05, n = 3). Exemplarisch gezeigt sind Ausschnitte aus den Massenspektren von Peptidextrakten aus Medulla Oblongata von wt und NAAGS-II ko Tieren im Vergleich mit dem Extrakt aus Leber (wt) (D). Der m/z Wert für [NAAG-H]⁺ von 303,3 ist im NAAGS-II ko nur noch halb intensiv, bei gleicher Intensität des Standards (m/z = 308,2) und in der Leber nicht zu detektieren. Der m/z Wert von 432,2 für [NAAG₂-H]⁺ existiert nur in der Messung der Medulla oblongate im wt, der Standard (m/z = 437,3) zeigt hingegen ähnliche Intensitäten in allen drei Messungen.

Menge des Standards bestimmt. Mögliche Verluste bei der Präparation der Peptidextrakte werden durch die Zugabe der Standards schon bei der Homogenisierung des Gewebes, berücksichtigt. Zur Quantifizierung wurden die Peptidextrakte von drei verschiedenen Tieren (6-7 Monate, Weibchen) pro Genotyp in einer

Doppelbestimmung gemessen. Der Standard wurde in einer Menge von 30-50 nmol zugegeben. Die höchsten Mengen an NAA werden im Kleinhirn (KH), im Stammhirn (SH) und in der Medulla oblongata (Med. obl.) gefunden (Abbildung 4.16 A). Auffällig war hierbei das in NAAGS-II ko Tieren eine signifikante Verringerung von NAA sowohl im Cortex (Cx) als auch im Kleinhirn zu finden ist (*: Student'scher t-Test $p \leq 0,05$, $n=3$). Sowohl Menge als auch Verteilung von NAA stimmen in wt Tieren mit früheren Untersuchungen überein³². NAAG zeigt eine zunehmende Menge in der Verteilung von oben nach unten: Die Menge nimmt vom Stammhirn, über die Medulla oblongata, das Rückenmark (RM) zu den Ischiasnerven (IN) zu (Abbildung 4.16 B). In den NAAGS-II ko Tieren ist eine Erniedrigung von NAAG um bis zu 70% zu erkennen, in heterozygoten Tieren um 30 - 40%. Die niedrigsten Verringerungen sind im Cortex und im Kleinhirn zu finden. Die Verteilung von NAAG₂ entspricht der Verteilung von NAAG, dabei ist NAAG₂ um das zehnbis zwanzigfache niedriger. In NAAGS-II ko Tieren wird kein NAAG₂ mehr detektiert (Abbildung 4.16 C). In heterozygoten Tieren liegt die Menge bei 50% vom wt.

4.5 Altersabhängige Verteilung von NAAG und NAAG₂

Die altersabhängige Verteilung von NAAG und NAAG₂ wurde in 1 (P1), 10 (P10), 15 (P15) und 21 (P21) Tage alten und jung adulten (6-8 Wochen) Tieren der wt, heterozygoten und NAAGS-II ko Mäuse gemessen. Hierzu wurde das Stammhirn verwendet. Aus denselben Gehirnen wurde je aus der linken Hemisphäre RNA und cDNA gewonnen und RT-PCR Untersuchungen durchgeführt. Die rechte Hemisphäre wurde teilweise für Western Blot Untersuchungen und Lipidextraktion verwendet. Die altersabhängige Verteilung

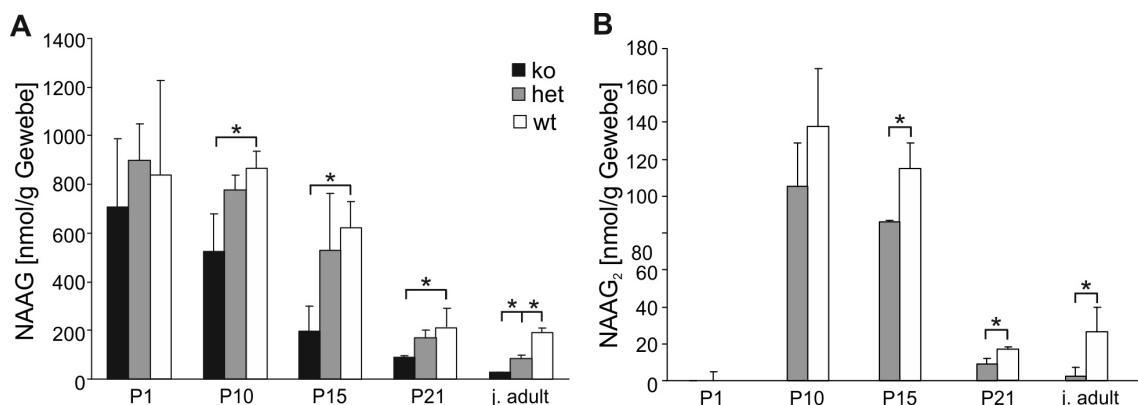


Abbildung 4.17: Altersabhängige Verteilung von NAAG und NAAG₂ in NAAGS-II Tieren aller drei Genotypen. NAAG und NAAG₂ wurden in Tieren unterschiedlichen Alters (1 Tag P1, 10 Tage P10, 15 Tage P15, 21 Tage P21 und jung adult, 6 - 8 Wochen) aller drei Genotypen mittels ESI-MS Messung quantifiziert. Es wurden jeweils drei Tiere pro Genotyp und Altersstufe verwendet ($n = 3$, Mittelwert \pm SD) NAAG₂ ist erst ab Altersstufe P10 detektierbar. Die Erniedrigung von NAAG liegt im adulten NAAGS-II ko Tier bei 70% gegenüber dem wt. NAAG ist im jungen Tier P1-P10 stark hochreguliert. Signifikante Veränderungen (Student'scher t-Test $p < 0,05$, $n = 3$) sind mit * gekennzeichnet.

der Peptide zeigt, dass in einen Tag alten Tieren noch kein NAAG₂ vorhanden ist. Außerdem ist kein NAAG₂ in allen ko Tieren vorhanden. NAAG ist dagegen in einen Tag alten Tieren, normiert auf das Gewicht des Gehirns, stark hochreguliert und in allen drei Genotypen gleichermaßen vorhanden. Ab 10 Tagen ist auch NAAG₂ messbar und in größeren Mengen vorhanden, das NAAG ist in NAAGS-II ko Tieren diesen Alters im Vergleich mit wt Tieren signifikant reduziert (* entspricht Signifikanz nach Student'schen t-Test $p < 0,05$, $n = 3$). Dieser Effekt wird in 15 Tage alten Tieren noch deutlicher, denn ab diesem Alter nehmen sowohl die Menge an NAAG als auch an NAAG₂ wieder ab. In 21 Tage alten und jung adulten Tieren ist NAAG₂ in den heterozygoten Tieren deutlich erniedrigt. In jung adulten NAAGS-II ko Tieren reduziert sich die Menge an NAAG um 70%. Diese Ergebnisse zeigen, dass es eine altersabhängige Expression oder

Kapitel 4. Untersuchung der NAAG Synthetase II

Aktivierung der beiden Synthetasen zu geben scheint. Dabei scheint die NAAGS-I eher im pränatalen und frühen postnatalen Alter eine Rolle zu spielen und die NAAGS-II erst im späteren Alter.

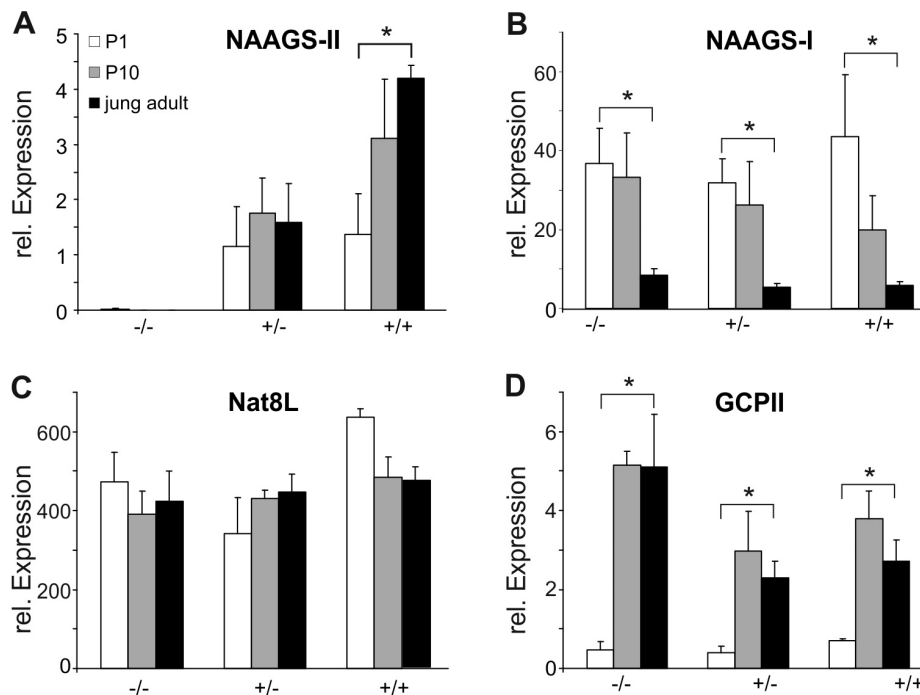


Abbildung 4.18: Quantitative Real-time PCR von Maus cDNA verschiedener Altersstufen. Untersucht wurde die Expression der Gene der NAAGS-I und II, der NAA Synthase (Nat8L) und GCPII in allen drei Genotypen (-/- ko, +/- heterozygot, +/+ wt) der NAAGS-II Maus in den Altersstufen ein Tag (P1), 10 Tage (P10) und jung adult (6-8 Wochen). Die relative Expression wurde durch die $2^{-\Delta C_T}$ mit Ubiquitin als "House-keeping" Gen ermittelt. Gezeigt sind die Daten von jeweils drei Tieren pro Genotyp und Altersstufe (n = 3, Mittelwert +/- SD). Signifikante Unterschiede sind durch * gekennzeichnet (Student'scher t-Test p < 0,05, n = 3).

Für die quantitative Real-time PCR wurde cDNA verwendet die aus den Gehirnen verschieden alter Mäuse gewonnen wurde (siehe oben). Aus dem Gewebe wurde die RNA isoliert, durch reverse Transkriptase die cDNA gewonnen und die Real-time PCR mittels SYBR Green System durchgeführt. Es wurden Primer für die Gene der beiden NAAG Synthetasen, der NAA Synthase und GCPII verwendet. In den NAAGS-II ko Tieren wurde kein Signal für das NAAGS-II Gen detektiert. Die Expression in einen Tag alten Tieren gegenüber jung adulten Tieren liegt um das Vierfache niedriger. Das Gen der NAAGS-I ist im adulten Tier im Vergleich mit einen oder zehn Tage alten Tieren herunter reguliert. Die Expression von NAA Synthase (Nat8L) ist in allen Altersstufen unabhängig vom Genotyp annähernd gleich. Die GCPII Expression steigt ab dem Alter von 10 Tagen an und ist in den NAAGS-II ko Tieren gegenüber den heterozygoten und wt Tieren hochreguliert. Die Verteilung der Genexpression zeigt, dass die NAAGS-I in der pränatalen und frühen postnatalen Phase stärker gebildet wird, die NAAGS-II hingegen wird erst im adulten Alter stärker exprimiert.

4.6 Untersuchungen zu neuroprotektiven Eigenschaften von NAAG in Primärkulturen

Die in der Literatur beschriebenen Experimente zur Untersuchung der neuroprotektiven Wirkung von NAAG verwenden GCPII/GCPIII Inhibitoren in Neuronen-Glia-Mischkulturen^{48,52,81}. Diese werden entweder direkt aus Ratten als Mischkulturen gewonnen oder die Neuronen werden auf einem Astrozytenbett ausgesät. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Inhibition von GCPII und GCPIII einen neuroprotektiven Effekt auf induzierte Neurotoxizität hat, ob dieser Effekt auch in reinen Neuronenkulturen zu sehen ist und ob ein Unterschied zwischen wt Neuronen und NAAGS-II defizienten Neuronen besteht. Für die Experimente wurden cortikale Neuronen Primärkulturen aus Embryonen (E 14,5) gewonnen und in 6-well Platten ausgesät. Im Falle der Mischkulturen wurden die Neuronen auf das Astrozytenbett ausgesät. Das Verhältnis von Neuronen zu Astrozyten beträgt dabei 80% zu 20%. Die Astrozyten wurden dafür aus Tieren isoliert, die einen Tag alt waren und zweimal passagiert und 24 bis 48 h vor den Neuronen ausgesät. Drei Tage nach Neuronenisolation wurde die Proliferation mit Cytosin Arabinosid gestoppt. 8 - 10 Tage nach Neuronenisolation wurde die Kulturen mit Desoxyglucose und Kaliumcyanid (DO+KCN) zur Inhibition der Glykolyse, oder mit NMDA zur Überaktivierung des NMDA-Rezeptors behandelt. Dies führt zu einer Überproduktion an Glutamat. Gleichzeitig erfolgte auch die Gabe von 2-PMPA. Nach einer 24-stündigen Regenerationsphase wurde die Menge der Lactatdehydrogenase (LDH) sowohl im Überstand als auch im Zellysat gemessen.

Wie in Abbildung 4.19 gezeigt, unterscheiden sich die Rein- und Mischkulturen morphologisch stark voneinander. Die Neuronen wurden mit Antikörper gegen die schwere Kette von Neurofilament (rot) gefärbt, die Astrozyten wurden mit GFAP Antikörper sichtbar (grün) gemacht. In Abbildung 4.19 A ist eine reine wt Neuronenkultur nach 7 Tagen zu sehen, in Abbildung 4.19 B eine vergleichbare wt Mischkultur nach derselben Zeit. In der Reinkultur liegen die Neuronen ausgebreitet vor und zeigen Ausläufer zu anderen Neuronen. In der Mischkultur befinden sich die Neuronen in inselförmigen Gruppen auf den Astrozyten und bilden sehr lange Ausläufer zur nächsten Gruppierung (am besten zu sehen in Abbildung 4.19 B, Durchlicht). Die Sterberate der Neuronen in der Mischkultur ist in den ersten sieben Tagen sehr viel höher als in der Reinkultur, es überleben fast nur Neuronen in unmittelbarer Umgebung von Astrozyten.

Die LDH Menge im Medium der Zellen ist proportional zu ihrer Sterberate, abgestorbenen Zellen setzen LDH frei und es wird im Medium messbar. Die Bildung des Verhältnis der LDH Aktivität im Medium zur Gesamt-LDH Aktivität kann als Maß für die Sterberate verwendet werden. Gezeigt sind jeweils Duplett-Bestimmungen aus zwei unterschiedlichen Versuchen verschiedener Präparationen (Mittelwert +/- SD, n = 2). Die Kontrollen sind Zellen, die nicht mit einer Substanz behandelt wurden, aber die Behandlungsart durchgeführt wurde. In reinen Neuronenkulturen beträgt die Sterberate in wt Neuronen, ausgelöst durch die toxischen Substanzen, das 1,5-fache der Kontrollen. Dieses kann durch Zugabe von 2-PMPA signifikant auf das 1,3-fache verringert werden (Abbildung 4.20 A). In den NAAGS-II ko Neuronen ist die Sterberate 1,5 Mal so hoch wie in der Kontrolle und kann nicht durch Gabe von 2-PMPA verringert werden.

In den Mischkulturen ist die Sterberate in wt Neuronen/Astrozyten Mischkulturen für die Behandlung mit DO und KCN 2,5-fach höher als in der Kontrolle, für NMDA 1,5-fach. Dieses kann durch Gabe von 2-PMPA auf Kontrollniveau gebracht werden (Abbildung 4.20 B). Auffällig ist hierbei, dass schon in den unbehandelten Kontrollzellen 2-PMPA eine Verbesserung bewirkt. In den Mischkulturen aus NAAGS-II ko Neuronen und wt Astrozyten ist die Sterberate für DO und KCN Behandlung 3,5-fach so hoch wie in der Kontrolle und bei NMDA Behandlung 2,5-fach höher. Dieses kann durch Gabe von 2-PMPA um 50% verbessert werden. Hier führt eine 2-PMPA Behandlung der Kontrolle nicht zu einer Verbesserung. Als weiterer Versuch wurde die NAAG Menge quantitativ mit LC-MS-Messung in wt und NAAGS-II ko Neuronen im Peptidextrakt und im Medium bestimmt (Abbildung 4.20 C). Hierfür wurden für jede

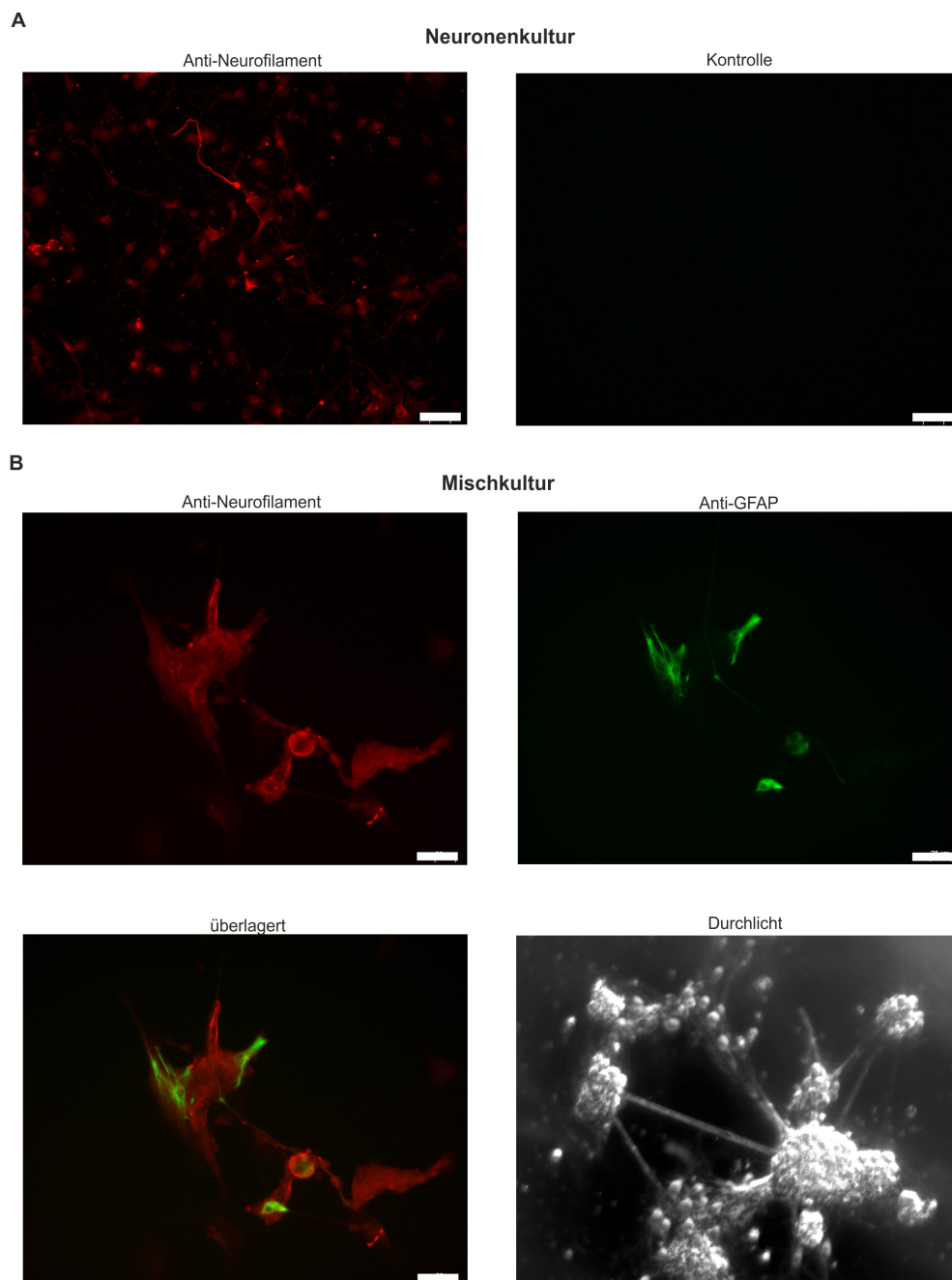


Abbildung 4.19: Mikroskopische Aufnahmen von wt Neuronen- und wt Mischkulturen. Die Neuronen wurden mit Antikörper gegen Neurofilament (rot) detektiert. Die Astrozyten mit Antikörper gegen GFAP (grün). In A) ist eine reine Neuronenkultur zu sehen, die Kontrolle ist die Färbung ohne Inkubation mit Sekundärantikörper. In B) ist die Immunfluoreszenzfärbung der Mischkultur und die Mischkultur im Durchlicht gezeigt. Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurde ein 20er Objektiv verwendet, für die Durchlichtaufnahme ein 10er Objektiv. Der Masstabsbalken beträgt 30 μm .

Messung jeweils Zellen und Überstand von einer 10cm Schale verwendet. Die quantitative Bestimmung ($n = 3$, Mittelwert \pm SD) zeigt eine signifikante Verringerung von NAAG in NAAGS-II ko Neuronen gegenüber wt Neuronen von 35%. Im Medium beträgt der Unterschied 70%. Während in den wt Neuronen die Menge an NAAG im Medium das Doppelte vom NAAG in den Extrakten der Zellen beträgt, liegt der Anteil bei den NAAGS-II ko Neuronen nur bei 4/5.

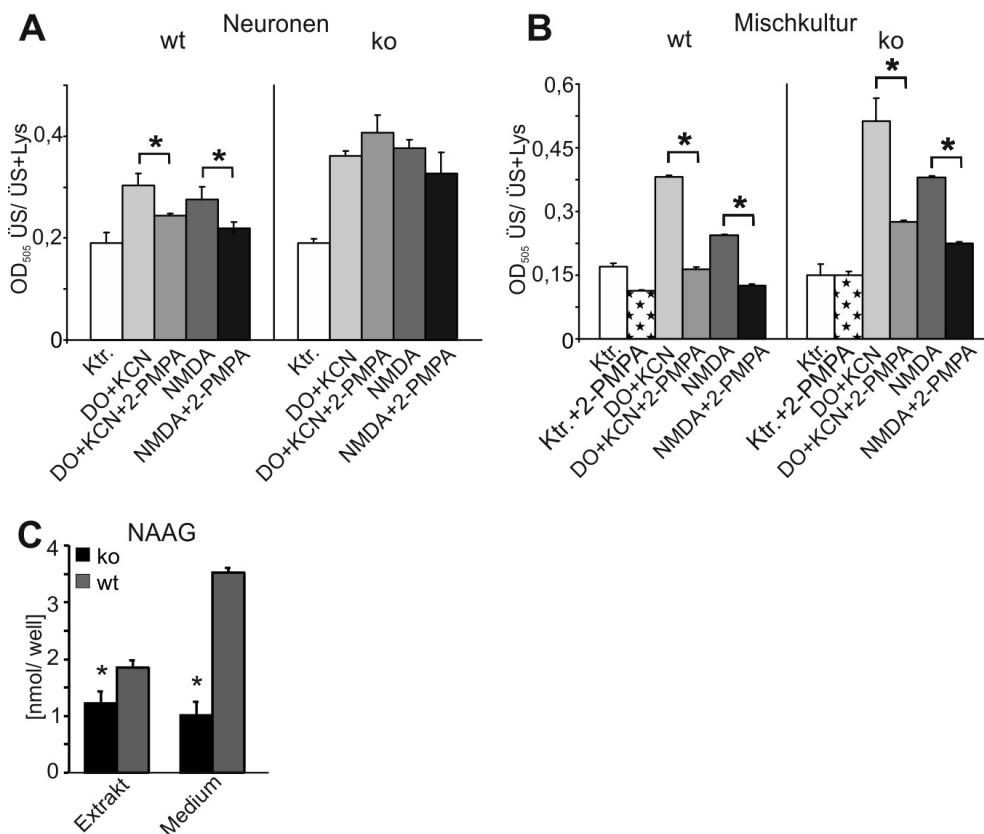


Abbildung 4.20: Sterberate von neurotoxisch behandelten Neuronen- und Mischkulturen. Gezeigt sind der Einfluss von Desoxyglucose und Kaliumcyanid (DO+KCN) oder NMDA auf Neuronen- und Neuronen-Astrozyten-Mischkulturen, die teilweise zusätzlich mit dem GCPII Inhibitor 2-PMPA (+2-PMPA) behandelt wurden. In den Kontrollen (Ktr.) erfolgte keine neurotoxische Behandlung. Es wurden wt und NAAGS-II ko Neuronenkulturen verwendet (A), sowie wt Mischkulturen und Mischkulturen aus NAAGS-II ko Neuronen und wt Astrozyten (B). Es wurden jeweils Duplettbestimmungen von zwei unabhängigen Versuchen verschiedener Präparationen gemacht (Mittelwert +/- SD, n = 2). In C) ist die quantitative Messung von NAAG in Extrakten und im Medium von wt und NAAGS-II ko Neuronen zu sehen, hierfür wurden jeweils die Zellen von einer 10cm Schale pro Messung verwendet. Gezeigt sind drei unabhängige Messungen aus verschiedenen Schalen (Mittelwert +/- SD, n = 3). Signifikanz nach dem Student'schen t-Test (p < 0,05, n = 2 oder 3) ist durch * gekennzeichnet.

4.7 Untersuchungen in anderen Tiermodellen

4.7.1 Untersuchung in ASPA defizienten Mäusen

Im Mausmodell der Canavan Krankheit (ASPA defiziente Mäuse), besteht eine Mutation des Gens der Aspartoacylase. Die Inaktivierung der Aspartoacylase verhindert in Zellen, hauptsächlich in Oligodendrozyten, einen Abbau von NAA zu Aspartat und Acetat und es kommt zur Akkumulation von NAA. Gezeigt wurde im Liquor von Patienten der Canavan Krankheit, dass es auch zu einer Erhöhung von NAAG kommt^{46,82}. Hier sollte untersucht werden, ob dieser Effekt auch im Mausmodell zu finden ist und ob dies eventuell an einer erhöhten Expression der Synthetasen liegt. Es wurde Gewebe aus 4 - 6 Wochen alten Tieren verwendet (n = 3, Mittelwert +/- SD). Die Analyse der Peptide aus Extrakten des Gehirns zeigt eine Erhöhung von NAA in ASPA defizienten Tieren gegenüber den wt Tieren um 50%, auch NAAG und NAAG₂ sind in ASPA defizienten Tieren signifikant erhöht gegenüber den wt Tieren (Student'scher tTest, p < 0,05, n = 3) (Abbildung 4.21 A). Der Anstieg von NAAG und NAAG₂ liegt bei 35%. Es wurden Real-time PCR Untersuchungen aus Gehirn cDNA zur Quantifizierung der Expression der Gene der NAAGS-I und II, der NAA Synthase Nat8L und GCPII gemacht.

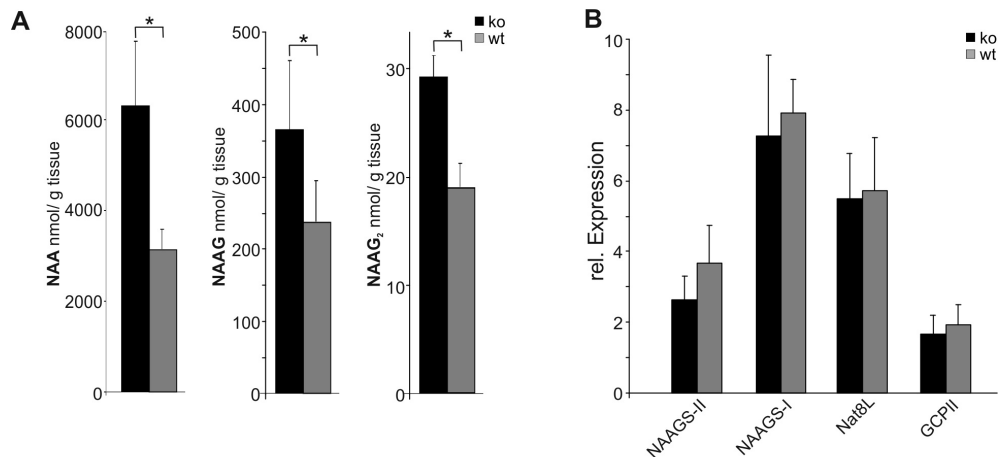


Abbildung 4.21: Untersuchung von ASPA defizienten Mäusen. Untersucht wurden die Peptidlevel und die Genexpression von Mäusen mit einer Fehlfunktion der Aspartoacylase (Canavan Krankheit, ASPA ko) im Vergleich mit wt Mäusen. Für die Peptidmessungen (A) wurde 1/2 Gehirn von 4 - 6 Wochen alten Mäusen verwendet (n = 3, Mittelwert +/- SD). Für die Real-time PCR cDNA aus der anderen Hälfte. Die Peptidmessungen zeigen eine Akkumulation von NAA, NAAG und NAAG₂ in den ASPA defizienten Mäusen gegenüber den wt Mäusen. Die signifikante Erhöhung der Peptidmengen in den ASPA ko Tieren ist mit * gekennzeichnet (Student'scher t-Test p < 0,05, n = 3). Die relative Genexpression wurde mit der 2^{-ΔC_T} mit Ubiquitin als "House-keeping" Gen ermittelt, es sind keine signifikanten Unterschiede messbar.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Expression zwischen wt Tieren und ASPA ko Mäusen gefunden werden (Abbildung 4.21 B).

4.7.2 Untersuchung in Nat8L ko Tieren

Auch in Nat8L ko Tieren wurden die Peptide gemessen und quantifiziert. Hierfür wurden Proben des Gehirns und Ischiasnerven von jeweils drei Tieren pro Genotyp verwendet. In den Nat8L ko Tieren wurden weder NAA noch NAAG und NAAG₂ detektiert (Abbildung 4.20). Das Signal welches noch detektiert werden kann, gehört zur Hintergrundmessung bedingt durch das Isotopenmuster der Signale m/z = 301,9 und m/z = 431,1. In den heterozygoten Tieren konnte ein signifikanter Rückgang an NAA gegenüber den wt Tieren um 50% gemessen werden. Es war keine Erniedrigung von NAAG und NAAG₂ messbar.

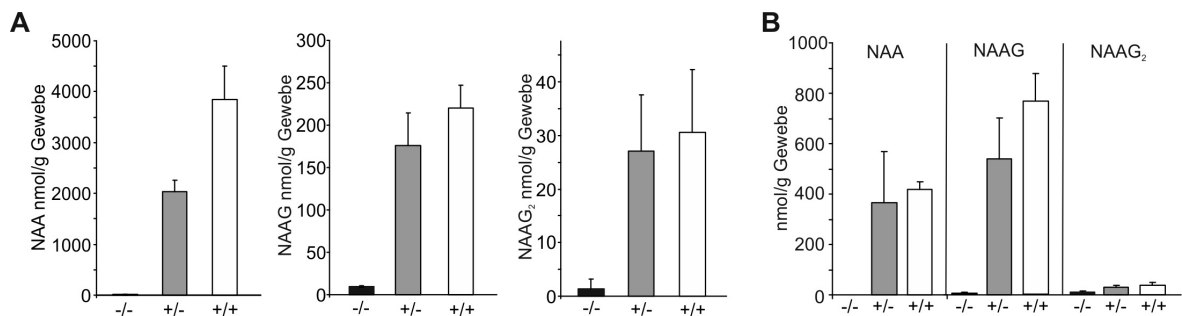


Abbildung 4.22: Untersuchung der Peptide in Nat8L ko Mäusen. Untersucht wurden Gehirnproben (A) und Ischiasnerven (B). Die Quantifizierung von NAA, NAA und NAAG₂ zeigt einen Rückgang von NAA im heterozygoten Tier von 50%, aber keinen Rückgang von NAAG oder NAAG₂. In Nat8L ko Tieren sind die Peptide nicht mehr detektierbar (n = 3, Mittelwert +/- SD). Die vermeintlichen Mengen an NAAG und NAAG₂, die noch gemessen werden, kommen aus den Signalen der Isotopenmuster von m/z = 301,9 und m/z = 431,1.

Kapitel 5

Sialin als NAAG Transporter

Im postulierten Metabolismus ist beschrieben, dass NAAG an Synapsen Calcium-abhängig freigesetzt wird. Nicht bekannt ist der Transportweg des Neuropeptids in synaptische Vesikel. Ein möglicher Kandidat sollte hier untersucht werden. Sialin (SLC17A5), ist bekannt als lysosomaler H^+ /Sialinsäure Cotransporter. Es wurde gezeigt, dass dieser Transporter auch Glutamat und Aspartat transportieren kann⁸³. Er gehört wie die vesikulären Glutamattransporter (VGLut) zur SLC17 Typ I Phosphat Transporter Familie. Sialin wird auch in vielen extralysosomalen Bereichen in verschiedenen Regionen des ganzen zentralen Nervensystems exprimiert^{84,85} und wird stark in Neuronen exprimiert. In verschiedenen Leukodystrophien ist bekannt, dass es eine starke Erhöhung von NAAG im Liquor der Patienten gibt, zum Beispiel in der Pelizaeus-Merzbacher Krankheit (PMD) oder Pelizaeus-Merzbacher ähnlichen Krankheit (PMLD) und auch in der SALLA Erkrankung (SD), der Mutationen im Sialin Gen zugrunde liegen^{47,82,86}.

5.1 Transport von NAAG in synaptische Vesikel

Für die Untersuchungen zum Transport von NAAG in synaptische Vesikel, wurde eine Mikrovesikelfraktion aus Gehirnen von adulten Mäusen angereichert (siehe Material und Methoden), die zum großen Teil aus synaptischen Vesikeln besteht. Hierzu wurden verschiedene Zentrifugationsschritte und die Aufreinigung über einen Sucrosegradienten durchgeführt. Die Güte der Vesikelfraktion wurde mittels Western Blot (Abbildung 5.1) und Proteom Analysen überprüft. Im Western Blot konnte die Anreicherung an Synaptophysin, als Marker für vesikuläre Kompartimente detektiert werden. Außerdem konnte gezeigt werden,

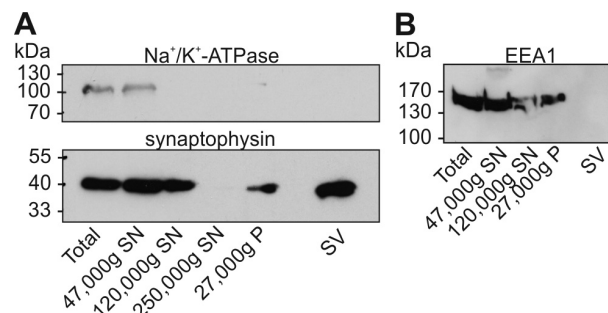


Abbildung 5.1: Western Blot der Anreicherung der Mikrovesikel aus Mausgewebe. Gezeigt sind exemplarische Western Blots der Anreicherung der Vesikel gegen Synaptophysin als Marker für vesikuläre Kompartimente, Na^+/K^+ -ATPase als Membranprotein und EEA1 als endosomaler Marker. Aufgetragen wurden gleiche Mengen ($10 \mu g$) jeder Fraktion. Zu erkennen ist eine deutliche Anreicherung von Synaptophysin in der Vesikel Fraktion (SV). Im Gegensatz dazu ist kein Signal mehr für die Na^+/K^+ -ATPase mehr zu sehen, als Marker für Plasmamembran(A). Auch ist kein EEA1 Signal in der Vesikelfraktion mehr sichtbar (B).

dass keine Plasmamembran-ständigen Proteine und keine endosomalen Kompartimente mehr enthalten waren, im Western Blot gegen Na^+/K^+ -ATPase und EEA1 war kein Signal mehr zu detektieren. Die Proteom Analysen zeigten eine 60%ige Übereinstimmung der Proteine, im Vergleich mit der Analyse von synaptischen Vesikeln aus Ratten (Daten nicht gezeigt). Für den Transportassay wurden Vesikel mit einer Gesamtproteinmenge von 1 mg/ml verwendet. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Reaktionspuffers gestartet und für 10 Minuten bei 32°C inkubiert. Der Reaktionspuffer enthielt KCl, MgSO_4 , ATP (als Kontrolle nicht enthalten), und radioaktiv markiertes Substrat, sowie verschiedene Substanzen als Inhibitoren (Sialinsäure, Gramicidin D, FCCCP, Aspartat, Glutamat). Die Vesikel wurden nach der Reaktionszeit über eine Nitrocellulosemembran gefiltert, gewaschen und die gebundene Radioaktivität wurde anschließend mit Flüssigszintillation gemessen. Die Messungen zeigen eine ATP-abhängige Aufnahme von NAAG in synaptische Vesikel (Abbildung 5.2 A). Diese Aufnahme kann durch die Zugabe an Gramicidin D oder FCCCP als Entkopplungsreagenzien gehemmt werden. Die Aufnahme wird auch durch Zugabe von Sialinsäure (Neu5Ac), Glutamat oder Aspartat im Überschuss (2,5 mM bzw. 2,0 mM) gehemmt. Die Aufnahme von Aspartat ist ebenfalls ATP-abhängig und kann durch Zugabe von hohen Mengen an NAAG (2,5 mM) gehemmt werden (Abbildung 5.2 B). Zur Leerwertbestimmung wurden Proben verwendet die 10 sek auf Eis inkubiert wurden (ctr.). Dieser Versuch zeigt, dass NAAG ATP-abhängig in Vesikel transportiert wird und dass dieser Transport durch Sialinsäure gehemmt werden kann. Dieses gab einen ersten Hinweis darauf, dass Sialin ein möglicher Transporter ist.

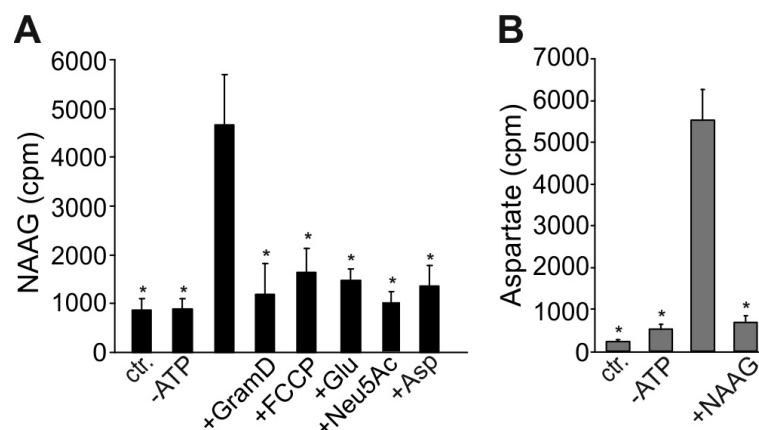


Abbildung 5.2: Transport von NAAG in Mikrovesikel. NAAG wird in die Mikrovesikel ATP-abhängig aufgenommen. Diese Aufnahme kann durch FCCCP (+FCCP) oder Gramicidin D (+GramD) als Entkopplerreagenzien oder durch Zugabe von hohen Dosen an Glutamat (+Glu) oder Sialinsäure (+Neu5Ac) oder Aspartat (+Asp) gehemmt werden (A). Bei diesen Transportversuchen wurden 500.000 cpm NAAG oder Aspartat (B) pro Ansatz eingesetzt. Die Aufnahme von Aspartat wird durch Zugabe von NAAG (+NAAG) ebenfalls gehemmt. Die Aufnahme von Aspartat und NAAG erfolgt nicht, wenn dem System kein ATP zugefügt wird (-ATP). Als Kontrolle (ctr.) wurden Proben verwendet, die 10 sek auf Eis inkubiert wurden um die Werte für unspezifisch gebundene Substrate zu erhalten. Es wurden je vier unabhängige Versuche durchgeführt (Mittelwert \pm SD, $n = 4$). Die Hemmung der Aufnahme ist in allen Fällen statistisch signifikant (Student'scher t-Test *: $p < 0,05$, $n = 4$) im Vergleich mit dem Transport unter Standardbedingungen.

Zur weiteren Untersuchung wurden kinetische Messungen des Transports durchgeführt. Hierzu wurden verschiedene Konzentrationen (0,5 - 3 mM) an NAAG oder Aspartat eingesetzt und die Aufnahme wurde nach einer Minute Inkubationszeit gemessen. Aus dem Michaelis-Menten Plot konnten so der K_M -Wert und der V_{max} -Wert bestimmt werden. Für NAAG ergibt sich ein K_M -Wert von $0,78 \pm 0,12$ mM und eine V_{max} -Wert von $32,9 \pm 11,2$ nmol/mg Protein pro Minute (Abbildung 5.3 A). Für Aspartat wurde der K_M -Wert als $0,90 \pm 0,16$ mM und der V_{max} -Wert als $51,8 \pm 3,1$ nmol/mg Protein pro Minute bestimmt (Abbildung 5.3 B). Diese Daten zeigen, dass NAAG und Aspartat ähnlich gute Substrate für die Aufnahme in Vesikel sind.

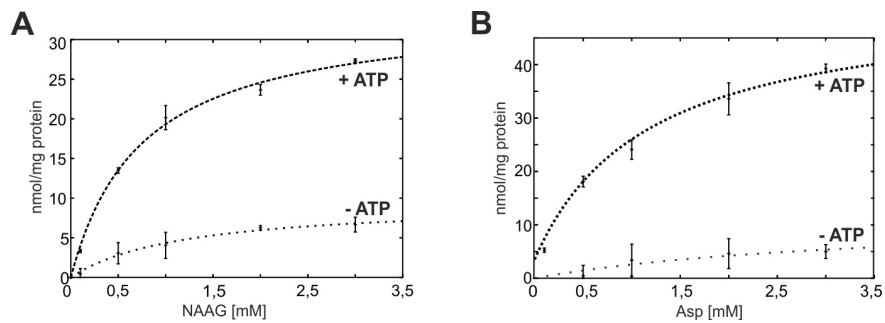


Abbildung 5.3: Michaelis-Menten-Plot der Aufnahme von NAAG und Aspartat in Vesikel. Gemessen wurde die Aufnahme von NAAG und Aspartat nach einer Minute bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen (0,5 - 3 mM) ($n = 2$, Mittelwert \pm SD). Für NAAG ergibt sich ein K_M -Wert von $0,78 \pm 0,12$ mM und ein V_{max} -Wert von $32,9 \pm 11,2$ nmol/mg Protein pro Minute (A). Für Aspartat wurde der K_M -Wert als $0,90 \pm 0,16$ mM und der V_{max} -Wert als $51,8 \pm 3,1$ nmol/mg Protein pro Minute bestimmt (B).

5.2 Aufnahme von NAAG durch Sialin im *in vitro* Zellversuch

Zur *in vitro* Untersuchung der Aufnahme von NAAG durch Sialin wurden verschiedene Zellkulturexperimente etabliert. Zum Testen wurden die Zellen in einem alkalischen Puffer (Krebs-Ringer-Lösung, gepuffert mit Glycylglycin $\text{pH} = 9$) inkubiert um einen pH-Gradienten zu simulieren. Die Zellen wurden mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert und 24 h nach Transfektion mit $[^{14}\text{C}]$ -NAAG in Krebs-Ringer-Lösung für 45 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden im Anschluss mehrfach gewaschen und der letzte Waschschritt wurde mit Flüssigszintillation gemessen, um die Effizienz der Waschschritte zu überprüfen. Es wurden nur Proben verwendet bei denen der letzte Waschschritt eine Messung von unter 60 cpm ergab. Es wurden EGFP-Sialin, die Oberflächenvariante Sialin-L22/23A und EGFP als Kontrolle exprimiert. Die Aufnahme von NAAG erfolgte in Zellen, die mit dem Plasmid für Sialin transfiziert wurden. Eine stärkere Aufnahme konnte detektiert werden, wenn die Oberflächenvariante exprimiert wurde. In EGFP exprimierenden Zellen konnte keine Aufnahme gemessen werden (Abbildung 5.4 A). Als Kontrolle für gleiche Markierung wurden die radioaktiv markierten Überstände der Zellen (Medium) mit aufgetragen. Die Immunfluoreszenz mit der Kofärbung von Lamp-2 zeigt die lysosomale Verteilung des EGFP-Sialin (Abbildung 5.4 B) im Gegensatz zur oberflächenlokalisierten Verteilung der Mutante EGFP-Sialin-L22/23A, der das lysosomale Rückhaltesignal fehlt (Abbildung 5.4 C). Da die Aufnahme an NAAG in die Zellen sehr gering war, wurde im

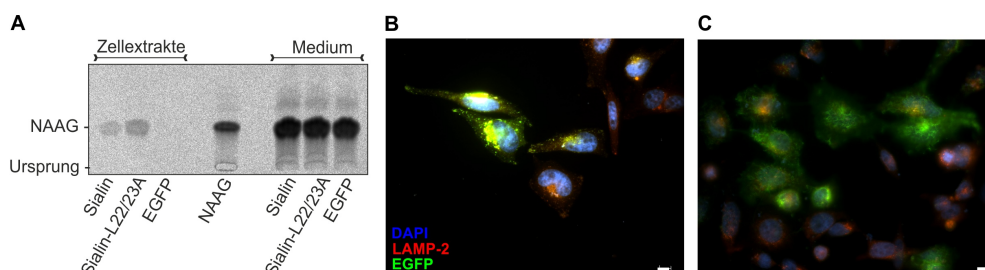


Abbildung 5.4: *in vitro* Versuch zur Aufnahme von NAAG in Sialin überexprimierende Zellen. NAAG ist in Peptidextrakten von Zellen detektierbar, die Sialin oder die Oberflächenvariante exprimieren. Kein Signal wurde in den Zellen gefunden, die EGFP exprimieren (A). Es wurden 70% der Extrakte und als Kontrolle 8% der markierten Überstände aufgetragen. Die Immunfluoreszenz der transfizierten Zellen zeigt in der Kofärbung mit Lamp-2 (rot) ein lysosomales Signal für EGFP-Sialin (grün) (B) und ein überwiegend oberflächenlokalisiertes Signal von EGFP-Sialin-L22/23A dem das lysosomale Rückhaltesignal fehlt (C). Die Kerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. (Massstabsbalken = $20 \mu\text{m}$)

Weiteren untersucht, ob diese nicht nur vom pH Gradienten abhängig ist, sondern auch vom Membranpotential der Zelle und ob dieses der Aufnahme vielleicht entgegen wirkt. Hierfür wurde der Transportversuch

in den Bedingungen variiert. Es wurden pH = 5,5, pH = 7 und pH = 9 für die Wirkung des pH-Gradienten getestet, sowie niedriger (4,7 mM) und hoher (120 mM) Kaliumgehalt im Reaktionspuffer. Hohe extrazelluläre Kaliumkonzentrationen führen zu einer Depolarisierung der Zelle, das Membranpotential wird dadurch verringert^{87–89}. Die TLC und die quantitative Auswertung der Signale für NAAG (siehe Abbildung 5.5 A

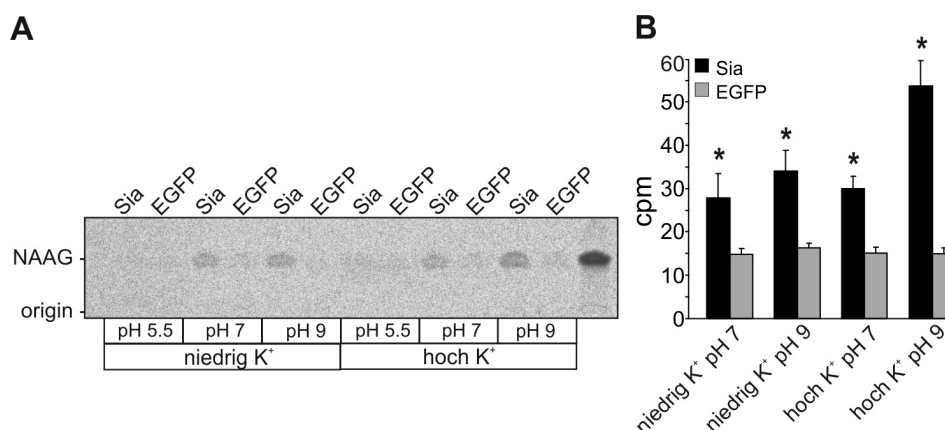


Abbildung 5.5: Aufnahme von NAAG bei verschiedenen Kalium-Konzentrationen. Gezeigt ist eine repräsentative TLC mit der Aufnahme von NAAG durch Sialin (als Oberflächenmutante L22/23A, Sia) im *in vitro* Versuch (A). Es ist eine schwache Aufnahme von NAAG bei pH 7 und bei pH 9 mit niedrigem Kalium zu detektieren. Im Vergleich gibt es das stärkste Signal unter alkalischen Bedingungen und hohem Kaliumgehalt. Kein Signal ist zu detektieren wenn im sauren pH Bereich (pH = 5,5) gearbeitet wurde oder bei den EGFP Kontrollversuchen. (B) Für die quantitative Auswertung (n = 4, Mittelwert ± SD) wurden die Banden mit dem radioaktiven Signal von der TLC ausgekratzt, in Wasser gelöst und mit Flüssigszintillation gemessen. Die Auswertung zeigt die stärkste Aufnahme von NAAG bei pH = 9 und hohem Kalium. Alle NAAG Signale sind gegenüber der EGFP Kontrolle statistisch signifikant (Student'scher t-Test, *: p < 0,05, n = 4) erhöht.

und B) zeigt eine erhöhte Aufnahme von NAAG durch Sialin unter alkalischen Bedingungen und hohen Kaliumkonzentrationen gegenüber neutralen Bedingungen und/oder niedrigen Kaliumkonzentrationen. Auch bei annähernd neutralen Bedingungen (pH = 7) kann NAAG noch durch Sialin in die Zellen aufgenommen werden. Diese Aufnahme erfolgt nicht bei sauren Bedingungen (pH = 5,5) oder in EGFP exprimierenden Kontrollzellen. Als Positivkontrolle wurde die Aufnahme von [³H]-Sialinsäure bei pH = 5,5, pH = 7 und pH = 9 und niedrigen Kaliumkonzentrationen mittels Flüssigszintillation gemessen (vergleiche Abbildung 5.10 C). Sialinsäure wird unter sauren und neutralen, aber nicht unter alkalischen Bedingungen transportiert.

5.3 Untersuchung des Transports in Mikrovesikel von Sialin defizienten Mäusen

Aufgrund der Ergebnisse der Transportversuche mit wt Vesikel und der Ergebnisse der *in vitro* Zellversuche wurde untersucht, ob ein Transport von NAAG, NAAG₂ oder Aspartat in Mikrovesikeln von Sialin defizienten Mäusen stattfindet. In diesen Mäusen wurde das SLC17A5 Gen durch ein "IRES-β-gal-neo" Gen ersetzt. Für die Isolation der Vesikel wurden Gehirne von P16 - P18 alten Tieren verwendet, als Kontrolle wurden auch die Vesikel der wt Tiere isoliert. Gemessen wurde nach einer Inkubationszeit von 10 min, es wurden 0,33 mM NAAG und NAAG₂ und 2,5 mM Aspartat eingesetzt, der Transportassay wurde durchgeführt wie in Abschnitt 5.1 beschrieben. Die Messungen zeigen, dass NAAG in wt Vesikel ATP-abhängig transportiert wird, dies aber nicht der Fall ist bei Vesikeln aus Sialin defizienten Mäusen (Abbildung 5.6 A). Die Menge an NAAG liegt hier auf dem Niveau der Kontrolle (-ATP). Es wurde außerdem sowohl mit FCCP als Entkopplungsreagenz als auch mit Sialinsäure im Überschuss (2,5 mM) die Reaktion inhibiert, die Aufnahme hier liegt auf Kontrollniveau. Gleiches gilt für Aspartat (Abbildung 5.6

C). Auch NAAG₂ wird ATP-abhängig in die Vesikel transportiert, die Menge entspricht ungefähr einem Fünftel der aufgenommenen Menge an NAAG bei gleicher Substratkonzentration (Abbildung 5.6 B). Auch gibt es keine Aufnahme von NAAG₂ in Sialin ko Vesikel oder eine Aufnahme von NAAG₂ in wt Vesikel bei Zugabe eines Inhibitors. Als Kontrollen wurde die Aufnahme von NAAG (und Glutamat) in wt Vesikel dünnenschichtchromatographisch detektiert, um zu überprüfen ob Abbauprodukte von NAAG, anstelle von NAAG, aufgenommen wurden (Abbildung 5.6 D). Außerdem wurde der Transport von Glutamat in wt und Sialin defiziente Vesikel gemessen (Abbildung 5.6 E). Glutamat wurde mit gleicher Effizienz in wt und Sialin ko Vesikel transportiert. Dies zeigt, dass der fehlende NAAG Transport nicht auf einen generellen Defekt der Sialin ko Vesikel beruht. Der Glutamat Transport konnte nicht durch Sialinsäure gehemmt werden, so dass ausgeschlossen werden kann, dass Sialinsäure einen allgemeinen Einfluss auf den Transport in die Mikrovessel hat.

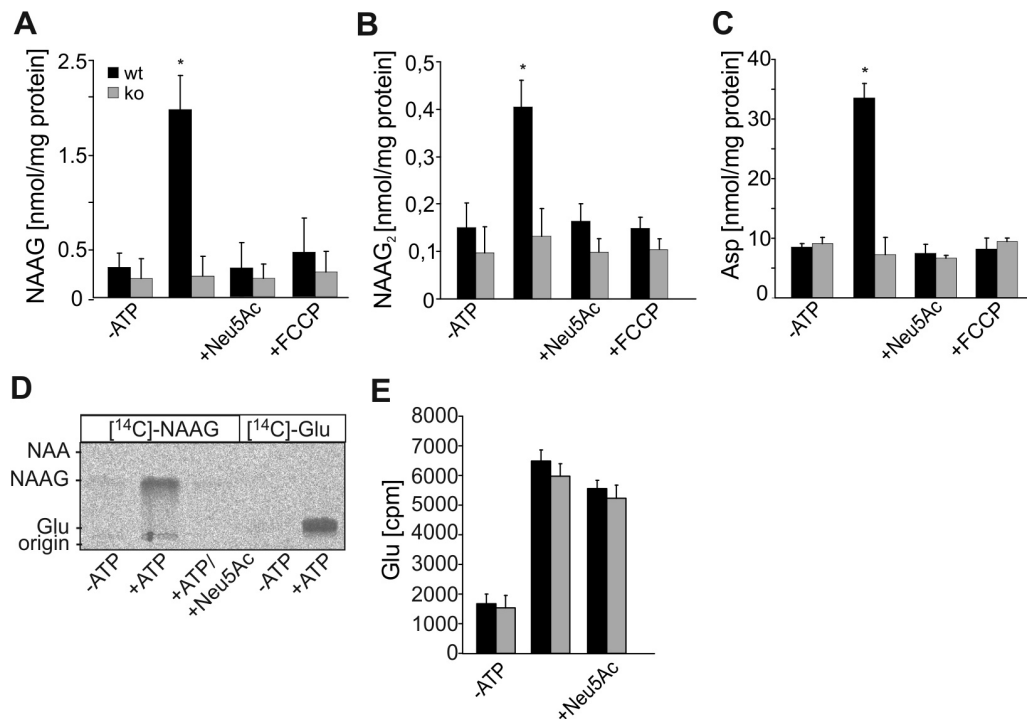


Abbildung 5.6: Transport in Mikrovessel von Sialin defizienten Mäusen. Gezeigt ist der Transport von NAAG (A), NAAG₂ (B) und Aspartat (C) in wt Vesikel im Vergleich mit Vesikeln aus Sialin defizienten Tieren (n=3, Mittelwert +/-SD). Ein signifikanter (Student'scher t-Test, *: p < 0,05, n = 3) Transport im Vergleich mit der Kontrolle (-ATP) findet nur in wt Vesikeln statt. Die Menge von NAAG, NAA und NAAG₂ des Transports in Sialin ko Vesikeln zeigt keinen Unterschied zu der Aufnahme unter Kontrollbedingungen (-ATP) oder nach Inhibition der Reaktion (+FCCP, +Neu5Ac). Die exemplarische TLC (D) der Aufnahme zeigt, dass NAAG selbst und nicht ein Abbauprodukt bei der Messung detektiert wird, zur Kontrolle wurde der Glutamattransport mit aufgetragen. Zur Überprüfung der Präparation der Sialin ko Vesikel wurde die Aufnahme von Glutamat gemessen (E), es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen wt und Sialin ko Vesikeln oder durch Zugabe von Sialinsäure (+ Neu5Ac).

5.4 Untersuchungen zu Sialinsäure Speichererkrankungen

Bei Patienten, bei denen die SALLA Erkrankung vorliegt, wurde eine Erhöhung an NAAG im Liquor gefunden⁴⁷. Deswegen wurde in den Sialin defizienten Mäusen die Menge an NAA, NAAG und NAAG₂ bestimmt und die NAAGS-I und NAAGS-II Expression untersucht.

Desweiteren sind zwei Formen der Sialinsäure Speichererkrankung bekannt, die SALLA Erkrankung (SALLA) und die infantile Sialinsäure Speichererkrankung (ISSD). Diese zeigen unterschiedliches Transportverhalten für Sialinsäure, Aspartat und Glutamat⁸³. Aus diesem Grund wurden Sialin Varianten mit verschiedenen Mutationen (R39C für SALLA und H183R für die ISSD) im *in vitro* Zellversuch untersucht.

5.4.1 Untersuchung der Sialin defizienten Mäuse

Unter Verwendung des quantitativen Tandem-LC/MS Verfahrens wurden die Mengen an NAA, NAAG und NAAG₂ in Peptidextrakten von Gesamtgehirnproben und Liquor (CSF) von Sialin defizienten Mäusen (ko) und Wildtyp Kontrolltieren (wt) bestimmt.

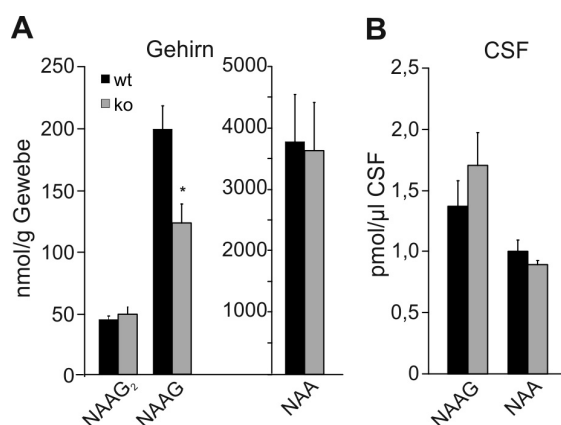


Abbildung 5.7: Quantitative Bestimmung von NAAG, NAAG₂ und NAA in Sialin defizienten Mäusen. In Peptidextrakten von Gehirnproben von wt und Sialin ko Tieren wurde die Menge an NAAG, NAAG₂ und NAA bestimmt (A, n = 3, Mittelwert +/- SD). In den Mengen von NAAG₂ und NAA gibt es keine Unterschiede, bei NAAG wurde eine signifikante Erniedrigung von ungefähr 40% gegenüber wt Tieren gefunden (Student'scher t-Test, *: p < 0,05, n = 3). Im Liquor (CSF) wurden keine Unterschiede zwischen wt und Sialin ko Tieren in der Menge von NAAG und NAA festgestellt, NAAG₂ konnte nicht gemessen werden, da die Menge unter der Detektionsgrenze lag (B).

In Gehirnproben von Sialin defizienten Tieren (P16-P18) und wt Tieren wurden die Mengen an NAAG, NAAG₂ und NAA gemessen (Abbildung 5.7 A). Es wurden je drei Tiere pro Genotyp verwendet (n = 3, Mittelwert +/- SD) Die Mengen an NAA und NAAG₂ sind in beiden Tiergruppen annähernd gleich. Ein signifikanter Unterschied besteht bei der Menge an NAAG. In Sialin ko Tieren wurde eine Erniedrigung von ungefähr 40% im Vergleich mit wt Tieren detektiert (Student'scher t-Test, *: p < 0,05, n=3). Im CSF besteht kein Unterschied in den Mengen an NAA und NAAG zwischen Sialin ko und wt Tieren. NAAG₂ konnte in der CSF nicht detektiert werden (Abbildung 5.7 B).

Aufgrund der Erniedrigung an NAAG in den Sialin ko Mäusen wurde im Weiteren untersucht, ob es eine Veränderung der Expression der NAAGS-I/-II gibt. Hierzu wurde quantitative Real-Time PCR durchgeführt. Es wurden die Expressionen der NAAG Synthetasen (NAAGS-I und II), der NAA Synthase (Nat8L), der Glutamat-Carboxypeptidase II (GCPII) und, aufgrund der beschriebenen Hypomyelination, die Level des Myelin-Basischen Proteins (MBP) und des Proteolipid Proteins (PLP) untersucht. Ausgewertet wurde mit der $2^{\Delta C_T}$ -Methode, normalisiert wurde dabei auf Ubiquitin C.

In den NAAG Synthetasen und der NAA Synthase gibt es keine Unterschiede im Expressionslevel zwischen wt und Sialin ko Tieren. Das Expressionslevel von GCPII ist um das Doppelte in Sialin ko Tieren im Vergleich mit wt Tieren erhöht. PLP und MBP sind, wie erwartet, in den Sialin ko Tieren stark herunter reguliert.

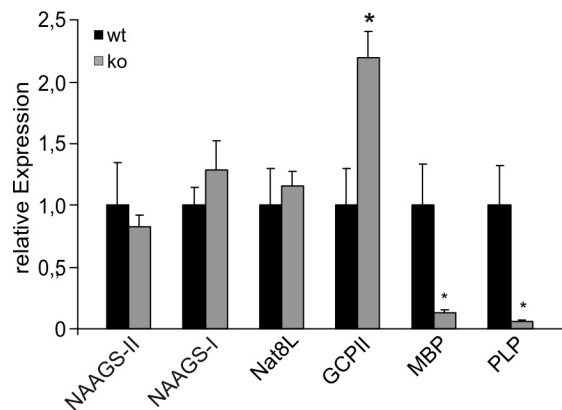


Abbildung 5.8: Expression von NAAGS-I/-II, Nat8L und GCPII in den Sialin defizienten Mäusen. Gezeigt ist die quantitative Real-Time PCR von Gehirn cDNA von P16 - P18 alte Sialin ko und wt Tieren. Die relative Expression, normalisiert auf Ubiquitin C, wurde über die $2^{\Delta C_T}$ - Methode bestimmt. Die Expression der NAAG Synthetasen (NAAGS-I und II und der NAA Synthase (Nat8L) ist nicht verändert. Für die Glutamat-Carboxypeptidase II (GCPII) gibt es eine signifikante Erhöhung in Sialin ko Tieren gegenüber wt Tieren. Das Myelin-basische Protein (MBP) und das Proteolipid Protein (PLP) sind aufgrund der bekannten Hypomyelination stark herunter reguliert. Verwendet wurden drei unabhängige RNA Präparationen pro Genotyp (n = 3, Mittelwert +/- SD). Die Signifikanz gegenüber dem wt ist durch * gekennzeichnet (Student'scher t-Test, p < 0,05, n = 3).

5.4.2 Patientenmutationen im in vitro Versuch

Da die Sialin defizienten Mäuse einen Total Knock out des gesamten Gens haben und nicht die zwei spezifischen Krankheitsformen widerspiegeln, wurden hier im Zellexperiment der NAAG Transport in den beiden Patientenmutationen R39C für die SALLA Erkrankung und die H183R für die ISSD untersucht. Die Mutationen wurden mit einer gezielten Mutagenese in das Sialingen eingeführt, dass schon die Mutation für das lysosomale Rückhaltesignal enthält (L22/23A). Die Versuche wurden durchgeführt wie in Abschnitt 5.2 beschrieben. Es wurde im alkalischen (pH = 9) Puffer mit hohen Kaliumkonzentrationen gearbeitet. Bevor der Zellversuch durchgeführt wurde, wurden zuerst die Konstrukte überprüft. Der Western Blot

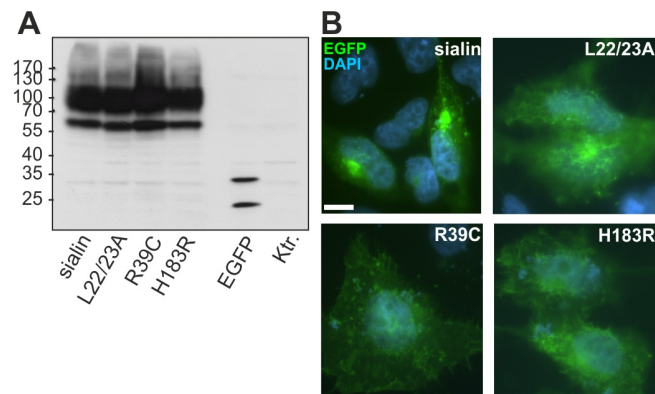


Abbildung 5.9: Western Blot und Immunofluoreszenz der Sialinvarianten. Der wt (Sialin), die Oberflächenmutante (L22/23A) und die beiden Mutanten (R39C und H183R) wurden als EGFP-Fusionsproteine in HEK 293T Zellen überexprimiert. Der Western Blot zeigt annähernd gleiche Expressionslevel aller Konstrukte (A). Die Immunfluoreszenz zeigt ein deutliches Oberflächensignal für die Mutanten, im Gegensatz zum lysosomalen Signal des Wildtyps (B). (Massstabsbalken = 30 μ m)

(Abbildung 5.9 A) der Zellysate von Sialin oder den Mutanten exprimierenden Zellen gerichtet gegen das EGFP, zeigt, dass alle Varianten ähnlich gut exprimiert werden. Es wurden gleiche Prozentsätze der Lysate aufgetragen. Die Immunfluoreszenz zeigt ein deutliches Oberflächensignal für die Mutanten im Gegensatz

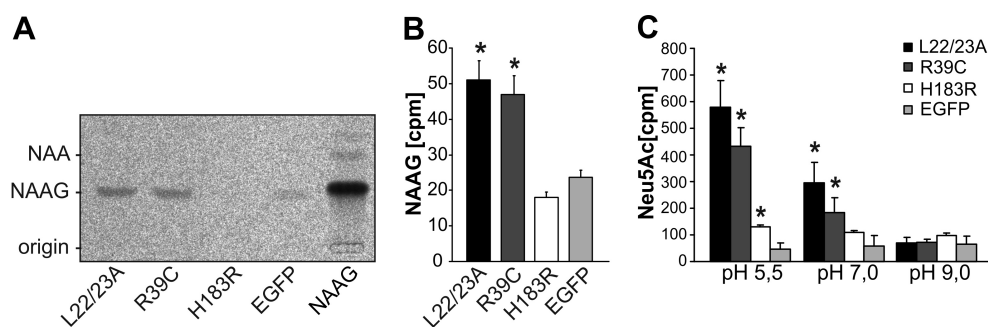


Abbildung 5.10: Zellversuch zum Transport von NAAG im mutierten Sialin. Die TLC der Zell-extrakte zeigt, dass NAAG sowohl im Fall der Oberflächenvariante, als auch im Fall der Variante der SALLA Erkrankung (R39C) in die Zellen transportiert wird. Die ISSD Mutante (H183R), sowie die EGFP Kontrolle zeigen keinen Transport mehr (A). Die quantitative Auswertung von vier unabhängigen Versuchen ($n = 4$, Mittelwert \pm SD), bei denen die Banden ausgekratzt, gelöst und mittels Flüssigszintillation gemessen wurden, zeigt eine signifikante Aufnahme (durch * gekennzeichnet) von NAAG bei der L22/23A und der R39C Mutante im Gegensatz zur H183R Mutante, verglichen mit dem Signal in der EGFP Kontrolle (B, Student'scher t-Test, $p < 0,05$, $n = 4$). Zur Überprüfung wurde die Aufnahme von Sialinsäure bei unterschiedlichen Bedingungen (niedrig Kalium, pH = 5,5, 7 und 9) gemessen ($n = 3$, Mittelwert \pm SD). Eine Aufnahme von Sialinsäure ist sowohl im Sauren, als auch im annähernd Neutralen zu beobachten, sowohl für die L22/23A als auch für die R39C Mutante. In der H183R Mutante ist die Aufnahme deutlich verringert, aber im Sauren noch signifikant detektierbar gegenüber die EGFP Kontrolle (Student'scher t-Test, *: $p < 0,05$, $n = 3$)

zum lysosomalen Signal des Wildtyps.

Im Zellversuch wurde die Aufnahme von NAAG über eine TLC detektiert. NAAG ist im Peptidextrakt der Zellen zu finden, die die Oberflächenvariante oder die R39C Mutante exprimieren. Kein Signal ist zu finden, wenn die H183R Mutante oder EGFP exprimiert wurden (Abbildung 5.10 A). Die quantitative Auswertung zeigt, dass NAAG nur von der Oberflächenvariante und der R39C Mutante signifikant transportiert wird. Für die quantitative Bestimmung wurden die entsprechenden Banden von der TLC ausgekratzt, gelöst und mittels Flüssigszintillation die Radioaktivität bestimmt (Abbildung 5.10 B). Zum Vergleich wurde die Aufnahme von Sialinsäure gemessen, die Transportbedingungen waren dieselben wie beim NAAG Transport. Es wurde in niedrig konzentriertem Kaliumpuffer bei verschiedenen pH-Werten getestet (C). Der Transport der Sialinsäure nimmt mit steigendem pH-Wert ab. Er ist bei pH = 5,5 am effektivsten, bei pH = 9 ist kein Transport mehr messbar. Die Oberflächenmutante und die R39C Mutante für die SALLA Erkrankung transportieren die Sialinsäure am besten. Der Transport durch die H183R Mutante ist nur bei pH = 5,5 messbar. In der Kontrolle (EGFP) gibt es keine Aufnahme. Es wurde auch die Aufnahme der Sialinsäure nach 5 Minuten gemessen, hier ist die Aufnahme durch die R39C Mutante nur bei 50% der Oberflächenvariante (Daten nicht gezeigt), kaum Aufnahme ist bei der H183R Variante zu erkennen.

5.5 Rekonstitution von Sialin und VGlut2 in Proteoliposomen

Um einen weiteren Nachweis zu erhalten, dass Sialin der vesikuläre NAAG Transporter ist, wurde Sialin zusammen mit einer bakteriellen H^+ -ATPase in Proteoliposomen rekonstituiert und mit den rekonstituierten Proteoliposomen wurden verschiedene Transportversuche durchgeführt. Als Kontrolle wurde zusätzlich die Rekonstitution von VGlut2 mit und ohne H^+ -ATPase durchgeführt. Hierbei wurde nach dem Protokoll von Moriyama et al.^{83,90} gearbeitet.

5.5.1 Aufreinigung der H^+ -ATPase aus *E. coli*

Für die Aufreinigung der H^+ -ATPase aus *E. coli* wurde der ATPase defiziente Stamm DK8 verwendet. Dieser wurde mit dem Vektor pSK11 transformiert, hierbei handelt es sich um einen *E. coli* Expressions-

vektor in den das unc Operon (ATPase Operon) einkloniert ist. Am N-terminalen Ende der β -Untereinheit der H^+ -ATPase wurde ein His-Tag zur leichteren Aufreinigung des Proteins eingefügt. Die Expression erfolgt im Minimalmedium über 48 h. Nach Isolation der inneren Membranvesikel durch Ultraschallbehandlung und Solubilisierung der Oberflächenproteine mit Octyl- β -D-glucopyranosid (GP) erfolgte die Aufreinigung des Proteins über Cobalt-Sepharose-Beads (für Details siehe Material und Methoden Abschnitt 3.13). In Abbildung 5.11 A und B sind die Isolation und die Aufreinigung des H^+ -ATPase F_0F_1 -Komplexes gezeigt. Gezeigt sind Proben des Überstands nach Ultraschallbehandlung und Sedimentation der Zelltrümmer (30.000 x g) und der isolierten invertierten Membranvesikelfraktion (287.000 x g). Die Vesikel nach Abtrennung der Oberflächenproteine durch fraktionierte Solubilisierung mit 0,8 % Octyl- β -D-glucopyranosid (0.8% GP), der Durchlauf nach Inkubation mit der Cobalt-Sepharose, die Waschschrte und die Eluatfraktionen E1 - E10. Nach der ersten Solubilisierung ist die α/β -Doppelbande zwischen 50 und 60 kDa des F_0F_1 -Komplexes deutlich zu erkennen, ein Teil befindet sich nach Inkubation mit der Cobalt-Sepharose noch im Durchlauf. Diese Doppelbande findet sich auch in den Eluatfraktionen E5 - E8 wieder. Diese wurde mittels Western-Blot gegen den His-Tag überprüft, detektiert wird dabei die β -Untereinheit. Gezeigt sind die Eluatfraktionen E5 - E8 (Abbildung 5.11 C). Aus 4 Litern Bakterienkultur konnten zwischen 200 - 600 μ g aufgereinigtes Protein gewonnen werden. Für einen Rekonstitutionsansatz werden 100 μ g eingesetzt.

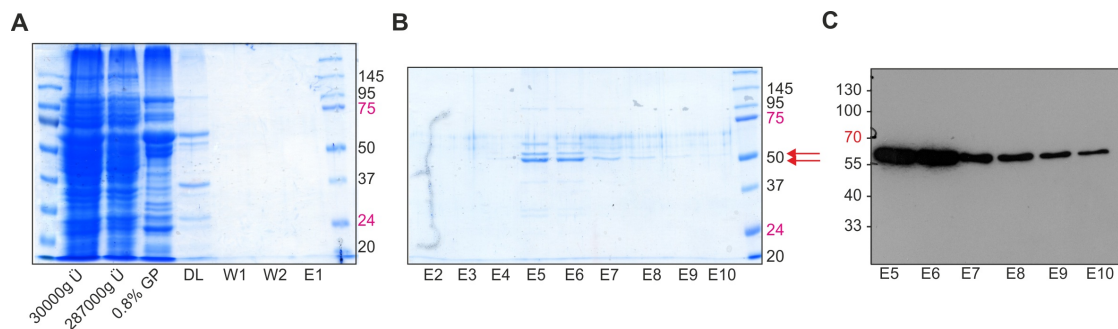


Abbildung 5.11: Exemplarisches Coomassie Gel und Western Blot der Aufreinigung der H^+ -ATPase aus *E. coli*. Es wurden gleiche Prozentsätze aller Fraktionen aufgetragen. Gezeigt sind die Fraktionen der invertierten Membranvesikel nach Ultraschallbehandlung (30.000 x g) und Ultrazentrifugation (287.000 x g), der Überstand nach Entfernen von Oberflächenproteinen der Membranvesikel (0.8% GP), der Durchlauf und die Waschschrte nach Inkubation mit der Cobalt-Sepharose und die Eluatfraktionen E1 - E10 der Aufreinigung. Die α/β -Doppelbande zwischen 50 und 60 kDa des F_0F_1 -Komplex ist in den Eluatfraktionen E5 - E8 deutlich zu sehen (durch Pfeile gekennzeichnet) (A und B). Zur Überprüfung wurde ein Western Blot der Eluatfraktionen E5 - E10 angefertigt und mit dem His-Tag Antikörper detektiert. Es wurden gleiche Prozentsätze (1%) der Eluatfraktionen aufgetragen, detektiert wird die β -Untereinheit (C).

5.5.2 Aufreinigung von Sialin und VGlut2 aus Insektenzellen

Für die Aufreinigung von Sialin und VGlut2 wurden diese als His-Tag Konstrukte in einem pUltraBac Vektor kloniert, in DH10bac transformiert und in Insektenzellen durch Infektion mit Baculoviren exprimiert. Die Aufreinigung der Proteine erfolgte über Isolation der Membranvesikel durch Ultraschallbehandlung und Ultrazentrifugation, Solubilisierung der Proteine mit 2% Octyl- β -D-glucopyranosid und Reinigung über den His-Tag der Proteine über Cobalt-Harz.

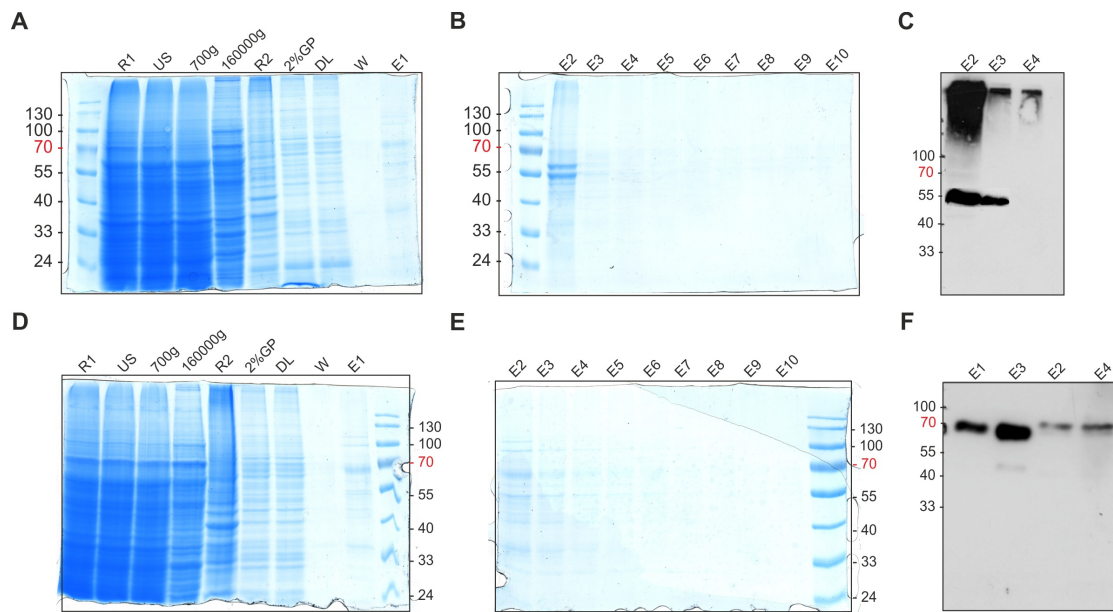


Abbildung 5.12: Aufreinigung von Sialin und VGlut2 aus Insektenzellen. Exemplarisch gezeigt ist eine Aufreinigung von Sialin (A - C) und VGlut2 (D - F) im Coomassie-Gel (A,B,D,E) und im Western Blot (C, F) mit einem Anti-His-Tag Antikörper. In den Coomassiegelen sind in gleichen Prozentsätzen das Homogenat (R1), das Homogenat nach Ultraschallbehandlung (US), der Überstand nach Sedimentation (700 x g), die isolierten Membranvesikel (160.000 x g), vor (R2) und nach Solubilisierung (2% GP) der Durchlauf (DL), die Waschfraktion (W) und die Eluatfraktionen E1 - E10 aufgetragen (Abbildung A, B für Sialin und Abbildung D, E für VGlut2). Der größte Anteil an aufgereinigtem Protein ist für beide Proteine in der Eluatfraktion E2 zu finden. Im Western Blot wird für Sialin eine Bande bei 55 kDa und eine hohe "verschmierte" Bande ab 130 kDa und höher detektiert, gezeigt sind die Fraktionen E2 - E4 (C). VGlut2 wird als Bande bei 70 kDa detektiert, gezeigt sind die Eluatfraktionen E1 - E4. Es wurden je gleiche Prozentsätze (1 %) aufgetragen

Die Coomassiegele zeigen eine exemplarische Aufreinigung von Sialin (Abbildung 5.12 A,B) und VGlut2 (Abbildung 5.12 D, E). Gezeigt sind das Homogenat (R1), das Homogenat nach Ultraschallbehandlung (US), der Überstand nach Abtrennen der Zelltrümmer (700 x g), die isolierten Membranvesikel (160.000 x g), die Suspension vor (R2) und nach der Solubilisierung (2% GP). Außerdem sind von der Aufreinigung der Überstand nach Inkubation mit dem Cobalt-Harz (DL), die Waschfraktion (W) und die Eluatfraktionen E1 - E10 aufgetragen. Eluiert wurde mit 5 ml in 500 μ l-Fractionen. Für Sialin ist das aufgereinigte Protein in den Fraktionen E2 und E3 zu sehen, VGlut2 befindet sich überwiegend in den Eluaten E1 und E2. Die theoretische berechneten Massen der Proteine betragen für Sialin 54 kDa und für VGlut2 68 kDa. Im Western Blot gegen den His-Tag der Proteine wird Sialin als Bande bei 55 kDa und als "verschmierte" Bande ab 130 kDa in den Eluatfraktionen E2 - E4 detektiert (Abbildung 5.12 C) (vergleiche dazu auch Abschnitt 5.4.2). VGlut2 wird bei 70 kDa in den Eluatfraktionen E1 - E4 detektiert (Abbildung 5.12 F). Eine exakte Zuordnung zu den Banden im Coomassiegel ist nicht möglich. Die Mengen der Proteine wurden mit einer Proteinbestimmung zu 250 μ g/ml für Sialin und zu 150 μ g/ml für VGlut2 bestimmt.

5.5.3 Rekonstitution von Sialin und VGlut2 in Proteoliposomen

Für die Rekonstitutionen wurden ungefähr 40 - 100 μg Sialin oder VGlut2 Protein und 100 μg von der H^+ -ATPase, sowie 0,5 mg Lipid verwendet. Die Substanzen wurden gemischt, bei -80°C für 10 min eingeforen, schnell wieder aufgetaut und sofort 30-fach in Puffer verdünnt. Danach erfolgte eine Ultrazentrifugation bei 200.000 x g für eine Stunde. Das Proteoliposomenpellet wurde anschließend in 200 - 400 μl Puffer resuspendiert, beschallt und aliquotiert. Es wurden folgende Rekonstitutionsansätze hergestellt:

Tabelle 5.1: Rekonstitutionsansätze

Protein	Eigenschaft
Sialin	Sialinsäuretransport, Negativkontrolle für Asp und NAAG
Sialin + H^+ -ATPase	Transport Asp und NAAG
VGlut2 + H^+ -ATPase	Glutamat-Transport, Negativkontrolle für Asp und NAAG
VGlut2	Negativkontrolle für Glutamattransport

Die Bildung der Proteoliposomen wurde durch Mischen des Lipids mit Nile Red und anschließender Rekonstitution untersucht. Nile Red interkaliert mit Lipiden, und bei der Reaktion mit Phospholipiden fluoreszieren diese rot. Diese Fluoreszenz kann mikroskopisch sichtbar gemacht werden.

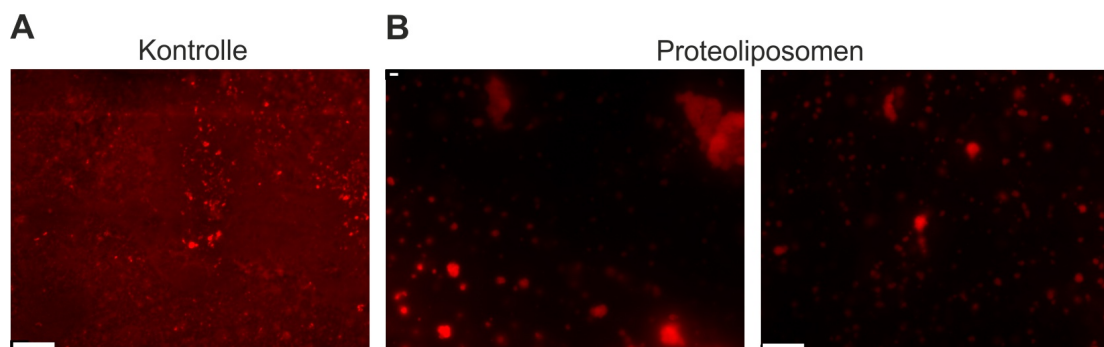


Abbildung 5.13: Nile Red Färbung von Proteoliposomen. Zu sehen sind die vesikulären Strukturen der Proteoliposomen die mit Nile Red gefärbt wurden (B). Als Kontrolle wurde der Farbstoff nur in Puffer verdünnt. Der Massstabsbalken beträgt 4 μm .

Durch die Färbung sind gut die entstandenen vesikulären Strukturen der Proteoliposomen sichtbar, die Größe variiert stark: Es gibt Vesikel die bis zu 1 μm groß sind (Abbildung 5.13 B). Als Kontrolle wurde der Farbstoff nur in Puffer verdünnt (Abbildung 5.13 A), es sind keine Strukturen erkennbar. Der Massstabsbalken beträgt 4 μm , es wurden mit einem 63er Objektiv gearbeitet.

Zur weiteren Untersuchung wurden Western Blots der Proben angefertigt, es wurden hierzu jeweils gleiche Prozentsätze der Proben von vor und nach Rekonstitution aufgetragen (Abbildung 5.14). Es wurde mit dem Anti-His-Tag Antikörper gearbeitet. Der exemplarische Western Blot zeigt die Signale für Sialin, für VGlut2 und \pm H^+ -ATPase nach Mischen mit dem Lipid (Mix) und nach Ultrazentrifugation und anschließender Resuspension (PL). Es wurden zwei verschiedene Blots für H^+ -ATPase und Sialin/VGlut2 angefertigt, da die Proben verschieden behandelt wurden. Die so überprüften rekonstituierten Proteine wurden für weitere Versuche verwendet, hierbei wurden drei unterschiedliche Rekonstitutionen mit Proteinen aus einer Aufreinigung verwendet.

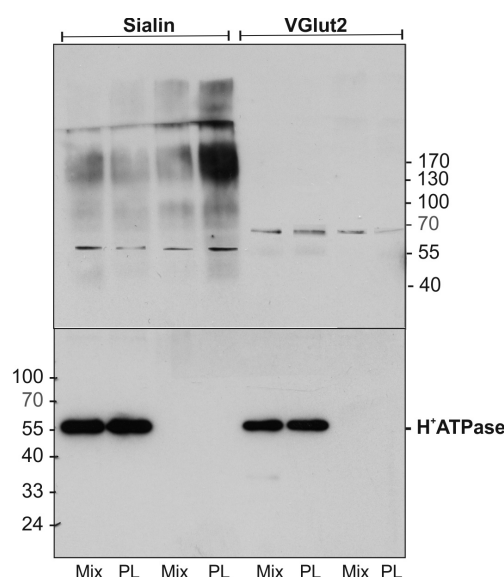


Abbildung 5.14: Exemplarische Western Blots der Rekonstitution. Es wurden gleiche Prozentsätze der Proben nach Mischen mit dem Lipid (Mix) und nach Ultrazentrifugation und anschließender Resuspension (PL) aufgetragen. Zu sehen sind die Signale für Sialin, VGlut2 und H⁺-ATPase (±). Es wurden zwei verschiedene Blots angefertigt, da die Proben für Sialin, VGlut2 und H⁺-ATPase unterschiedlich behandelt wurden.

5.5.4 Transportversuche mit rekonstituierten Proteinen

5.5.4.1 Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit des Transport von NAAG und Aspartat

Zur Untersuchung des Transports von Aspartat und NAAG durch Sialin wurde dieses zusammen mit der H⁺-ATPase in Proteoliposomen rekonstituiert. Diese wurden dann für Transportuntersuchungen verwendet. Hierfür wurden die Proteoliposomen mit ATP bei 27°C vorinkubiert und die Transportreaktion wurde durch Zugabe von [¹⁴C]-Aspartat oder [¹⁴C]-NAAG gestartet. Zu verschiedenen Zeitpunkten (1, 3, 5 Minuten) wurde ein Teil der Probe entnommen, über eine Sephadex-Säule gegeben, um ungebundenes Substrat abzutrennen, und die im Proteoliposom gebundene Radioaktivität wurde mittels Flüssigszintillation bestimmt. Nach Bestimmung der Zeitabhängigkeit wurde der Transport von NAAG und Aspartat bei verschiedenen Konzentrationen zwischen 0,1 und 3 mM bei einer Minute gemessen. Verfahren wurde dabei wie oben beschrieben. Es konnte kein Transport detektiert werden, wenn keine aktive H⁺-ATPase vorhanden war (vergleiche auch Abschnitt 5.5.4.3).

Wie in Abbildung 5.15 zu sehen, werden sowohl NAAG als auch Aspartat ATP-abhängig in die Proteoliposomen transportiert. Über den konzentrationsabhängigen Transport lässt sich durch einen Michaelis-Menten-Plot für NAAG der K_M-Wert zu 0,2 ± 0,1 mM und der V_{max} mit 2234 ± 52 nmol/mg Protein/min berechnen. Für den Aspartat Transport berechnet sich K_M zu 0,5 ± 0,2 mM und V_{max} und 2429 ± 247 nmol/mg Protein/min.

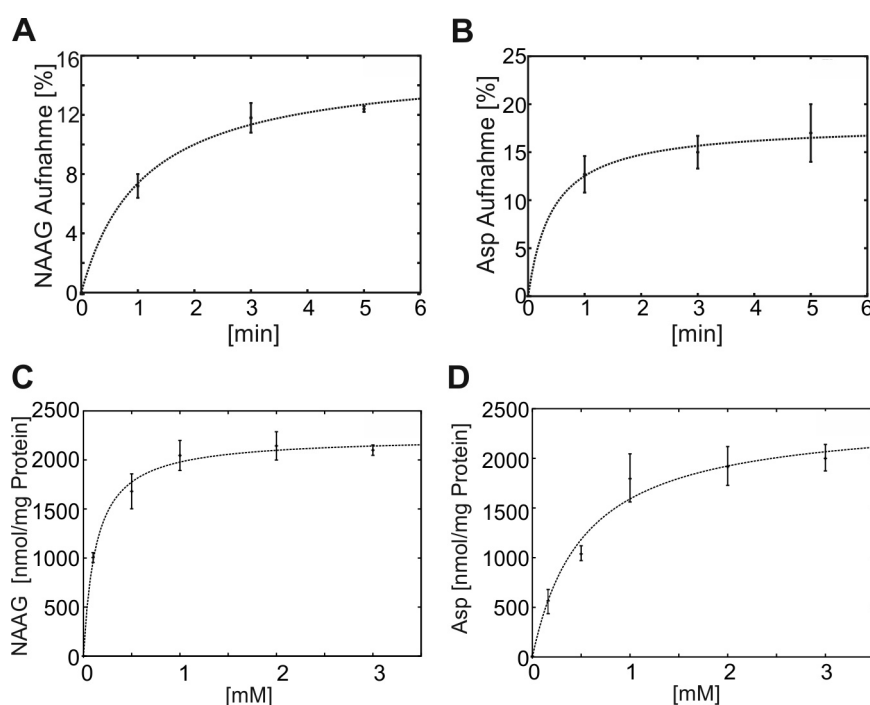


Abbildung 5.15: Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit von NAAG und Aspartat beim Transport in Sialin-Proteoliposomen. NAAG und Aspartat (Asp) werden in Proteoliposomen transportiert die Sialin und die H^+ -ATPase enthalten. Gezeigt sind die Zeitabhängigkeit und die Konzentrationsabhängigkeit für NAAG Transport (A,C) und Aspartat Transport (B,D). Für die Zeitabhängigkeit wurden jeweils zwei unabhängige Versuche in zwei verschiedenen Rekonstitutionsansätzen gemacht. ($n = 4$, Mittelwert \pm SD). Für die Konzentrationsabhängigkeit drei unabhängige Versuche aus zwei verschiedenen Rekonstitutionsansätzen ($n = 3$, Mittelwert \pm SD), gemessen wurde nach einer Minute. Für NAAG lässt sich durch den Michaelis-Menten-Plot ein K_M -Wert mit $0,2 \pm 0,1$ mM und ein V_{max} mit 2234 ± 52 nmol/mg Protein/min bestimmen, für Aspartat ein K_M -Wert mit $0,5 \pm 0,2$ mM und ein V_{max} mit 2429 ± 247 nmol/mg Protein/min bestimmen.

5.5.4.2 Kontrollversuche

Als Positivkontrolle wurde die Aufnahme von Sialinsäure in Sialin haltige Proteoliposomen zeitabhängig untersucht. Hierfür wurden Bedingungen bei pH 6 gewählt. Wie in Abbildung 5.16 A zu sehen, findet eine Aufnahme statt. Zur Untersuchung ob NAAG nur durch Sialin und nicht durch ähnliche Transporter transportiert werden kann, wurde hier analog zum Sialin VGlut2 aufgereinigt und ebenfalls in Liposomen rekonstituiert. Gezeigt ist die prozentuale Aufnahme von Glutamat und NAAG in VGlut2 haltigen Proteoliposomen mit und ohne aktiver H^+ -ATPase (Abbildung 5.16 B). Der Transport von Glutamat findet nur statt, wenn eine aktive H^+ -ATPase vorhanden ist, es ist kaum Transport messbar, wenn nur VGlut2 vorhanden ist. Der NAAG Transport liegt mit und ohne H^+ -ATPase auf dem Niveau von Glutamat ohne aktive H^+ -ATPase, es findet also kein Transport statt.

5.5.4.3 Transport und Inhibition

Zur weiteren Untersuchung des Transports von NAAG und Aspartat in Sialin haltige Proteoliposomen, wurde in Ablehnung an Miyaji *et al.*⁹¹ untersucht, ob der Transport auch durch Gabe an Valinomycin angeregt werden kann. Valinomycin erzeugt ein Membranpotential (innen positiv) durch Kalium-Diffusion. In Anwesenheit von ATP reduziert es den Aspartat Transport⁸³. Abbildung 5.17 A zeigt die Aufnahme von NAAG und Aspartat in die Sialin und H^+ -ATPase haltigen Proteoliposomen mit und ohne ATP und Valinomycin. Eine Aufnahme von NAAG und Aspartat erfolgt bei aktiver H^+ -ATPase (+ATP, 2 mM), diese Aufnahme wird durch zusätzliche Gabe an Valinomycin (2 μ M) um ungefähr 40% reduziert. Ist kein

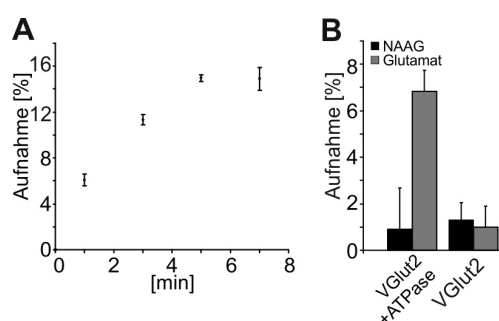


Abbildung 5.16: Transport von Sialinsäure und Glutamat. Gezeigt ist die zeitabhängige Aufnahme von Sialinsäure in Sialin haltige Proteoliposomen bei pH = 6 (A) (n = 3, Mittelwert +/- SD) und die Aufnahme von Glutamat und NAAG in VGlut2 haltige Proteoliposomen (B) (n = 2, Mittelwert +/- SD). Die Aufnahme von Glutamat erfolgt nur bei aktiver H⁺-ATPase, der Transport von NAAG durch VGlut2 kann nicht gemessen werden.

ATP vorhanden, liegt die Aufnahme von NAAG und Aspartat bei unter 10%, gemessen an der Aufnahme bei aktiver H⁺-ATPase. Durch Gabe an Valinomycin bei inaktiver H⁺-ATPase kann der Transport wieder auf Normalniveau (wie bei aktiver H⁺-ATPase) angeregt werden. Für diesen Versuch wurden 2,5 mM NAAG und 1,5 mM Aspartat eingesetzt, gemessen wurde nach einer Minute Inkubationszeit bei 27°C. Für alle Ansätze wurden die Proteoliposomen bei 27°C vorinkubiert. Die Inhibition des Transports von NAAG

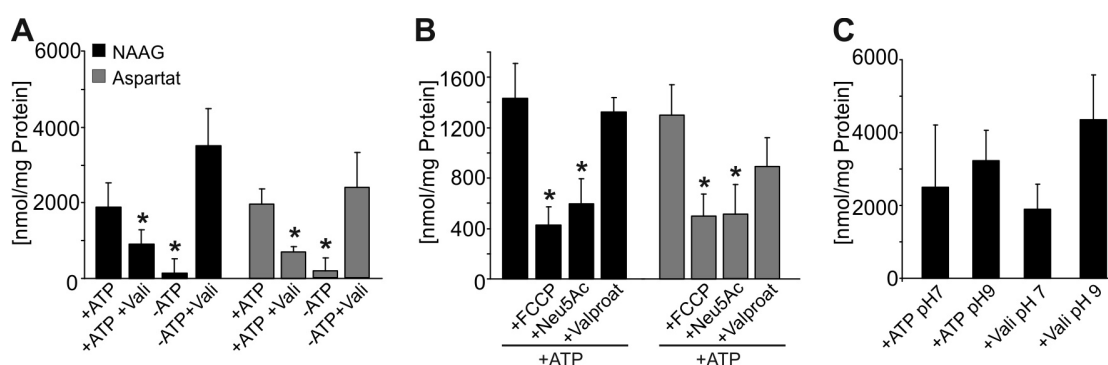


Abbildung 5.17: Transport und Inhibition von NAAG und Aspartat in Sialin haltige Proteoliposomen. Gezeigt ist der Transport von NAAG und Aspartat in Sialin und H⁺-ATPase haltige Proteoliposomen mit oder ohne ATP (2 mM) und Valinomycin (2 μM) (A). Die Inhibition des Transports durch FCCP, Sialinsäure oder Valproat (B) und die Untersuchung zur pH-Abhängigkeit des Transports von NAAG (C). Sowohl der Transport von NAAG als auch Aspartat kann sowohl durch Gabe von ATP oder Valinomycin angeregt werden. Durch Gabe von Valinomycin bei aktiver H⁺-ATPase (+ATP) wird die Aufnahme signifikant verringert. Der Transport beider Substanzen kann durch Zugabe von FCCP oder Sialinsäure inhibiert werden. Gezeigt sind drei (für NAAG) oder vier (für Asp) unabhängige Experimente aus zwei verschiedenen Rekonstitutionsansätzen (n = 3 - 4, Mittelwert +/- SD), die Signifikanz des Transports bezogen auf den Transport mit ATP Gabe ist durch * gekennzeichnet (Student'scher t-Test p < 0,05, n = 3 - 4).

und Aspartat in Sialin haltige Proteoliposomen mit aktiver H⁺-ATPase (2 mM ATP) sollte mit verschiedenen Faktoren untersucht werden (Abbildung 5.17 B). Es wurden 0,2 mM NAAG und 0,5 mM Aspartat verwendet um im Konzentrationsbereich des K_M-Wertes zu liegen. Als Inhibitoren wurden 20 μM FCCP, 5 mM Neu5Ac oder 20 μM Valproat eingesetzt. Für Valproat wird beschrieben, dass es die Konzentration an Aspartat in Nervenendigungen reduziert⁹². Die Aufnahme von NAAG und Aspartat wird sowohl durch FCCP als Entkopplungsreagenz, als auch durch einen Überschuss an Sialinsäure inhibiert. Mit Valproat lässt sich keine signifikante Reduzierung des Transports feststellen.

Als Letztes wurde untersucht, ob auch der Transport von NAAG in die rekonstituierten Proteoliposomen zusätzlich eine pH-Abhängigkeit aufweist, wie im Zellversuch gezeigt (Abbildung 5.17 C). Hierfür wurden

Sialin haltige Proteoliposomen mit aktiver H⁺-ATPase (+ATP, 2mM) oder mit Valinomycin (2 μ M) Behandlung ohne ATP verwendet. Es wurde bei pH = 7 und bei pH = 9 gemessen, für pH = 9 wurde zusätzlich mit Glycylglycin gepuffert. Verwendet wurden 2,5 mM NAAG, gemessen wurde nach einer Minute Inkubation nach Durchlauf über eine Sephadexsäule. Es gibt eine Tendenz zu einem besseren Transport von NAAG mit Valinomycin Behandlung und pH = 9, dies ist aber nicht signifikant (Student'scher t-Test, p = 0,1, n = 4). Es wurden für alle hier gezeigten Versuche vier unabhängige Experimente unter Verwendung von zwei verschiedenen Rekonstitutionsansätzen gemacht (n = 4, Mittelwert +/- SD).

Kapitel 6

Diskussion

6.1 Untersuchung der NAAG Synthetase II

Wie einleitend beschrieben, konnten zwei Synthetasen identifiziert werden, die NAAG in einem ATP-abhängigen Prozess produzieren^{19,21}. Diese Synthetasen werden als NAAGS-I und NAAGS-II bezeichnet. In dieser Arbeit wurden unter anderem genauere Untersuchungen zur NAAGS-II gemacht.

Collard et al.²¹ konnten zeigen, dass beide Synthetasen neben dem Hauptprodukt NAAG auch β -Citrylglutamat (BCG) synthetisieren. In dieser Arbeit konnte durch metabolische Markierung von Zellen gezeigt werden, dass NAAGS-II neben dem Hauptprodukt NAAG (und BCG) noch eine weitere Substanz synthetisiert. Diese Substanz konnte durch verschiedene Experimente als Tripeptid NAAG₂ identifiziert werden (vergleiche Abbildung 4.2 - 4.10):

Untersuchungen in Anlehnung an Brovia et al.⁷⁶ zeigten, dass es eine cyclisierte Form des NAAG (asu-NAAG) gibt. Da es sich hierbei aber nicht um die unbekannte Substanz handelte, konnte in vergleichenden ESI-MS-Messungen von Zellextrakten gezeigt werden, die entweder NAAGS-I oder NAAGS-II und Nat8L exprimierten und keinerlei Unterschied im Massenbereich des asu-NAAG zeigten (Abbildung 4.6). HPLC-Messungen von Peptidextrakten von Zellen die entweder NAAGS-I oder NAAGS-II und NaDC3 exprimierten und mit NAA markiert wurden, konnten zeigen, dass es keine Unterschiede in den Spektren der NAAGS-I und NAAGS-II gab und das asu-NAAG nicht nachweisbar war. Da die unbekannte Substanz X scheinbar gleiches oder ähnliches Laufverhalten im HPLC-Spektrum zeigt wie NAAG, muss X eine chemische Ähnlichkeit zu NAAG aufweisen (vergleiche Abschnitt 4.1.2, Abbildung 4.5).

Durch Hydrolyseversuche und enzymatische Spaltung von X, konnte diese Substanz als das Tripeptid NAAG₂ identifiziert werden: Die Experimente zeigten, dass die Bestandteile der Substanz Glutamat und Asparat sind und dass der enzymatische Verdau über NAAG zu NAA verläuft. Es wurde im Verhältnis betrachtet mehr Glutamat in X als in NAAG gefunden (vergleiche Abschnitt 4.1.3). Diese Ergebnisse bestärkten die Hypothese, dass es sich bei der unbekannt Substanz X um NAAG₂ handelt. Bestätigt werden konnte dies durch vergleichende dünnschichtchromatographische Analyse von X und synthetischem NAAG₂ Standard (Abschnitt 4.1.4).

Vergleichende massenspektrometrische Untersuchungen von Peptidextrakten von Zellen die entweder NAAGS-I oder NAAGS-II und Nat8L exprimierten, konnten zeigen, dass das $m/z = 432$, welche der theoretischen Masse $[M-H^+]$ von NAAG₂ entspricht nur in Extrakten der NAAGS-II zu finden war. Das Fragmentierungsmuster konnte strukturell entschlüsselt werden und entsprach der Fragmentierung des NAAG₂ Standards (vergleiche Abschnitt 4.2, Abbildung 4.9).

Bei der Quantifizierung von NAAG und NAAG₂ in Extrakten von Zellen die NAAGS-II und Nat8L oder NaDC3 (mit NAA inkubiert) exprimierten, war auffällig, dass bei einem hohen Angebot an NAA (durch

NaDC3 Expression und NAA Behandlung) im Verhältnis betrachtet, viel weniger NAAG₂ synthetisiert wurde als bei einem kleineren Angebot an NAA (bedingt durch Nat8L). Für NAAG hingegen waren die Verhältnisse genau umgekehrt, bei viel NAA wurde viel NAAG gebildet, bei weniger NAA weniger NAAG. Da hohe Mengen an NAA die Synthese von NAAG₂ scheinbar inhibieren, lässt dies auf eine Substratkompetition schließen.

Betrachtet man diesen Aspekt von der physiologischen Seite findet man hohe Konzentrationen von NAA in verschiedenen Neuronen^{93,94}. Mit Konzentrationen von bis zu 4 mM NAA im Gehirn, kann vermutet werden, dass Neuronen die NAA produzieren auch sehr hohe Konzentrationen an NAA enthalten. Hier würde also folglich kaum oder kein NAAG₂ produziert. Eventuell gäbe es aber andere Neuronenarten mit wenig NAA und demzufolge relativ hohen Mengen an NAAG₂.

Es wurden verschiedene Untersuchungen zur Funktion von NAAG₂ durchgeführt. Durch eine neue Tandem-Massenspektrometriemethode konnte NAAG₂ nicht nur in NAAGS-II exprimierenden Zellen, sondern auch im murinen Nervensystem nachgewiesen werden (Abbildung 4.11). Die Existenz von NAAG₂ im Nervensystem von Wirbeltieren wurde bisher noch nicht beschrieben. Die Eigenschaft durch Kondensation von einem oder mehreren Glutamatresten an kleinen Peptide diese zu verändern, ist für verschiedene prokaryotische Mitglieder der ATP-grasp Protein Familie beschrieben. Als Beispiel katalysiert das RimK Protein aus *E. coli* die Kondensation von bis zu vier Glutamatresten an den Carboxylrest des ribosomalen Protein S6⁹⁵. Dies zeigt, dass diese Funktion schon bekannt ist für diese Proteinfamilie. Ob es auch im murinen Nervensystem die entsprechenden Oligopeptide von NAAG gibt (also NAAG₃, NAAG₄ usw.), konnte mit der verwendeten Massenspektrometriemethode noch nicht geklärt werden, da diese Peptide nicht mehr im messbaren Bereich lagen. Dies sollte aber weiter verfolgt werden, eventuell über die Messung der exakten Massen durch hochauflösende Massenspektrometrie.

In Untersuchungen mit GCP-II, als spezifische Peptidase für NAAG konnte gezeigt werden, dass auch NAAG₂ ein Substrat für GCPII ist. Der K_M -Wert von NAAG₂ ist dabei vergleichbar zu den gemessenen Werten von NAAG und liegt in derselben Größenordnung wie die K_M -Werte von NAAG in früheren Arbeiten^{54,77}.

GCPIII wurde durch Immunpräzipitation aus Zelllysaten mit IgG Sepharose gewonnen. Gezeigt werden konnte eine Hydrolyse von NAAG, nicht aber von NAAG₂. Der Abbau von NAAG durch GCPIII liegt nach zwei Stunden ungefähr bei 7 - 10%, wohingegen der Abbau von NAAG durch GCPII bei 20% liegt. In der Literatur ist beschrieben, dass GCPIII zwar NAAG abbaut, aber im viel geringeren Maße als GCPII und dass das Hauptsubstrat für GCPIII β -Citrylglutamat ist⁵⁵. β -Citrylglutamat (BCG) wird nur sehr wenig von NAAGS-II synthetisiert, die Menge an BCG, synthetisiert durch NAAGS-I, ist viel höher (75fach höhere Konzentration an BCG als NAAG)²¹. Dies lässt vermuten, dass GCPII eher für den Abbau von NAAG und NAAG₂ verantwortlich ist, wohingegen GCPIII hauptsächlich BCG abbaut. Die Hydrolyse von NAAG durch GCPII bewirkt extrazellulär eine Freisetzung von NAA und Glutamat⁹⁶. Glutamat kann anschließend von Neuronen oder Astrozyten aufgenommen werden. Es wird diskutiert, ob es eine Rolle von NAAG ist, große Mengen an Glutamat aus Neuronen freizusetzen und extrazellulär zu transportieren, ohne seine excitotoxische Wirkung zu entfalten⁶⁵. Sollte dies der Fall sein, wäre NAAG₂ in der Lage die doppelte Menge an Glutamat auf diese Weise zu transportieren und könnte aus diesem Grund synthetisiert werden. Im Weiteren wurde untersucht, ob NAAG₂ ebenfalls ein Substrat für den Peptidtransporter Pept2 ist. Dieser transportiert NAAG⁸⁰ und wird im zentralen Nervensystem exprimiert^{34,78,79}. Es konnte gezeigt werden, dass auch NAAG₂ durch Pept2 transportiert wird und dass sich der Transport von NAAG und NAAG₂ konzentrationsabhängig gegenseitig inhibiert. Es wird beschrieben, dass Pept2 eine mögliche Rolle in der Dispositionierung und Transport von NAAG in Neuronen hat⁸⁰. Eine ähnliche Rolle könnte auch der Transport von NAAG₂ beinhalten.

Untersuchungen zur Menge und Verteilung an NAAG₂, NAAG und NAA im zentralen und peripheren Nervensystem sollten Aufschluss über die Konzentrationen der Peptide in verschiedenen Bereichen des Nervensystems geben (vergleiche Abschnitt 4.4, Abbildung 4.16). Sowohl NAAG als auch NAAG₂ zeigen in wt Tieren eine Verteilung, die vom vorderen Bereich des zentralen Nervensystems (Kleinhirn, Cortex, optischer Nerv) über den zentralen Bereich (über Medulla Oblangata, Rückenmark) zum peripheren Nervensystem (Ischiasnerv) zunimmt. Die Menge an NAAG stimmt hierbei mit Angaben aus älteren Arbeiten überein^{1,41,97}, allerdings ist dies nur ansatzweise vergleichbar, da die meisten Untersuchungen an Ratten gemacht wurden. Die Menge an NAAG₂ liegt um das 10 - 20fache niedriger als die Menge an NAAG. Die Synthese ist aber abhängig von der Expressionsrate der NAAGS-II, NAAGS-I und Nat8L. Wie schon vorher beschrieben, sollten Zellen mit einer hohen Nat8L Aktivität nur sehr wenig NAAG₂ produzieren, wohingegen Zelltypen mit einer hohen NAAGS-II Aktivität und nur geringer Nat8L Aktivität größere Mengen an NAAG₂ produzieren sollten. Die Menge an NAAG₂ könnte also stark zellspezifisch sein.

In NAAGS-II ko Tieren ist kein NAAG₂ mehr detektierbar, dies beweist noch einmal, dass NAAG₂ nur durch die NAAGS-II synthetisiert wird. Die Menge an NAAG im adulten NAAGS-II defizienten Tier geht um bis zu 70% zurück (zum Beispiel im Ischiasnerv), die geringsten Unterschiede zwischen wt und NAAGS-II ko sind im Cortex und im Kleinhirn zu finden. Dies lässt darauf schließen, dass vermutlich hier die NAAGS-I eine höhere Aktivität aufweist. In heterozygoten Tieren liegt der Rückgang von NAAG bei 30-40%, die Menge von NAAG₂ verringert sich um 50%. Die Menge an NAA ist um bis zu eine Größenordnung höher als die Menge an NAAG, mit den höchsten Konzentrationen in Kleinhirn, Stammhirn und Medulla oblangata. Dies stimmt in der Größenordnung mit Ergebnissen aus älteren Arbeiten^{32,97,98} überein. Auch hier ist zu berücksichtigen, dass die meisten Ergebnisse aus Untersuchungen mit Ratten stammen. Zwischen wt und heterozygoten Tieren gibt es keine signifikanten Unterschiede im Level von NAA. In NAAGS-II ko Tieren gibt es eine signifikante Verringerung von NAA im Cortex und im Kleinhirn gegenüber wt Tieren. Hier ist der Unterschied in den NAAG Mengen zwischen wt und NAAGS-II ko am geringsten. Eventuell bedingt ein geringeres Angebot an NAA eine Hochregulation der Produktion von NAAG durch die NAAGS-I.

Da die Expressionsmuster der NAAGS-I und der NAAGS-II sich stark unterscheiden und es Hinweise darauf gibt, dass die NAAGS-I eine größere Rolle im embryonalen und frühen postnatalen Stadium spielt, wurden hier Untersuchungen zum altersabhängigen Expressionsmuster und zur Verteilung von NAAG und NAAG₂ in den NAAGS-II ko, heterozygoten und wt Mäuse gemacht.

NAAGS-I zeigt ein weitläufiges Verteilungsmuster über das gesamte Gehirn¹⁹. Im Gegensatz dazu ist die Verteilung von NAAGS-II punktueller. Außerdem entsprechen die Regionen der NAAGS-II Expression den Regionen mit hohen NAAG Konzentrationen^{1,20,41}. NAAGS-II könnte speziell die NAAG Produktion in bestimmten Regionen des Nervensystems anzuregen ohne zugleich zu einer sehr viel höheren BCG-Synthese zu führen. Collard *et al.* konnten zeigen, dass die Produktion von BCG durch NAAGS-II 75-fach niedriger liegt als die von NAAG, wohingegen die Produktion durch NAAGS-I für NAAG und BCG gleichermaßen ist²¹. Die altersabhängige Untersuchung der Peptide zeigt in wt Tieren eine deutliche Abnahme an NAAG mit zunehmenden Alter (vergleiche Abschnitt 4.5 Abbildung 4.17). NAAG₂ hingegen ist im Alter von einem Tag nicht detektierbar und nimmt in 21 Tage alten Tieren wieder ab. Auffällig ist außerdem, dass in einen Tag alten NAAGS-II defizienten Tieren noch keine signifikante Verringerung in der NAAG Menge zu sehen ist, dies beginnt erst im Alter von 10 Tagen mit einer Abnahme um ungefähr 40% bis hin zum adulten Tier und einer Abnahme von 70%. NAAG₂ ist im NAAGS-II ko Tier nicht zu detektieren, die Reduktion in heterozygoten Tieren nimmt aber ebenfalls mit steigendem Alter deutlich zu. Die Expression der NAAGS-II und NAAGS-I zeigen ein korrespondierendes Verhalten (vergleiche Abschnitt 4.5 Abbildung 4.18). Die Produktion an NAAGS-II nimmt mit steigendem Alter zu und liegt im jung adulten Tier fast fünfmal so hoch wie im neugeborenen Tier (P1). Die Expression an NAAGS-I nimmt hingegen

mit steigendem Alter ab und ist im adulten Tier ungefähr sechsmal niedriger als im neugeborenen Tier. Die Expression von NAAGS-I, Nat8L oder GCPII ist in den NAAGS-II ko Tieren nicht signifikant verändert. Auffällig ist auch, dass die Expression von GCPII erst mit dem Alter ansteigt, wohingegen die Nat8L Expression altersunabhängig ist. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die NAAGS-I eher im embryonalen und frühen postnatalen Alter eine Rolle spielt, wohingegen die NAAGS-II erst im steigenden Alter an Bedeutung zunimmt. Dies wird dadurch unterstützt, dass die BCG Konzentration im embryonalen und frühen postnatalen Alter am höchsten ist und danach stark abnimmt⁹⁹. Betrachtet man die Tatsache, dass BCG ein Eisen-Chelatkomplexbildner ist und dies eine Eigenschaft zur Inhibition der Bildung von reaktiven Sauerstoffformen ist⁴⁰, könnte man vermuten, dass NAAGS-I eine generelle Rolle zum Schutz vor oxidativem Stress, zum Beispiel bei hypoxischer Ischämie, hat. NAAGS-II scheint hingegen spezifisch für die Produktion von NAAG und NAAG₂ im adulten Tier notwendig zu sein. Da beide Synthetasen in 10 Tage alten Tieren stark exprimiert werden und hier die NAAG Konzentration besonders hoch ist, scheint in dieser Altersstufe sowohl eine Produktion von BCG als auch hohe Konzentrationen von NAAG besonders wichtig zu sein. Dies könnte mit dem Entwicklungsstadium zusammenhängen. In 10 Tage alten Tieren steigt die Zahl synaptischer Verknüpfungen und die Myelinisierung beginnt. Es konnte gezeigt werden, dass in NAAGS-II ko Tieren, eine Entwicklungsverzögerung von ungefähr 5 Tagen in der Expression vom Proteolipid Protein (PLP) und Myelin basischen Protein (MBP) vorliegt. Dies lässt vermuten, dass eventuell ein Zusammenhang von hohen Konzentrationen an NAAG und Myelinbildung besteht.

Ob NAAG₂ wie NAAG neuroprotektive Eigenschaften durch die agonistische Bindung an den Glutamatrezeptor hat, muss noch geklärt werden. Frühere Studien, in denen NAAG durch einen Antikörper detektiert wurde, könnten auch NAAG₂ detektiert haben¹⁰⁰. Sinnvoll wäre für weitere Untersuchungen die Synthese von NAAG₂ spezifischen Antikörpern oder die Messung nach Mikrodialyse durch Tandem-LC/MS Messungen¹⁰⁰.

In Versuchen mit Primärkulturen wurde die neuroprotektive Rolle von NAAG untersucht und auf Unterschiede in den NAAGS-II ko und wt Zellen überprüft. Die meisten Untersuchungen zu neuroprotektiven Eigenschaften von NAAG beruhen auf der indirekten Erhöhung von NAAG durch Inhibition der Glutamatcarboxypeptidasen GCPII und GCPIII. Hier wurde für die Versuche 2-PMPA (2-(Phosphonomethyl)-Glutarsäure) als Inhibitor verwendet, der durch die Kristallstruktur der Enzyme als Inhibitor gefunden wurde²⁵. GCPII wird fast ausschließlich in Gliazellen exprimiert, während GCPIII auch in Neuronen exprimiert wird^{24,25}. Ältere Arbeiten zeigen aber auch eine Expression von GCPII in Neuronen⁵⁶. Gezeigt wurde, dass GCPIII überwiegend BCG hydrolysiert⁵⁵. Hier wurde untersucht ob 2-PMPA auch einen Einfluss in reinen Neuronenkulturen hat, was die Expression von GCPII auch in Neuronen vermuten lässt und ob es Unterschiede zwischen Neuronen aus wt und NAAGS-II ko Tieren gibt.

Die Ergebnisse zeigen, dass 2-PMPA auch in reinen wt Neuronenkulturen neuroprotektiv wirkt, die Verbesserung liegt hier bei 10 - 20%. Dies lässt vermuten, dass GCPII auch in Neuronen vorkommt, wie es auch in älteren Arbeiten postuliert wurde⁵⁶, oder dass GCPIII doch einen größeren Einfluss hat. Eventuell wird doch mehr NAAG durch GCPIII hydrolysiert, als angenommen, oder BCG hat ebenfalls neuroprotektive Eigenschaften. In Neuronenkulturen aus NAAGS-II ko Mäusen und auch in den Mischkulturen ist die Reaktion auf die neurotoxischen Substanzen viel höher als im vergleichbaren wt, die Sterberate ist um 30 - 40 % größer, die reinen Neuronenkulturen aus den NAAGS-II Tieren können nicht durch Gabe von 2-PMPA positiv stimuliert werden. In den wt Mischkulturen liegt die Sterberate 2,5-fach höher als in der Kontrolle bei DO und KCN Behandlung und 1,5 Mal höher bei NMDA Behandlung. Die Gabe von 2-PMPA in der verwendeten Konzentration bewirkt eine Regeneration der Zellen auf Kontrollniveau, dies konnte auch schon in verschiedenen früheren Studien gezeigt werden^{48,52,53}. In den NAAGS-II ko Mischkulturen (NAAGS-II ko Neuronen und wt Astrozyten) liegt die Sterberate 3,5-fach höher als die Sterberate

in den Kontrollzellen, diese kann durch Gabe von 2-PMPA um 40 - 50 % verbessert werden. Das 2-PMPA auch auf die unbehandelten Kontrollen von wt Mischkulturen einen protektiven Effekt hat, konnte schon früher gezeigt werden⁵² und ist darauf zurückzuführen, dass die Protektivität auch auf die Kultivierung der Zellen wirkt. Dass die Neuronen aus den NAAGS-II ko Tieren stärker auf die Stressfaktoren ansprechen und nur im geringeren Maße auf die Gabe von 2-PMPA reagieren kann verschiedene Ursachen haben: In der quantitativen Messung von NAAG konnte gezeigt werden, dass es 35 % weniger NAAG in den Zellen gibt und das wesentlich weniger NAAG an das Medium abgegeben wird (vermutlich weil weniger produziert wird). Geht man davon aus, dass NAAG erst nach Abgabe in den Extrazellulärraum an den metabotropen Glutamatrezeptor bindet, der sich an der Oberfläche von Neuronen und Astrozyten befindet, ist eine mögliche Ursache, dass nicht genug NAAG zur Aktivierung der Rezeptoren vorhanden ist, da der Anteil an hydrolysiertem NAAG ohne 2-PMPA Behandlung höher ist, weil die Menge an GCPII in den Tieren nicht verändert ist. Da von den NAAGS-II ko Neuronen kein NAAG₂ mehr gebildet werden kann, könnte auch dies eine Ursache sein, wenn man davon ausgeht, dass auch NAAG₂ ähnliche neuroprotektive Eigenschaften wie NAAG hat. Ein weiterer Ansatz der untersucht werden sollte, ist das Verhalten von Mischkulturen aus NAAGS-II ko Neuronen und Astrozyten, ebenso wie die Untersuchung von Mischkulturen aus Nat8L ko Tieren, in denen kein NAAG mehr vorhanden ist.

In verschiedenen Erkrankungen wurden im Liquor von Patienten erhöhte NAAG Mengen gefunden, zum Beispiel in der Pelizaeus-Merzbacher Krankheit oder der SALLA Erkrankung. Ebenfalls erhöhte Konzentrationen an NAAG wurden in Patienten gefunden die an der Canavan Krankheit leiden. Bei dieser Erkrankung handelt es sich um eine Defizienz der Aspartoacylase⁴³, die NAA hauptsächlich in Oligodendrozyten zu Aspartat und Acetat abbaut. Hier wurde im Tiermodell der Canavan Krankheit untersucht, ob eine Erhöhung der Konzentration an NAAG oder NAAG₂ in Peptidextrakten des Gehirns vorliegt und ob dies mit Veränderungen der Expressionslevel der NAAGS einhergeht. Es konnte in den Aspartoacylase ko Mäusen eine Erhöhung an NAA um 50% und eine Erhöhung an NAAG und NAAG₂ um 35% gefunden werden. Diese Anreicherung geht aber nicht mit einer erhöhten Expressionsrate der NAAGS einher. Die Erhöhung an NAAG und NAAG₂ könnte ein sekundärer Effekt durch das höhere Angebot an NAA sein. Da es keine Veränderungen in der Expression von GCPII gibt, ergibt sich auch kein regulatorisch bedingter erhöhter Abbau von NAAG zu NAA.

In Nat8L ko Tiere werden weder NAA noch NAAG oder NAAG₂ produziert. Hiermit wird noch einmal bewiesen, dass NAA nur durch die Synthese produziert wird und direkt an der Synthese von NAAG und NAAG₂ beteiligt ist und nicht ersetzt werden kann. In den heterozygoten Tieren gibt es einen Rückgang von NAA um 50%, die Peptide NAAG und NAAG₂ zeigen keine Veränderung. Dies zeigt, dass das Angebot an NAA in den heterozygoten Tieren noch so hoch ist, dass die Synthese der Peptide nicht beeinflusst wird. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die NAAGS-II neben dem Hauptprodukt NAAG noch ein weiteres Peptid synthetisiert, das Tripeptid N-Acetylaspartylglutamylglutamat (NAAG₂). Dieses wird nicht durch die NAAGS-I produziert. NAAG₂ kann ebenfalls durch GCPII abgebaut werden und wird auch von Pept2 transportiert. NAAG₂ kann im murinen Nervengewebe gefunden werden und hat dabei dieselbe Verteilung wie NAAG. Altersabhängige Studien von wt und NAAGS-II ko Tieren zeigen, dass die NAAGS-I eine größere Rolle im embryonalen und frühen postnatalen Alter zu spielen scheint. Wohingegen die NAAGS-II erst im postnatalen und adulten Alter an Bedeutung gewinnt. Zu einer physiologischen Funktion von NAAG₂ kann bis zu diesem Zeitpunkt noch keine eindeutige Aussage gemacht werden.

6.2 Sialin als NAAG Transporter

Um den postulierten Metabolismus von NAAG weiter aufzuklären, wurde untersucht wie NAAG und auch NAAG₂ in synaptische Vesikel transportiert werden können. Bekannt ist die Calcium-abhängige Freisetzung von NAAG an Synapsen^{11,14,22}. Nicht bekannt ist der Transport in synaptische Vesikel. Neale *et al.* konnten NAAG in konzentrierter Form in synaptischen Vesikeln nachweisen und zeigen dass es als Cotransmitter mit den klassischen Neurotransmittern Glutamat, GABA und Acetylcholin freigesetzt wird⁹⁶.

Ein Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Untersuchung des Transports von NAAG in synaptische Vesikel. Hier wurde der Schwerpunkt auf die Untersuchung von Sialin gelegt da dieses verschiedenen Faktoren entspricht, die es als potentiellen Kandidaten für den NAAG Transport wichtig machen: Sialin (SLC17A5), ist bekannt als lysosomaler H⁺/Sialinsäure Cotransporter. Seine extra-lysosomalen Lokalisation in Neuronen lässt weitere Funktionen neben dem Transport von Sialinsäure vermuten. Miyaji *et al.* konnten mit spezifischen Antikörpern gegen Sialin zeigen, dass es in synaptisch ähnlichen Mikrovessikeln vorkommt⁸³. Miyaji *et al.* konnten außerdem zeigen, dass sowohl Glutamat als auch Aspartat durch Sialin in diese Vesikel transportiert werden können und dass der Transport von Aspartat und Glutamat durch Sialin spezifisch ist⁸³. Sialin scheint in synaptischen Vesikeln vorzukommen und dort den Transport von Aspartat und Glutamat zu katalysieren. Betrachtet man als letzten Punkt die Zusammensetzung von Sialinsäure (Neu5Ac), kann man einige Parallelen zu NAAG finden. Beide Moleküle sind ähnlich groß, besitzen eine N-Acetylgruppe und haben beide ähnliche Donor-Akzeptoreigenschaften. Studien zur Bindung von Neu5Ac und synthetischen Analoga an das aktive Zentrum von Sialin zeigen, dass vor allem starke Bindungen über die Acetylgruppe, die Hydroxy-Gruppen und die Säuregruppe aufgebaut werden¹⁰¹. Über die Acetylgruppe (die auch im NAAG vorhanden ist) können bis zu fünf Komplexbindungen zu verschiedenen Resten ausgebildet werden (β -Anomer, "offenes Lumen Modell").

Aufgrund der aufgezeigten Eigenschaften wurde untersucht, ob NAAG in Vesikel transportiert werden kann und ob dies möglicherweise durch Sialin als Transporter katalysiert wird.

Zuerst wurde untersucht ob in Mikrovessikeln aus Mäusen eine Aufnahme von NAAG und Aspartat messbar ist. Für die Anreicherung der Vesikel wurde ein Protokoll von Hell *et al.* in modifizierter Form verwendet^{73,74}. Die Anreicherung der Vesikel wurde mit Western Blot Analysen mit Antikörpern gegen Synaptophysin, Na⁺/K⁺-ATPase und EEA1 überprüft (vergleiche Abbildung 5.1). Außerdem wurden Proteom Studien der Fraktion durchgeführt und mit Studien aus Ratten Vesikeln verglichen (Daten nicht gezeigt). Es konnten viele spezifische Proteine für synaptische Vesikel wie Synaptophysin, Synapsin 1a und 1b, Vesikel assoziierte Proteine, die VGlut Transporter und andere vesikuläre Transporter gefunden werden. Die verwendeten Mikrovessikel sind vergleichbar mit den synaptischen Vesikel ähnlichen Mikrovessikeln die von Miyaji *et al.* verwendet wurden und mit denen der Sialin abhängige Transport von Glutamat und Aspartat gemessen wurde⁸³.

Im Transportversuch konnte gezeigt werden, dass sowohl NAAG als auch Aspartat in die Vesikel transportiert werden. Dieser Transport ist ATP-abhängig und kann durch Zugabe von Entkopplern (FCCP und GramD) inhibiert werden. Die Aufnahme erfolgt nur in Gegenwart von Cl⁻-Ionen, wie auch schon für Aspartat und Glutamat gezeigt wurde^{90,102}. Hier wurde außerdem untersucht ob dieser Transport durch einen Überschuss an Sialinsäure oder Glutamat gehemmt werden kann und ob sich Aspartat und NAAG gegenseitig inhibieren können. Der NAAG Transport wurde signifikant durch Zugabe an Glutamat, Sialinsäure und Aspartat gehemmt. Der Aspartattransport kann durch Zugabe an NAAG gehemmt werden. Dies lässt vermuten, dass NAAG und Aspartat denselben Transporter transportiert werden. Außerdem lässt die Inhibition durch Glutamat und Sialinsäure darauf schließen, dass Sialin am Transport beteiligt sein könnte. Bei der kinetischen Untersuchungen von NAAG- und Aspartattransport in Vesikel konnte gezeigt werden, dass sie ähnliche Substrateigenschaften haben.

Zur weiteren Untersuchung wurde ein Zellkulturversuch entwickelt, indem die Aufnahme von NAAG durch Sialin dünnenschichtchromatographisch nachgewiesen werden kann. Ein vom Prinzip analoger Versuch wurde von Wreden *et al.*^{103,104} zur Untersuchung des Transports von Glutamat und Neu5Ac (Sialinsäure) durchgeführt. Dort wurden aufgrund der pH-Abhängigkeit des Transports von Neu5Ac saure Bedingungen gewählt. Im ersten Versuch zum Transport mit NAAG wurden aufgrund der Vermutung, dass der Transport pH-abhängig sein könnte, alkalische Bedingungen gewählt. Physiologisch betrachtet, muss der Transport von NAAG nach außen gerichtet sein. Da für andere Ionen oder Potential abhängige Transporter bekannt sind, dass sie das gleiche Substrat in beide Richtungen transportieren können und in Abhängigkeit von der Richtung des Ionengradienten ist¹⁰⁵, könnte dies auch für Sialin gelten.

Gezeigt wurde die Aufnahme von NAAG durch Sialin und eine stärkere Aufnahme durch die Oberflächenmutante Sialin-L22/23A. Mit dem Kontrollprotein (EGFP) konnte keine Aufnahme detektiert werden. Die Mutagenese des lysosomalen Rückhaltesignals im Sialin wurde von Morin *et al.* beschrieben¹⁰⁶. Wie auch in der gezeigten Immunofluoreszenz zu sehen ist, ist die Mutante überwiegend oberflächenlokalisiert (Abbildung 5.4 B). Die bessere Zugänglichkeit des Proteins in der Zelle führt zur besseren Aufnahme des Substrats.

Miyajii *et al.* konnten zeigen, dass der Transport von Aspartat und Glutamat zum größten Teil auf die Membranpotentialdifferenz zurückzuführen ist, da aber der Transport durch Nigericin reduziert werden kann, lässt dies vermuten dass der Transport zumindestens teilweise pH-abhängig verläuft^{83,91}. Nigericin in niedrigen Konzentrationen verringert den pH-Gradienten¹⁰⁷. Da das Signal für NAAG im pH-abhängigen Zellversuch sehr schwach war, wurde im Weiteren untersucht, ob der Transport eventuell Membranpotentialdifferenzabhängig ist, oder das Potential dem pH-Gradienten entgegenwirkt. Durch Zugabe hoher Kaliumkonzentrationen in den Reaktionspuffer kann das Membranpotential verringert (oder eventuell sogar umgekehrt) werden⁸⁸. Es wurde der Transportversuch bei pH 5,5, pH 7 und pH 9 mit hohen und niedrigen Konzentrationen an Kalium durchgeführt (vergleiche Abbildung 5.5). Die Auswertung zeigte, dass der Transport am effektivsten bei pH 9 und hohen Kaliumkonzentrationen war. Da kein Transport bei pH 5,5 stattfindet, bestätigt dies den vermuteten pH-abhängigen Transport. Da der Transport am effizientesten bei pH 9 und hohen Kaliumkonzentrationen war, könnte auch hier ein Transport vorliegen der pH- und Membranpotentialabhängig ist. Dass NAAG auch bei einem annähernd neutralen pH-Wert noch transportiert wird, ist konform mit dem Ergebnis, dass auch Sialinsäure noch im Neutralen anteilhaft transportiert wird, obwohl der Transport eigentlich pH-abhängig ist (vergleiche Abbildung 5.10 C). Dies wurde auch schon in früheren Studien gezeigt^{103,106}.

Für weitere Untersuchungen wurden zusätzlich zu den wt Vesikeln, Vesikel aus Sialin defizienten Tieren gewonnen. Diese Tiere haben ein nicht mehr funktionelles Sialingen. Verwendet wurden zur besseren Vergleichbarkeit nur Tiere im Alter zwischen P16 und P18. In Transportversuchen mit angereicherten Mikrovesikeln aus wt und Sialin ko Mäusen konnte gezeigt werden, dass ein Transport von NAAG, NAAG₂ und Aspartat nur bei wt Vesikeln stattfindet, der gemessene Transport in Sialin ko Vesikel befindet sich auf dem Niveau der Kontrollen (Transport ohne ATP oder Zugabe an FCCP). Dies ist in Einklang mit den Ergebnissen von Miyaji *et al.*, die gezeigt haben, dass Aspartat durch Sialin in Vesikel transportiert wird und dass Sialin in synaptischen Vesikeln zu finden ist^{83,91}. Das Ergebnis widerspricht den Ergebnissen von Morland *et al.*¹⁰⁸, die gezeigt haben, dass die Aufnahme von Aspartat in den Vesikeln aus Sialin ko Mäusen nicht signifikant reduziert ist. Die dort verwendete Präparation der Vesikel unterscheidet sich etwas von der hier angewendeten Präparation und der Präparation von Miyaji *et al.*. Morland *et al.* verwendeten ein Verfahren indem zuerst Synaptosomen isoliert werden und daraus anschließend die synaptischen Vesikel. Morland *et al.* stellten desweiteren die Hypothese auf, dass Sialin nicht in synaptischen Vesikeln vorhanden ist, da es in Proteom Analysen von synaptischen Vesikeln nicht zu finden ist^{108,109}. Sowohl in

der Proteom Analyse von Morland *et al.* als auch in anderen Proteom Studien zu synaptischen Vesikeln¹¹⁰ wurde eine Vortrennung der Proteine über 16-BAC/SDS-PAGE und 1D-SDS-Page durchgeführt. Da Sialin die Eigenschaft hat im SDS-Gel zu aggregieren, sehr "verschmiert" über einen Bereich von über 100 kDa zu laufen und teilweise im Sammelgel bleibt (vergleiche auch Western Blot aus Abbildung 5.9) könnte dies dazu geführt haben, dass es in Proteom Analysen nicht detektierbar war.

Die hier gezeigten Ergebnisse für Asparat sind konform mit den Ergebnissen von Miyaji *et al.*. Der NAAG und auch der NAAG₂ Transport findet nicht statt in Vesikeln aus Sialin defizienten Mäusen und kann durch Sialinsäure gehemmt werden. Der Zellversuch zeigt außerdem, dass NAAG nur in Anwesenheit von Sialin von Zellen aufgenommen werden kann. Diese Ergebnisse zeigen, dass Sialin der vesikuläre Transporter für NAAG und auch für NAAG₂ ist.

Patienten mit verschiedenen Formen der SALLA Erkrankung (bedingt durch verschiedene Mutationen) haben erhöhte NAAG Konzentrationen im Liquor⁴⁶. Die Konzentrationen variieren dabei um das zwei- bis zehnfache der Menge in Kontrollpatienten. Zur infantilen Form der Erkrankung wurden keine Untersuchungen in diese Richtung gemacht. Die Erhöhung von NAAG im Liquor von Patienten konnte schon in einigen Krankheiten mit starker Hypomyelinisierung gezeigt werden⁸⁶. Aufgrund dieser Ergebnisse, wurde hier untersucht, ob die Erhöhung an NAAG auch in Sialin defizienten Mäusen vorkommt.

Die Messung von NAA und NAAG in der cerebralen Flüssigkeit von wt und Sialin defizienten Mäusen zeigte keine Veränderung (Abbildung 5.7 B). Allerdings liegt die Messung am Detektionsminimum der Peptide und ist daher nicht exakt quantitativ. Im Gesamtgehirn kann eine Erniedrigung von NAAG um 40% in Sialin ko Tieren gegenüber den wt Tieren detektiert werden. Das Level an NAAG₂ und NAA bleibt dabei unverändert (Abbildung 5.7 B). Die entsprechenden Real-Time PCR Untersuchungen zeigen keine Veränderung in der Genexpression der NAAGS oder Nat8L, aber eine Erhöhung des Levels an GCPII (Abbildung 5.8). Die Erniedrigung an NAAG im Gehirn der Sialin ko Mäuse kann verschiedene Ursachen haben: Die Reduktion könnte an der gesteigerten Expression an GCPII liegen. Da die Tiere eine starke Entwicklungsverzögerung gegenüber ihren wt Geschwistern zeigen, kann auch dies eine mögliche Ursache für die reduzierte Menge an NAAG sein. Die Tiere zeigen neben Wachstumsverzögerung und einer starken Hypomyelinisierung auch eine geringere Anzahl an Oligodendrozyten und eine verstärkte Apoptose¹¹¹. Ebenfalls wurde schon für die Canavan Krankheit beschrieben, dass erhöhte NAAG Mengen im Liquor von Patienten mit einer erhöhten Freisetzung aus dem Gehirn einhergehen könnten⁴⁴, auch dies könnte hier ein Grund sein. Warum das NAAG Niveau im Liquor von Patienten erhöht ist, kann nur spekulativ beantwortet werden. Es könnte sein, dass Sialin zusätzlich als Transporter von NAAG außerhalb der synaptischen Vesikel fungiert, da es in vielen Bereichen des zentralen Nervensystems gefunden wird. Sialin konnte in Neuronen in vesikulären Strukturen in den Zellkörpern und Neuriten gefunden werden⁸⁴. Außerdem wurde es im Neocortex und im Hippocampus in den ventrikulären Progenitorzellen gefunden⁸⁴. Da Sialin auch in Epithelzellen nachgewiesen wurde¹¹², könnte es der Transporter für NAAG in die Ventrikel des Gehirns oder für die Liquor-Blut-Schranke sein. Dieses würde bei einer Sialindefizienz zu einer Akkumulation von NAAG im Liquor führen, wie in den Patienten zu sehen.

Mit dem etablierten Zellversuch wurde die Aufnahme von NAAG untersucht, wenn im Sialin Mutationen vorliegen. Es wurden zwei Mutanten ausgesucht, die gut beschrieben sind. Die R39C Mutante entspricht einer Mutation in Patienten mit der SALLA Erkrankung, die H183R Mutante entspricht einer Mutation in Patienten mit der ISSD. Patienten mit ISSD zeigen den stärkeren Phänotyp. Gezeigt wurde außerdem, dass Sialinsäure in der R39C Mutante noch anteilhaft transportiert werden kann, nicht aber in der H183R Mutante¹⁰³. Miyaji *et al.* konnten außerdem zeigen, dass der Transport von Glutamat und Asparat im Fall der R39C Mutante nicht mehr stattfindet, aber noch bei der H183R Mutante¹¹³. Im Fall von NAAG sieht

man weiterhin einen Transport in der R39C Mutante, aber nicht mehr für die H183R Mutante (Abbildung 5.10 A und B). Da das Signal sehr schwach war, wurde eine lange Inkubationszeit für die Aufnahme von 45 Minuten gewählt. Die Aufnahme liegt dadurch nicht mehr im linearen Bereich und es ist nur eine semiquantitative Aussage über die aufgenommene Menge an NAAG durch die R39C Mutante möglich. Dies zeigt auch die gemessene Aufnahme an Sialin, hier liegt die Aufnahme in der R39C Mutante bei 50 % des wt (Abbildung 5.10 C). In der Literatur werden aber Werte um 10 %¹⁰³, gemessen in Zellen nach 5 Minuten, bis 35 %¹¹³ gemessen in rekonstituierten Proteoliposomen nach 1 Minute, angegeben. Da in der H183R Mutante kein Transport von NAAG mehr stattfindet, kann vermutet werden, dass der starke Phänotyp der Patienten nicht nur auf den fehlenden Transport und die Akkumulation von Sialinsäure zurückzuführen ist, sondern auch auf einen fehlerhaften neuronalen Transport von NAAG.

Als weiteren Nachweis für den Transport von NAAG durch Sialin wurde nach den Vorgaben von Miyaji *et al.*⁸³ eine Rekonstitution von Sialin durchgeführt. Dieses wurde dafür in Insektenzellen exprimiert und aufgereinigt, genauso wie der Glutamat-Transporter VGlut2 als Kontrollprotein. Zusätzlich wurde aus *E. coli* die H⁺-ATPase gewonnen und aufgereinigt. Es wurden verschiedene Transportversuche durchgeführt. Sowohl NAAG als auch Aspartat werden in die rekonstituierten Proteoliposomen aufgenommen wenn Sialin und eine aktive H⁺-ATPase (durch Zugabe an ATP) vorhanden sind. Aus der konzentrationsabhängige Aufnahme von NAAG und Aspartat lässt sich durch dem Michaelis-Menten-Plot der K_M-Wert und der V_{max}-Wert bestimmen (Abbildung 5.15). Für NAAG berechnet sich der K_M-Wert zu 0,2 ± 0,1 mM und der V_{max} zu 2234 ± 52 nmol/mg Protein/min, für Aspartat zu 0,5 ± 0,2 mM und 2429 ± 247 nmol/mg Protein/min. Von Miyaji *et al.* wurde der K_m-Wert für Aspartat mit 0,62 mM bestimmt, dies liegt im guten Einklang mit den hier erhaltenen Ergebnissen. NAAG und Aspartat zeigen ähnlich gute Substrateigenschaften. In den Kontrollversuchen (Abschnitt 5.5.4.2) konnte gezeigt werden, dass Sialinsäure in die Sialin haltigen Proteoliposomen bei vorhandenen pH-Gradienten aufgenommen wird. Außerdem konnte die ATP-abhängige Aufnahme von Glutamat in die VGlut2 haltigen Proteoliposomen mit aktiver ATPase gezeigt werden. NAAG wird dabei nicht von VGlut2 transportiert. Weitere Transportversuche zeigen, dass auch NAAG, wie Aspartat, transportiert wird, wenn dem System statt ATP Valinomycin zugefügt wird (Abbildung 5.17 A). Valinomycin erzeugt ein Membranpotential (innen positiv) durch K⁺-Diffusion⁹⁰. Sind ATP und Valinomycin vorhanden wird der Transport reduziert, ist weder ATP noch Valinomycin vorhanden kann nur noch der passive Transport gemessen werden⁹¹. Der ATP-abhängige Transport von NAAG und Aspartat kann durch Zugabe von FCCP und Sialinsäure inhibiert werden (Abbildung 5.17 B). Valproat wurde als potentieller Inhibitor untersucht, da gezeigt wurde, dass es die Menge an Aspartat in den Nervenendigungen reduziert⁹². Hier konnte keine signifikante Reduzierung des Transports von Aspartat oder NAAG bei aktiver H⁺-ATPase gezeigt werden. Der NAAG Transport gemessen bei pH 7 und pH 9 zeigt keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 5.17 C).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass NAAG und NAAG₂ in Mikrovesikel transportiert werden, dass dieser Transport durch Sialinsäure inhibiert wird und von Sialin abhängt. Der Transport von NAAG durch Sialin wurde außerdem in rekonstituierten Proteoliposomen und in einem neu entwickelten zellulären Transportversuch gezeigt. Hier konnte auch gezeigt werden, dass der NAAG Transport bestimmt wird durch das Membranpotential und zum Teil durch den pH-Gradienten. Im Zellversuch konnte gezeigt werden, dass NAAG nicht mehr transportiert wird, wenn eine Mutation des Sialingens (H183R) vorliegt, die der ISSD Erkrankung zugrunde liegt. Dies sollte aber zum Beispiel durch weitere Rekonstitutionsversuche noch genauer untersucht werden. Interessant wäre außerdem die Untersuchung, ob eine direkte Interaktion zwischen NAAG-Synthese und Transport besteht, das heißt, ob es zwischen Sialin und den NAAGS eine Interaktion gibt. Die Kopplung von Synthese und Transport von Neurotransmittern konnte für Dopamin¹¹⁴, Acetylcholin¹¹⁵ und GABA¹¹⁶ gezeigt werden.

Kapitel 7

Zusammenfassung

NAAG ist eines der höchst konzentrierten Neuropeptide im Nervensystem von Säugetieren. Die Konzentrationen von NAAG im zentralen und peripheren Nervensystem liegen im millimolaren Bereich. Es wird durch spezifische Synthetasen, die NAAGS-I und die NAAGS-II synthetisiert¹⁹⁻²¹. In dieser Arbeit wurden Teile des postulierten trizellulären Metabolismus weiter aufgeklärt. Es wurde die Funktion der NAAGS-II genauer aufgeklärt und es wurde der Transport von NAAG in Synapsen ähnliche Mikrovesikel untersucht und der Transporter identifiziert.

Die Untersuchung der NAAGS-II ergab, dass sie neben NAAG als Hauptprodukt noch ein weiteres Peptid, das Tripeptid NAAG₂ synthetisiert. Dieses wird vermutlich durch eine Kondensationsreaktion aus Glutamat und NAAG gebildet. Mit ESI-MS Messungen konnte gezeigt werden, dass NAAG₂ im murinen zentralen und peripheren Nervensystem vorkommt, aber in einer zehn- bis zwanzig-fach niedrigeren Menge als NAAG. Es konnte gezeigt werden, dass NAAG₂ wie NAAG durch die Glutamatcarboxypeptidase GCPII hydrolysiert wird und durch Pept2 transportiert werden kann. Ob auch NAAG₂ an den metabotropen Glutamatrezeptor als Agonist bindet, muss noch geklärt werden.

Die Detektion und Quantifizierung von NAA, NAAG und NAAG₂ im murinen Gewebe konnte durch ei-

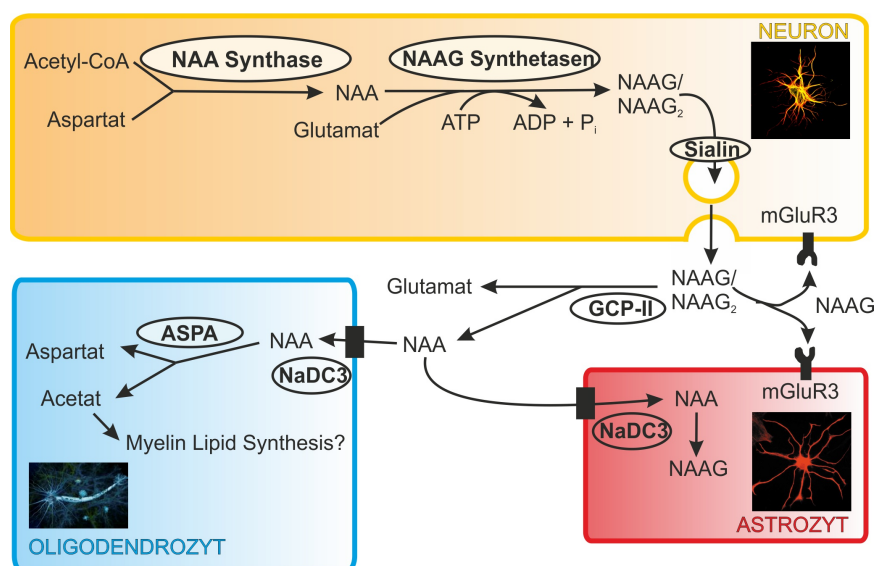


Abbildung 7.1: Trizellulärer Metabolismus von NAAG. Der teilweise geklärt Metabolismus zeigt ein zusätzliches neues Produkt der NAAGS-II, das Tripeptid NAAG₂. Dieses kann ebenfalls von GCPII hydrolysiert und von Pept2 transportiert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass NAAG und auch NAAG₂ durch Sialin in Vesikel transportiert wird.

ne neu entwickelte Tandem-LC/MS-Methode mit der Benutzung von internen [^{13}C]-markierten Standards etabliert werden. In NAAGS-II defizienten Tieren konnte kein NAAG₂ mehr detektiert werden, im heterozygoten adulten Tier liegt die Menge an NAAG₂ nur noch bei 50%. NAAG ist in den adulten NAAGS-II ko Tieren um 70%, in den heterozygoten Tieren um 40% gegenüber den Mengen in wt Tieren verringert. In altersabhängigen Studien von NAAGS-II ko und wt Tieren konnte gezeigt werden, dass es Unterschiede in der Expression der beiden Synthetasen gibt. Die NAAGS-I scheint eine größere Rolle im embryonalen und frühen postnatalen Alter zu spielen, während die Expression der NAAGS-II erst mit steigendem Alter zunimmt. Diese Altersabhängigkeit konnte auch schon für das Hauptprodukt der NAAGS-I, dem BCG gezeigt werden^{21,39}. Unterschiede konnten auch in den NAAG und NAAG₂ Mengen gefunden werden: Während NAAG₂ bei einem Tag alten Tieren noch nicht detektierbar war, war die Menge von NAAG stark hochreguliert und es konnten keine Unterschiede zwischen wt und NAAGS-II ko Tieren gefunden werden. Dies lässt darauf schließen, dass in diesem Alter NAAG nur von NAAGS-I gebildet wird. Ab dem Alter von 10 Tagen ist NAAG₂ detektierbar, und es gibt signifikante Unterschiede zwischen den NAAGS-II ko und wt Tieren. In 15 Tage alten Tieren nimmt die NAAG Menge, aber noch nicht die NAAG₂ Menge wieder ab, vermutlich weil die Expression der NAAGS-I zurück geht. Ab dem Alter von 21 Tagen nehmen sowohl NAAG als auch NAAG₂ weiter ab, die Unterschiede zwischen wt und NAAGS-II ko Tieren, bezogen auf die Peptidmengen werden größer. Ab diesem Alter scheint NAAG überwiegend von der NAAGS-II synthetisiert zu werden. In Untersuchungen von Primärkulturen konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von GCPII und GCPIII auch in reinen Neuronenkulturen einen positiven Effekt hat, vermutlich weil GCPII auch von Neuronen exprimiert wird oder die Inhibition von GCPIII stärkere neuroprotektive Eigenschaften hat als beschrieben. Außerdem wurde untersucht ob die NAAGS-II Defizienz einen Einfluss auf die neuroprotektiven Eigenschaften hat. Es wurde gezeigt, dass die NAAGS-II ko Neuronen stärker auf die neurotoxischen Substanzen reagieren als die wt Neuronen und dass der Effekt der Inhibition von GCPII durch 2-PMPA wesentlich geringer ist als in wt Kulturen. Es wurde außerdem weniger NAAG in den NAAGS-II ko Neuronen und im Überstand der Zellen im Vergleich mit wt gefunden, was eine mögliche Ursache sein könnte. Im Mausmodell der Canavan Krankheit, der ein Defekt der Aspartoacylase zugrunde liegt⁴⁴, konnte gezeigt werden, dass es neben der Akkumulation von NAA auch eine Erhöhung von NAAG und NAAG₂ gibt, dies aber nicht auf eine erhöhte Expression der NAAGS-II zurückzuführen ist, sondern wahrscheinlich auf einem sekundären Effekt durch den verhinderten Abbau von NAA beruht.

Im zweiten Teil wurde der Transport von NAAG in synaptische Vesikel untersucht. Hierfür wurden Mikrovesikel aus Mäusen isoliert. Die isolierten Vesikel wurden für Transportversuche verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass NAAG wie auch Aspartat ATP-abhängig aufgenommen werden. Dieser Transport kann durch Zugabe eines Entkopplers (GramD, FCCP) gehemmt werden. Außerdem wird die Aufnahme durch Zugabe von Glutamat und Sialinsäure inhibiert. Es wurden außerdem Vesikel isoliert, die aus Gehirnen von Sialin defizienten Mäusen gewonnen wurden. In diese Vesikel konnte keine ATP-abhängige Aufnahme von NAAG, NAAG₂ oder Aspartat detektiert werden. Es wurde zusätzlich ein Zellversuch etabliert, in dem der Transport von NAAG durch Sialin dünn-schichtchromatographisch nachgewiesen werden konnte. Durch diese Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass der Transport von NAAG vermutlich vom pH-Gradient und Membranpotential abhängig ist. Zusätzlich konnte für zwei Patientenmutationen gezeigt werden, welche die SALLA Erkrankung bzw. die ISSD verursachen, dass kein Transport mehr stattfindet, wenn die Mutation der ISSD vorliegt (H183R).

Zur Bestätigung, dass Sialin ein NAAG-Transporter ist wurde der Transport auch in rekonstituierten Proteoliposomen durchgeführt. Hierfür wurde die H⁺-ATPase aus *E. coli* und Sialin und VGlut2 aus Insektenzellen gewonnen und aufgereinigt und in Liposomen rekonstituiert. Sowohl NAAG als auch Aspartat werden nur bei aktiver H⁺-ATPase oder durch Gabe von Valinomycin in Sialin haltige Liposomen transportiert. Die Aufnahme von NAAG findet nicht durch den VGlut2 Transporter statt. Der Transport von

NAAG und Aspartat kann durch Gabe von FCCP und Sialinsäure reduziert werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass Sialin der neuronale Vesikel-Transporter für NAAG ist. Welche Rolle NAAG in den verschiedenen Patientenmutationen spielen könnte, könnte durch die Zellversuche und die Rekonstitutionsversuche weiter aufgeklärt werden.

Kapitel 8

Danksagungen

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. Matthias Eckhardt. Ihm möchte ich insbesondere für die interessante Aufgabenstellung, die vielen Diskussionen und Anregungen, den Hilfestellungen bei kleinen und größeren Problemen und dem guten Arbeitsverhältnis danken. Ohne seine Motivation und die Leidenschaft für dieses Thema wäre diese Arbeit wahrscheinlich nie zustande gekommen.

Weiterhin möchte ich Professor Dr. Christoph Thiele für die freundliche Übernahme der Zweitbegutachtung danken, sowie PD Dr. Thomas Kolter und Professor Dr. Thomas Bredow für die Übernahme des dritten und vierten Gutachters.

Ich danke Professor Volkmar Giesemann, dass ich meine Doktorarbeit an seinem Institut machen durfte, für die finanzielle Förderung meines Projektes und für anregende Ideen zu meinem Thema.

Ich danke der gesamten Arbeitsgruppe "Familie Eckhardt" für wundervolle drei Jahre gemeinschaftlichen Arbeitens, Unternehmungen, viel Freude und großer Unterstützung in allen Lebenslagen und natürlich allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Giesemann. Insbesondere seien hierbei erwähnt, Elvira Thiessen mit großem Dank für Tausende von Genotypisierungen und die Unterstützung bei der Aufreinigung der Proteine und bei den vielen kleinen Dingen, die das Arbeiten soviel einfacher gemacht haben, Lihua Wang-Eckhardt für die Unterstützung beim Arbeiten mit RNA, Klaudia Brysch für viele Ideenreiche Diskussionen und die beruhigenden Worte, wenn es nötig war. Außerdem danke ich Heba Mahmoud Ahmed Eltahir und Katharina Klein für das geduldige Erklären der Präparation von Embryonen und den Umgang mit Primärkulturen.

Ich danke meinem Mann Immanuel für das Verständnis, die moralische Unterstützung und die Geduld in all der Zeit. Auch wenn er manchmal den Kürzeren gegenüber der Arbeit ziehen musste, war er immer für mich da.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die mich immer wieder motivierend unterstützen haben, besonders meinen Eltern, die immer an mich geglaubt haben.

Anhang A

Plasmidkarten der neu generierten Konstrukte

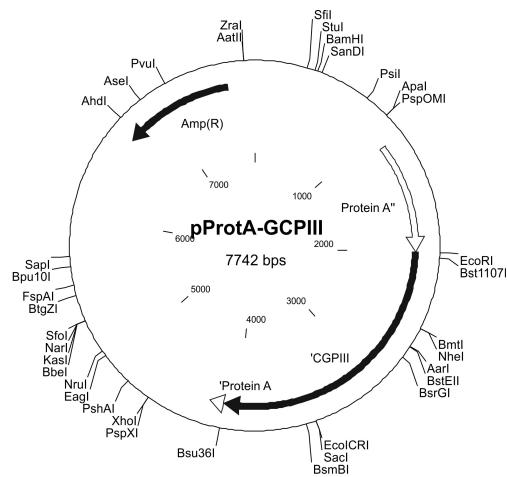


Abbildung A.1: Plasmidkarte von pProtA-GCPIII. Die Gen-Sequenz für GCPIII wurde aus Maus cDNA mit entsprechenden Primern amplifiziert und in einen pProtA-Vektor kloniert.

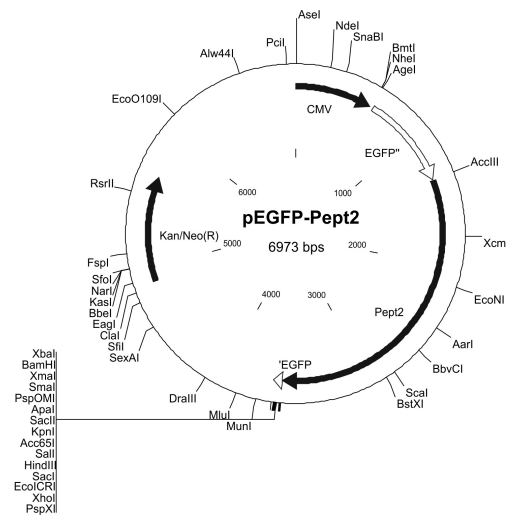


Abbildung A.2: Plasmidkarte von pEGFP-Pept2. Die cDNA des Transporters wurde in zwei Teil-PCRs kloniert. Nach Isolation der einzelnen Fragmente, wurden diese in einer neuen PCR mit den äußeren Primern zu einem Fragment fusioniert. Die vollständige Pept2 cDNA wurde zuerst in einen pBlueskript Vektor kloniert und anschließend in den pEGFP-C3 Vektor umklontiert.

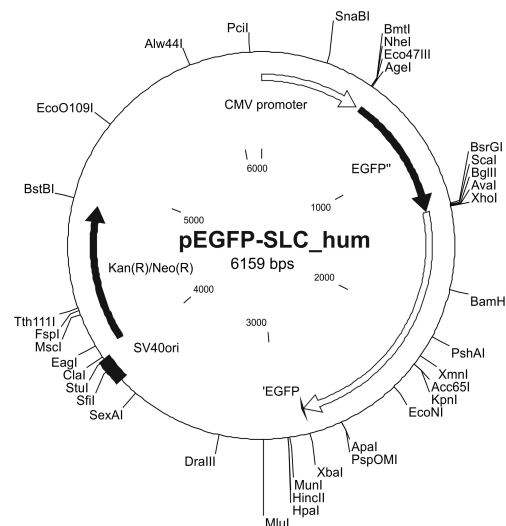


Abbildung A.3: Plasmidkarte von pEGFP-SLC_human. Die cDNA von SLC17A-human (Klon IRAT p970 H0614D) wurde käuflich erworben (Source BioScience, Nottingham, UK) und in einen pEGFP-C3 Vektor kloniert. Es wurden zusätzlich folgende Mutationen eingefügt: L22/23A, Mutation im lysosomalen Rückhalte-signal, R39C Mutation für die SALLA Erkrankung, H183R Mutation für die ISSD.

Anhang A. Plasmidkarten der neu generierten Konstrukte

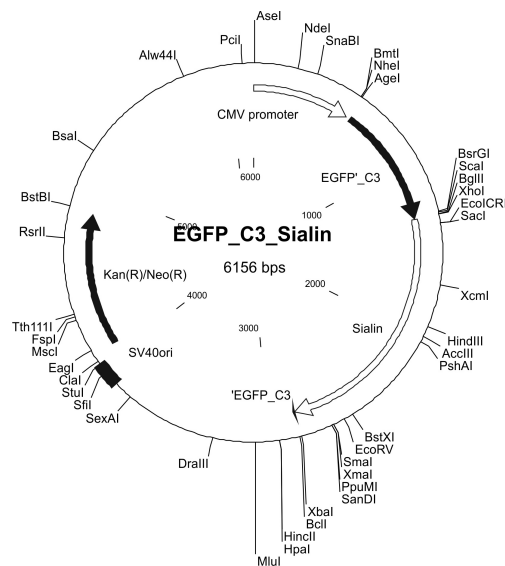


Abbildung A.4: Plasmidkarte von pEGFP-SLC_murin. Die Gen-Sequenz für SLC17A wurde aus Maus cDNA mit entsprechenden Primern amplifiziert und in einen pEGFP-C3 Vektor kloniert. Es wurden zusätzlich die L22/23A Mutation im lysosomalen Rückhaltesignal eingefügt.

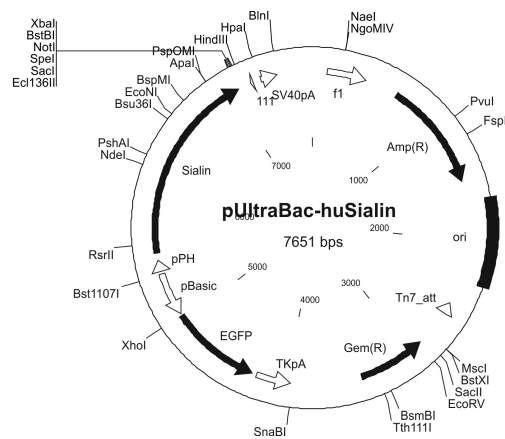


Abbildung A.5: Plasmidkarte von pUltraBac-Sialin_human. Die cDNA von Sialin wurde mit einem N-terminalen His-Tag in einen pUltraBac Vektor kloniert.

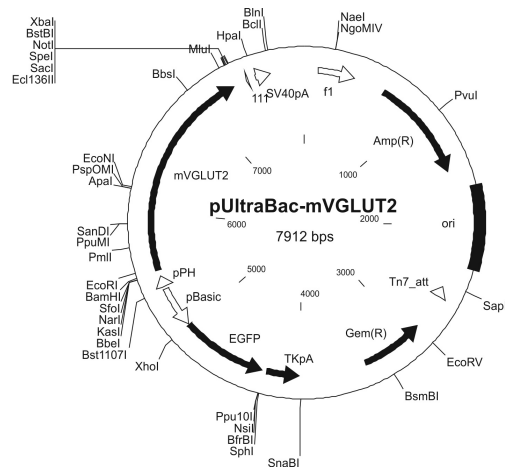


Abbildung A.6: Plasmidkarte von pUltraBac-VGlu2_murin. Die VGLut2 cDNA wurde mit einem N-terminalen His-Tag in einen pUltraBac Vektor kloniert.

Anhang B

ESI-MS Spektrum von NAAG₂-Standard

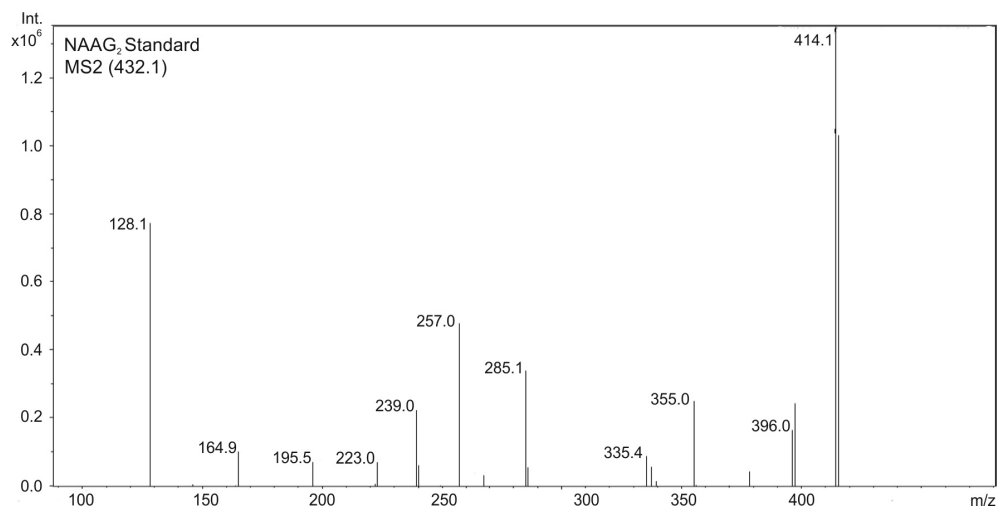


Abbildung B.1: ESI-MS Spektrum von NAAG₂ Standard. Es wurde der NAAG₂ Standard gemessen und dabei die entsprechende Masse $m/z = 432$ fragmentiert.

Literaturverzeichnis

- [1] A. Curatolo, P. d’Arcangelo, A. Lino and A. Brancati, *J. Neurochem.*, 1965, **12**, 339–342.
- [2] M. E., K. Y. and S. I., *J. Neurochem.*, 1966, **13**, 999–1003.
- [3] J. Neale, T. Bzdega and B. Wroblewska, *J. Neurochem.*, 2000, **75**, 443.
- [4] C. Cangro, M. Namboodiri, L. Sklar, A. Corigliano-Murphy and J. Neale, *J. Neurochem.*, 1987, **49**, 1579–1588.
- [5] K. Anderson, M. Borja, C. Cotman, J. Moffett, M. Namboodiri and J. Neale, *Brain Res.*, 1987, **411**, 172.
- [6] J. Moffett and M. Namboodiri, *J. Neurocytol.*, 1995, **24**, 409–433.
- [7] M. Kowalski, M. Cassidy, M. Namboodiri and J. Neale, *Brain Res.*, 1987, **406**, 397–401.
- [8] S. Tieman, C. Cangro and J. Neale, *Brain Res.*, 1987, **420**, 188–193.
- [9] S. Tieman, K. Butler and J. Neale, *JAMA*, 1988, **259**, 2020.
- [10] S. Tieman, J. Neale and D. Tieman, *J. Comp. Neurol.*, 1991, **313**, 45–64.
- [11] L. Williamson and J. Neale, *Brain Res.*, 1988, **456**, 375–381.
- [12] W. Renno, J. Lee and A. Beitz, *Synapse*, 1998, **26**, 140–154.
- [13] A. Pittaluga, L. Barbeito, V. Serval, G. Godeheu, F. Artaud, J. Glowinski and A. Chéramy, *Eur. J. Pharmacol.*, 1988, **158**, 263–266.
- [14] M. Zollinger, U. Amsler, K. Do, P. Streit and M. Cuénod, *J. Neurochem.*, 1988, **51**, 1919–1923.
- [15] M. Baslow, *J. Neurochem.*, 2000, **75**, 453.
- [16] F. Goldstein, *J. Biol. Chem.*, 1969, **244**, 4257–4260.
- [17] H. Knizley, *J. Biol. Chem.*, 1967, **242**, 4619–4622.
- [18] L. Gehl, O. Saab, T. Bzdega, B. Wroblewska and J. Neale, *J. Neurochem.*, 2004, **90**, 989.
- [19] I. Becker, J. Lodder, V. Gieselmann and M. Eckhardt, *J. Biol. Chem.*, 2010, **285**, 29156–29164.
- [20] J. Lodder-Gadaczek, I. Becker, V. Gieselmann, L. Wang-Eckhardt and M. Eckhardt, *J. Biol. Chem.*, 2011, **286**, 16693–16706.
- [21] F. Collard, V. Stroobant, P. Lamosa, C. Kapanda, D. Lambert, G. Muccioli, J. Poupaert, F. Opperdoes and E. Van Schaftingen, *J. Biol. Chem.*, 2010, **285**, 29826–29833.

- [22] L. Williamson, D. Eagles, M. Brady, J. Moffett, M. Namboodiri and J. Neale, *Eur. J. Neurosci.*, 1991, **3**, 441–451.
- [23] J. Moffett, B. Ross, P. Arun, C. Madhavarao and A. Namboodiri, *Prog. Neurobiol.*, 2007, **81**, 89–131.
- [24] T. Bzdega, T. Turi, B. Wroblewska, D. She, H. Chung, H. Kim and J. Neale, *J. Neurochem.*, 1997, **69**, 2270.
- [25] T. Bzdega, S. Crowe, E. Ramadan, K. Sciarretta, R. Olszewski, O. Ojeifo, V. Rafalski, B. Wroblewska and J. Neale, *J. Neurochem.*, 2004, **89**, 627.
- [26] N. Riveros and F. Orrego, *Brain Res.*, 1984, **299**, 393–395.
- [27] R. George, W. Huang, H. Naggar, S. Smith and V. Ganapathy, *BBA - Molecular Basis of Disease*, 2004, **1690**, 63–69.
- [28] B. Wroblewska, J. Wroblewski, S. Pshenichkin, A. Surin, S. Sullivan and J. Neale, *J. Neurochem.*, 1997, **69**, 174.
- [29] S. Birnbaum, L. Levintow, R. Kingsley and J. Greenstein, *J. Biol. Chem.*, 1952, **194**, 455–470.
- [30] E. Bitto, C. A. Bingman, G. E. Wesenberg, J. G. McCoy and G. N. Phillips, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, **104**, 456–461.
- [31] R. Burri, C. Steffen and N. Herschkowitz, *Dev. Neurosci.*, 1991, **13**, 403–411.
- [32] J. Moffett and A. Namboodiri, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2006, **576**, 7.
- [33] M. Cassidy and J. Neale, *J. Neurochem.*, 1993, **60**, 1631–1638.
- [34] T. Fujita, T. Kishida, M. Wada, N. Okada, A. Yamamoto, F. H. Leibach and V. Ganapathy, *Brain Res.*, 2004, **997**, 52–61.
- [35] R. Finking and M. Marahiel, *Annu. Rev. Microbiol.*, 2004, **58**, 453–488.
- [36] T. Stachelhaus, H. Mootz, V. Bergendahl and M. Marahiel, *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 22773–22781.
- [37] R. Dringen, J. Gutterer and J. Hirrlinger, *FEBS J.*, 2000, **267**, 4912–4916.
- [38] H. Li, H. Xu, D. Graham and R. White, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, **100**, 9785–9790.
- [39] M. Miyake, Y. Kakimoto and S. M., *Biochim. Biophys. Acta.*, 1978, **544**, 656–666.
- [40] M. Hamada-Kanazawa, M. Kouda, A. Odani, K. Matsuyama, K. Kanazawa, T. Hasegawa, M. Nara-hara and M. Miyake, *Biol. Pharm. Bull.*, 2010, **33**, 729–737.
- [41] K. Koller, R. Zaczek and J. Coyle, *J. Neurochem.*, 1984, **43**, 1136–1142.
- [42] I. Becker, *Diplomarbeit*, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2009.
- [43] A. Namboodiri, A. Peethambaran, R. Mathew, P. Sambhu, J. Hershfield, J. Moffett and C. Madha-varao, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2006, **252**, 216–223.
- [44] A. Burlina, V. Ferrari, P. Divry, W. Gradowska, C. Jakobs, M. Bennett, A. Sewell, C. Dionisi-Vici and A. Burlina, *Eur. J. Pediatr.*, 1999, **158**, 406–409.

- [45] S. Sartori, A. Burlina, L. Salviati, E. Trevisson, I. Toldo, A. Laverda and A. Burlina, *Eur. J. Paediatr. Neuro.*, 2008, **12**, 348–350.
- [46] F. Mochel, N. Boildieu, J. Barritault, C. Sarret, E. Eymard-Pierre, F. Seguin, R. Schiffmann and O. Boespflug-Tanguy, *BBA- Molecular Basis of Disease*, 2010, **1802**, 1112–1117.
- [47] F. Mochel, U. Engelke, J. Barritault, B. Yang, N. H. McNeill, J. N. Thompson, A. Vanderver, N. I. Wolf, M. A. Willemsen, F. W. Verheijen, F. Seguin, R. A. Wevers and R. Schiffmann, *Neurology*, 2010, **74**, 302–305.
- [48] G. Ghadge, B. Slusher, A. Bodner, M. Canto, K. Wozniak, A. Thomas, C. Rojas, T. Tsukamoto, P. Majer, R. Miller *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, **100**, 9554–9559.
- [49] L. Passani, J. Vonsattel, R. Carter and J. Coyle, *Mol. Chem. Neuropathol.*, 1997, **31**, 97–118.
- [50] C. Bjartmar, J. Battistuta, N. Terada, E. Dupree and B. Trapp, *Ann. Neurol.*, 2002, **51**, 51–58.
- [51] F. Tortella, Y. Lin, H. Ved, B. Slusher and J. Dave, *Eur. J. Pharmacol.*, 2000, **402**, 31–37.
- [52] A. Thomas, J. Olkowski and B. Slusher, *Eur. J. Pharmacol.*, 2001, **426**, 35–38.
- [53] A. Berent-Spillson, A. Robinson, D. Golovoy, B. Slusher, C. Rojas and J. Russell, *J. Neurochem.*, 2004, **89**, 90–99.
- [54] M. B. Robinson, R. D. Blakely, R. Couto and J. T. Coyle, *J. Biol. Chem.*, 1987, **262**, 14498–14506.
- [55] F. Collard, D. Vertommen, S. Constantinescu, L. Buts and E. Van Schaftingen, *J. Biol. Chem.*, 2011, **286**, 38220–38230.
- [56] B. S. Slusher, M. B. Robinson, G. Tsai, M. L. Simmons, S. S. Richards and J. T. Coyle, *J. Biol. Chem.*, 1990, **265**, 21297–301.
- [57] C. Schweitzer, C. Kratzeisen, G. Adam, K. Lundstrom, P. Malherbe, S. Ohresser, H. Stadler, J. Wichmann, T. Woltering and V. Mutel, *Neuropharmacol.*, 2000, **39**, 1700–1706.
- [58] J. Zhao, E. Ramadan, M. Cappiello, B. Wroblewska, T. Bzdega and J. Neale, *Eur. J. Neurosci.*, 2001, **13**, 340.
- [59] M. Chopra, Y. Yao, T. Blake, D. Hampson and E. Johnson, *J. Pharm. Exp. Ther.*, 2009, **330**, 212–219.
- [60] A. Fricker, M. Selina Mok, R. de la Flor, A. Shah, M. Woolley, L. Dawson and J. Kew, *Neuropharmacol.*, 2009, **56**, 1060–1067.
- [61] W. Zhang, Y. Murakawa, K. Wozniak, T. Tsukamoto, P. Jackson and A. Sima, *J. Neurol. Sci.*, 2002, **194**, 21–28.
- [62] W. Zhang, Y. Murakawa, K. Wozniak, B. Slusher and A. Sima, *J. Neurol. Sci.*, 2006, **247**, 217–223.
- [63] R. Olszewski, N. Bukhari, J. Zhou, A. Kozikowski, J. Wroblewski, S. Shamimi-Noori, B. Wroblewska, T. Bzdega, S. Vicini, F. Barton *et al.*, *J. Neurochem.*, 2004, **89**, 876–885.
- [64] R. Olszewski, M. Wegorzewska, A. Monteiro, K. Krolikowski, J. Zhou, A. Kozikowski, K. Long, J. Mastropaolo, S. Deutsch and J. Neale, *Biol. Psychiatry*, 2008, **63**, 86–91.
- [65] M. Baslow, *Amino acids*, 2010, **38**, 51–55.

- [66] M. Baslow, *Amino acids*, 2010, **39**, 1139–1145.
- [67] P. Saransaari, A. Schousboe and A. Lajtha, *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Amino Acids and Peptides in the Nervous System*, Springer, 2007, vol. 6, pp. 305–246.
- [68] O. H. Chen C., *Mol. Cell Biol.*, 1987, **7**, 2745–2752.
- [69] O. Lowry, N. Rosebrough, A. Farr and R. Randall, *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**, 265–275.
- [70] D. Skoog, J. Leary, D. Brendel and S. Hoffstetter-Kuhn, *Instrumentelle Analytik: Grundlagen, Geräte, Anwendungen*, Springer, 1996.
- [71] H. Kienitz and F. Aulinger, *Massenspektrometrie*, Verlag Chemie, 1968.
- [72] M. Hesse, H. Meier and B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Thieme, 2005.
- [73] J. Hell, P. Maycox, H. Stadler and R. Jahn, *EMBO J.*, 1988, **7**, 3023.
- [74] J. Hell, P. Maycox and R. Jahn, *J. Biol. Chem.*, 1990, **265**, 2111–2117.
- [75] J. Lodder, *Diplomarbeit*, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2009.
- [76] V. Brovia, A. Costa and L. Barbeito, *J. Neurochem.*, 1996, **67**, 382–388.
- [77] R. Luthi-Carter, A. K. Barczak, H. Speno and J. T. Coyle, *Brain Res.*, 1998, **795**, 341 – 348.
- [78] C. Shu, H. Shen, N. S. Teuscher, P. J. Lorenzi, R. F. Keep and D. E. Smith, *J. Pharm. Exp. Ther.*, 2002, **301**, 820–829.
- [79] U. V. Berger and M. A. Hediger, *Anat. Embryol.*, 1999, **199**, 439–449.
- [80] H. Wang, Y.-J. Fei, V. Ganapathy and F. H. Leibach, *Am. J. Physiol. - Cell Ph.*, 1998, **275**, 967–975.
- [81] C. Corti, G. Battaglia, G. Molinaro, B. Rizzo, A. Pittaluga, M. Corsi, M. Mugnaini, F. Nicoletti and V. Bruno, *J. Neurosci.*, 2007, **27**, 8297–8308.
- [82] A. P. Burlina, V. Ferrari, A. Burlina, M. Ermani, O. Boespflug-Tanguy and E. Bertini, *N-Acetylaspartate*, *Adv. Exp. Med. Biol.*, Springer US, 2006.
- [83] T. Miyaji, N. Echigo, M. Hiasa, S. Senoh, H. Omote and Y. Moriyama, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, **105**, 11720–11724.
- [84] N. Aula, O. Kopra, A. Jalanko and L. Peltonen, *Neurobiol. Dis.*, 2004, **15**, 251 – 261.
- [85] N. Yarovaya, R. Schot, L. Fodero, M. McMahon, A. Mahoney, R. Williams, E. Verbeek, A. de Bondt, M. Hampson, P. van der Spek, A. Stubbs, C. L. Masters, F. W. Verheijen, G. M. Mancini and D. J. Venter, *Neurobiol. Dis.*, 2005, **19**, 351 – 365.
- [86] N. I. Wolf, M. A. Willemsen, U. F. Engelke, M. S. van der Knaap, P. J. Pouwels, I. Harting, J. Zschocke, E. A. Sistermans, D. Rating and R. A. Wevers, *Neurology*, 2004, **62**, 1503–1508.
- [87] H. P. Jenerick, *J. Gen. Physiol.*, 1956, **39**, 773–787.
- [88] J. Follett, B. Darlow, M. Wong, J. Goodwin and D. Pountney, *Neurotox. Res.*, 2012.
- [89] K. G. Slepchenko and Y. V. Li, *Ex. Diabetes Res.*, 2012.

- [90] N. Juge, J. Gray, H. Omote, T. Miyaji, T. Inoue, C. Hara, H. Uneyama, R. Edwards, R. Nicoll and Y. Moriyama, *Neuron*, 2010, **68**, 99–112.
- [91] T. Miyaji, H. Omote and Y. Moriyama, *J. Neurochem.*, 2011, **119**, 1–5.
- [92] C. Morland, K. Nordengen and V. Gundersen, *Neurosci. Lett.*, 2012, 100–104.
- [93] H. Tallan, S. Moore and W. Stein, *J. Biol. Chem.*, 1956, **219**, 257–264.
- [94] M. Simmons, C. Frondoza and J. Coyle, *J. Neurosci.*, 1991, **45**, 37–45.
- [95] W. Kang, T. Ichio, S. Isono, M. Kitakawa and K. Isono, *Mol. Gen. Genet.*, 1989, **217**, 281–288.
- [96] J. Neale, R. Olszewski, L. Gehl, B. Wroblewska and T. Bzdega, *TIPS*, 2005, **26**, 477–484.
- [97] A. Shah, R. de la Flor, A. Atkins, J. Slone-Murphy and L. Dawson, *J. Chromatogr. B*, 2008, **876**, 153–158.
- [98] B. Tavazzi, R. Vagnozzi, D. Di Pierro, A. Amorini, G. Fazzina, S. Signoretti, A. Marmarou, I. Caruso and G. Lazzarino, *Anal. Biochem.*, 2000, **277**, 104–108.
- [99] M. Miyake and Y. Kakimoto, *J. Neurochem.*, 2006, **37**, 1064–1067.
- [100] J. Neale, R. Olszewski, D. Zuo, K. Janczura, C. Profaci, K. Lavin, J. Madore and T. Bzdega, *J. Neurochem.*, 2011, **118**, 490–498.
- [101] N. Pietrancosta, C. Anne, H. Prescher, R. Ruivo, C. Sagne, C. Debacker, H. Bertrand, R. Brossmer, F. Acher and B. Gasnier, *J. Biol. Chem.*, 2012, 11489–11497.
- [102] R. Reimer and R. Edwards, *Pflügers Arch., EJP*, 2004, **447**, 629–635.
- [103] C. Wreden, M. Wlizla and R. Reimer, *J. Biol. Chem.*, 2005, **280**, 1408–1416.
- [104] C. Wreden, J. Johnson, C. Tran, R. Seal, D. Copenhagen, R. Reimer and R. Edwards, *J. Neurosci.*, 2003, **23**, 1265–1275.
- [105] G. Kottra and H. Daniel, *J. Physiol.*, 2001, **536**, 495–503.
- [106] P. Morin, C. Sagné and B. Gasnier, *EMBO J.*, 2004, **23**, 4560–4570.
- [107] S. Ahmed and I. R. Booth, *Biochem. J.*, 1983, **212**, 105.
- [108] C. Morland, K. Nordengen, M. Larsson, L. Prolo, Z. Farzampour, R. Reimer and V. Gundersen, *FASEB J.*, 2012.
- [109] S. Takamori, M. Holt, K. Stenius, E. Lemke, M. Grønborg, D. Riedel, H. Urlaub, S. Schenck, B. Brügger, P. Ringler *et al.*, *Cell*, 2006, **127**, 831–846.
- [110] J. Burré and W. Volkanddt, *J. Neurochem.*, 2007, **101**, 1448–1462.
- [111] L. Prolo, H. Vogel and R. Reimer, *J. Neurosci.*, 2009, **29**, 15355–15365.
- [112] L. Qin, X. Liu, Q. Sun, Z. Fan, D. Xia, G. Ding, H. L. Ong, D. Adams, W. A. Gahl, C. Zheng *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, **109**, 13434–13439.
- [113] T. Miyaji, H. Omote and Y. Moriyama, *Biol. Pharm. Bull.*, 2010, **33**, 1783–1785.

- [114] Z. Rahman, J. Schwarz, S. Gold, V. Zachariou, M. Wein, K. Choi, A. Koor, C. Chen, R. DiLeone, S. Schwarz *et al.*, *Neuron*, 2003, **38**, 941–952.
- [115] S. Vernino, L. Ermilov, L. Sha, J. Szurszewski, P. Low and V. Lennon, *J. Neurosci.*, 2004, **24**, 7037–7042.
- [116] H. Jin, H. Wu, G. Osterhaus, J. Wei, K. Davis, D. Sha, E. Floor, C. Hsu, R. Kopke and J. Wu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, **100**, 4293–4298.

Publikationsliste

Artikel

1. Ivonne Becker, Julia Lodder, Volkmar Gieselmann und Matthias Eckhardt, *Molecular Characterization of N-Acetylaspartylglutamate Synthetase*, J. Biol. Chem., **2010**, 285(38), 29156–29164
2. Julia Lodder-Gadaczek, Ivonne Becker, Volkmar Gieselmann, Lihua Wang-Eckhardt, und Matthias Eckhardt, *N-Acetylaspartylglutamate Synthetase II synthesizes N-Acetylaspartylglutamylglutamate*, J. Biol. Chem., **2011**, 286(19), 16693–16706
3. Julia Lodder-Gadaczek, Volkmar Gieselmann und Matthias Eckhardt, *Vesicular uptake of N-Acetylaspartylglutamate is catalyzed by sialin (SLC17A5)*, eingereicht

Poster

1. Julia Lodder-Gadaczek, Matthias Eckhardt, *Characterization and Investigation of Two New Dipeptide Synthetases*, **2010**, First THEME Symposium, Bad Honnef, Deutschland
2. Julia Lodder-Gadaczek, Matthias Eckhardt, *Postnatal Upregulation of the Tripeptide N-Acetylaspartylglutamylglutamate*, **2011**, Neuroscience conference, Washington D.C., USA
3. Julia Lodder-Gadaczek, Matthias Eckhardt, *Metabolism of N-Acetylaspartylglutamate*, **2012**, Third THEME Symposium, Bad Honnef, Deutschland
4. Julia Lodder-Gadaczek, Matthias Eckhardt, *Metabolism of NAAG, Uptake of NAAG by sialin into synaptic vesicles*, **2012**, NeuroVisionen 8, Aachen, Deutschland

Bonn, den 11.03.2013

An Eides statt versichere ich, dass
die vorgelegte Arbeit - abgesehen von den ausdrücklich bezeichneten Hilfsmitteln - persönlich, selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde,
die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht sind,
die vorgelegte Arbeit oder ähnliche Arbeiten nicht bereits anderweitig als Dissertation eingereicht worden ist bzw. sind, sowie eine Erklärung über frühere Promotionsversuche und deren Resultate,
für die inhaltlich-materielle Erstellung der vorgelegten Arbeit keine fremde Hilfe, insbesondere keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen wurde sowie keinerlei Dritte vom Doktoranden unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Tätigkeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Arbeit stehen. Die Arbeit ist auszugsweise an folgenden Stellen veröffentlicht worden:

Julia Lodder-Gadaczek, Ivonne Becker, Volkmar Gieselmann, Lihua Wang-Eckhardt, und Matthias Eckhardt, *N-Acetylaspartylglutamate Synthetase II synthesizes N-Acetylaspartylglutamylglutamate*, J. Biol. Chem., **2011**, 286(19), 16693–16706

Julia Lodder-Gadaczek