

INAUGURAL - DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht - Karls - Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom- Ingenieur Biotechnologie (FH) Sven Wolfgang Sauer
aus: Heidelberg
Tag der mündlichen Prüfung:

Bioenergetik und Biochemie
bei zerebralen Organoazidopathien am Beispiel der
Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Defizienz und der
Succinatsemialdehyd-Dehydrogenase-Defizienz

Gutachter: Prof. Dr. med. Klaus Unsicker
Prof. Dr. med., Prof. h.c. (RCH) Georg F. Hoffmann

Abstract

The aim of this study was to investigate the biochemistry and bioenergetics of cerebral organic acid disorders focusing on glutaryl-CoA dehydrogenase (GCDH) deficiency and succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH) deficiency. GCDH deficiency is an inherited metabolic defect in the degradation of L-lysine, L-hydroxylysine and L-tryptophan. It is caused by a defect of GCDH resulting in an accumulation of glutaryl-CoA, glutaric (GA) and 3-hydroxyglutaric (3-OH-GA) acid in tissues and body fluids. Clinically, this disease is complicated by striatal degeneration within encephalopathic crises which are precipitated by catabolic state during infancy. SSADH deficiency is an inherited metabolic defect in the degradation of the neurotransmitter γ -aminobutyric acid (GABA). Affected patients are characterized by an accumulation of GABA, γ -hydroxybutyric acid, succinic semialdehyde, and 4,5-dihydroxyhexanoic acid in tissues and body fluids because of a defect SSADH. Common clinical symptoms are psychomotoric retardation, seizures, movement disorders, and behavioral problems.

In the bioenergetic part of this study it was examined, if a mitochondrial, bioenergetical dysfunction is involved in the pathogenesis of these diseases. Endogenous activities of respiratory chain and β -oxidation enzymes were studied in tissue homogenates of *Gcdh*- and *Ssadh*-deficient mice. Purified enzymes, tissue homogenates and submitochondrial particles were used to determine the influence of the accumulating metabolites on enzymes of the respiratory chain, β -oxidation and citric cycle. Oxidative stress was investigated by detecting glutathione concentrations in tissue homogenates. The most important finding for GCDH deficiency was an uncompetitive inhibition of the α -ketoacid dehydrogenase complexes, especially the α -ketoglutarate dehydrogenase complex, by glutaryl-CoA. Otherwise, there was no impact of accumulating metabolites on the enzymes of citric cycle, respiratory chain, and β -oxidation. Activities of β -oxidation enzymes in *Gcdh*^{-/-} mice were lower than in wild-type mice, whereas activities of respiratory chain enzymes remained unchanged. In contrast to GCDH deficiency there was no evidence that enzyme activities were affected or accumulating metabolites had an impact on these enzymes in SSADH deficiency. In both mouse models glutathione concentrations were reduced in brain tissues indicating oxidative stress.

The biochemical properties (tissue distribution, blood-brain-barrier [BBB] permeability, origin of cerebral concentrations) of accumulating metabolites are well described for SSADH deficiency. Although GA and 3-OH-GA are putative neurotoxins, these factors are quite unknown for GCDH deficiency. Therefore these biochemical properties of GA and 3-OH-GA were investigated. The concentrations of these dicarboxylic acids were studied in *Gcdh*-deficient (*Gcdh*^{-/-}) mice, *hepatic Gcdh*^{-/-} mice, C57Bl/6 mice after intraperitoneal loading with d₄-GA and d₅-3-OH-GA. In addition, the transport of d₄-GA and d₅-3-OH-GA across porcine brain capillary endothelial cells, an *in vitro* model for the BBB, was examined. The major results were as follows: 1) an equimolar increase in *cerebral* and *hepatic* concentrations of GA and 3-OH-GA in *Gcdh*^{-/-} mice, 2) a discrepant increase (liver >> brain) of GA and 3-OH-GA in *hepatic Gcdh*^{-/-} mice and in C57Bl/6 mice after intraperitoneal loading with d₄-GA and d₅-3-OH-GA, and 3) a low permeability of BCEC for GA and 3-OH-GA (efflux > influx). These findings suggest that there is a cerebral *de novo* synthesis and subsequent trapping of GA and 3-OH-GA because of the strongly limited BBB permeability for these dicarboxylic acids.

Übersicht

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der Biochemie und Bioenergetik bei *zerebralen* Organoazidopathien am Beispiel der Glutaryl-CoA-Dehydrogenase (GCDH)-Defizienz und der Succinatsemialdehyd-Dehydrogenase (SSADH)-Defizienz untersucht. Die GCDH-Defizienz ist eine erbliche Stoffwechselstörung im Abbau der Aminosäuren L-Lysin, L-Hydroxylysin und L-Tryptophan. Durch einen Defekt der GCDH akkumulieren bei Patienten Glutaryl-CoA, Glutarsäure (GA) und 3-Hydroxyglutarsäure (3-OH-GA) in Geweben und Körperflüssigkeiten. Unbehandelt wird diese Krankheit in der Kindheit zumeist durch eine striatale Degeneration im Rahmen einer enzephalopathischen Krise nach einer katabolen Stoffwechsellage kompliziert. Die SSADH-Defizienz ist eine erbliche Stoffwechselstörung im Abbau des Neurotransmitters γ -Aminobuttersäure (GABA). Patienten fallen durch eine Akkumulation von GABA, γ -Hydroxybuttersäure, Succinatsemialdehyd und 4,5-Dihydroxyhexansäure in Geweben und Körperflüssigkeiten infolge einer defekten SSADH auf. Häufige klinische Befunde sind psychomotorische Retardierung, epileptische Krampfanfälle, Bewegungstörungen und Verhaltensauffälligkeiten.

Im bioenergetischen Teil der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob eine mitochondriale, bioenergetische Dysfunktion an der Pathogenese dieser Erkrankungen beteiligt ist. Hierfür wurden endogene Enzymaktivitäten der Atmungskette und der β -Oxidation in Gewebehomogenaten von *Gcdh*- und *Ssadh*-defizienten Mäusen bestimmt. An isolierten Enzymen, Gewebehomogenaten und submitochondrialen Partikeln wurde der Einfluss der akkumulierenden Metabolite auf die Enzyme der Atmungskette, der β -Oxidation und des Citratzyklusses getestet. Oxidativer Stress wurde über die Glutathion-Konzentrationen in Gewebehomogenaten abgeschätzt. Das wichtigste Ergebnis für die GCDH-Defizienz war eine unkompetitive Hemmung der α -Ketosäure-Dehydrogenase-Komplexe - insbesondere des α -Ketoglutarat-Dehydrogenase Komplexes - durch Glutaryl-CoA. Es konnte kein weiterer Einfluss akkumulierender Metabolite auf die Enzyme des Citratzyklusses, der Atmungskette und der β -Oxidation gefunden werden. Bei *Gcdh*-defizienten Mäusen waren die endogenen Aktivitäten von Enzymen der β -Oxidation erniedrigt, die Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe waren jedoch unverändert. Für die SSADH-Defizienz konnte keine Änderung endogener Enzymaktivitäten der Atmungskette oder ein direkter Einfluss akkumulierender Metabolite auf die Enzyme der Atmungskette oder des Citratzyklusses gefunden werden. Bei beiden Mausmodellen wurden im Gehirn erniedrigte Glutathion-Konzentrationen als Hinweis auf oxidativen Stress nachgewiesen.

Die biochemischen Eigenschaften (Gewebeverteilung, Bluthirnschranke [BBB]-Permeabilität und Herkunft der zerebralen Konzentrationen) akkumulierender Metabolite sind für die SSADH-Defizienz gut beschrieben. Obwohl GA und 3-OH-GA postulierte Neurotoxine sind, sind diese Faktoren bei der GCDH-Defizienz noch relativ unbekannt. Deshalb wurden diese biochemischen Eigenschaften für GA und 3-OH-GA untersucht. Hierzu wurden die Konzentrationen dieser Dicarbonsäuren in *Gcdh*-defizienten (*Gcdh*^{-/-}) Mäusen, *hepatozytären Gcdh*^{-/-}-Mäusen und C57Bl/6-Mäusen nach einer intraperitonealen Injektion von d₄-GA und d₅-3-OH-GA gemessen. Zusätzlich wurde der Transport von d₄-GA und d₅-3-OH-GA über kapilläre Endothelzellen aus Schweinehirn, einem *in vitro*-Modell der BBB, untersucht. Die wichtigsten Ergebnisse waren wie folgt: 1) ein äquimolarer Anstieg *zerebraler* und *hepatischer* GA- und 3-OH-GA-Konzentrationen in *Gcdh*^{-/-}-Mäusen, 2) ein unterschiedlicher Anstieg (Leber >> Gehirn) bei *hepatozytären Gcdh*^{-/-}-Mäusen und C57Bl/6-Mäusen nach einer intraperitonealen Injektion von d₄-GA und d₅-3-OH-GA und 3) eine geringe Permeabilität der BCEC für GA und 3-OH-GA (Efflux > Influx). Diese Ergebnisse weisen auf eine *zerebrale de novo*-Synthese von GA und 3-OH-GA und anschließendes *Trapping* durch eine stark limitierte BBB-Permeabilität für diese Dicarbonsäuren hin.

Danksagung

Ich danke:

Herrn Prof. Dr. med. Unsicker und Herrn Prof. Dr. med., Prof. h.c. (RCH) Hoffmann für die Supervision des Promotionsvorhabens.

Dr. med. Kölker für die sehr gute Betreuung, die vielen fruchtbaren Diskussionen, die hilfreichen Anregungen und Denkanstöße sowie für die interessanten vergangenen und zukünftigen Projekte.

Dr. phil. nat. Okun für die Bereitstellung des spannenden Themas und die sehr gute Betreuung.

Prof. Dr. (M.D.) Koeller für die persönliche und fachliche Betreuung während meiner Zeit als *research scholar* an der Oregon Health and Science University, Portland, Oregon USA.

meiner Familie für ihre Unterstützung und ihr Vertrauen.

Christiane Schöl für ihre herausragenden Kenntnisse der deutschen Sprache und Grammatik, die Unterstützung bei statistischen Problemen, die vielen, langen und inspirierenden Diskussionen, ihre unermüdliche Geduld und Unterstützung.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht oder vorgetragen:

Publikationen

IF, Impact-Faktor 2004; *, beide Autoren trugen zu gleichen Teilen zur Publikation bei.

Sauer SW, Okun JG, Schwab MA, Crnic LR, Hoffmann GF, Goodman SI, Koeller DM und Kölker S (2005). Bioenergetics in glutaryl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: a role for glutaryl-coenzyme A. *J. Biol. Chem.* **280**: 21830-6. **IF 6,355**

Sauer SW, Okun JG, Fricker G, Mahringer A, Müller I, Crnic LR, Mühlhausen C, Hoffmann GF, Hörster F, Goodman SI, Harding CO, Koeller DM und Kölker S (2006). Intracerebral accumulation of glutaric and 3-hydroxyglutaric acids secondary to limited flux across the blood-brain barrier constitute a biochemical risk factor for neurodegeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J. Neurochem.* (Epub ahead of print). **IF 4,824**

Sauer SW, ten Brink HR, Jacobs C, Hoffmann GF, Gibson KM, Kölker S und Okun JG (2006). Bioenergetics in succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency. (Manuskript in Vorbereitung).

Okun JG*, **Sauer S***, Bahr S, Lenhartz H und Mayatepek E (2004). S-Acetylglutathione normalizes intracellular glutathione content in cultured fibroblasts from patients with glutathione synthetase deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* **27**: 783-6. **IF 1,586**

Kölker S, **Sauer SW**, Okun JG, Hoffmann GF und M. Koeller DM. Lysine intake and neurotoxicity in glutaric aciduria type I: towards a rationale for therapy? Scientific Commentary. *Brain* (Under Review). **IF 8,201**

Kölker S, **Sauer SW**, Surtees RAH und Leonard JV. The aetiology of neurological complications of organic acidurias – a role for the blood-brain barrier. (Manuskript in Vorbereitung).

Koeller DM, **Sauer S**, Wajner M, de Mello CF, Goodman SI, Woontner M, Mühlhausen C, Okun JG und Kölker S. (2004). Animal models for glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* **27**: 813-8. **IF 1,586**

Schwab MA, **Sauer SW**, Okun JG, Nijtmans LGJ, Rodenburg RJT, van den Heuvel LP, Dröse S, Brandt U, Hoffmann GF, Laak H, Kölker S und Smeitink JAM. Bioenergetics in Propionic Aciduria. *Biochem. J.* (revidiertes Manuskript eingereicht). **IF 4,323**

Külkens S, Harting I, **Sauer S**, Zschocke J, Hoffmann GF, Gruber S, Bodamer OA und Kölker S (2005). Late-onset neurologic disease in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Neurology* **64**: 2142-4. **IF 5,973**

Kölker S, Koeller DM, **Sauer S**, Hörster F, Schwab MA, Hoffmann GF, Ullrich K und Okun JG (2004). Excitotoxicity and bioenergetics in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* **27**: 805-12. **IF 1,586**

Funk CB, Prasad AN, Frosk P, **Sauer S**, Kölker S, Greenberg CR und Del Bigio MR. (2005). Neuropathological, biochemical and molecular findings in a glutaric acidemia type 1 cohort. *Brain* **128**: 711-22. **IF 8,201**

Hörster F, Schwab MA, **Sauer SW**, Pietz J, Hoffmann GF, Okun JG, Kins J und Kölker S. Phenylalanine reduces synaptic density in mixed cortical cultures from mice. *Pediatr. Res.* **59**: 44-8. **IF 2,875**

Kölker S, Schwab M, Horster F, **Sauer S**, Hinz A, Wolf NI, Mayatepek E, Hoffmann GF, Smeitink JA und Okun JG (2003). Methylmalonic acid, a biochemical hallmark of methylmalonic acidurias but no inhibitor of mitochondrial respiratory chain. *J. Biol. Chem.* **278**: 47388-93. **IF 6,355**

Okun JG, Hörster F, Farkas LM, Feyh P, Hinz A, **Sauer S**, Hoffmann GF, Unsicker K, Mayatepek E und Kölker S (2002). Neurodegeneration in methylmalonic aciduria involves inhibition of complex II and the tricarboxylic acid cycle, and synergistically acting excitotoxicity. *J. Biol. Chem.* **277**: 14674-80. **IF 6,355**

Schwab MA, Kolker S, van den Heuvel LP, **Sauer SW**, Wolf NI, Rating D, Hoffmann GF, Smeitink JA und Okun JG (2005). Optimized Spectrophotometric Assay for the Completely Activated Pyruvate Dehydrogenase Complex in Fibroblasts. *Clin. Chem.* **51**: 151-60. **IF 6,501**

Kongressbeiträge:

Sauer S, Okun JG, Mühlhausen C, Ott N, Feyh P, Langhans CD, Goodman SI, Ullrich K, Hoffmann GF, Rinaldo PL, Koeller DM und Kölker S (2003). Tissue-specific biochemical and bioenergetical analysis in *Gcdh*^{-/-} mice. Poster, ICIEM Brisbane, Australien.

Sauer S, Okun JG, Hoffmann GF, Koeller DM und Kölker S (2003). Evaluation of mitochondrial β -oxidation in *Gcdh*-deficient mice. Vortrag, GA I Workshop, Heidelberg.

Sauer S, Koeller DM, Schwab MA, Crnic LS, Goodman SI, Hoffmann GF, Okun JG und Kölker S (2004). Tissue-Specific Bioenergetic Analysis In *Gcdh*^{-/-} Mice. Poster, SSIEM Amsterdam.

Sauer S, Okun JG, Feyh P, Goodman SI, Crnic LS, Hoffmann GF, Koeller DM und Kölker S. (2004). Brain Is Different: Tissue-Specific Distribution Of 3-Hydroxyglutaric And Glutaric Acids In *Gcdh*^{-/-} Mice. Poster, SSIEM Amsterdam.

Sauer SW, Mueller Ines, Koeller DM und Kölker S (2006). Cerebral Accumulation of dicarboxylic acids in glutaric aciduria – a biochemical risk factor. Vortrag, ICIEM Tokyo, eingereicht.

1	THEORIE	1
1.1	Einleitung	1
1.2	Organoazidopathien	2
1.3	Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Defizienz	3
1.3.1	<i>Gcdh</i> ^{-/-} -Maus	4
1.3.2	Weitere Tiermodelle der GCDH-Defizienz	5
1.3.2.1	Rousettus aegypticus	5
1.3.2.2	Artifizielle Modelle der GCDH-Defizienz durch zerebrale Applikation von GA und 3-OH-GA	5
1.3.3	Exzitotoxizitätshypothese	6
1.3.3.1	Primäre Exzitotoxizität	6
1.3.3.2	Sekundäre Exzitotoxizität	7
1.3.3.3	Das Striatum und exzitotoxische Mechanismen	8
1.3.4	Ein pathophysiologisches Konzept zur GCDH-Defizienz	9
1.3.4.1	Stand der Forschung	9
1.3.4.2	Bedeutung der Bluthirnschranke für die GCDH-Defizienz	10
1.3.5	Therapeutische Strategien bei GCDH-Defizienz	12
1.4	Succinatsemialdehyd-Dehydrogenasen-Defizienz	13
1.4.1	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-} -Maus	13
1.4.2	Ein pathophysiologisches Konzept zur SSADH-Defizienz	14
1.4.2.1	Einfluss erhöhter GABA- und GHB-Konzentrationen auf die Neurotransmission	14
1.4.2.2	Einfluss erhöhter GABA-Konzentrationen auf die neuronale Entwicklung	16
1.4.2.3	Bedeutung des Glutamat/ Glutaminzyklus für die SSADH-Defizienz	17
1.4.3	Therapeutische Strategien bei der SSADH-Defizienz	17
2	FRAGESTELLUNG	19
2.1	Bioenergetik	19
2.2	Biochemie	19
3	MATERIAL UND METHODEN	20
3.1	Materialien	20
3.1.1	Chemikalien	20
3.1.2	Isolierte Enzyme	21
3.2	Tiermodelle	21
3.2.1	<i>Gcdh</i> ^{-/-} -Mäuse	21
3.2.2	Hepatozytäre <i>Gcdh</i> ^{-/-} -Mäuse	22
3.2.3	Intraperitoneale Injektion deuterierter GA und 3-OH-GA in C57Bl/6-Mäuse	23
3.2.4	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-} -Mäuse	23
3.2.5	Diätstudien mit <i>Gcdh</i> ^{-/-} -Mäusen	23
3.2.6	Präparation der Gewebehomogenate	24
3.2.7	Submitochondriale Partikel (SMPs)	24
3.3	Genetische Methoden	25
3.3.1	DNA-Extraktion aus <i>Gcdh</i> ^{-/-} -Mausschwanzspitzen	25
3.3.2	<i>Gcdh</i> -PCR	25
3.4	Spektrophotometrische Methoden	27
3.4.1	Proteinbestimmung	27
3.4.2	Untersuchung von <i>steady state</i> Enzymaktivitäten	27
3.4.2.1	Bestimmung der Einzelenzymaktivitäten der Atmungskettenkomplexe I-V in SMPs	28
3.4.2.1.1	NADH-Dehydrogenase (Komplex I)	28

3.4.2.1.2	Succinat-Dehydrogenase (Komplex II)	28
3.4.2.1.3	Cytochrom c-Reduktase (Komplex III)	29
3.4.2.1.4	Cytochrom c-Oxidase (Komplex IV)	29
3.4.2.1.5	ATP-Synthase (Komplex V)	30
3.4.2.1.6	Inhibitionsexperimente	30
3.4.2.2	Bestimmung der Einzelenzymaktivitäten der Atmungskettenkomplexe I-V in Gewebehomogenaten	30
3.4.2.3	Untersuchung von Citratzyklus-Enzymaktivitäten	31
3.4.2.3.1	Citrat-Synthase	31
3.4.2.3.2	Malat-Dehydrogenase	31
3.4.2.3.3	Fumarase	31
3.4.2.3.4	Isocitrat-Dehydrogenase	31
3.4.2.3.5	Aconitase	32
3.4.2.3.6	Inhibitionsexperimente	32
3.4.2.4	Untersuchungen an den α -Ketosäure-Dehydrogenase-Komplexen	32
3.4.2.4.1	α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex	32
3.4.2.4.1.1	α -Ketoglutarat-Dehydrogenase	32
3.4.2.4.1.2	Dihydrolipoyl Succinyltransferase	33
3.4.2.4.1.3	Dihydrolipoyl-Dehydrogenase	33
3.4.2.4.2	Verzweigt-kettige-Ketosäure-Dehydrogenase-Komplex	33
3.4.2.4.3	Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex	33
3.4.2.4.4	Inhibitionsexperimente	34
3.4.2.5	Spektrophotometrische Analyse von FAD-abhängigen Acyl-CoA-Dehydrogenasen	34
3.4.2.5.1	Inhibitionsexperimente	34
3.4.3	Glutathion-Konzentrationen der Gewebehomogenate	35
3.5	Quantitativ analytische Methoden	36
3.5.1	Quantitative Analyse von GA und 3-OH-GA mittels GC/MS	36
3.5.2	Quantitative Analyse der Acylcarnitine mittels MS/MS	37
3.6	Transport von Dicarbonsäuren über kultivierte kapilläre Endothelzellen aus Schweinehirn	38
3.7	Analyse der Inhibitionsstudien	40
3.8	Statistische Analyse	41
4	ERGEBNISSE	43
4.1	GCDH-Defizienz	43
4.1.1	Bioenergetik	43
4.1.1.1	Aktivität der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe I-V in Gewebehomogenaten	43
4.1.1.2	Inhibitionsstudien an der mitochondrialen Atmungskette	44
4.1.1.3	Inhibitionsstudien an den α -Ketosäure-Dehydrogenase-Komplexen	45
4.1.1.4	Unkompetitive Hemmung des KGDHc	45
4.1.1.5	Inhibitionsstudien an Citratzyklusenzymen	47
4.1.1.6	Gcdh-Aktivität in Leber- und Gehirnhomogenaten	47
4.1.1.7	Aktivität mitochondrialer β -Oxidationsenzyme in Leberhomogenaten	48
4.1.1.8	Inhibitionsstudien an mitochondrialen β -Oxidationsenzymen	49
4.1.2	Glutathion-Konzentrationen in Gewebehomogenaten	50
4.1.3	Biochemie	51
4.1.3.1	Gewebespezifische Konzentrationen von GA und 3-OH-GA	51
4.1.3.2	Gewebespezifische Konzentrationen von Glutaryl-carnitin	53
4.1.3.3	GA- und 3-OH-GA-Konzentrationen in hepatozytären <i>Gcdh</i> ^{-/-} -Mäusen	54
4.1.3.4	d ₄ -GA- und d ₅ -3-OH-GA-Konzentrationen nach intraperitonealer Injektion	57
4.1.3.5	Transport von GA und 3-OH-GA über BCEC	59
4.1.3.6	Diätstudien	61
4.2	SSADH-Defizienz	65
4.2.1	Bioenergetik	65
4.2.1.1	Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe I-V in Gewebehomogenaten	65

4.2.1.2	Einfluss von GABA, GHB, SSA und 4,5-DHHA auf die Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe I-V	66
4.2.1.3	Der Einfluss von GABA, GHB, SSA und 4,5-DHHA auf die Enzyme des Citratzyklusses	67
4.2.2	Glutathion-Konzentrationen in Gewebehomogenaten	68
5	DISKUSSION	69
5.1	Bioenergetische Untersuchungen zur SSADH-Defizienz	69
5.1.1	Reduzierte Glutathion-Konzentrationen in Hirnarealen der <i>Aldh5a1</i> ^{-/-} -Mäuse	69
5.1.2	Ssadh-Defizienz und oxidativer Stress	70
5.1.3	Kein Einfluss von GABA, GHB, SSA und 4,5-DHHA auf die Enzyme der Atmungskette und des Citratzyklusses	70
5.1.4	Oxidativer Stress und die Atmungskette	71
5.1.5	Ssadh-Defizienz und Hippocampus	72
5.1.6	Zusammenfassung des bioenergetischen Teils	72
5.2	Bioenergetische Untersuchungen zur GCDH-Defizienz	73
5.2.1	Hemmung der α -Ketosäure-Dehydrogenase-Komplexe, insbesondere des KGDHc, durch Glutaryl-CoA	73
5.2.2	Unkompetitive Hemmung des KGDHc durch Glutaryl-CoA	74
5.2.3	Biochemische Hinweise aus GCDH-defizienten Patienten	75
5.2.4	KGDHc und Neurodegeneration	75
5.2.4.1	Potentielle Mechanismen für eine neuronale Schädigung durch reduzierte KGDHc-Aktivität	76
5.2.4.2	Sekundäre Effekte einer KGDHc-Inhibition	77
5.2.5	Potentielle Rolle der KGDHc Hemmung <i>in vivo</i>	78
5.2.6	Limitierung des Zeitraums einer enzephalopathischen Krise bei GCDH-defizienten Patienten durch den KGDHc	79
5.2.7	Leichte Hemmung des BCKDHc durch Glutaryl-CoA	79
5.2.8	Schwache Hemmung des PDHc durch Glutaryl-CoA	80
5.2.9	Einfluss von Glutaryl-CoA auf CS, MDH, IDH und Fumarase	80
5.2.10	Störung der mitochondrialen β -Oxidation	81
5.2.11	Verringerte Glutathion-Konzentrationen in <i>Gcdh</i> ^{-/-} -Mäusen	82
5.2.12	Zusammenfassung des bioenergetischen Teils	82
5.3	Biochemische Untersuchungen zur GCDH-Defizienz	83
5.3.1	Zerebrale Akkumulation von GA und 3-OH-GA in der GCDH-Defizienz	83
5.3.2	Zerebrale GA- und 3-OH-GA-Konzentrationen stehen in keinem Zusammenhang mit GCDH-Aktivität oder den Konzentrationen im Serum	83
5.3.2.1	Post mortem-Untersuchungen	83
5.3.2.2	Gewebespezifische Verteilung von GA, 3-OH-GA und Glutarylcarnitin bei der <i>Gcdh</i> ^{-/-} -Maus	85
5.3.3	Streng limitierter Transport von GA und 3-OH-GA über die BBB	85
5.3.3.1	<i>Hepatozytäre Gcdh</i> ^{-/-} -Maus	85
5.3.3.2	Intraperitoneale Injektion von deuterierter GA und 3-OH-GA	86
5.3.3.3	Untersuchungen zum Transport von GA und 3-OH-GA über BCEC	87
5.3.4	Keine schädigende Wirkung der GA und 3-OH-GA auf die BBB	88
5.3.5	Zusammenfassung des biochemischen Teils	89
5.4	Synopsis eines potentiellen Pathomechanismus	90
5.4.1	Der zerebrale Energiemetabolismus	90
5.4.2	Bioenergetische und metabolische Kopplung zwischen Nervenzellen und Astrozyten	91
5.5	Vom biochemischen Risikofaktor zu therapeutischen Optionen	94
6	AUSSICHTEN	96
6.1	SSADH-Defizienz	96
6.2	GCDH-Defizienz	96

7	REFERENZEN	100
8	ANHANG	I
8.1	Abkürzungsverzeichnis	I
8.2	Abbildungsverzeichnis	III
8.3	Tabellenverzeichnis	V
8.4	Statistische Verfahren zur <i>Aldh5a1</i>^{-/-}-Maus	VI
8.4.1	Test auf Normalverteilung nach Kolmogorov-Smirnov	VI
8.4.2	Test auf Homogenität der Varianz nach Levene	VII
8.4.3	Kruskal-Wallis H-Test und Mann-Whitney U-Test	IX
8.5	Statistische Verfahren zur <i>Gcdh</i>^{-/-}-Maus	X
8.5.1	Test auf Normalverteilung nach Kolmogorov-Smirnov	X
8.5.2	Test auf Homogenität der Varianz nach Levene	XI
8.5.3	Kruskal-Wallis H-Test und Mann-Whitney U-Test	XIII
8.6	Statistische Verfahren zur <i>hepatozytären Gcdh</i>^{-/-}-Maus	XIV
8.6.1	Kruskal-Wallis H-Test und Mann-Whitney U-Test	XIV
8.7	Statistische Verfahren zu den Diätstudien	XV
8.7.1	Kruskal-Wallis H-Test und Mann-Whitney U-Test	XV
8.8	Tabellarische Auflistung im Ergebnisteil nur graphisch dargestellter Messwerte der Gewebehomogenate	XVI

1 Theorie

1.1 Einleitung

Der Begriff der angeborenen Stoffwechselstörungen beschreibt eine große Gruppe von erblichen Defekten im zellulären Stoffwechsel. Die kumulative Inzidenz für einen solchen Defekt bei einem Neugeborenen liegt bei ca. 1:500 (Zschocke und Hoffmann 2004). Angeborene Stoffwechselstörungen sind ein relativ junges Gebiet der Medizin, das sich parallel zur Etablierung neuer diagnostischer Verfahren etabliert hat. Viele dieser Stoffwechseldefekte haben für unbehandelte Patienten verheerende Folgen. Die klinische Symptomatik des Defektes manifestiert sich oft bereits vor oder kurz nach der Geburt. Eine frühe Diagnose des Defektes verbunden mit therapeutischen Maßnahmen ist von größter Relevanz, da die ersten Lebensmonate bei vielen Defekten durch irreversibel Schädigungen von Organen den Verlauf der Erkrankung prägen. Die Einführung des *Neugeborenen-Screenings* brachte einen großen Fortschritt auf diesem Gebiet, da es mittels Tandem-Massenspektrometrie und wenigen Blutstropfen des Neugeborenen erlaubt, einige behandelbare Stoffwechselstörung noch vor der Manifestation irreversibler Organschäden zu diagnostizieren und zu behandeln. Um therapeutische Konzepte für noch nicht oder nur schlecht therapierbare Stoffwechseldefekte entwickeln zu können, ist jedoch zunächst die Kenntnis ihrer Pathomechanismen erforderlich.

Im Rahmen dieser Arbeit soll deshalb am Beispiel der Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Defizienz und der Succinatsemialdehyd-Dehydrogenase-Defizienz die Rolle der Biochemie und der Bioenergetik im Pathomechanismus *zerebraler* Organoazidopathien, einer Untergruppe der angeborenen Stoffwechselstörungen, exemplarisch untersucht werden.

Im Folgenden wird zunächst der Begriff der *zerebralen* Organoazidopathien eingeführt und in die Gruppe der Organoazidopathien eingeordnet. Darauf aufbauend werden die Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Defizienz und zugehörige Tiermodelle beschrieben. In diesem Zusammenhang wird auf die Exzitotoxizitätshypothese mit ihren Implikationen für diesen Stoffwechseldefekt eingegangen. Ein allgemeines pathophysiologisches Konzept und die daraus folgenden Therapiestrategien der Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Defizienz werden vorgestellt. Der Abschnitt schließt mit einer Beschreibung der Succinatsemialdehyd-Dehydrogenase-Defizienz und des zugehörigen Knock Out-Mausmodells sowie der Vorstellung eines pathomechanistischen Konzepts und daraus resultierenden Behandlungsansätzen für diese Erkrankung.

1.2 Organoazidopathien

Organoazidopathien sind eine heterogene Gruppe angeborener Stoffwechselkrankheiten des Intermediärstoffwechsels, deren gemeinsames biochemisches Gruppenmerkmal die vermehrte Produktion und Akkumulation von charakteristischen Carbonsäuren und CoA-Estern und z.T. von Carnitin- und Glycinestern ist. Die meisten Organoazidopathien entstehen durch einen Defekt im intramitochondrialen Abbau von verzweigtkettigen Aminosäuren. Die Anhäufung der CoA-Verbindungen bildet dabei ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal zur Gruppe der Aminoazidopathien. Bei diesen kommt es durch den Enzymdefekt zu einer Akkumulation von charakteristischen Aminosäuren (z.B. Phenylalanin bei Phenylketonurie).

Die Gruppe der Organoazidopathien lässt sich in zwei Untergruppen aufteilen, die *klassischen* und die *zerebralen* Organoazidopathien. Eine *klassische* Organoazidopathie stellt sich durch eine akute, systemische, d.h. mehrere Organsysteme betreffende, Problematik dar. Bei der klinischen Präsentation lässt sich zwischen einer neonatalen Form (z.B. metabolische Enzephalopathie, Lethargie, Dehydratation, neurovegetative Dysregulation), einer chronischen, intermittierenden Form mit einer Manifestation im Adoleszenten- oder Erwachsenenalter (z.B. ketoazidotisches Koma, Lethargie, Ataxie und Reye-Syndrom) und einer chronisch progredienten Form (z.B. Gedeihstörungen, chronisches Erbrechen, Osteoporose, muskuläre Hypotonie und psychomotorische Retardierung) unterscheiden. Als wichtigste Vertreter sind zu nennen Propionazidurie (Propionyl-Carboxylase-Defizienz), Methylmalonazidurie (Defizienz der Methylmalonyl-CoA-Mutase oder der Adenosylcobalamin-Synthese), Isovalerianazidurie (Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase-Defizienz).

Zerebrale Organoazidopathien zeichnen sich durch einen weitgehend auf das Gehirn beschränkten und oft progredienten Krankheitsverlauf aus. Häufige klinische Befunde sind mentale Retardierung, Bewegungsstörungen, metabolische oder epileptische Enzephalopathie und Leukodystrophie. Viele der bei den *klassischen* Organoazidopathien nachweisbaren Laborveränderungen (metabolische Azidose, Laktatazidose, Ketonämie/-urie, Hyperammonämie, Hypoglykämie) treten bei den *zerebralen* Organoazidopathien nicht auf. Die wichtigsten Vertreter dieser Untergruppe sind die Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Defizienz, die Succinatsemialdehyd-Dehydrogenase-Defizienz, die L-2- und D-2-Hydroxyglutarazidurien (Defekt der L-2- oder D-2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydrogenase), der Morbus Canavan (Defekt der Aspartoacylase), die Ethylmalonsäure-Enzephalopathie und der 2-Methyl-3-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydrogenase-Mangel.

Innerhalb der Gruppe der Organoazidopathien lässt sich auch die Subgruppe der organischen Azidopathien mit akkumulierenden Dicarbonsäuren definieren. Diese umfasst bis auf die

Methylmalonazidurie, die eine *klassische* Organoazidurie ist, nur *zerebrale* Organoazidurien. Dazu gehören Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Defizienz, L-2- und D-2-Hydroxyglutarazidurie und Ethylmalonsäure-Enzephalopathie. Die ursächlichen Mechanismen der neurologischen Komplikationen bei *zerebralen* Organoazidopathien sind meist noch unzureichend geklärt. In vielen Fällen wird jedoch eine neurotoxische Wirkung der akkumulierenden Intermediate postuliert.

1.3 Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Defizienz

Die Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Defizienz (GA I; Synonym: Glutarazidurie/ azädemie Typ I; MIM # 231670) ist eine autosomal rezessive Erkrankung mit einer geschätzten Median-Prävalenz von 1:100000 Neugeborenen (Lindner *et al.* 2004) in Europa, Australien und Nordamerika. Die Erkrankung ist jedoch in einigen Populationen, wie der Old Order Amish Community (Lancaster County, Pennsylvania, USA; Strauss *et al.* 2003) und den kanadischen *Oji-Cree*-Indianern (Greenberg *et al.* 2002) überrepräsentiert. Das Glutaryl-CoA-Dehydrogenase (GCDH) Gen liegt auf Chromosom 19p13.2, enthält 11 Exons und ist 7 kb groß (Greenberg *et al.* 1995). Die GCDH (EC 1.3.99.7) ist ein mitochondriales Schlüsselenzym im Abbau der Aminosäuren L-Tryptophan, L-Lysin und L-Hydroxylysin. Es katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Glutaryl-CoA zu Crotonyl-CoA und CO₂ (Christensen 1993). Insgesamt sind mehr als 150 krankheitserzeugende Mutationen bekannt (Busquets *et al.* 2000; Goodman *et al.* 1998; Zschocke *et al.* 2000). Biochemisch ist die Krankheit durch eine Akkumulation der organischen Säuren Glutarsäure (GA) und 3-Hydroxyglutarsäure (3-OH-GA) in Körperflüssigkeiten und Geweben gekennzeichnet.

Klinisch wird die GCDH-Defizienz durch eine akute striatale Degeneration kompliziert, die sich im Rahmen einer enzephalopathischen Krise während des Säuglings- oder Kleinkindalters (Median: 9 Monate) manifestiert. Dieser Krise gehen häufig fiebrige Infektionskrankheiten, Routineimpfungen oder Operationen voraus. Die Mehrheit der unbehandelten Kinder entwickelt schwere klinische Symptome, insbesondere eine Dystonie, vor Erreichen des 36 Lebensmonats. Diese Tatsache legt eine Begrenzung der Vulnerabilität auf einen definierten Zeitraum der *zerebralen* Entwicklung nahe (Hoffmann *et al.* 1996; Kyllerman *et al.* 2004; Strauss *et al.* 2003a).

Zu den häufigsten neuroradiologischen Befunden zählen eine temporale Hypoplasie und/ oder Atrophie, striatale Degeneration, pathologische Veränderungen der weißen Substanz, subependymale Pseudozysten sowie subdurale Blutungen und Hygrome. Wenn der Enzymdefekt frühzeitig diagnostiziert wird und eine L-Lysinrestringierte Diät und eine orale

Carnitin-Supplementation sowie eine intensivierete Notfalltherapie im Rahmen kataboler Stoffwechsellagen erfolgt, kann eine Manifestation der prognostisch relevanten enzephalopathischen Krisen bei der Mehrzahl der Kinder verhindert werden (Hoffmann *et al.* 1996; Strauss *et al.* 2003; Naughten *et al.* 2004; Kölker *et al.* 2006).

Zwei biochemische Untergruppen – „*high excretor*“ (GA im Urin > 100 mmol/mol Kreatinin) und „*low excretor*“ (GA im Urin < 100 mmol/mol Kreatinin) – konnten mittels quantitativer Gaschromatographie/ Massenspektrometrie (GC/MS; Baric *et al.* 1999) definiert werden. Generell ist der „*high excretor*“ Status mit einer nichtdetektierbaren GCDH-Aktivität verbunden, während „*low excretor*“ eine residuale GCDH Aktivität von bis zu 30 % in Fibroblasten oder Leukozyten (Christensen *et al.* 2004) aufweisen. Bemerkenswerterweise lässt sich aufgrund des biochemischen Phänotyps keine Aussage über den klinischen Phänotyp treffen (Busquets *et al.* 2000; Mühlhausen *et al.* 2003; Christensen *et al.* 2004; Kölker *et al.* 2006). Einige Studien weisen darauf hin, dass GA und 3-OH-GA maßgeblich an der Pathogenese der GCDH-Defizienz beteiligt sind (Übersicht Kölker *et al.* 2004a)

1.3.1 *Gcdh*^{-/-}-Maus

Das murine *Gcdh*-Gen liegt auf Chromosom 8 in einer Region mit hoher Homologie zum humanen Chromosom 19, enthält 11 Exone und ist 7 kb groß. (Koeller *et al.* 1995). Die DNA-Sequenz des murinen und humanen *GCDH*-Gens enthält konservierte Bereiche, die Sequenzen im Promotorbereich des Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase- und des mittelkettigen-Acyl-CoA-Dehydrogenase-Gens ähneln. Auch viele Konsensuselemente mit bekannten Transkriptionsfaktoren für mitochondriale Proteine konnten identifiziert werden. (Woontner *et al.* 2000). Die Expression des *Gcdh*-Gens in der Maus zeigt hohe Konzentrationen des Proteins in Leber und Niere, mittlere im Herzmuskel und geringe in Skelettmuskulatur und Gehirn. *Zerebral* ist die Expression im Cerebellum und Hippocampus am höchsten, im Striatum am niedrigsten (Woontner *et al.* 2000). *Gcdh*-defiziente Mäuse wurden mittels Integration eines Vektors in das *Gcdh*-Gen (*gene targeting* Technik) in embryonalen Stammzellen generiert (Koeller *et al.* 2002). Die mutanten Mäuse weisen einen vollständigen Verlust der *Gcdh*-Aktivität auf (Koeller *et al.* 2002). Präliminare biochemische Untersuchungen der *Gcdh*^{-/-}-Maus ergaben erhöhte Konzentrationen von GA und 3-OH-GA in Urin und Gehirn (Koeller *et al.* 2002). Dies gleicht dem biochemischen Phänotyp humaner GA I Patienten. Der klinische Phänotyp ähnelt hingegen nur teilweise dem humanen. Die Evaluation der motorischen Funktionen mutanter Maus ergab im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen, dass *Gcdh*^{-/-}-Mäuse eine signifikant niedrigere Asymptote auf dem Rotarod

aufweisen, langsamer einen schmalen Rundstab überqueren und beim Überqueren dieses Rundstabes öfter ausrutschen bzw. stürzen (Koeller *et al.* 2002). Auf neuropathologischer Ebene fallen *Gcdh*^{-/-}-Mäuse durch eine diffuse spongiforme Myelinopathie auf. Neben diesen phänotypischen Veränderungen entwickeln die Mäuse im Unterschied zu humanen GA I Patienten jedoch keine Dystonie oder akute striatale Schädigung (Koeller *et al.* 2002). Auch katabolischer Stress, inflammatorische Cytokine und Lipopolysaccharide, die *in vitro* die 3-OH-GA Neurotoxizität amplifizieren konnten (Kölker *et al.* 2001a), leiteten keine akute enzephalopathische Krise bei diesen Tieren ein.

1.3.2 Weitere Tiermodelle der GCDH-Defizienz

1.3.2.1 *Rousettus aegypticus*

Rousettus aegypticus ist ein natürlich vorkommendes Modell einer systemischen *Gcdh*-Defizienz. Der Fledermaus fehlt eine relevante *Gcdh*-Aktivität in der Leber (*Rousettus aegypticus*, 1,9 - 1,1 pmol/min pro mg Protein; Ratte 690 - 70 pmol/min pro mg) und Niere (*Rousettus aegypticus*, 21 - 3 pmol/min pro mg Protein; Ratte, 380 - 240 pmol/min pro mg). Sie gleicht dem biochemischen Phänotyp von GA I Patienten und scheidet erhöhte Mengen GA und 3-OH-GA über den Urin aus. Sie besitzt jedoch eine normale *zerebrale* *Gcdh*-Aktivität. Dieses natürliche Tiermodell weist keine neurologischen Auffälligkeiten auf, die sich auch nach L-Lysinbelastung nicht provozieren ließen (McMillan *et al.* 1988). Das vollkommene Fehlen eines klinischen Phänotyps deutet darauf hin, dass die *zerebrale* GCDH-Defizienz eine zentrale Rolle in der neuronalen Pathophysiologie der GA I spielt. Eine biochemische Charakterisierung der *zerebralen* GA- und 3-OH-GA-Konzentrationen, um diese Hypothese überprüfen zu können, wurde jedoch für *Rousettus aegypticus* bisher nicht beschrieben.

1.3.2.2 Artificielle Modelle der GCDH-Defizienz durch zerebrale Applikation von GA und 3-OH-GA

Ein alternativer Ansatz zur Untersuchung der Rolle von GA und 3-OH-GA in der *zerebralen* Pathophysiologie der GCDH-Defizienz ist die stereotaktische, intrastriatale Injektion dieser beiden Dicarbonsäuren. Ein solcher Ansatz wurde schon mit einer Vielzahl von potentiellen Neurotoxinen (z.B. 3-Nitropropionsäure [3-NPA]) beschrieben (Beal *et al.* 1993; de Mello *et al.* 1996). Zwei Studien (de Mello *et al.* 2001; Lima *et al.* 1998) konnten nach intrastriataler Applikation von GA und 3-OH-GA die postulierte Neurotoxizität (Übersicht Kölker *et al.* 2004a) dieser beiden Metabolite zeigen. 3-OH-GA induzierte eine ipsilaterale striatale Läsion

und Krampfanfälle, die durch Blockade der NMDA-Rezeptoren und Stimulation der GABA-Rezeptoren (de Mello *et al.* 2001) verhindert werden konnten. Weiterhin wurde nach 3-OH-GA-Injektionen eine erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in denselben Modellen gefunden (Latini *et al.* 2002). Die Applikation von GA erzeugte ebenfalls Krampfanfälle, die durch eine Stimulation der GABA-Rezeptoren reduziert wurden (Lima *et al.* 1998). In einer Modifikation dieser Studie (Funk *et al.* 2004) konnte dieses Ergebnis nur partiell repliziert werden. Es zeigten sich zwar striatale Nekrosen, jedoch waren diese um die Injektionsstelle räumlich begrenzt. Auch eine Präkonditionierung mit Lipopolysacchariden konnte den Effekt nicht amplifizieren. Neben den uneinheitlichen Ergebnissen dieser Experimente, liegt ein weiterer Nachteil in der einmaligen Injektion hoher Dosen von GA und 3-OH-GA. Dies kann leicht zu einer Überschätzung des Effektes führen und spiegelt nicht die chronische Belastungssituation bei GA I Patienten wider.

1.3.3 Exzitotoxizitätshypothese

1.3.3.1 Primäre Exzitotoxizität

Der Begriff der Exzitotoxizität wurde in den 70er Jahren von Olney und Kollegen (1969, 1970, 1971 und 1972) eingeführt und beschreibt allgemein die neuronale Schädigung durch pathologisch erhöhte exzitatorische Neurotransmitter, vor allem Glutamat.

Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter und interagiert mit AMPA-, Kainat- und metabotropen und ionotropen NMDA-Rezeptoren. Der exzitotoxische Schädigungsmechanismus wird durch eine Überstimulierung glutamaterger Rezeptoren erzeugt und lässt sich in zwei Komponenten unterteilen.

Eine Hyperstimulierung von NMDA- und nonNMDA-Rezeptoren führt direkt über einen Einstrom von Na^+ zu einem Influx von Cl^- und H_2O . Dies hat eine Schwellung des Neurons und osmotische Schädigung (Choi 1987; Olney 1986; Churchwell *et al.* 1996; Inglefield *et al.* 1998) zur Folge.

Eine spätere Komponente wird durch einen Einstrom von Ca^{2+} erzeugt (Olney 1986; Dessi *et al.* 1994). Hier spielen NMDA-Rezeptoren eine wichtige Rolle, aber auch Ca^{2+} -permeable AMPA- und Kainat-Rezeptoren und spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle können beteiligt sein (Lu *et al.* 1996). Der vermehrte Calciumeinstrom führt zu einem Ungleichgewicht in der Ca^{2+} -Homöostase und zu einer Ca^{2+} -Überladung der Zelle. Da Ca^{2+} eine zentrale Rolle als Botenstoff und Enzymaktivator in der Zelle spielt, kommt es zu einer komplexen zellulären Reaktion (Übersicht Rego und Oliveira 2003; Berg *et al.* 2004; Nicholls 2004; Canzoniero

und Snider 2005; Araujo und Carvalho 2005; Manfredi und Xu 2005; Desjardins und Butterworth 2005). Wichtige Komponenten dieser Reaktion sind die:

- Aktivierung der Phospholipase A2 (Dumuis *et al.* 1988). Diese ist an den Arachidonsäure Stoffwechselweg gekoppelt, dessen Aktivierung in eine erhöhte ROS Bildung mündet.
- Aktivierung der Ca^{2+} -abhängigen Cystein-Protease Calpain (Siman und Noszek 1988). Diese spaltet Strukturproteine proteolytisch und baut Cytoskelettkomponente ab.
- Aktivierung der neuronalen NO-Synthase (nNOS). Dies führt zur Bildung von NO und des freien Radikals Peroxynitrit (Dawson *et al.* 1993a; Dawson *et al.* 1996; Lipton *et al.* 1993).
- Aktivierung von Calcineurin. Diese Ca^{2+} / Calmodulin aktivierte Phosphatase dephosphoryliert die nNOS und erhöht so die nNOS Aktivität (Dawson *et al.* 1993b).
- Depolarisation der inneren mitochondrialen Membran infolge des Ca^{2+} -Einstroms, woraus eine mitochondriale Dysfunktion (Schinder *et al.* 1996) und ROS Produktion resultiert (Dykens *et al.* 1994).

Die Rolle metabotroper NMDA-Rezeptoren besteht in der Modulation der durch ionotrope NMDA-Rezeptor induzierten Exzitotoxizität über Signalkaskaden wie *second messenger* vermittelte Aktivierung der Proteinkinase C, der Adenylatcyclase-Signalkaskade und der Entleerung IP_3 -sensitiver Ca^{2+} -Speicher (Bruno *et al.* 1995, 1999; Kingston *et al.* 1999; Strasser *et al.* 1998; Sagara *et al.* 1998; Mukkhin *et al.* 1996). Insgesamt führen diese Prozesse in Abhängigkeit von der Intensität des zugrunde liegenden Stimulus, vom Zelltyp und Ausreifung zu apoptotischem und nekrotischem Zelluntergang (Ankarcrona *et al.* 1995; Choi 1996; Bonfoco *et al.* 1995).

1.3.3.2 Sekundäre Exzitotoxizität

Die primäre Komponente der Exzitotoxizität, die durch pathologische Glutamat-Konzentrationen erzeugt wird, spielt vor allem bei der Pathogenese des Hirninfarkts und der hypoxisch-ischämischen Enzephalopathie asphyktischer Neugeborener eine Rolle. (Hirsch und Gibson 1984; Nicholls und Attwell 1990; Szatkoski und Attwell 1994; Benveniste *et al.* 1984; Drejer *et al.* 1985; Obrenovitch und Richards 1995; Rothman 1984, 1986; Lee *et al.* 1999), ist jedoch ungenügend um die langsameren, progressiven Veränderungen bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Morbus Huntington und *zerebralen* Organoazidopathien (z.B. GCDH-Defizienz) zu erklären. Als Ursache wurden zwei unterschiedliche Mechanismen postuliert: Abnormalität der Rezeptoren

und mitochondriale Dysfunktion (Novelli *et al.* 1988; Beal 1992; Albin und Greenamyre 1992).

Ein abnormes Ansprechverhalten von NMDA-Rezeptoren und dem zugehörigen Mg^{2+} -Block konnten unter anderem in einem Mausmodell zum Morbus Huntington beschrieben werden (Starling *et al.* 2005). Zahlreiche Studien wiesen aber vor allem auf die Bedeutung einer mitochondrialen Dysfunktion als zugrunde liegenden Mechanismus hin (Novelli *et al.* 1988; Zeevalk und Nicklas 1990, 1991; Beal *et al.* 1991; Storey *et al.* 1992). Im Rahmen einer mitochondrialen Dysfunktion kommt es zu einer verminderten ATP-Produktion durch die Atmungskette. ATP wird in Neuronen benötigt, um den Ionen- und Spannungsgradienten bzw. das Ruhepotential an der Zellmembran über Na^+ / K^+ -Pumpen (Na^+ / K^+ -ATPasen) einzustellen. Weiterhin halten Ca^{2+} -ATPasen mittels aktiven Transports von intrazellulärem Ca^{2+} aus der Zelle oder durch Transport in zelluläre Speicher (endoplasmatisches Retikulum) die Ca^{2+} -Homöostase aufrecht. Bei einem Ungleichgewicht des Energiestoffwechsels führt der ATP-Mangel nach einem synaptischen Signal zu einer unkontrollierten Membrandepolarisation. Ist die Depolarisation stark genug, werden die spannungsabhängigen Mg^{2+} -Blöcke der NMDA-Rezeptoren gelöst, und es kommt zu einer Überstimulation durch schon physiologische Glutamat-Konzentrationen. Die unkontrollierte Membrandepolarisation und Überstimulation der NMDA-Rezeptoren leitet die unter primärer Exzitotoxizität beschriebenen Reaktionen ein.

1.3.3.3 Das Striatum und exzitotoxische Mechanismen

In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass besonders das Striatum eine verstärkte Vulnerabilität für Ischämie (Pulsinelli *et al.* 1982), Hypoxie (Haddad und Jiang 1993), Hypoglykämie (Nakao *et al.* 1995) und exzitatorische Schädigung durch sowohl Glutamatrezeptor-Agonisten (z.B. Glutamat, NMDA, Quinolinsäure) (Beal *et al.* 1988; Chapman *et al.* 1989; Bruyn und Stoof 1990) als auch durch eine Dysfunktion (Nishino *et al.* 2000) oder Inhibition des mitochondrialen Energiemetabolismus (z.B. 3-NPA, Malonsäure) (Green *et al.* 1993; Kim *et al.* 2000) besitzt. Die striatale Vulnerabilität wird durch mehrere konvergierende Mechanismen begünstigt. Hierzu gehören der starke corticostriatale und thalamocorticale glutamaterge *Input* und ein hoher Gehalt von *medium-spiny* Neuronen (Calabresi *et al.* 1998). (*Medium-spiny*) Neurone weisen aufgrund ihrer physiologischen und molekularen Konzeption eine besondere Verwundbarkeit für exzitotoxische Mechanismen auf (Calabresi *et al.* 2000).

1.3.4 Ein pathophysiologisches Konzept zur GCDH-Defizienz

1.3.4.1 Stand der Forschung

Die bisher etablierten pathophysiologischen Konzepte für die GCDH-Defizienz basierten im wesentlichen auf der Annahme, dass die beiden akkumulierenden Dicarbonsäuren GA und 3-OH-GA maßgeblich an den neurodegenerativen Veränderungen der Krankheit beteiligt sind (Übersicht Kölker *et al.* 2004a). Die strukturelle Ähnlichkeit von 3-OH-GA und Glutamat (2-Amino-GA), dem wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitter, legte den initiativen Grundstein eines exzitotoxischen Schädigungsmodells. Es wurde hierbei postuliert, dass GA und/ oder 3-OH-GA als ‚falsche‘ endogene Neurotransmitter einen exzitotoxischen Schädigungsmechanismus über eine vermehrte Stimulation von Glutamat-Rezeptoren auslösen. Untersuchungen an neuronalen Primär- und organotypischen *Slice*-Kulturen konnten zeigen, dass 3-OH-GA eine neuronale Schädigung hervorrief, die durch Präinkubation mit NMDA-Rezeptorant-Agonisten verhindert werden konnte (Kölker *et al.* 1999, 2000a,b, 2001a,b, 2002a; Ullrich *et al.* 1999). Mittels Patch-clamp-Untersuchungen in HEK293-Zellen und Rezeptorbindungsstudien wurde von zwei Arbeitsgruppen gezeigt, dass 3-OH-GA als schwacher NMDA-Rezeptor-Agonist wirkt (Kölker *et al.* 2002; Rosa *et al.* 2004). Dies konnte in *Xenopus laevis*-Oozyten jedoch nicht bestätigt werden (Ullrich *et al.* 1999; Lund *et al.* 2004). Deshalb wurde postuliert, dass die Stimulation von NMDA-Rezeptoren durch 3-OH-GA nicht nur direkt, sondern auch indirekt durch Beeinflussung des spannungsabhängigen Mg^{2+} -Blocks zustande kommt (Ullrich *et al.* 1999). Als möglicher Ansatzpunkt wurde hierfür eine Depletion des intrazellulären Kreatinphosphat-Pools durch 3-OH-GA aufgezeigt (Ullrich *et al.* 1999), wobei der zugrunde liegende Mechanismus unklar blieb. In Übereinstimmung mit der Exzitotoxizitätshypothese konnte eine vermehrte neuronale Generierung von ROS (Kölker *et al.* 2001a,c; Latini *et al.* 2002) nach Inkubation mit 3-OH-GA gefunden werden.

Für GA wurden andere Schädigungsmechanismen postuliert, wobei eine direkte Stimulation von ionotropen Glutamatrezeptoren keine Bedeutung hatte (Kölker *et al.* 2002a; Ullrich *et al.* 1999; Lund *et al.* 2004). Es konnte eine Reduktion der GABA Produktion (Stokke *et al.* 1976), der synaptosomalen Glutamataufnahme (Bennett *et al.* 1973; Porciuncula *et al.* 2000) und eine Inhibition der Na^+ / K^+ -ATPase (Kölker *et al.* 2002b) durch GA beschrieben werden. Eine Studie von Gerstner *et al.* (2005) konnte zeigen, dass GA und 3-OH-GA in unreifen Oligodendrozyten einen apoptotischen Zelluntergang initiiert. Dieser Effekt könnte an der bei GA I Patienten zu findenden progredienten Leukoencephalopathie beteiligt sein. Da unreife Oligodendrozyten keine funktionellen NMDA-Rezeptoren exprimieren, wurden alternative

Schädigungsmechanismen postuliert. Eine aktuelle Arbeit von Mühlhausen und Kollegen (2006) konnte eine gestörte Angiogenese humaner, dermalen, microvaskulärer Endothelzellen durch sehr hohe 3-OH-GA-Konzentrationen nachweisen. Die Autoren postulieren, dass dies im Zusammenhang mit den *subduralen* Blutungen bei GA I Patienten steht.

Die beschriebenen Effekte sind jedoch einzeln zu schwach, um die striatale Neurodegeneration mittels primärer Exzitotoxizität zu erklären. Außerdem konnte der direkte exzitotoxische Effekt von 3-OH-GA nicht in allen Studien gezeigt werden (Bjugstad *et al.* 2001; Lund *et al.* 2000; Freudenberg *et al.* 2004). Zudem bleibt der toxische Effekt nicht allein auf Nervenzellen begrenzt, was die Annahme NMDA-Rezeptor-unabhängiger Schädigungsmechanismen bestärkt (Gerstner *et al.* 2005; Mühlhausen *et al.* 2006). Es scheint, dass eine weitere amplifizierende Größe notwendig ist. Die sekundäre Exzitotoxizitätshypothese verweist in diesem Zusammenhang auf den bioenergetischen Stoffwechsel. Zwar deuteten präliminare Daten (Ullrich *et al.* 1999) eine Inhibition des Atmungskettenkomplexes II und V durch 3-OH-GA und GA an, direkte Messungen konnten diesen Befund jedoch nicht belegen (Kölker *et al.* 2002b).

1.3.4.2 Bedeutung der Bluthirnschranke für die GCDH-Defizienz

Um die Relevanz der exzitotoxischen Hypothese und einer potentiellen bioenergetischen Dysfunktion für den Pathomechanismus der GCDH-Defizienz einzuordnen, ist die Kenntnis *zerebraler* GA- und 3-OH-GA-Konzentration von großer Relevanz. Das Wissen über die *zerebralen* GA- und 3-OH-GA-Spiegel war zu Beginn dieser Arbeit jedoch auf wenige *post mortem*-Untersuchungen (Goodman *et al.* 1977; Leibel *et al.* 1980; Bennett *et al.* 1986; Kölker *et al.* 2003a) begrenzt. Aktuelle Studien konnten die Kenntnisse über zerebrale GA und 3-OH-GA Spiegel durch einige *post mortem*-Untersuchungen (Funk *et al.* 2005) und eine Hirnbiopsie (Külkens *et al.* (2005) erweitern. Patienten ohne eine strikte Diät wiesen GA-Konzentrationen von ungefähr 500 - 5000 μM und 3-OH-GA-Konzentrationen von 40 - 200 μM in Hirngewebe auf. Diese Konzentrationen übersteigen die bekannten Plasmakonzentrationen 10 - 1000fach und erreichen einen Bereich der in *in vitro*-Modellen neurotoxisch war (Kölker *et al.* 2004a). Für *Gcdh*^{-/-}-Mäuse lag nur ein präliminärer Datensatz zu beiden organischen Säuren vor (Koeller *et al.* 2002).

Vor allem für diätetische Strategien ist neben der Konzentration auch der Ursprung von *zerebraler* GA und 3-OH-GA von großer Bedeutung. Die Herkunft *zerebraler* Metabolite ist im Allgemeinen auf eine *de novo*-Synthese im Gehirn und/ oder Anreicherung aus der systemischen Zirkulation beschränkt. Eine entscheidende Rolle spielt hierbei die

Bluthirnschranke (BBB). Sie besteht aus kapillären Endothelzellen, die von einer kollagenhaltigen extrazellulären Matrix umgeben sind. In diese Matrix sind Pericyten eingebettet. Die Oberfläche wird von Astrozyten bedeckt, die über Signalstoffe die Differenzierung der Endothelzellen und die Ausbildung der *tight junctions* modulieren (Lattera *et al.* 1994; Rubin *et al.* 1991).

Die kapillären Endothelzellen der BBB unterscheiden sich in zwei Punkten von Endothelzellen anderer Organe. Zum einen bilden sie kontinuierliche *tight junctions* aus, die einen *trans*-kapillären Fluss von Metaboliten und Ionen verhindern, zum anderen besitzen sie keine *trans*-endotheliale Transportwege (Brightman 1977). Die BBB isoliert so das Gehirn metabolisch von der systemischen Zirkulation. Ein passiver Austausch von Substanzen über die BBB ist streng durch die Größe, Ladung und hydrophobe oder hydrophile Gruppen des Metaboliten limitiert. Um die Versorgung des Gehirns zu sichern, gibt es über 20 spezifische Transportsysteme, die als biochemische Torwächter für Schlüsselmetabolite wie Amino- und Monocarbonsäuren fungieren (Tamai und Tsuji 2000). Die Passage anderer Verbindungen wie Dicarbonsäuren (z.B. GA) ist jedoch nur begrenzt möglich (Hassel *et al.* 2002). Als ein potentieller Transporter für die Dicarbonsäuren in der BBB wurde der organische Anionen Transporter 3 (OAT3), ein organischer Anion/ Dicarbonsäure Austauscher beschrieben (Kikuchi *et al.* 2003; Ohtsuki *et al.* 2002; Sweet *et al.* 2003). Durch die beschriebenen Eigenschaften der BBB wird das Gehirn einerseits mit Nährstoffen versorgt, gleichzeitig aber vor plasmatischen Fluktuationen (z. B. postprandialer Anstieg der Plasma-Aminosäuren) und Intoxikationen geschützt.

Eine Hypothese zur GCDH-Defizienz von Strauss und Morton (2003) postuliert eine *zerebrale* Anreicherung von GA und 3-OH-GA aus der systemischen Zirkulation. 3-OH-GA soll hierbei in Analogie zum kovalenten Komplex II-Inhibitor 3-NPA (Nishino *et al.* 1995) die BBB schädigen und diese so für beide Dicarbonsäuren permeabel machen.

Das neurologisch unauffällige natürliche Tiermodell *Rousettus aegypticus* (McMillan 1988) und der starke ZNS/ Plasma Gradient beider organischer Säuren in Patientendaten (Goodman *et al.* 1977; Leibel *et al.* 1980; Bennett *et al.* 1986; Kölker *et al.* 2003; Funk *et al.* 2005; Külkens *et al.* 2005) sprechen jedoch für eine *zerebrale de novo*-Synthese bei gleichzeitiger Impermeabilität der BBB. Diese Alternativhypothese ist jedoch noch nicht untersucht worden.

1.3.5 Therapeutische Strategien bei GCDH-Defizienz

Nach dem heutigen Stand der Forschung scheinen GA und 3-OH-GA grundlegend an der Pathophysiologie der GCDH-Defizienz beteiligt zu sein. Infolgedessen stellt eine Reduzierung der Synthese dieser organischen Säuren eines der therapeutischen Grundprinzipien der GCDH-Defizienz dar. Aktuelle Therapieformen sind eine diätetische Restriktion der Vorläuferaminosäuren L-Lysin und L-Tryptophan und eine orale Carnitin-Supplementation (Baric *et al.* 1998; Hoffmann *et al.* 1996; Kölker *et al.* 2004b; Strauss *et al.* 2003). Bei einer L-Lysinrestringierten Diät wird die täglich zugeführte Lysinmenge exakt berechnet. Im Rahmen einer proteinrestringierten Diät wird hingegen lediglich die tägliche Proteinzufuhr kalkuliert.

Des Weiteren wird eine intensivierete Notfallbehandlung im Rahmen kataboler Stoffwechsellagen (z.B. fieberhafte Infektionskrankheiten) durchgeführt, um die Manifestation enzephalopathischer Krisen zu verhindern (Hoffmann *et al.* 1996; Monavari und Naughten 2000; Strauss *et al.* 2003). Die Wirksamkeit dieser therapeutischen Ansätze war vor Studienbeginn noch schlecht belegt, da klinische Studien zumeist nur an einer kleinen Stichprobe vorgenommen wurden. Eine fehlende Integration grundlagenwissenschaftlicher und klinischer Forschungsdaten erschwerte die Findung einer therapeutischen Rationalen.

1.4 Succinatsemialdehyd-Dehydrogenasen-Defizienz

Die Succinatsemialdehyd-Dehydrogenase-Defizienz (Synonym, γ -Hydroxybutyrazidurie; MIM # 271980) ist eine seltene autosomal-rezessive Erkrankung des *zerebralen* γ -Aminobutyrat (GABA)-Metabolismus. Das Succinatsemialdehyd-Dehydrogenase (SSADH)-Gen (*ALDH5A1*) liegt auf Chromosom 6p22 (Trettel *et al.* 1997) und ist 38 kb groß. Die SSADH (EC 1.2.1.24) katalysiert den zweiten Schritt in der Umwandlung von GABA zu Succinat, die Dehydrogenierung von Succinatsemialdehyd (SSA) zu Succinat. Der erste Schritt dieser Umwandlung, die Transaminierung von GABA zu SSA, wird durch die GABA-Transaminase katalysiert. Dieser Stoffwechselweg ist in *zerebralen* Mitochondrien von großer Bedeutung, da er den Metabolismus der beiden wichtigsten Neurotransmitter GABA und Glutamat über Succinat an die Atmungskette koppelt. Bei einem Defekt der SSADH wird GABA zu γ -Hydroxybuttersäure (GHB) umgewandelt. Biochemisch ist die SSADH-Defizienz durch eine Akkumulation von GHB und GABA in Serum, Urin und im Liquor der Patienten charakterisiert (Jacobs *et al.* 1993). Vor allem GHB gilt aufgrund seiner außergewöhnlichen neuropharmakologischen Eigenschaften (Snead 1978) als wichtiger Wirkstoff im Pathomechanismus der Erkrankung (Gibson *et al.* 1998). Klinisch präsentiert sich die SSADH-Defizienz in der Kindheit mit psychomotorischer Retardierung, Krampfanfällen, Hypotonie, einer nicht progressiven Ataxie (Gibson *et al.* 1998) und Mikro- oder Makrozephalie. Im MRT zeigen sich T₂-Hyperintensitäten im Globus pallidus und der weißen Substanz. Zusätzlich treten Beeinträchtigungen der Sprachfähigkeit und Verhaltensauffälligkeiten wie Aggressivität, Angstzustände, Halluzinationen und Autoaggression auf (Gibson *et al.* 2003). Bisher konnten über 50 Mutationen des *ALDH5A1*-Gens in Patienten beschrieben werden (Akaboshi *et al.* 2003; Aoshima *et al.* 2002; Bekri *et al.* 2004; Hogema *et al.* 2001a). Wie bei der GCDH-Defizienz konnte auch bei diesem Defekt keine Genotyp-Phänotyp-Korrelation gefunden werden.

1.4.1 *Aldh5a1*^{-/-}-Maus

Aldh5a1^{-/-}-Mäuse wurden durch die *gene targeting* Technik am *Aldh5a1*-Gen und Cre-Lox-Rekombination erstellt (Hogema *et al.* 2001b). Die mutanten Mäuse nahmen in den ersten Lebenswochen nicht an Gewicht zu (Cortez *et al.* 2004) und zeichneten sich durch erhöhte GHB- und GABA-Konzentrationen in Körperflüssigkeiten und Gewebeextrakten aus (Gibson *et al.* 2002). Elektrocorticogramme sich frei bewegender Mäuse ergaben Abscenen mit Krampfanfällen ab dem 14. postnatalen Tag. Ab den Tagen 20-24 gingen diese Krampfanfälle

in generalisierende Krampfanfälle über, die ab dem 26. Tag letal waren (Cortez *et al.* 2004). Ungewöhnlicherweise fielen diese Mäuse durch reduzierte *zerebrale* Glutamin-Konzentrationen bei gleichzeitig normalem Glutamatspiegel auf (Hogema *et al.* 2001b).

Zudem konnten in der *Aldh5a1*^{-/-}-Maus erhöhte Konzentrationen von Homocarnosin beschrieben werden (Gupta *et al.* 2004a). Die Bedeutung dieses GABA-Histidin-Dipeptides für die Neuropathologie der Erkrankung aber auch seine Bedeutung für das gesunde ZNS ist bis jetzt noch unklar. Homocarnosin wurde als osmoregulatorisches und potentiell neuroprotektives Agens beschrieben (Tabakman *et al.* 2002).

Neben GABA und GHB wurde auch eine Akkumulation von 4,5-Dihydroxyhexansäure (4,5-DHHA) bei der *Ssadh*-Defizienz gemessen (Gibson *et al.* 2002). Es wird postuliert, dass 4,5-DHHA durch eine Kondensation von SSA und 2- oder 3-Kohlenstoffintermediaten (z.B. Acetyl-CoA, Laktat oder Pyruvat) entsteht (Brown *et al.* 1987). Möglicherweise ist an dieser Reaktion auch der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex beteiligt (Schoerken und Sprenger 1998; Shaw und Westerfeld 1968). Die Rolle dieses Metaboliten für die Pathogenese ist noch unklar.

Eine Hämatoxylin/ Eosin Färbung von Hirnschnitten der mutanten Mäuse ergab keine strukturellen Abnormalitäten. Eine immunohistochemische Färbung des *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) zeigte hingegen eine Astrogliose in den dorsalen hippocampalen Kommissuren (Hogema *et al.* 2001b).

1.4.2 Ein pathophysiologisches Konzept zur SSADH-Defizienz

1.4.2.1 Einfluss erhöhter GABA- und GHB-Konzentrationen auf die Neurotransmission

Während die Pathogenese der GCDH-Defizienz nach dem heutigen Stand der Forschung durch eine Überstimulation der exzitatorischen Neurotransmission entsteht, scheint der Pathomechanismus der SSADH-Defizienz auf einem Ungleichgewicht der inhibitorischen Neurotransmission zu basieren. Eine zentrale Rolle bei der SSADH-Defizienz spielt die Akkumulation von GABA und GHB.

GABA ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im Gehirn. Drei verschiedene Rezeptorklassen sind bekannt (Enna 2001). GABA_A- und GABA_C-Rezeptoren sind ionotrope, GABA_B-Rezeptoren hingegen metabotrope Rezeptoren, die über G-Proteine mit den inhibitorischen Signalkaskaden verknüpft sind. GABA_A-Rezeptoren sind aus verschiedenen α -, β - und γ -Untereinheiten zusammengesetzt. Über die Zusammensetzung dieser Untereinheiten kann die Funktionalität und das Antwortverhalten auf modulierende Faktoren

des Rezeptors verändert werden. Eine pathologische Bedeutung dieser Modulation konnte vor allem für Epilepsien gezeigt werden (Isokawa 1996; Shumate *et al.* 1998; Loup *et al.* 2000). GABA_A-Rezeptoren erlauben den Fluss von Cl⁻- und Bicarbonationen (im Verhältnis 4:1). Durch eine Hyperpolarisation der Membran infolge des Cl⁻-Einstroms entsteht die inhibierende Wirkung GABA_A auf die Neurotransmission. Über eine Senkung des Membranwiderstands durch die Öffnung von GABA_A-Rezeptoren kann auch ein exzitatorisches Signal abgeschwächt werden (Gulledge und Stuart 2003; Cohen *et al.* 2002; Khalilov *et al.* 2003; Staley *et al.* 1995).

Aktuelle Studien zeigen, dass sich die Bedeutung der GABA-Rezeptoren nicht auf die inhibitorische Neurotransmission beschränkt. In Abhängigkeit von Ruhemembranpotential und intrazellulärer Chloridionenkonzentration kann ein GABAerges Signal inhibitorisch oder exzitatorisch wirken (Chavas und Marty 2003; Gulledge und Stuart 2003; Cohen *et al.* 2002; Khalilov *et al.* 2003; Staley *et al.* 1995). Dieser Effekt wird im Kapitel 1.4.2.2 genauer beschrieben.

GHB ist der zweite wichtige Marker der SSADH-Defizienz. Sie ist ein endogenes Derivat der GABA und kann in Konzentrationen kleiner als 1 % der zugehörigen GABA-Konzentration gemessen werden (Doherty *et al.* 1978). Während die BBB für GABA nicht permeabel ist, ist sie für GHB jedoch durchlässig und erlaubt so die *zerebrale* Anreicherung von GHB aus der systemischen Zirkulation. Im Gehirn hat GHB starke Effekte auf die Elektrophysiologie und das Verhalten (Snead 2000). Die *zerebrale* Stellung der GHB - Neurotransmitter oder Neuromodulator - wird diskutiert. Jüngere Studien weisen aufgrund pharmakologischer Effekte vermehrt auf ihre Rolle als Neurotransmitter hin (Bernasconi *et al.* 1999; Cash 1994; Maitre *et al.* 2000). GHB bindet GABA_B-Rezeptoren mit einer geringen Affinität (mM Konzentrationen) und spezifische GHB-Rezeptoren mit hoher Affinität (nM bis μ M Konzentrationen) (Lingenhoehl *et al.* 1998; Murphy *et al.* 2004). Molekularbiologische Studien unterstützen die Existenz eines eigenständigen GHB-Rezeptors (Wu *et al.* 2004).

Zurzeit wird angenommen, dass die intrinsische Wirkung von GHB über GHB-Rezeptoren, die pharmakologische und klinische Wirkung von exogenem GHB jedoch über GABA_B - Rezeptoren vermittelt wird. (Kaupmann *et al.* 2003).

Der Metabolismus von GHB ist noch relativ ungeklärt. 3,4-Dihydroxybuttersäure und Glycolsäure im Urin von Patienten (Jakobs *et al.* 1981) könnten auf eine Verstoffwechslung mittels β -Oxidation hinweisen. GHB könnte auch zu GABA zurückgewandelt werden, da die Konversationsschritte zu GABA und SSA reversibel sind (Hechler *et al.* 1997; Vayer *et al.* 1985).

Untersuchungen zum GABAergen Rezeptorsystem konnten eine Abnahme der GABA_B-Rezeptoruntereinheiten (R1a,b und R2) im Cortex von Ssadh-defizienten Mäusen vor dem Beginn von Krampfanfällen feststellen (Buzzi *et al.* 2003). Aus diesem Befund lässt sich eine Hypothese für den epileptischen Phänotyp der Mäuse beschreiben.

Die frühen Absence-Krampfanfälle der Ssadh-defizienten Mäuse werden durch die erhöhten GABA- und GHB-Konzentrationen im Gehirn erzeugt. Dieser Effekt konnte schon in anderen Tiermodellen gezeigt werden (Hu *et al.* 2001; Hosford *et al.* 1992).

Als Mechanismus für die sich anschließenden generalisierenden Krampfanfälle wird ein Zusammenbruch der GABAergen Neurotransmission angenommen. Dieser könnte durch eine Herunterregulierung der GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren - wie in der *Aldh5a1*^{-/-}-Maus gezeigt - als sekundäre Antwort auf die erhöhten GABA- und GHB-Spiegel entstehen. Letztlich käme es zu einem Ungleichgewicht zwischen der exzitatorischen und der inhibitorischen Neurotransmission zugunsten der exzitatorischen Erregungsleitung, das sich in Krampfanfällen manifestiert (Cortez *et al.* 2004).

Ein Ungleichgewicht des bioenergetischen Stoffwechsels durch die bei dieser Erkrankung akkumulierenden Metabolite könnte an dieser Stelle als amplifizierender Mechanismus einsetzen. Neben einer reduzierten inhibitorischen Neurotransmission würden sekundäre exzitotoxische Mechanismen die exzitatorische Signale und somit den klinischen Phänotyp verstärken.

1.4.2.2 Einfluss erhöhter GABA-Konzentrationen auf die neuronale Entwicklung

Ein weiterer Schädigungsmechanismus durch GABA könnte in der neuronalen Entwicklung stattfinden. Während dieser Phase wirkt GABA depolarisierend und führt zu einer Erhöhung des intrazellulären Calciumpools über Aktivierung von L-type und spannungsvermittelten Ca²⁺-Kanälen (Cherubini *et al.* 1991; Obrietan und van den Pol 1995; Leinekugel *et al.* 1999). Dieser Effekt basiert auf der Tatsache, dass in der neonatalen Entwicklung das Gleichgewichtspotential für Chloridionen in Bezug auf das Ruhemembranpotential positiv ist (Rivera *et al.* 1999; Wang *et al.* 2001), woraus sich eine nach außengerichtete treibende Kraft für Chloridionen bei Öffnung der GABA_A-Rezeptoren ergibt. Im Laufe der neuronalen Entwicklung wird das Gleichgewichtspotential negativ und die treibende Kraft richtet sich nach innen.

GABA spielt auch beim Neuritenwachstum und der Stabilisierung der Synapsen eine wichtige Rolle. Erhöhte GABA-Konzentrationen könnten so mit neuronaler Migration und Strukturbildung interferieren (Jelitai *et al.* 2004).

1.4.2.3 Bedeutung des Glutamat/ Glutaminzyklus für die SSADH-Defizienz

Der Befund reduzierter Glutamin-Konzentrationen bei gleichzeitig normalen Glutamat-Konzentrationen bei der *Aldh5a1*^{-/-}-Maus spricht für ein Ungleichgewicht im Glutamat/ Glutaminzyklus zwischen Neuronen und Astrozyten.

Die Glutamat/ Glutaminzyklus Hypothese konnte schon von Van den Berg und Garfinkel (1971) und Benjamin und Quastel (1972) beschrieben werden. Sie steht im Zusammenhang mit der engen Kopplung von Gliazellen und Neuronen zur Aufrechterhaltung des Transmitterpools und der metabolischen und energetischen Homöostase (Bacci *et al.* 1999; Deitmer 2001; Patel *et al.* 1982; Pfrieder und Barres 1996; Rothman *et al.* 1999; Tsacopoulos und Magistretti 1996). Glutamat wird im Laufe eines exzitatorischen Impulses vom Neuron in den synaptischen Spalt entlassen, von dort kann es mit exzitatorischen Rezeptoren (z.B. NMDA- oder AMPA-Rezeptoren) wechselwirken. Astrozyten nehmen das Glutamat auf und wandeln es mittels Glutamin-Synthase in Glutamin um. Dieses Enzym ist *zerebral* auf Astrozyten beschränkt. Glutamin wird ausgeschleust und vom Neuron aufgenommen. In einer auf das Neuron beschränkten Reaktion wird aus Glutamin mittels Glutaminase Glutamat synthetisiert, welches für weitere Neurotransmissionen erneut zur Verfügung steht.

Eine mögliche Ursache für eine Störung dieses Shuttles und die reduzierten Glutamin-Konzentrationen könnte ein Ungleichgewicht des mitochondrialen Energiestoffwechsels vor allem auf Ebene des Citratzyklus sein. Durch einen Block des Citratzyklus wird Glutamin als Kohlenstoffquelle benötigt und steht nicht mehr für die bioenergetische und metabolische Kopplung zwischen Astrozyt und Neuron zu Verfügung (Pellerin und Magistretti 2003).

1.4.3 Therapeutische Strategien bei der SSADH-Defizienz

Die häufigste therapeutische Strategie bei der SSADH-Defizienz ist die Gabe von Vigabatrin (Gibson *et al.* 1995; Matern *et al.* 1996). Die Wirkung von Vigabatrin beruht auf seiner anti-epileptischen Funktion als GABA-Transaminase Inhibitor. Es erhöht die GABA-Konzentration und verringert durch die inhibierte Bildung von SSA die GHB-Konzentrationen. Der größte Kritikpunkt dieser Strategie ist darin zu sehen, dass die SSADH-Defizienz schon krankheitsbedingt durch erhöhte *zerebrale* GABA Spiegel charakterisiert ist. Die uneinheitlichen Ergebnisse zum Behandlungserfolg stellen diese Behandlungsform ebenfalls in Frage (Matern *et al.* 1996).

Weitere Therapieoptionen sind die phänotyporientierte Gabe von Methylphenidat gegen Aufmerksamkeitsdefizite und Hyperkinesie, von Carbamazepin und Lamotrigin gegen die Krampfanfälle und von Benzodiazepin gegen Angststörungen (Pearl *et al.* 2004).

Am Mausmodell der SSADH-Defizienz wurden bekannte Therapieformen überprüft und neue Optionen erforscht. Die Gabe von Vigabatrin, dem GABA_B-Rezeptor-Antagonisten CGP 35348 und GHB-Rezeptor-Antagonist NCS-382 führten bei diesem Mausmodell zu einer signifikant längeren Überlebensdauer (Gupta *et al.* 2002). In dieser Untersuchung hatte auch Taurin eine protektive Wirkung.

Die Isolierung von SSADH aus verschiedenen Gewebetypen ergab, dass die Leber den größten Anteil an diesem Protein aufweist (Chambliss *et al.* 1995). Es wurde deshalb postuliert, dass die Leber über die GHB-Produktion einen wichtigen Grundstein der Pathophysiologie legt. *Hepatisches* GHB kann anschließend über die Zirkulation und die BBB in das Gehirn gelangen und dort seine schädigende Wirkung induzieren. Hieraus ergab sich ein neues Therapiekonzept, die gentherapeutische Korrektur der hepatischen Ssadh-Defizienz. Diese Strategie wurde an mutanten Mäuse mittels eines Adenovirus gekoppelten Konstruktes (Gupta *et al.* 2004b) überprüft. Sie konnte die Leberaktivität der Ssadh um 10 - 20 % heben und verlängerte die Lebensdauer der Mäuse um 40 %. Der periphere GHB-Spiegel konnte um 70 % und der *zerebrale* um 50 % gesenkt werden.

2 Fragestellung

Diese Arbeit gliedert sich in einen bioenergetischen und einen biochemischen Teil.

2.1 Bioenergetik

Es soll untersucht werden, ob eine Dysfunktion des bioenergetischen, mitochondrialen Energiestoffwechsels infolge von

1. regulatorischen Änderungen von Enzymen des mitochondrialen Energiestoffwechsels,
2. toxischen Effekten akkumulierender Metabolite auf Enzyme des mitochondrialen Energiestoffwechsels und
3. oxidativem Stress

im Pathomechanismus der GCDH- und SSADH-Defizienz eine Rolle spielen. Hierzu werden endogene Enzymaktivitäten der mitochondrialen β -Oxidation von Fettsäuren und der Atmungskette in Gewebehomogenaten der Knock Out-Mausmodelle und der direkte Einfluss akkumulierender Metabolite (GCDH-Defizienz: Glutaryl-CoA, GA und 3-OH-GA; SSADH-Defizienz: SSA, GABA, GHB und 4,5-DHHA) auf Enzyme der β -Oxidation, der Atmungskette und des Citratzyklusses untersucht. Oxidativer Stress wird über den Glutathiongehalt der Gewebehomogenate abgeschätzt.

2.2 Biochemie

Während für die SSADH-Defizienz die biochemischen Eigenschaften akkumulierender Metabolite bereits beschrieben sind (z.B. Jacobs *et al.* 1993; Chambliss *et al.* 1995; Gibson *et al.* 2002), sind diese Faktoren für die GCDH-Defizienz noch relativ unbekannt. Um das bestehende Konzept zur Pathophysiologie der GCDH-Defizienz zu präzisieren, soll Folgendes untersucht werden:

4. Gewebeverteilung von GA und 3-OH-GA,
5. BBB-Permeabilität für GA und 3-OH-GA und
6. Ursprung *zerebraler* GA und 3-OH-GA (Anreicherung aus der systemischen Zirkulation *vs. zerebrale de novo*-Synthese)

Hierzu wird die Gewebeverteilung von GA und 3-OH-GA in *Gcdh*^{-/-}-Mäusen und hepatozytären *Gcdh*^{-/-}-Mäusen untersucht. Der Transport von GA und 3-OH-GA über die BBB wird durch intraperitoneale Injektion von deuterierter GA und 3-OH-GA in Wildtyp-Mäuse und direkt an kapillären Endothelzellen aus Schweinehirn bestimmt. Abschließend soll der Nutzen verschiedener Diätstrategien an *Gcdh*^{-/-}-Mäusen beschrieben werden.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Aventis Crop Science, Frankfurt

3-Dimethoxy-5-Methyl-6-Decyl-1,4-Benzochinon

Biochrom, Berlin

F12-HAM, L-Glutamin, Medium 199, MEM, Penicillin G, HEPES, 10 % Pferdeserum, 10 % Hitze inaktiviertes Pferdeserum und Streptomycin.

CDN Isotopes

[2,2,4,4-²H₄]-GA und [2,2,3,4,4-²H₅]-3-OH-GA

Macherey-Nagel, Düren

N-methyl-*N*-trimethylsilylheptafluorbutyramid

Pharmacia, Uppsala, Sweden

Percoll Gradient

Roche, Mannheim

Collagen, Collagenase/ Dispase, Dispase

Serva, Heidelberg

Carboxyfluorescein

Sigma Aldrich, Taufkirchen

Acetyl-CoA, α -Ketoglutarat, α -Ketoisovalerat, Antimycin, Arginin, ATP, Butyryl-CoA, CaCl₂ x 2 H₂O, Carnitin, Chloralhydrat, Citrat, CoA-SH, Cytochrom *c*, DBQ, DCPIP, D-Glucose, DMSO, DTNB, EGTA, FAD, Ammonium-Eisen(II)-Sulfat, Folin-Ciocalteaus-Phenolreagenz, Fumarat, GA, GABA, GHB, Glutaryl-CoA, Glutathion, K₂HPO₄, Kalium-Natrium Tartrat, KCl, KCl, Kupfersulfat, Laurylmaltosid, L-Cystein, Lipoamid, Malat, Mangansulfat, MgCl₂ x 6 H₂O, MgSO₄, NaCl, NaCl, NaCN, NAD, NADH, NADP, NaHCO₃, NaN₃, Natrium-Dithionit, Natriumdodecylsulfat, *N*-Ethylmaleimid, Octanoyl-CoA,

Oligomycin, Ornithin, Palmitoyl-CoA, *para*-Aminohippursäure, PBS, Phenazinmethosulfat, Phosphoenolpyruvat, *p*-Iodonitrotetrazolium Violet, Rinderserum-Albumin, Saccharose, SSA, Succinat, Succinyl-CoA, Thiaminpyrophosphat, Tris/HCl, Triton X -100 und TTFA

Synthesen

3-OH-GA und 4,5-DHHA: Herman ten Brink, Amsterdam, Vrije Universiteit

3.1.2 Isolierte Enzyme

Sigma Aldrich, Taufkirchen

Aconitase, α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex, Citrat-Synthase, Fumarase, Glutathion Reduktase, Laktat-Dehydrogenase, Isocitrat-Dehydrogenase, Malat-Dehydrogenase, Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex und Pyruvatkinase

Globozym, Carlsbad, USA

verzweigt-kettige-Ketosäure-Dehydrogenase-Komplex

3.2 Tiermodelle

Für die grundlegende Charakterisierung gewebespezifischer bioenergetischer und biochemischer Parameter der GCDH-Defizienz wurden Wildtyp-C57Bl/6-Mäuse, *Gcdh*^{-/-}, *Gcdh*^{+/-}, *Gcdh*^{+/+}-Mäuse und *hepatozytäre Gcdh*^{-/-}-Mäuse verwendet. Für die intraperitonealen Injektionsexperimente mit Deuterium-markierter GA und 3-OH-GA wurden C57Bl/6-Mäuse genutzt. Für die grundlegende Charakterisierung gewebespezifischer bioenergetischer Parameter der SSADH-Defizienz wurden *Aldh5a1*^{-/-}, *Aldh5a1*^{+/-}- und *Aldh5a1*^{+/+}-Mäuse verwendet. Alle Tiere wurden unter SPF (*specific pathogen-free*) Bedingungen gehalten und gezüchtet. Tierpflege und Experimente entsprachen den offiziellen Richtlinien für Tierversuche. Sie waren sowohl von einem offiziellen Gremium als auch von einem universitären Ethikkomitee genehmigt.

3.2.1 *Gcdh*^{-/-}-Mäuse

Die *Gcdh*^{-/-}-Mäuse wurden durch die *gene targeting* Technik am *Gcdh*-Gen von murinen, embryonalen Stammzellen durch den Kooperationspartner Herrn Prof. Dr. Koeller (Oregon Health and Science University (OHSU), Portland) generiert (Koeller *et al.* 2002). Eine Zucht dieser Mäuse wurde parallel in der OHSU und im Zentralen Tierlabor der Universität

Heidelberg durchgeführt. Alle im weiteren Verlauf als *Gcdh*^{+/+}-Mäuse bezeichneten Tiere sind Wildtyp-C57Bl/6.

3.2.2 Hepatozytäre *Gcdh*^{-/-}-Mäuse

Mäuse mit einer hepatozytären *Gcdh*-Defizienz wurden in Zusammenarbeit mit unserem Kooperationspartner Herrn Prof. Dr. Koeller in Portland generiert. Hepatozyten aus *Gcdh*^{-/-}-Mäusen wurden mittels Hepatozytentransplantation in Empfängertiere mit einem intakten *Gcdh*-Gen eingebracht. Die Empfängertiere tragen eine Deletion des Fumarylacetoacetat-Hydrolase (*Fah*)-Gens. Dies entspricht dem Genotyp einer humanen Tyrosinämie Typ I. *Fah* (EC 3.7.1.2) ist ein zentrales Enzym im Abbauweg von Tyrosin, dessen Defizienz chronisches Leberversagen durch den Anstau von toxischer Homogentisinsäure und sekundär mutagenem Fumarylacetoacetat verursacht. Die Akkumulation dieser Metabolite und das daraus resultierende Leberversagen kann durch eine Behandlung mit 2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedion (NTBC) verhindert werden. Dieser Wirkstoff blockiert die 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase (EC 1.13.11.27), die enzymatisch vier Schritte vor *Fah* im Abbau von Tyrosin liegt (Lindstedt *et al.* 1992). Eine akute Hepatopathie der *Fah*^{-/-}-Mäuse kann so bis zum Zeitpunkt der Transplantation verhindert werden. Zum Zeitpunkt der Transplantation wird die Behandlung mit NTBC eingestellt. Da die transplantierten Hepatozyten aus *Gcdh*^{-/-}-Mäusen über eine intakte *Fah*-Aktivität verfügen, besitzen diese Zellen einen selektiven Wachstumsvorteil zum Zeitpunkt der Transplantation und können die Leber repopularisieren. Hepatozyten von *Gcdh*^{-/-}-Mäusen wurden mittels einer zweiseitigen Kollagenase Perfusion *in situ* gewonnen (Hamman *et al.* 2005). Zellzahl und Viabilität wurden durch Trypanblau-Färbung in einem Hemocytometer gemessen. Ca 3×10^5 Hepatozyten wurden in 100 μ l DMEM + 15 % fötalem Kälberserum aufgenommen und in einer offenen Laparotomie injiziert. Eine systematische Verhaltensuntersuchung der Mäuse steht noch aus.

Die Organe (Leber und Gehirn) und das Serum wurden in Portland entnommen und auf Trockeneis nach Heidelberg für die weiteren Analysen versandt. Wobei die Hirne der Mäuse mit 20 ml einer Lösung aus PBS und 25 U/ml Heparin perfundiert wurden, um eine Kontamination mit GA oder 3-OH-GA aus dem Blut zu verhindern.

3.2.3 Intraperitoneale Injektion deuterierter GA und 3-OH-GA in C57Bl/6-Mäuse

[2,2,4,4-²H₄]-GA (d₄-GA) und [2,2,3,4,4-²H₅]-3-OH-GA (d₅-3-OH-GA) wurden in PBS gelöst und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Beide Lösungen wurden in C57Bl/6-Mäuse (postnataler Tag 90) mit einer Endkonzentration von 5 mmol/kg Körpergewicht injiziert. Zu definierten Zeitpunkten (1 h, 3 h, und 5 h) nach der intraperitonealen Injektion wurden Mäuse unter Chloralhydrat-Anästhesie getötet. Für jeden Zeitpunkt wurden n = 3 Mäuse verwendet. Leber und Gehirn der Mäuse wurden mit 20 ml einer Lösung aus PBS und 25 U/ml Heparin perfundiert, um eine Kontamination mit stabilen Isotopen aus dem Blut zu verhindern.

3.2.4 *Aldh5a1*^{-/-}-Mäuse

Die *Aldh5a1*^{-/-}-Maus wurde durch die *gene targeting* Technik am *Aldh5a1*-Gen von murinen, embryonalen Stammzellen von unserem Kooperationspartner Herrn Prof. Dr. Gibson in der OHSU, Portland generiert (Hogema *et al.* 2001). Vor Ort wurden die Organe entnommen und auf Trockeneis nach Heidelberg für die weiteren Analysen versandt.

3.2.5 Diätstudien mit *Gcdh*^{-/-}-Mäusen

An *Gcdh*^{-/-}-Mäusen wurde der Effekt verschiedener Diätstrategien überprüft, erstens eine L-Lysinrestringierte Diät, zweitens eine Kompetition zwischen Arginin/ Ornithin und L-Lysin um das Transportsystem y⁺ in der BBB zur Senkung zerebraler GA- und 3-OH-GA-Konzentrationen und drittens eine Carnitin-Supplementation um eine Ausscheidung der beiden Dicarbonsäuren zu fördern.

Die Diäten waren wie folgt aufgebaut:

- Lysinreduzierte Diät („PMI Amino acid W/4% Lysine“ (D1810191) von Lab Diet). Der Lysingehalt der Diät wurde auf 0,4 % w/w reduziert, dies entspricht ungefähr 350 mg/kg Körpergewicht und Tag und ist der Mindestbedarf einer Maus an L-Lysin. Die Standarddiät enthält 1,42 % w/w.
- 100 und 500 mg/kg Körpergewicht und Tag Arginin über das Trinkwasser
- 100 und 500 mg/kg Körpergewicht und Tag Ornithin über das Trinkwasser
- 100 und 400 mg/kg Körpergewicht und Tag Carnitin über das Trinkwasser

Die Kontrollgruppe erhielt eine Standard Diät („Amino Acid Control diet“ (D44181) von Lab Diet). Pro Diättyp wurden n = 3 Mäuse verwendet. Nach zwei Wochen wurden die Mäuse getötet und Serum, Urin, Leber und Gehirn entnommen.

3.2.6 Präparation der Gewebehomogenate

Im Falle der *Gcdh*^{-/-}-Maus wurden die Tiere zwischen dem postnatalen Tag 56 - 200 getötet. Die Gewebe (Gehirn, Leber, Herz- und Skelettmuskel) aus allen Experimenten - *Gcdh*^{-/-}-, *Gcdh*^{+/-}-, *Gcdh*^{+/+}-Mäuse, intraperitoneal belastete C57Bl/6-Mäuse und Diätstudien - wurden sofort entfernt, auf Eis in einem Puffer (0,1 ml pro 0,1 mg Gewebe) bestehend aus 250 mM Saccharose, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 20 mM Tris/HCl (pH 7,4) aufgenommen und gekühlt. Serum wurde durch Blutabnahme aus dem rechten Atrium und anschließender Zentrifugation gewonnen.

Die Gewebe (Leber und Gehirn) und das Serum der *hepatozytären Gcdh*^{-/-} und *Gcdh*^{+/-}-Mäuse und die Gewebe (Leber, Niere, Skelettmuskel, Cortex, Hippocampus, Cerebellum und Hirnstamm) der *Aldh5a1*^{-/-}-, *Aldh5a1*^{+/-}- und *Aldh5a1*^{+/+}-Mäuse wurden durch die Kooperationspartner vor Ort entnommen und uns auf Trockeneis zugesandt. Auch diese Gewebe wurden auf Eis in einem Puffer (0,1 ml pro 0,1 mg Gewebe) bestehend aus 250 mM Saccharose, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 20 mM Tris/HCl (pH 7.4) aufgenommen.

Die Gewebe wurden anschließend mit einem Potter-Elvehjem-System in diesem Puffer homogenisiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.2.7 Submitochondriale Partikel (SMPs)

Mitochondriale Membranen aus Rinderherz wurden nach der Methode von Smith (1967) mit einer Modifikation von Engel *et al.* (1983) in einem Puffer bestehend aus 250 mM Saccharose, 10 mM Tris/HCl, 0,05 mM EDTA bei pH 7,4 isoliert. Der hieraus resultierende Überstand wurde 20 Minuten bei 15000 × g zentrifugiert. Das mitochondriale Pellet wurde mit einem Puffer bestehend aus 250 mM Saccharose, 10 mM KPi, 10 mM Tris/HCl, 2 mM EGTA, 2 mM MgCl₂ bei pH 7,4 auf eine ungefähre Proteinkonzentration von 10 mg/ml eingestellt. 25 ml Einheiten wurden zehnmal für 15 Sekunden mit einem Branson Sonifier 250 (Branson, Danbury, CT) bei maximaler Energie in einem Eisbad behandelt. Die sonifizierte Suspension wurde bei 10000 × g für 10 Minuten und der Überstand anschließend bei 100000 × g für 45 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 75 mM KPi bei pH 7,4 resuspendiert. Die Suspension wurde in 10 µl Fraktionen in flüssigen Stickstoff getropft, die gefrorenen Tropfen wurden aliquotiert und in flüssigem Stickstoff gelagert. Der Proteingehalt wurde nach Lowry *et al.* (1951) bestimmt.

3.3 Genetische Methoden

3.3.1 DNA-Extraktion aus *Gcdh*^{-/-}-Mausschwanzspitzen

Die Extraktion erfolgt nach dem Invitrogen-Protokoll: #8 für Mouse Tails (Easy-DNA™ Kit). In einem Mikrozentrifugationsgefäß wurde ein Mix aus 320 µl TE Puffer, 20 µl Lysierungspuffer, 10 µl Präzipitationspuffer und 5 µl Protein Degradier (5 mg/ml) erstellt. Die ca. 1 cm lange Mausschwanzspitze wurde zu dem Mix hinzugegeben und 12-20 Stunden bei 225 upm und bei 60 °C in einem Wasserbad geschüttelt. Danach wurden 300 µl Lysierungspuffer und 120 µl Präzipitationspuffer zu der Probe pipettiert. Der Ansatz wurde gevortext bis die Lösung viskos erschien. Es wurden darauf 750 µl Chloroform hinzugegeben und die Lösung erneut gevortext bis sie homogen war. Es folgte eine Zentrifugation bei 1300 upm und 4 °C in einer Tischzentrifuge (Biofuge, Heraceus Instruments). Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Mikrozentrifugationsgefäß überführt. 1 ml Ethanol (99,7 %, -20 °C) wurde zu der wässrigen Phase pipettiert, die Lösung gevortext und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Probe wurde anschließend 15 Minuten bei 13000 upm zentrifugiert, das Ethanol dekantiert und das Pellet mit 80 % Ethanol (-20 °C) gewaschen. Die Probe wurde erneut bei 13000 upm 3-5 Minuten zentrifugiert und das Ethanol abgenommen. Das Pellet wurde nochmals kurz bei 13000 upm zentrifugiert, um das restliche Ethanol zu entfernen. Das Pellet wurde dann 5 Minuten an der Luft getrocknet und in 50 µl TE-Puffer, dem 1 µl einer 2 mg/ml konzentrierten RNase zugegeben wurde, gelöst. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 37 °C wurde die DNA-Konzentration auf 50 µg/ml mit TE-Puffer eingestellt.

3.3.2 *Gcdh*-PCR

Die *Gcdh*^{-/-}-Maus ist durch die Integration eines Vektors in das *Gcdh*-Gen generiert worden. Durch diesen Vektor wurden Exon 1–7 des *Gcdh*-Gens durch die Gene *nlacF* und *NEO* ersetzt (Koeller *et al.* 2002). Zur Genotypisierung der Mäuse wurde die homologe Integration am 3'-Ende des Vektors mittels eines Vorwärtsprimers aus der *NEO*-Gensequenz und einem zur chromosomalen DNA komplementären Rückwärtsprimer im Intron 8 untersucht. Die homologe Integration am 5'-Ende wurde über einen Rückwärtsprimer aus dem *lacZ*-Gen und einem Vorwärtsprimer, der zur genomischen DNA außerhalb des Vektors komplementär war, überprüft. Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte mittels Duplex-PCR bestehend aus den Primern für das K.O. und das Wildtyp-Produkt (NEO25, R17, R21 und F13). Es wurde ein Reaktionsmix bestehend aus 1 µM je Primer, 0,25 mM je Nukleotid, Puffer J (1x) (Invitrogen), 1,5 U Taq-Polymerase (Fischer) und 2 ng/µl DNA mit einem Endvolumen von

50 µl angesetzt. Das Zyklusprogramm der PCR war auf 40 Zyklen mit einer Denaturierungsphase von 30 Sekunden bei 94 °C, einer Annealingphase von 30 Sekunden bei 69 °C und einer Elongationsphase von 60 Sekunden bei 72 °C eingestellt. Zu Beginn der Zyklen erfolgte ein Denaturierungsschritt von fünf Minuten bei 94 °C und am Ende der Zyklen folgte eine finale Elongationsphase von fünf Minuten bei 72 °C. Das Wildtyp-Produkt der PCR (F13 - R21) ist 570 bp und das Knock Out-Produkt (NEO25 - R17) 750 bp groß. 10 µl des mit Bromphenolblau eingefärbten PCR-Produkts wurden zur Analyse auf ein 1,8 % Agarose-Gel in TBE-Puffer aufgetragen.

3.4 Spektrophotometrische Methoden

3.4.1 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt wurde nach Lowry *et al.* (1951) mit einer Modifikation nach Helenius und Simons (1972) bestimmt und auf Mikrotiterplattenmaßstab adaptiert. Rinderserum-Albumin wurde in Konzentrationen von 0 – 2 mg/ml in wässriger 1 %iger Natriumdodecylsulfatlösung angesetzt und als Standard verwendet. Die Probe wurde mit 1 % Natriumdodecylsulfat auf eine Konzentration unter 2 mg/ml eingestellt. Zu 2,5 µl Probe bzw. Standard wurden 250 µl eines Reaktionsgemisches bestehend aus 0,01 % Kupfersulfat, 0,02 % Kalium-Natrium Tartrat, 1 % Natriumdodecylsulfat, 2 % NaHCO₃ und 0,1 M NaOH gegeben. Nach einer Inkubation (10 Minuten, 37 °C) wurden 25 µl Folin-Ciocalteaus-Phenolreagenz (1:3 H₂O) hinzugegeben und das Gemisch 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt danach durch Messung der Extinktion bei 578 nm und Korrelation mit der Eichreihe.

3.4.2 Untersuchung von *steady state* Enzymaktivitäten

Steady state Aktivitäten der Enzyme wurden mit einem Computer gesteuerten Spektrophotometer (Spectramax Plus Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, California, U.S.A.) gemessen. Bis auf die Reduktion von 5',5"-Dithiobis-(2-Nitrobenzoat) (DTNB) wurden alle Kinetiken im Einstrahl-Zweiwellenlängenverfahren aufgenommen, um den Einfluss störender Umgebungsvariablen auszuschließen. Alle Proben wurden in einer temperierten 96-well Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One) mit einem finalen Volumen von 300 µl gemessen. Die spezifischen Enzymaktivitäten (U/mg) wurden mittels Proteinnormierung der Enzymaktivität und des Extinktionskoeffizient des Chromogens bestimmt. Folgende Extinktionskoeffizienten wurden verwendet:

Cytochrom *c*: $\epsilon_{540-550 \text{ nm}} = 19,0 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$,

NAD/NADH: $\epsilon_{340-400 \text{ nm}} = 6,1 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$;

DCPIP: $\epsilon_{610-750 \text{ nm}} = 22,0 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$,

DTNB: $\epsilon_{412 \text{ nm}} = 14,2 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

3.4.2.1 Bestimmung der Einzelenzymaktivitäten der Atmungskettenkomplexe I-V in SMPs

In den Ansätzen für die Komplexe I, II, III, V wurde ein Basispuffer bestehend aus 250 mM Saccharose, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂ und 20 mM Tris/HCl (pH 7,4) eingesetzt. Die Spezifität aller Aktivitätsmessungen wurde durch die Zugabe eines spezifischen Hemmstoffs überprüft.

3.4.2.1.1 NADH-Dehydrogenase (Komplex I)

Die Komplex I-Aktivität wurde durch die Oxidation von NADH in Anwesenheit von Ubichinon gemessen. Die Aktivität wurde nach einem modifizierten Protokoll von Okun *et al.* (1999) im Basispuffer mit folgenden Zusätzen aufgenommen: 0,05 % (w/v) Laurylmaltosid, 200 µM NADH, 60 µM 2,3-Dimethoxy-5-Methyl-6-Decyl-1,4-Benzochinon (DBQ) bei pH-Wert 7,4 und 30 °C. Die SMPs (0,53 mg/ml) wurden im Basispuffer mit 2 mM NaCN und 200 µM NADH verdünnt und bei 30 °C bis zur Messung inkubiert. Die Komplex I - Hemmung erfolgt mit 1 µM 2-*n*-Decylquinazolin-4-yl-Amin (DQA, in Ethanol). Pro Well wurden 50 µl SMP-Verdünnung vorgelegt und die Reaktion durch Zugabe von 250 µl des Reaktionsgemisches gestartet. Die maximale Hemmung liegt bei 95 %. Die Messung erfolgte bei 30 °C und $\lambda = 340\text{--}400$ nm.

3.4.2.1.2 Succinat-Dehydrogenase (Komplex II)

Die Aktivität von Komplex II wurde über die Reduktion von Succinat zu Fumarat bestimmt, wobei Dichlorophenolindophenol (DCPIP) als Elektronenakzeptor fungierte. Die Aktivität wurde nach einem modifizierten Protokoll von Ziegler und Rieske (1967) im Basispuffer mit folgenden Zusätzen aufgenommen: 0,05 % (w/v) Triton X -100, 20 mM Succinat, 40 µM DBQ (in DMSO), 60 µM DCPIP, 2 mM NaN₃ bei pH-Wert 7,4 und 30 °C. Die SMPs (0,26 mg/ml) wurden im Basispuffer mit 2 mM NaN₃, 20 mM Succinat verdünnt und bei 30 °C bis zur Messung (mindestens 10 Minuten) inkubiert. Pro Well wurden 50 µl SMP-Verdünnung vorgelegt und die Reaktion durch Zugabe von 250 µl des Reaktionsgemisches gestartet. Die Komplex II - Hemmung erfolgte mit 8 mM Thenoyltrifluoroacetone (TTFA, in Ethanol). Die maximale Hemmung liegt bei 90 %. Die Messung erfolgte bei 37 °C und $\lambda = 610\text{--}750$ nm.

3.4.2.1.3 *Cytochrom c-Reduktase (Komplex III)*

Die Aktivität des Komplex III wurde durch die Reduzierung von Cytochrom *c* in Anwesenheit von reduziertem Ubichinon (QH₂) gemessen. Die Aktivität wurde nach einem modifizierten Protokoll von Brandt und Okun (1997) im Basispuffer mit folgenden Zusätzen aufgenommen: 0,05 % (w/v) Triton X-100, 50 µM Decylubihydrochinon (DBH) bei pH-Wert 7,4 und 25 °C. Die SMPs (0,11 mg/ml) wurden im Basispuffer mit 2 mM NaCN verdünnt und bei 25 °C bis zur Messung inkubiert. Pro Well wurden 50 µl SMP-Verdünnung und 2 µl oxidiertes Cytochrom *c* (10 mM in 20 mM KPi und pH 7,4) vorgelegt und die Reaktion durch Zugabe von 250 µl des Reaktionsgemisches gestartet. Die Komplex III - Hemmung erfolgte mit 2 µM Antimycin (alternativ Stigmatellin) (in Ethanol). Die maximale Hemmung liegt bei 100 %. Die Messung erfolgte bei 25 °C und $\lambda = 540-550$.

Herstellung von Decylubihydrochinon

DBQ wurde wie bei Brandt und Okun (1997) beschrieben durch Zugabe von Natrium-Dithionit zu DBH reduziert. Die Konzentration von DBH wurde bei 290-350 nm ($\epsilon_{290-350} = 4,2 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) bestimmt.

3.4.2.1.4 *Cytochrom c-Oxidase (Komplex IV)*

Die Aktivität des Komplex IV wurde durch die Oxidation von reduziertem Cytochrom *c* gemessen. Die Aktivität wurde nach einem modifizierten Protokoll von Sinjorgo *et al.* (1987) in einem Puffer bestehend aus: 250 mM Saccharose, 120 mM KPi, 5 mM MgCl₂, 0,05 % Laurylmaltosid bei pH-Wert 7,4 und 25 °C aufgenommen. Die SMPs (0,01 mg/ml) wurden im Basispuffer verdünnt und bei 25 °C bis zur Messung inkubiert. Pro Well wurden 50 µl SMP-Verdünnung und 3 µl reduziertes Cytochrom *c* (5 mM in 20 mM KPi und pH 7,4) vorgelegt und die Reaktion durch Zugabe von 250 µl des Reaktionsgemisches gestartet. Die Komplex IV - Hemmung erfolgte mit 2 mM NaCN. Die maximale Hemmung liegt bei 100 %. Die Messung erfolgte bei 25 °C und $\lambda = 540-550 \text{ nm}$.

Cytochrom c-Reduktion:

Zu 2,7 ml 10 mM Cytochrom *c* in 20 mM KPi wurden 0,3 ml einer 1 M Natriumdithionitlösung gegeben. Eine Säule (Econo-Pac 10DG Columns) wurde mit 100 ml 20 mM Stickstoff-begastem KPi-Puffer äquilibriert. Die Cytochrom *c*-Dithionitlösung wurde aufgetragen und mit begastem KPi-Puffer eluiert. Das Eluat wurde in ml-Fractionen

aufgefangen. Der reduzierte Cytochrom *c*-Gehalt der Fraktionen wurde spektroskopisch bei $\epsilon_{540-550\text{ nm}} = 19,0\text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ überprüft.

3.4.2.1.5 ATP-Synthase (Komplex V)

Die Aktivität des Komplex V wurde indirekt durch seine reverse Reaktion, die Hydrolyse von ATP zu ADP, gemessen. Diese treibt die reverse Reaktion zweier dem System zugesetzter Enzyme an. Phosphoenolpyruvat wird mittels Pyruvatkinase und ADP zu ATP und Pyruvat umgewandelt, welches durch die Laktat-Dehydrogenase zu Laktat unter Oxidation von NADH abgebaut wird. Die Komplex V-Aktivität wurde nach einem modifizierten Protokoll von Percy *et al.* (1985) im Basispuffer mit folgenden Zusätzen gemessen: 250 μM NADH, 1 mM Phosphoenolpyruvat, 2,5 U/ml Laktat-Dehydrogenase, 2 U/ml Pyruvatkinase, 2 mM ATP, 1 μM DQA bei pH-Wert 7,4 und 37 °C. Die SMPs (1,05 mg/ml) wurden im Basispuffer mit 2 mM NaCN und 200 μM NADH verdünnt und bei 37 °C bis zur Messung inkubiert. Pro Well wurden 50 μl SMP-Verdünnung vorgelegt und die Reaktion durch Zugabe von 250 μl des Reaktionsgemisches gestartet. Die Komplex V - Hemmung erfolgte mit 80 μM Oligomycin (in Ethanol). Die maximale Hemmung liegt bei 93 %. Die Messung erfolgte bei 37 °C und $\lambda = 340\text{-}400\text{ nm}$.

3.4.2.1.6 Inhibitionsexperimente

Der Einfluss von GA, 3-OH-GA, Glutaryl-CoA oder GABA, GHB, 4,5-DHHA, SSA (jeweils 1 mM und pH 7,4) auf die Einzelenzymaktivitäten wurde durch die Zugabe der jeweiligen Substanz zum Testsystem untersucht.

3.4.2.2 Bestimmung der Einzelenzymaktivitäten der Atmungskettenkomplexe I-V in Gewebhomogenaten

Die gleichen Methoden wie für die SMPs wurden verwendet, um die Einzelenzymkomplexe in Gewebhomogenaten zu messen. Die SMPs wurden durch das jeweilige Gewebhomogenat ersetzt. (Komplex I: 3 mg Protein/ml; Komplex II: 1 mg Protein/ml; Komplex III: 0,5 mg Protein/ml; Komplex IV: 0,2 mg Protein/ml und Komplex V: 1 mg Protein/ml).

3.4.2.3 Untersuchung von Citratzyklus-Enzymaktivitäten

Es kamen isolierte Citrat-Synthase, Malat-Dehydrogenase, Fumarase, Isocitrat-Dehydrogenase und Aconitase aus Schweineherz zum Einsatz. Die Enzymaktivitäten wurden nach Vorlage von 10 μ l der Enzymverdünnung (in 10 mM KPi Puffer) durch die Zugabe von 290 μ l des jeweiligen Reaktionspuffers gestartet.

3.4.2.3.1 Citrat-Synthase

Die Citrat-Synthase (CS)-Aktivität (Endkonzentration 23 mU/ml; EC 2.3.3.1) wurde in einem Puffer bestehend aus 10 mM KPi, 30 μ M Oxalacetat, 80 μ M Acetyl-CoA und 100 μ M DTNB bei pH 7,4 und 25 °C gemessen. Die CS-Aktivität wurde als DTNB-Reduktion bei $\lambda = 412$ nm bestimmt.

3.4.2.3.2 Malat-Dehydrogenase

Die Malat-Dehydrogenase (MDH)-Aktivität (Endkonzentration 16 mU/ml; EC 1.1.1.37) wurde in einem Puffer bestehend aus 400 mU CS, 2 mM Malat, 10 mM KPi, 330 μ M NAD und 80 μ M Acetyl-CoA bei pH 7,4 und 25 °C gemessen. Die MDH-Aktivität wurde als NAD-Reduktion bei $\lambda = 340$ -400 nm bestimmt.

3.4.2.3.3 Fumarase

Die Fumarase-Aktivität (Endkonzentration 650 mU/ml; EC 4.2.1.2) wurde in einem Puffer bestehend aus 660 mU/ml MDH, 400 mU CS, 2 mM Fumarat, 10 mM KPi, 330 μ M NAD und 80 μ M Acetyl-CoA bei pH 7,4 und 25 °C gemessen. Die Fumarase-Aktivität wurde als NAD-Reduktion durch die MDH bei $\lambda = 340$ -400 nm bestimmt.

3.4.2.3.4 Isocitrat-Dehydrogenase

Die Isocitrat-Dehydrogenase (IDH)-Aktivität (Endkonzentration 1 U/ml; EC 1.1.1.41) wurde in einem Puffer bestehend aus 2 mM Isocitrat, 10 mM KPi und 0,2 mM NADP bei pH 7,4 und 25 °C gemessen. Die IDH-Aktivität wurde als NADP Reduktion bei $\lambda = 340$ -400 nm gemessen.

3.4.2.3.5 Aconitase

Die Aconitase-Aktivität (EC 4.2.1.3) wurde nach einem Protokoll von Morrison (1954) mit Modifikationen untersucht. Die Aconitase (Endkonzentration 0,70 mg/ml) wurde in einem Puffer bestehend aus 0,7 U IDH, 36 mM Tris/HCl, 0,07 mM Citrat, 0,18 mM NADP, 1,3 mM Mangansulfat, 0,8 μ M Ammonium-Eisen(II)-Sulfat und 0,08 mM L-Cystein bei pH 7,4 und 25 C gemessen. Die Aconitase-Aktivität wurde als NADP-Reduktion bei $\lambda = 340-400$ nm bestimmt.

3.4.2.3.6 Inhibitionsexperimente

Der Einfluss von GA, 3-OH-GA, Glutaryl-CoA (bis zu 2 mM und pH 7,4) oder GABA, GHB, 4,5-DHHA, SSA (jeweils 1 mM und pH 7,4) auf die Einzelenzymaktivitäten wurde durch die Zugabe der jeweiligen Substanz zum Testsystem untersucht.

3.4.2.4 Untersuchungen an den α -Ketosäure-Dehydrogenase-Komplexen

Es kamen isolierter α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex, verzweigtkettige-Ketosäure-Dehydrogenase-Komplex und Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex aus Schweineherz zum Einsatz. Die Enzymaktivitäten wurden nach Vorlage von 10 μ l Enzymverdünnung (in 10 mM KPi Puffer) durch die Zugabe von 290 μ l des jeweiligen Reaktionspuffers gestartet.

3.4.2.4.1 α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex

Die α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex (KGDHc)-Aktivität wurde nach einem Protokoll von Humphries und Szweda (1998) mit Modifikationen untersucht. Der KGDHc (Endkonzentration 650 mU/ml) wurde in einem Puffer bestehend aus 35 mM KPi, 5 mM $MgCl_2$, 0,5 mM EDTA, 0,5 mM NAD, 0,2 mM Thiaminpyrophosphat, 0,04 mM CoA-SH und 2 mM α -Ketoglutarat bei pH 7,4 und 30 °C gemessen. Die KGDHc-Aktivität wurde als NAD-Reduktion bei $\lambda = 340-400$ nm bestimmt.

3.4.2.4.1.1 α -Ketoglutarat-Dehydrogenase

Die α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Aktivität (Endkonzentration 650 mU/ml; E1k, EC 1.2.4.2.) wurde in einem Puffer bestehend aus 35 mM KPi, 0,5 mM $MgSO_4$, 0,5 mM EDTA, 1 mM Thiaminpyrophosphat, 0,5 mM DCPIP und 2 mM α -Ketoglutarat bei pH 7,4 und 30 °C gemessen. Die E1k-Aktivität wurde als DCPIP-Reduktion bei $\lambda = 610-750$ nm bestimmt.

3.4.2.4.1.2 Dihydrolipoyl Succinyltransferase

Die Dihydrolipoyl Succinyltransferase-Aktivität (Endkonzentration 650 mU/ml; E2k, EC 2.3.1.61) wurde in einem Puffer bestehend aus 35 mM KPi, 0,5 mM EDTA, 1 mM Glutaryl-CoA oder Succinyl-CoA und 0,1 mM DTNB bei pH 7,4 und 30 °C gemessen. Die E2k-Aktivität wurde als Produktionsrate von freiem CoA mittels DTNB-Reduktion bei $\lambda = 412$ nm bestimmt.

3.4.2.4.1.3 Dihydrolipoyl-Dehydrogenase

Dihydrolipoyl-Dehydrogenase-Aktivität (Endkonzentration 650 mU/ml; E3, EC 1.8.1.4) wurde in einem Puffer bestehend aus 35 mM KPi, 0,5 mM EDTA, 0,1 mM NADH und 0,4 mM Lipoamid bei pH 7,4 und 30 °C gemessen. Die E3-Aktivität wurde als NADH-Oxidation bei $\lambda = 340\text{--}400$ nm bestimmt.

3.4.2.4.2 Verzweigt-kettige-Ketosäure-Dehydrogenase-Komplex

Die verzweigt-kettige-Ketosäure-Dehydrogenase-Komplex (BCKDHc)-Aktivität wurde nach einem Protokoll von Danner *et al.* (1979) mit Modifikationen untersucht. BCKDHc (Endkonzentration 16,7 $\mu\text{g/ml}$) wurde in einem Puffer bestehend aus 50 mM Tris-HCl, 2 mM MgCl_2 , 1 mM NAD, 0,4 mM Thiaminpyrophosphat, 0,4 mM CoA-SH und 0,2 mM α -Ketoisovalerat bei pH 7,4 und 30 °C gemessen. Die BCKDHc-Aktivität wurde als NAD-Reduktion bei $\lambda = 340\text{--}400$ nm bestimmt.

3.4.2.4.3 Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex

Die Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (PDHc)-Aktivität wurde nach einem Protokoll von Schwab *et al.* (2005) mit Modifikationen untersucht. PDHc (Endkonzentration 160 mU/ml) wurde in einem Puffer bestehend aus 0,05 M KPi, 2,5 mM NAD, 0,2 mM Thiaminpyrophosphat, 0,1 mM CoA-SH, 0,1 % Triton X-100, 1 mM MgCl_2 , 1 mg/ml Rinderserum-Albumin, 0,6 mM *p*-Iodonitrotetrazolium-Violett und 6,5 μM Phenazin-methosulfat bei pH 7,4 und 25 °C gemessen. Die PDHc-Aktivität wurde als *p*-Iodonitrotetrazolium-Violett-Reduktion bei $\lambda = 500\text{--}750$ nm bestimmt.

3.4.2.4.4 *Inhibitionsexperimente*

Der Einfluss von GA, 3-OH-GA, Glutaryl-CoA (bis zu 2 mM und pH 7,4) oder GABA, GHB, 4,5-DHHA, SSA (jeweils 1 mM und pH 7,4) auf die Einzelenzymaktivitäten wurde durch die Zugabe der jeweiligen Substanz zum Testsystem untersucht.

3.4.2.5 **Spektrophotometrische Analyse von FAD-abhängigen Acyl-CoA-Dehydrogenasen**

Die Enzymaktivitäten der FAD-abhängigen Acyl-CoA-Dehydrogenasen - kurzkettige (Scad, EC 1.3.99.2), mittel-langkettige (Mcad, EC 1.3.99.3), sehr-langkettige (Vlcad, EC 1.3.99.13) Acyl-CoA-Dehydrogenase und Gcdh (EC 1.3.99.7) - wurden in Gewebehomogenaten bei einer Konzentration von 1 mg Protein/ml in einem Puffer bestehend aus 250 mM Saccharose, 120 mM KPi, 5 mM MgCl₂, 0,05 % (w/v) Laurylmaltosid, 0,2 mM Ferriceniumhexafluorophosphat, 0,01 mM FAD und 0,5 mM N-Ethylmaleimid bei pH 7,5 und 37 °C gemessen. Die Enzymaktivität wurde als Ferriceniumhexafluorophosphat-Reduktion bei $\lambda = 300\text{--}617$ nm bestimmt. Butyryl-CoA (50 μ M; Scad-Aktivität), Octanoyl-CoA (50 μ M; Mcad-Aktivität), Palmitoyl-CoA (50 μ M; Vlcad-Aktivität) und Glutaryl-CoA (50 μ M; Gcdh-Aktivität) wurden als physiologische Substrate eingesetzt. Es wurden je 10 μ l Homogenat und 10 μ l Substrat vorgelegt und die Reaktion durch Zugabe des Puffers gestartet.

3.4.2.5.1 *Inhibitionsexperimente*

Für die Inhibitionsexperimente wurde die Scad-, Mcad-, Vlcad-Aktivität von Leberhomogenaten aus Wildtyp-Mäusen ohne und mit Zugabe von GA, 3-OH-GA und Glutaryl-CoA (je 1 mM und pH 7,5) bestimmt.

3.4.3 Glutathion-Konzentrationen der Gewebehomogenate

Die Glutathion-Konzentrationen wurden nach Modifizierung eines Protokolls von Okun *et al.* (2004) untersucht. Das zu untersuchende Gewebehomogenat wurde mit 5 % Sulfosalicylsäure (1:5) behandelt und anschließend 5 Minuten bei 3000 x g und 25 °C zentrifugiert. 10µl des Überstandes aus dem Zentrifugationsschritt wurden für die Bestimmung des Glutathiongehaltes verwendet. Zu diesem Zweck wurde die Glutathion Reduktase (EC 1.8.1.7)-Aktivität in Leber und Gehirnhomogenaten in einem Puffer bestehend aus 180 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 6 mM EDTA, 0,3 mM NADPH, 6 mM DTNB und Glutathion Reduktase (0,3 U/ml; E.C. 1.8.1.7) bei pH 7,5 und 25 °C gemessen. Die Enzymaktivität wurden als DTNB-Reduktion bei $\lambda = 412$ nm bestimmt. Weiterhin wurde die Enzymaktivität eine Eichreihe aufgenommen. Hierzu wurden 10µl reduziertes Glutathion (30 - 210 µM in einem Puffer aus 180 mM NaHCO₃ und 6 mM EDTA) vorgelegt und nach Zugabe des Puffers die Reduktase-Aktivität aufgenommen. Über diese Eichreihe wurden die Aktivitäten der Proben mit einem Glutathiongehalt korreliert. Der Glutathiongehalt der Probe wurde immer auf den Proteingehalt normiert.

3.5 Quantitativ analytische Methoden

3.5.1 Quantitative Analyse von GA und 3-OH-GA mittels GC/MS

GA und 3-OH-GA wurden in Gewebehomogenaten und Serum von Mäusen nach einer Methode von (Baric *et al.* 1999; Kölker *et al.* 2003; Schor *et al.* 2002) mittels GC/MS und stabile-Isotopen Verdünnungsmethode gemessen. Interne Standards von d₄-GA und d₅-3-OH-GA (Stoffmenge jeweils 1 nmol) wurden zu Gewebehomogenaten (Stoffmenge 2 mg Protein) oder 10 µl Serum hinzugefügt. Die Proben wurden mit 100 µmol H₂SO₄ unter pH = 1 angesäuert. Das Reaktionsgemisch wurde mit 1 ml NaHCO₃ (20 mM) verdünnt und die Ionenstärke der Lösung durch Zugabe von NaCl im Überschuss erhöht. Beide Dicarbonsäuren wurden zweimal mit Ethylacetat extrahiert und die Überstände unter Stickstoffbegasung bei 65 °C getrocknet. Anschließend wurden die Proben mit *N*-Methyl-*N*-Trimethylsilylheptafluorbutyramid derivatisiert.

Für die GC/MS Analytik kam eine DB5-MS Kapillarsäule (25 m × 0,25 mm I.D., Filmdicke 0,25 µm) von J&W in einem Hewlett-Packard 6890 series GC und Hewlett-Packard engine 5972A mass spectrometer (beide Agilent Technologies, Böblingen) zum Einsatz. Das Massenspektrometer arbeitete unter Elektroneneinfluss im *single ion monitoring mode* zur gesteigerten Sensibilität (Schor *et al.* 2002). Eine Vier-Punkt Eichgerade für GA und 3-OH-GA im Bereich von 0 - 20 nmol mit jeweils 1 nmol d₄-GA und 1 nmol d₅-3-OH-GA als interne Standards wurde zur Quantifizierung verwendet. Folgende Fragmente wurden zur Quantifizierung verwendet: *m/z* 217 und 259 (3-OH-GA), *m/z* 218 und 262 (deuterierter 3-OH-GA Standard), *m/z* 261 und 158 (GA) und *m/z* 265 und 161 (deuterierter GA Standard). GA- und 3-OH-GA-Konzentrationen wurden darauf auf den Proteingehalt der Probe normalisiert. Die Analyse der d₄-GA- und d₅-3-OH-GA-Konzentrationen in Gewebehomogenaten und Serum von intraperitoneal belasteten C57Bl/6-Mäusen und der Zellkulturmedien der BCEC Experimente fand zu diesem Protokoll analog statt. Jedoch wurde 1 nmol d₄-Nitrophenol als interner Standard zu den Proben hinzugefügt. Eine Vierpunkt Kalibrationskurve für d₄-GA und d₅-3-OH-GA im Bereich von 0-20 nmol mit 1 nmol d₄-Nitrophenol als interner Standard wurde zur Quantifizierung dieser Experimente eingesetzt.

3.5.2 Quantitative Analyse der Acylcarnitine mittels MS/MS

Acylcarnitine wurden in Gewebehomogenaten, Serum und Trockenblutkarten durch *electrospray ionization tandem mass spectrometry* (MS/MS) nach einer modifizierten Methode von Schulze *et al.* (2003) gemessen. Gewebehomogenate (Stoffmenge 100µg), 10 µl Serum oder eine Trockenblutstanze mit 10 mm Durchmesser wurden in ein Loch einer 96-well Mikrotiterfilterplatte gegeben und 100 µl einer methanolischen Lösung mit den internen deuterierten Standards hinzugefügt. Nach 20 Minuten wurden die Proben zentrifugiert, das Eluat unter Stickstoffbegasung bei 65 °C getrocknet und anschließend in 60 µl butanolischer Salzsäure (3 N) wieder gelöst. Die Mikrotiterplatte wurde verschlossen, 15 Minuten bei 65 °C inkubiert und wieder unter Stickstoffbegasung bei 65 °C getrocknet. Nach der Trocknung wurden die Proben in 100 µl eines Lösungsmittels aus Acetonitril/ Wasser/ Ameisensäure (50:50:0,025 v/v/v) neu gelöst. Ein PE 200 Autosampler (Perkin Elmer, Rodgau) übertrug jeweils 25 µl jeder Probe in die Kollisionszelle mit einer Lösungsmittelflussrate von 40 µl/min durch eine PE 200 *high performance* Flüssigchromatographiepumpe. Alle Acylcarnitine wurden mittels *positive precursor ion scan* von m/z 85 (*scan range* m/z : 225–502) detektiert. Jedes Acylcarnitin wurde unter Nutzung des Intensitätsverhältnisses zum jeweiligen internen Standard und Korrelation mit einer Standardkurve quantifiziert. Die Analyse fand in einem *Quattro Ultima triple quadrupole mass spectrometer* (Micromass, Manchester, UK) mit einer Elektronspray Ionenquelle und *Micromass MassLynx data system* statt. Die Probe wurde mittels eines Stroms aus Acetonitril: Wasser (50:50 v/v) durch einen HTS-PAL autosampler (CTC Analytics Zwingen, Suisse) und einer Flux Rheos 2000 HPLC Pumpe (Flux Instruments, Basel, Suisse) in das System injiziert. Elternionen von m/z 85 wurden in einem Bereich von 224-502 m/z unter einer Kollisionsenergie von 24 eV, Kegelspannung von 40 V, *scan time* von 3 s, *interscan delay* von 0,1 s (zusätzlich 7 *scans*) und unter Einsatz eines Argon Kollisionsgas bei $1,8 \times 10^{-3}$ mbar gemessen.

3.6 Transport von Dicarbonsäuren über kultivierte kapilläre Endothelzellen aus Schweinehirn

Die kultivierten kapillären Endothelzellen aus Schweinehirn (BCEC) sind ein *in vitro*-Modellsystem für die BBB (Huwlyer *et al.* 1996). Sie sind in Bezug auf ihre Hauptfunktionen wie *tight junctions*, Glukose- und Aminosäuren-Transport gut charakterisiert (Huyler *et al.* 1996; Torok *et al.* 1998; Sauer *et al.* 2006).

Primäre Kulturen von BCEC aus Schweinen wurden nach einem Protokoll von Fellner *et al.* 2002 gewonnen. Corticale graue Hirnsubstanz von frischen Schweinehirnen wurde zerkleinert und mit 0,5 % Dispase enzymatisch verdaut. *Zerebrale* Blutgefäße wurden durch Zentrifugation in 13 % Dextran aufgereinigt und in einem Puffer aus 1 mg/ml Collagenase/Dispase inkubiert. Diese Zellsuspension wurde mit 10 % Pferdeserum supplementiert und durch eine 150- μ m Nylon Membran gefiltert. BCEC wurden mittels kontinuierlichen 50 % Percoll Gradienten separiert. Die isolierten BCEC wurden durch eine 35- μ m Nylon Membran filtriert und mit einer Dichte von 250000 Zellen/cm² auf Collagen beschichtete Filter in 12-well Zellkulturplatten ausgesät. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO₂) in Medium 199 unter dem Zusatz von 100 μ g/ml Streptomycin, 100 μ g/ml Penicillin G, 10 mM HEPES, 10 % Hitze-inaktiviertes Pferdeserum und 0,8 mM L-Glutamin kultiviert. In diesem artifizialen System bildet das untere Kompartiment die basolaterale/ Hirnseite und das obere Kompartiment die apicale/ Blutseite. Nachdem die Zellen am 7. Tag Konfluenz erreicht hatten, wurde das Medium gewechselt und die Zellen in einem Medium aus 45 % MEM, 45 % F12-HAM, 100 μ g/ml Streptomycin, 100 μ g/ml Penicillin G, 10 mM HEPES, 2 mM Glutamin kultiviert. Am folgenden Tag wurde das Medium von beiden Kompartimenten der Kammer abgezogen und diese zweimal mit Krebs-Ringer Puffer (KRB; 142 mM NaCl, 3 mM KCl, 1,5 mM K₂HPO₄, 10 mM HEPES, 4 mM D-Glucose, 1,2 mM MgCl₂ und 1,4 mM CaCl₂; pH 7,4 und 37 °C) gewaschen. Die so behandelten Zellen standen für Transportstudien zur Verfügung.

Um den Transport von GA und 3-OH-GA über die BBB zu untersuchen, wurden d₄-GA oder d₅-3-OH-GA (0,1-1 mM in KRB, pH 7,4 und 37 °C) verwendet. Im apicalen Kompartiment wurden 0,5 ml, im basolaterale Kompartiment 1,5 ml der entsprechenden Lösung eingesetzt.

Weiterhin sollte eine Beteiligung des OAT3 an diesem Transport untersucht werden. Da ein *trans*-stimulatorischer Effekt von *para*-Aminohippursäure (PAH) auf einen OAT3 vermittelten Efflux von GA (Bakhiya *et al.* 2003) *et vice versa* (Sweet *et al.* 2003) beschrieben werden konnte, wurde untersucht, ob PAH (1 mM; contralateral zu d₄-GA

eingesetzt) einen *trans*-stimulatorischen Effekt auf den Transport von d₄-GA (100 µM) hat. Tabelle (1) beschreibt die Bedingungen der Transportstudien.

Tabelle (1) Aufbau der Experimente zum Transport von GA und 3-OH-GA über die BBB:

- (1) Transport von d₄-GA und d₅-3-OH-GA vom apicalen in das basolaterale Kompartiment.
- (2) Transport von d₄-GA und d₅-3-OH-GA vom basolateralen in das apicale Kompartiment.
- (3) Transport von d₄-GA mit contralateraler PAH-Applikation.
- (4) Transport von d₄-GA ohne contralateraler PAH-Applikation aber Bedingungen wie bei diesem Experiment (Kontrollexperiment).
- (5) Transport von d₄-GA und d₅-3-OH-GA unter pathophysiologischen Bedingungen.

Kondition	1	2	3	4	3	4	5
apical	d ₄ -GA 1 mM	KRB	d ₄ -GA 100 µM	d ₄ -GA 100 µM	PAH 1 mM	KRB	GA 100 µM
basolateral	KRB	d ₄ -GA 1 mM	PAH 1 mM	KRB	d ₄ -GA 100 µM	d ₄ -GA 100µM	d ₄ -GA 1 mM

Kondition	1	2	5
apical	d ₅ -3-OH-GA 1 mM	KRB	3-OH-GA 100 µM
basolateral	KRB	d ₅ -3-OH-GA 1 mM	d ₅ -3-OH-GA 1 mM

Bei allen Experimenten wurden die Zellen 90 Minuten unter den entsprechenden Bedingungen bei 37 °C inkubiert. Nach 30 und 60 Minuten wurden 200 µl Puffer vom Akzeptor Kompartiment entnommen und mit jeweils 200 µl KRB Puffer wieder aufgefüllt. Der hierdurch entstehende Verdünnungsfehler wurde bei der späteren Auswertung berücksichtigt. Nach 90 Minuten Inkubation wurde der restliche Puffer aus beiden Kompartimenten entfernt. Die Konzentration von d₄-GA und d₅-3-OH-GA wurden mittels GC/MS gemessen. Nach dem kompletten Entfernen des Puffers wurden die Zellen zweimal mit KRB (37 °C) gewaschen und ein Kontrollexperiment mit 2,5 µM Carboxyfluorescein angeschlossen, um die Konfluenz des Monolayers zu überprüfen. Ein Permeabilitätskoeffizient von $P \leq 1,7 \times 10^{-5}$ cm/s wurde als Grenzwert für das Kontrollexperiment gesetzt. Wenn P des Kontrollexperimentes größer als dieser Grenzwert war, wurde angenommen, dass die Konfluenz und Intaktheit des Monolayers nicht gewährleistet ist.

Der Permeabilitätskoeffizient (P) wurde wie folgt berechnet:

$$(1) \quad P = \frac{\partial Q}{\partial t} \times \frac{V_{ac}}{A \times C_0}$$

$\partial Q / \partial t$: Konzentration von GA oder 3-OH-GA im Akzeptor Kompartiment als Funktion der Zeit
 A: Oberfläche des Filters (1,1 cm²)
 V_{ac}: Volumen des Akzeptor-Kompartimentes
 C₀: Ausgangskonzentration von GA oder 3-OH-GA im Donor-Kompartiment

3.7 Analyse der Inhibitionsstudien

Zur Analyse der Daten der Inhibitionsstudien wurde eine graphische Darstellung im Hanes-Woolf-Diagramm gewählt (Abbildung 1). Diese Darstellungsart ist am unempfindlichsten gegenüber Ausreißern der Messung. Hierzu werden die reziproken Werte der gemessenen Geschwindigkeit bzw. Aktivitäten auf die Y-Achse und die zugehörigen Substratkonzentrationen auf der X-Achse aufgetragen.

Aus der Michaelis-Menten-Gleichung (2):

$$(2) \quad v = \frac{v_{\max} \times [S]}{K_m + [S]} \quad v: \text{gemessene Geschwindigkeit; } [S]: \text{Substratkonzentration}$$

ergibt sich für v_{\max} aus der Darstellung:

$$(3) \quad v_{\max} = \frac{1}{m} \quad m: \text{Geradensteigung}$$

und für K_m :

$$(4) \quad K_m = \frac{C}{m} \quad C: \text{Schnittpunkt der Gerade mit der Y-Achse}$$

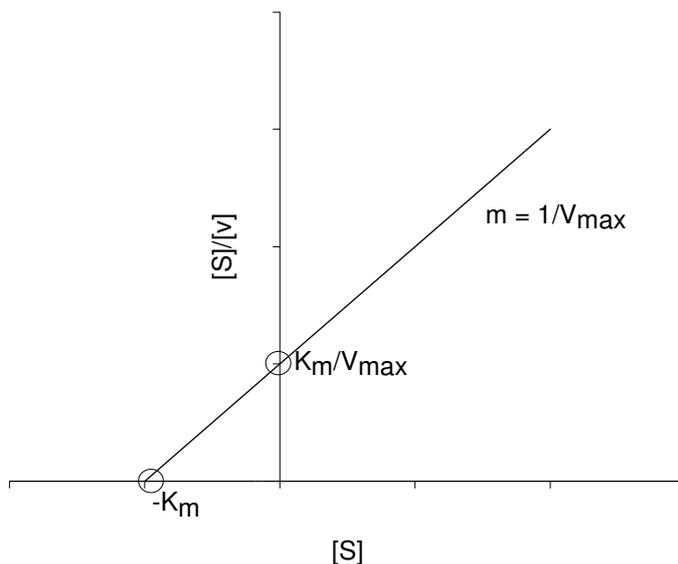


Abbildung (1) Hanes-Woolf Diagramm, K_m und v_{\max} .

Die Dissoziationskonstanten des Inhibitors ergeben sich aus folgender Formel:

$$(5) \quad v = \frac{v_{\max} \times [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_{is}}\right)}$$

worin K_i die Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes und K_{is} die Dissoziationskonstante des Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplexes ist. Für die Inhibitionstypen gilt ferner:

- a) Mischtyp: $K_i, K_{is} \in +Q$
- b) nicht-kompetitiv $K_i = K_{is}$
- c) kompetitiv $K_{is} \propto \infty$
- d) unkompetitiv $K_i \propto \infty$

3.8 Statistische Analyse

Für die deskriptiv-statistische Auswertung der Daten werden diese als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Enzymaktivitäten und gemessene Konzentrationen wurden immer auf den Proteingehalt der Probe normiert. Alle Experimente wurden mindestens als Triplikate durchgeführt. Im Rahmen der interferenz-statistischen Auswertung wurde zuerst ein Levene-Test durchgeführt, um die Varianzen der Gruppen auf Homogenität zu testen und ein Kolmogorov-Smirnov-Test, um die Normalverteilung der Gruppen zu testen. Für die Untersuchungen zu der *hepatozytären Gcdh*^{-/-}-Maus und den Diätstudien wurden diese Tests nicht durchgeführt, da die Gruppengröße ($n \leq 4$) zu klein war, um Aussagen über Varianzhomogenität oder Normalverteilung treffen zu können.

Bei den meisten Fällen lag keine Varianzhomogenität oder Normalverteilung der Testvariablen (z.B. GA-Konzentration bei *Gcdh*^{-/-}- und *Gcdh*^{+/+}-Mäusen) vor. Zudem war die Gruppengröße meist relativ klein ($n < 16$) war. Deshalb wurde zur interferenz-statistischen Auswertung der Daten auf non-parametrische Verfahren zurückgegriffen.

Bei $n = 2$ unabhängigen Variablen wurde die Nullhypothese (die Gruppen unterscheiden sich nicht) mit einem Mann-Whitney U-Test (Mann und Whitney 1947) überprüft. Hierbei handelt es sich um ein non-parametrisches Verfahren zum Vergleich von zwei unabhängigen Stichproben. Im Unterschied zu einem parametrischen Verfahren (z.B. *t*-Test oder Varianzanalyse) werden hier die den Messwerten zugeordneten Ränge untersucht. Alle Messwerte werden in eine Rangreihe eingeordnet und es wird überprüft, ob sich beide Gruppen innerhalb dieser Rangreihe gleich verteilen.

Bei $n = 3$ unabhängigen Variablen (z.B. *Gcdh*^{-/-}- vs. *Gcdh*^{+/-}- vs. *Gcdh*^{+/+}-Mäusen) wurde die Nullhypothese mittels eines Kruskal-Wallis H-Test (Kruskal und Wallis 1952) getestet. Hierbei handelt es sich um einen non-parametrischen Test zum Vergleich von n unabhängigen Stichproben, der eine Erweiterung des Mann-Whitney U-Test auf n Gruppen ist. Um Gruppenunterschiede im Falle einer verworfenen Nullhypothese herausarbeiten zu können,

wurde ein Mann-Whitney U-Test angeschlossen. Um eine alpha-Fehler-Inflationierung durch multiple Mann-Whitney U-Tests Rechnung zu tragen, wurde der erhaltene Signifikanzwert nach Bonferroni und Holm (Holm 1979) korrigiert. Hierzu werden die Signifikanzniveaus der einzelnen Tests nach ihrer Größe (aufsteigend) von 1 - 3 sortiert und mit einem entsprechenden Koeffizienten B multipliziert. Für den Koeffizienten gilt:

(6) $B = k + 1 - R$ k: Anzahl der durchgeführten Tests; R: der Rang des Signifikanzniveaus

Alle gerechneten Mann-Whitney U-Tests wurden auf Bindungen, d.h. mehrfach vorkommende Ränge korrigiert.

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde mit der SPSS für Windows 12.0 Software gerechnet. Das Signifikanzniveau wurde auf 5 % ($p < 0,05$) gesetzt.

Die Tabellen mit den statistischen Auswertungen befinden sich im Anhang.

4 Ergebnisse

4.1 GCDH-Defizienz

4.1.1 Bioenergetik

4.1.1.1 Aktivität der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe I-V in Gewebehomogenaten

Um zu überprüfen, ob veränderte Aktivitäten der mitochondrialen Atmungskette am Pathomechanismus der GCDH-Defizienz beteiligt sind, wurden die Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe I-V in Gewebehomogenaten (Gehirn, Leber, Herz- und Skelettmuskel) von *Gcdh*^{-/-} (n = 12), *Gcdh*^{+/-} (n = 13) und *Gcdh*^{+/+}-Mäusen (n = 14) spektrophotometrisch untersucht. Bis auf eine erhöhte Komplex II- und V-Aktivität in Leberhomogenaten von *Gcdh*^{-/-}-Mäusen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede dieser fünf Multi-Proteinkomplexe zwischen den unterschiedlichen Genotypen ($p < 0,05$ vs. *Gcdh*^{+/+}-Mäuse; Tabelle 2).

Tabelle (2) Spektrophotometrische Analyse der Atmungskettenkomplexe I-V in Gewebehomogenaten (Gehirn, Leber, Herz- und Skelettmuskel) von *Gcdh*^{-/-}, *Gcdh*^{+/-} und *Gcdh*^{+/+}-Mäusen. Die spezifischen Aktivitäten sind angegeben als Mittelwerte \pm Standardabweichung [*Gcdh*^{-/-} (n = 12), *Gcdh*^{+/-} (n = 13) und *Gcdh*^{+/+}-Mäuse (n = 14)] in mU/mg. * $p < 0,05$ vs. *Gcdh*^{+/+}-Mäuse.

Gewebe	Genotyp	Komplex I	Komplex II	Komplex III	Komplex IV	Komplex V
Gehirn	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	5,58 \pm 2,03	4,92 \pm 1,08	21,80 \pm 6,22	92,38 \pm 28,06	27,66 \pm 11,75
	<i>Gcdh</i> ^{+/-}	6,51 \pm 1,76	4,13 \pm 1,05	18,28 \pm 4,88	82,08 \pm 27,68	34,38 \pm 11,61
	<i>Gcdh</i> ^{+/+}	6,52 \pm 2,36	4,16 \pm 1,44	18,44 \pm 7,13	90,26 \pm 29,25	35,73 \pm 16,63
Leber	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	1,58 \pm 0,69	8,45 \pm 3,58*	17,70 \pm 5,97	30,52 \pm 12,12	18,58 \pm 7,22*
	<i>Gcdh</i> ^{+/-}	1,17 \pm 0,52	5,66 \pm 3,05	20,07 \pm 12,21	31,67 \pm 10,86	15,86 \pm 6,07
	<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,99 \pm 0,51	4,15 \pm 3,47	16,82 \pm 8,29	23,17 \pm 11,74	11,84 \pm 6,27
Skelettmuskel	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	1,24 \pm 0,88	1,86 \pm 0,89	5,29 \pm 3,26	10,60 \pm 8,40	24,51 \pm 10,95
	<i>Gcdh</i> ^{+/-}	2,17 \pm 1,53	2,58 \pm 0,96	6,21 \pm 3,98	12,20 \pm 7,31	31,62 \pm 10,92
	<i>Gcdh</i> ^{+/+}	2,06 \pm 1,35	2,21 \pm 1,01	5,63 \pm 2,58	11,08 \pm 7,76	29,09 \pm 13,43
Herzmuskel	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	11,34 \pm 3,81	19,20 \pm 7,05	39,02 \pm 19,20	127,33 \pm 47,03	62,52 \pm 22,90
	<i>Gcdh</i> ^{+/-}	9,80 \pm 3,40	16,04 \pm 5,53	31,96 \pm 16,47	101,42 \pm 40,26	51,80 \pm 17,13
	<i>Gcdh</i> ^{+/+}	9,38 \pm 2,47	19,48 \pm 8,02	44,89 \pm 19,52	119,00 \pm 50,35	62,04 \pm 25,31

4.1.1.2 Inhibitionsstudien an der mitochondrialen Atmungskette

Der Einfluss von GA, 3-OH-GA und Glutaryl-CoA auf die Atmungskettenaktivität wurde in SMPs untersucht. In Übereinstimmung mit den Resultaten aus den Gewebehomogenaten wurde kein direkter Einfluss von GA, 3-OH-GA oder Glutaryl-CoA (jeweils 1 mM) auf die Einzelenzymkomplexe I-V in SMPs nachgewiesen (Tabelle 3). Die Zugabe von Standard Atmungsketteninhibitoren zu den SMPs erzeugte hingegen eine gute inhibitorische Antwort ($p < 0,001$ vs. Kontrolle; Tabelle 3) und unterstreicht die Spezifität der Messungen.

Tabelle (3) Spektrophotometrische Analyse der Atmungskettenkomplexe I-V in SMPs nach einer Inkubation mit GA, 3-OH-GA und Glutaryl-CoA. Die spezifischen Aktivitäten sind angegeben als Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 4$) in mU/mg. * $p < 0,001$ vs. Kontrolle. **Komplex I DQA (1 μ M); Komplex II: TTFA (8 mM); Komplex III: Stigmatellin (2 μ M); Komplex IV: NaCN (2 mM); Komplex V: Oligomycin (80 μ M).

	Komplex I	Komplex II	Komplex III	Komplex IV	Komplex V
Kontrolle	23,01 \pm 0,59	15,53 \pm 0,15	66,22 \pm 9,52	1327,44 \pm 118,87	77,20 \pm 1,07
Glutaryl-CoA (1 mM)	24,98 \pm 0,35	14,49 \pm 0,19	57,14 \pm 28,68	1436,38 \pm 130,76	72,39 \pm 1,59
GA (1 mM)	22,00 \pm 1,75	15,25 \pm 0,49	64,56 \pm 2,75	1269,31 \pm 62,38	72,67 \pm 2,78
3-OH-GA (1 mM)	21,42 \pm 0,55	15,99 \pm 0,32	65,93 \pm 8,56	1307,24 \pm 68,47	72,44 \pm 1,32
Standard Inhibitor**	1,92 \pm 0,79*	0,69 \pm 0,02*	1,99 \pm 0,02*	14,71 \pm 5,74*	4,34 \pm 2,15*

4.1.1.3 Inhibitionsstudien an den α -Ketosäure-Dehydrogenase-Komplexen

Es konnte gezeigt werden, dass alle drei α -Ketosäure-Dehydrogenase-Komplexe – KGDHc, BCKDHc und PDHc durch Glutaryl-CoA konzentrationsabhängig gehemmt werden. Dieser Effekt war für den KGDHc am stärksten und den PDHc am schwächsten ausgeprägt (Abbildung 2). GA und 3-OH-GA (je 1 mM) wiesen keine Effekte auf den PDHc (GA: $94,03 \pm 1,80$ % der Kontrollaktivität; 3-OH-GA $89,66 \pm 1,69$ % der Kontrollaktivität) und KGDHc (GA: $95,16 \pm 2,41$ % der Kontrollaktivität; 3-OH-GA $95,24 \pm 1,85$ % der Kontrollaktivität) auf. Die Aktivität des BCKDHc wurde hingegen durch die Zugabe von 3-OH-GA ($126,38$ % der Kontrollaktivität), aber vor allem durch GA ($159,16$ % der Kontrollaktivität) erhöht.

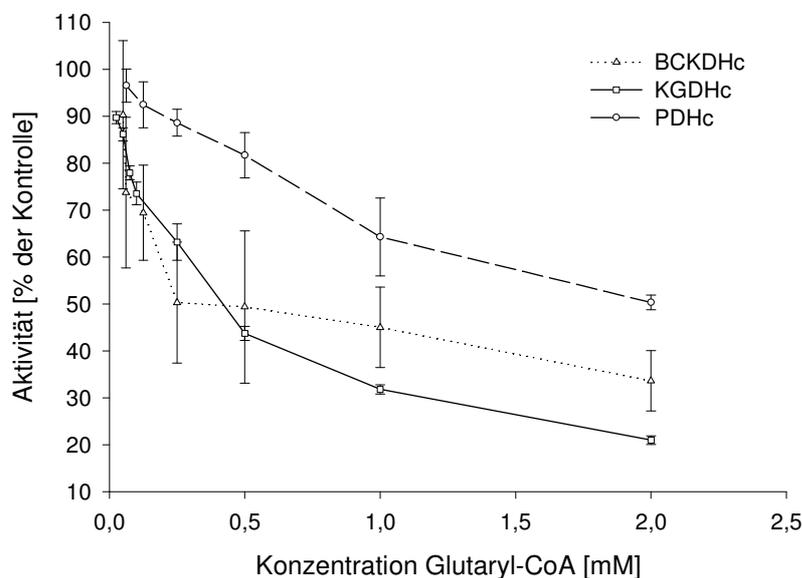


Abbildung (2) Gegenüberstellung der konzentrationsabhängigen Inhibition des BCKDHc, KGDHc, und PDHc durch Glutaryl-CoA. Die Aktivitäten sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 4$) in % der Kontrollaktivität.

4.1.1.4 Unkompetitive Hemmung des KGDHc

Um den Inhibitionstyp der KGDHc-Hemmung durch Glutaryl-CoA zu bestimmen, wurde die Hemmung mit verschiedenen Variationen der Konzentration von α -Ketoglutarat und Glutaryl-CoA aufgenommen. Eine Auftragung der Ergebnisse dieser Messungen in einem Hanes-Woolf-Diagramm ergab, dass die Inhibition des KGDHc durch Glutaryl-CoA in Bezug auf α -Ketoglutarat unkompetitiv war (V_{max} : 50,92 mOD/min, K_m : 0,12 mM; Abbildung 3). Für die Dissoziationskonstante des Inhibitors ergab sich K_{is} : 0,35 mM.

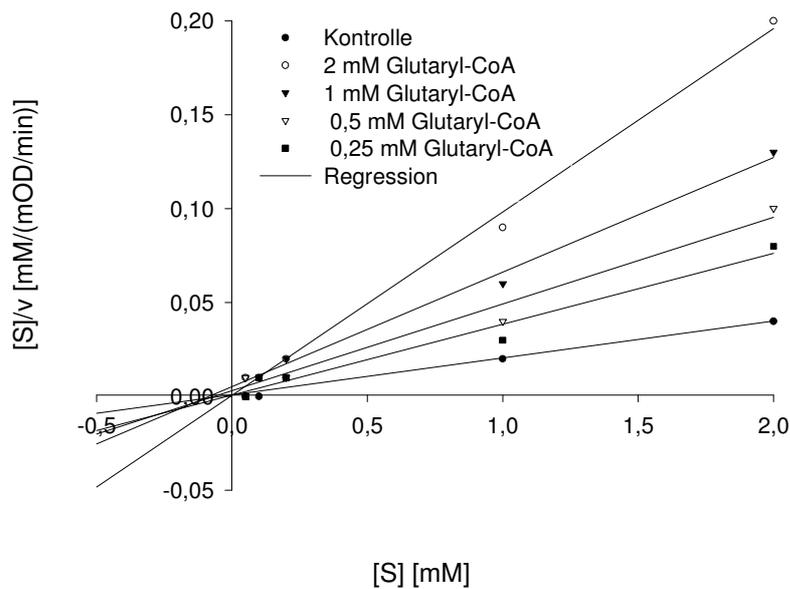


Abbildung (3) Hanes-Woolf-Diagramm: Unkompetitive Hemmung des KGDHc durch Glutaryl-CoA. Die Aktivitäten sind angegeben als Mittelwert ($n = 4$) in mM(mOD/min).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Glutaryl-CoA (1 mM) in der reversen Reaktion der KGDHc Untereinheit E2k ($50,02 \pm 14,67$ % der Aktivität mit Succinyl-CoA als Substrat) abgebaut wurde. Es konnte jedoch kein inhibitorischer Einfluss auf die E1k ($125,93 \pm 4,02$ % der Kontrollaktivität) und die E3 ($106,16 \pm 1,04$ % der Kontrollaktivität) Untereinheiten gemessen werden. Die Inhibition des KGDHc durch Glutaryl-CoA konnte auch mit α -Ketoacidat als ein alternatives Substrat der KGDHc repliziert werden (Tabelle 4).

Tabelle (4) Inhibition des KGDHc durch Glutaryl-CoA mit α -Ketoacidat als Substrat. Die Aktivitäten sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 4$) in % der Kontrollaktivität (2 mM α -Ketoacidat: 5,30 mOD/min).

Konzentration Glutaryl-CoA (mM)	Restaktivität (% der Kontrolle)
2	$16,21 \pm 2,33$
1	$32,48 \pm 1,57$
0,5	$43,34 \pm 0,79$

4.1.1.5 Inhibitionsstudien an Citratzyklusenzymen

Glutaryl-CoA hatte keinen Effekt auf die Aconitase und IDH. Auf die CS, MDH und Fumarase zeigte sich eine schwach inhibitorische Wirkung (Abbildung 4). Weder GA noch 3-OH-GA (je 1 mM) hatten einen Effekt auf Aconitase, IDH, Fumarase und MDH. Beide Dicarbonsäuren wirkten sich jedoch leicht aktivierend auf die CS aus (Abbildung 4).

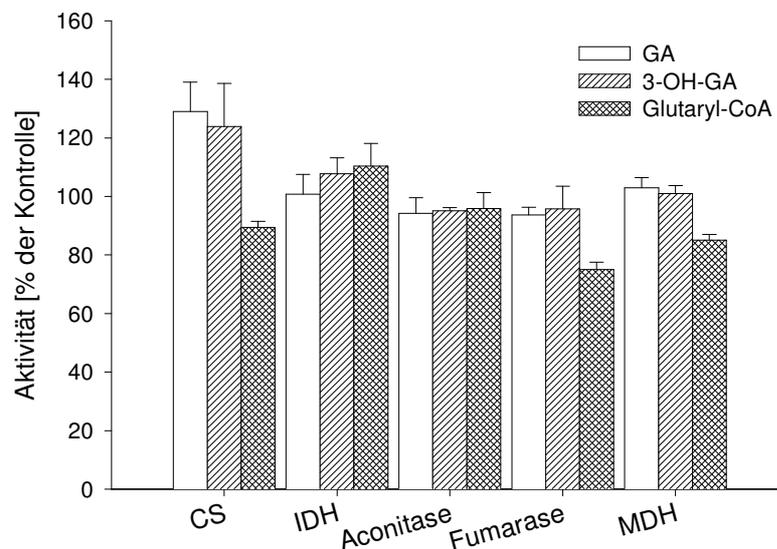


Abbildung (4) Einfluss von GA, 3-OH-GA und Glutaryl-CoA auf die Citratzyklusenzyme CS, IDH, Aconitase, Fumarase und MDH. Die Aktivitäten sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 4$) in % der Kontrollaktivität.

4.1.1.6 Gcdh-Aktivität in Leber- und Gehirnhomogenaten

Die Gcdh-Aktivität wurde in Gewebehomogenaten (Leber, Gehirn) von *Gcdh*^{-/-} ($n = 13$), hepatozytären *Gcdh*^{-/-} ($n = 4$), *Gcdh*^{+/-} ($n = 18$) und *Gcdh*^{+/+}-Mäusen ($n = 16$) gemessen. Es wurde keine Gcdh-Aktivität in Gehirn- und Leberhomogenat von *Gcdh*^{-/-}-Mäusen gemessen. In der Leber besaßen *Gcdh*^{+/-}-Mäuse 60 %, im Gehirn 46 % der Gcdh-Aktivität von *Gcdh*^{+/+}-Mäusen. Hepatozytäre *Gcdh*^{-/-}-Mäuse zeigten 11 % der Gcdh-Aktivität von *Gcdh*^{+/+}-Mäusen in Leberhomogenaten und unveränderte Gcdh-Aktivitäten in Gehirnhomogenaten (Tabelle 5).

Tabelle (5) Spezifische Gcdh-Aktivität in *Gcdh*^{-/-}, hepatozytären *Gcdh*^{-/-}, *Gcdh*^{+/-} und *Gcdh*^{+/+}-Mäusen. Die Aktivitäten sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung [*Gcdh*^{-/-} ($n = 13$), hepatozytäre *Gcdh*^{-/-} ($n = 4$), *Gcdh*^{+/-} ($n = 18$) und *Gcdh*^{+/+}-Mäuse ($n = 16$)] in % der Aktivitäten von *Gcdh*^{+/+}-Mäusen. * $p < 0,05$ vs. *Gcdh*^{+/+}-Mäuse.

	<i>Gcdh</i> ^{+/+}	<i>Gcdh</i> ^{+/-}	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	hepatozytäre <i>Gcdh</i> ^{-/-}
Leber	90,40 \pm 33,94	54,25 \pm 25,30*	0	9,58 \pm 6,84*
Gehirn	21,42 \pm 6,21	10,03 \pm 2,91*	0	19,04 \pm 7,41

4.1.1.7 Aktivität mitochondrialer β -Oxidationsenzyme in Leberhomogenaten

Der Vergleich der Scad-, Mcad- und Vlcad-Aktivitäten in Leberhomogenaten von $Gcdh^{-/-}$ (n = 13), $Gcdh^{+/-}$ (n = 18) und $Gcdh^{+/+}$ -Mäusen (n = 16) ergab eine Reduzierung aller drei Acyl-CoA-Dehydrogenase-Aktivitäten in $Gcdh^{-/-}$ -Mäusen (Abbildung 5). Diese Reduzierung wurde für Scad und Vlcad signifikant ($p < 0,05$ vs. $Gcdh^{+/+}$ -Mäuse). Die Reduzierung der Mcad-Aktivität wurde nur im direkten Vergleich zu $Gcdh^{+/+}$ -Mäusen signifikant ($p < 0,05$ vs. $Gcdh^{+/+}$ -Mäuse), nach der Bonferroni-Holm Korrektur war die Änderung nicht mehr signifikant.

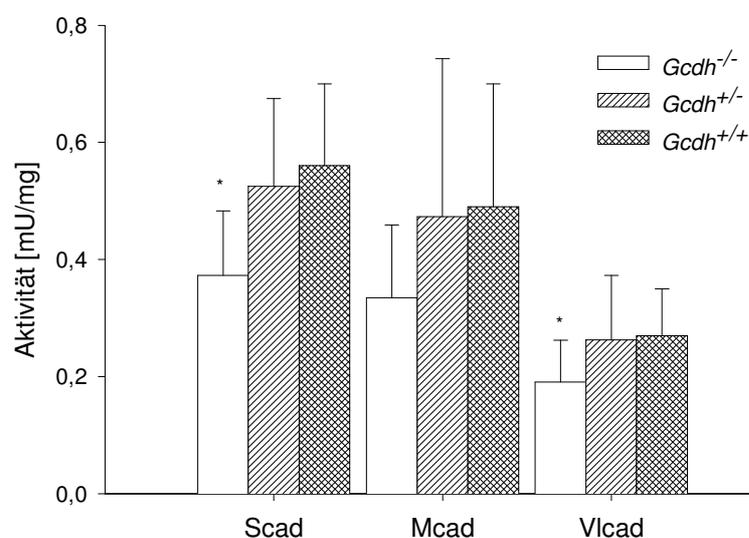


Abbildung (5) Spezifische Scad-, Mcad-, Vlcad-Aktivitäten in Leberhomogenaten von $Gcdh^{-/-}$, $Gcdh^{+/-}$, $Gcdh^{+/+}$ -Mäusen. Die Aktivitäten sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung [$Gcdh^{-/-}$ (n = 13), $Gcdh^{+/-}$ (n = 18) und $Gcdh^{+/+}$ -Mäuse (n = 16)] in mU/mg. * $p < 0,05$ vs. $Gcdh^{+/+}$ -Mäuse.

In Übereinstimmung mit diesem Befund wurden mittels quantitativer MS/MS-Analytik in der Gallenflüssigkeit der $Gcdh^{-/-}$ -Mäuse erhöhte Konzentrationen von langkettigen Acylcarnitinen (Tabelle 6) gefunden (Sauer *et al.* 2005). Diese Erhöhung konnte allerdings nicht in Serum, Trockenblut oder den Organhomogenaten der $Gcdh^{-/-}$ -Mäuse nachvollzogen werden.

Tabelle (6) Analyse der langkettigen Acylcarnitine in der Gallenflüssigkeit $Gcdh$ -defizienter Mäuse. Die Konzentrationen sind als Mittelwert \pm Standardabweichung [$Gcdh^{-/-}$ (n = 7) und $Gcdh^{+/-}$ -Mäuse (n = 11)] in μ M angegeben. * $p < 0,05$ vs. $Gcdh^{+/-}$ -Mäuse.

Genotyp	C12:1	C12	C14:1	C14	C16:1	C16	C18:2	C18:1	C18
$Gcdh^{-/-}$	0,81 \pm	0,26 \pm	0,53 \pm	0,05 \pm	0,17 \pm	0,46 \pm	0,08 \pm	0,28 \pm	0,28 \pm
	0,27*	0,71*	0,46*	0,76*	0,58	1,11	0,62	0,81	0,29
$Gcdh^{+/-}$	0,10 \pm	0,07 \pm	0,15 \pm	0,07 \pm	0,08 \pm	0,08 \pm	0,19 \pm	0,33 \pm	0,22 \pm
	0,19	0,33	0,22	0,25	0,17	0,35	0,41	0,4	0,25

4.1.1.8 Inhibitionsstudien an mitochondrialen β -Oxidationsenzymen

In Inhibitionsexperimenten konnte kein Einfluss von GA, 3-OH-GA oder Glutaryl-CoA (1 mM) auf die Scad-, Mcad- oder Vlcad-Aktivität in Leberhomogenaten von *Gcdh*^{+/+}-Mäusen gefunden werden (Abbildung 6).

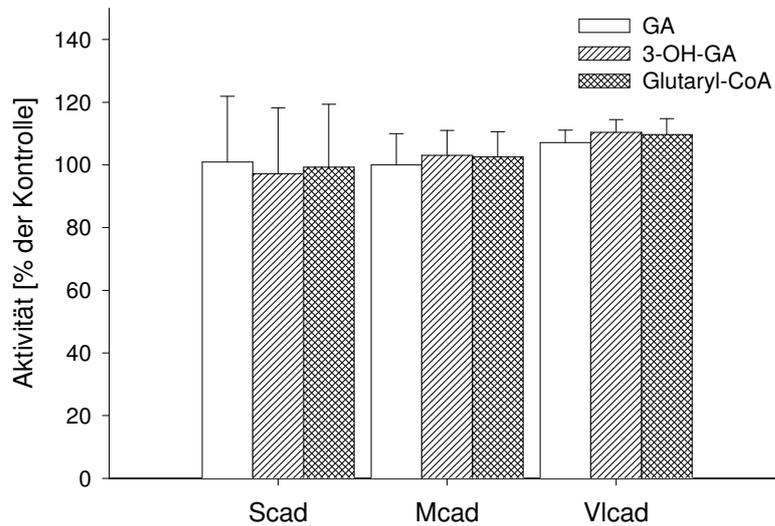


Abbildung (6) Einfluss von GA, 3-OH-GA und Glutaryl-CoA auf die Aktivitäten von Scad, Mcad und Vlcad in Leberhomogenaten von Wildtyp-Mäusen. Die Aktivitäten sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung (n = 4) in % der Kontrollaktivität.

4.1.2 Glutathion-Konzentrationen in Gewebehomogenaten

Als Marker für oxidativen Stress wurden die Glutathion-Konzentrationen in Leber- und Gehirnhomogenaten von $Gcdh^{-/-}$ (n = 5), $Gcdh^{+/-}$ (n = 6) und $Gcdh^{+/+}$ -Mäusen (n = 10) untersucht. Die Glutathion-Konzentrationen in Gehirn- und Leberhomogenaten von $Gcdh^{-/-}$ -Mäusen waren im Vergleich zu $Gcdh^{+/+}$ -Mäusen signifikant erniedrigt. ($p < 0,05$ vs. $Gcdh^{+/+}$ -Mäuse; Abbildung 7).

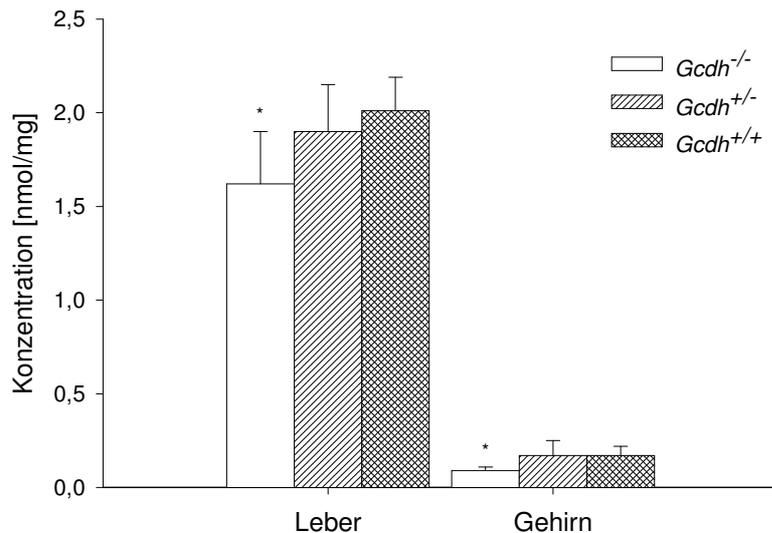


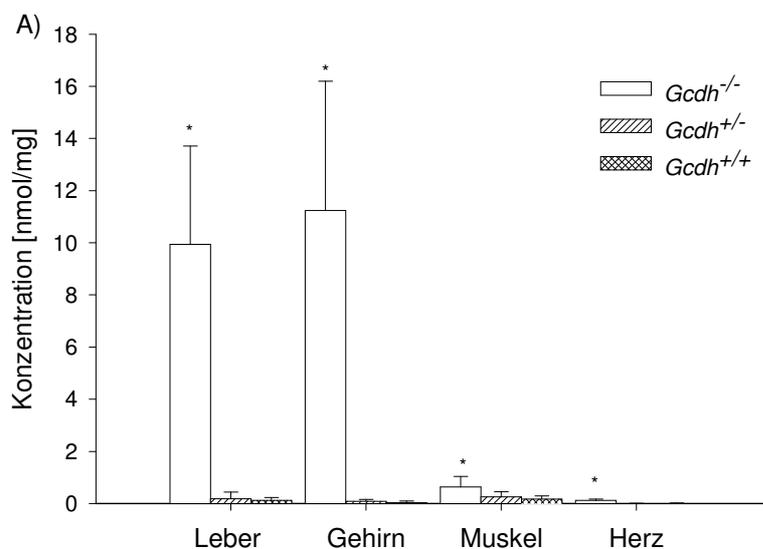
Abbildung (7) Glutathion-Konzentrationen in Leber- und Gehirnhomogenaten von $Gcdh^{-/-}$, $Gcdh^{+/-}$ und $Gcdh^{+/+}$ -Mäusen. Die Konzentrationen sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung [$Gcdh^{-/-}$ (n = 5), $Gcdh^{+/-}$ (n = 6) und $Gcdh^{+/+}$ -Mäuse (n = 10)] in nmol/mg. * $p < 0,05$ vs. $Gcdh^{+/+}$ -Mäuse.

4.1.3 Biochemie

4.1.3.1 Gewebespezifische Konzentrationen von GA und 3-OH-GA

Die gewebespezifischen Konzentrationen der Schlüsselmetabolite der GCDH-Defizienz - GA und 3-OH-GA - waren in Gewebehomogenaten (Leber, Gehirn, Herz- und Skelettmuskel) und in Körperflüssigkeiten (Urin, Serum) der *Gcdh*^{-/-}-Mäuse (n = 13) im Vergleich zu den *Gcdh*^{+/-}- (n = 14) und *Gcdh*^{+/+}- (n = 14) Mäusen signifikant erhöht ($p < 0,05$; Abbildungen 8A, B und 9). Besonders hohe GA- und 3-OH-GA-Konzentrationen fanden sich in Leber- (GA: $9,94 \pm 3,77$ nmol/mg; 3-OH-GA: $0,49 \pm 0,41$ nmol/mg) und Gehirnhomogenaten (GA: $11,24 \pm 4,95$ nmol/mg; 3-OH-GA: $0,52 \pm 0,26$ nmol/mg), während die Konzentrationen in Herzmuskel (GA: $0,12 \pm 0,04$ nmol/mg; 3-OH-GA: $0,10 \pm 0,05$ nmol/mg) und Skelettmuskel (GA: $0,63 \pm 0,41$ nmol/mg ; 3-OH-GA: $0,23 \pm 0,16$ nmol/mg) deutlich niedriger ausfielen. Um die *zerebralen* Konzentrationen (Einheit: nmol/mg) mit den Serumkonzentrationen (Einheit: μ M) vergleichen zu können, wurden die *zerebralen* Konzentrationen unter der Annahme eines Flüssigkeitsgehaltes von 80 % und eines Proteingehaltes von 12 % des Gehirngewebes auf Stoffmenge pro Flüssigkeitsvolumen umgerechnet (Tabelle 7). Diese Umrechnung zeigt einen starken Konzentrationsgradienten zwischen Gehirn und Serum (Gehirn \gg Serum).

Es konnten für GA und 3-OH-GA keine Korrelation zwischen gewebespezifischen Konzentrationen dieser organischen Säuren und dem Alter (postnataler Tag 56 bis 200) in *Gcdh*^{-/-}-, *Gcdh*^{+/-}- und *Gcdh*^{+/+}-Mäusen gefunden werden.



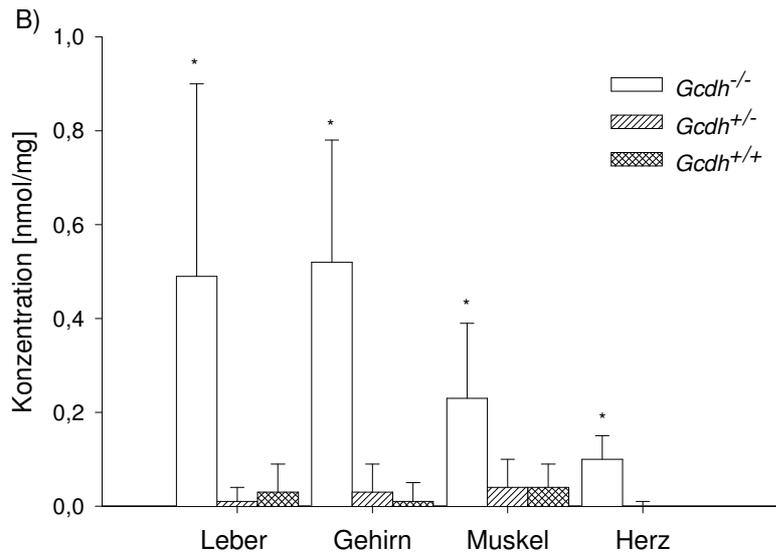


Abbildung (8) A) GA- und B) 3-OH-GA-Konzentrationen in Gewebehomogenaten (Leber, Gehirn, Skelett- und Herzmuskel) von *Gcdh*^{-/-}, *Gcdh*^{+/-}- und *Gcdh*^{+/+}-Mäusen. Die Konzentrationen sind angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung [*Gcdh*^{-/-} (n = 13) *Gcdh*^{+/-} (n = 14) und *Gcdh*^{+/+}-Mäuse (n = 14)] in nmol/mg. **p* < 0,05 vs. *Gcdh*^{+/+}-Mäuse.

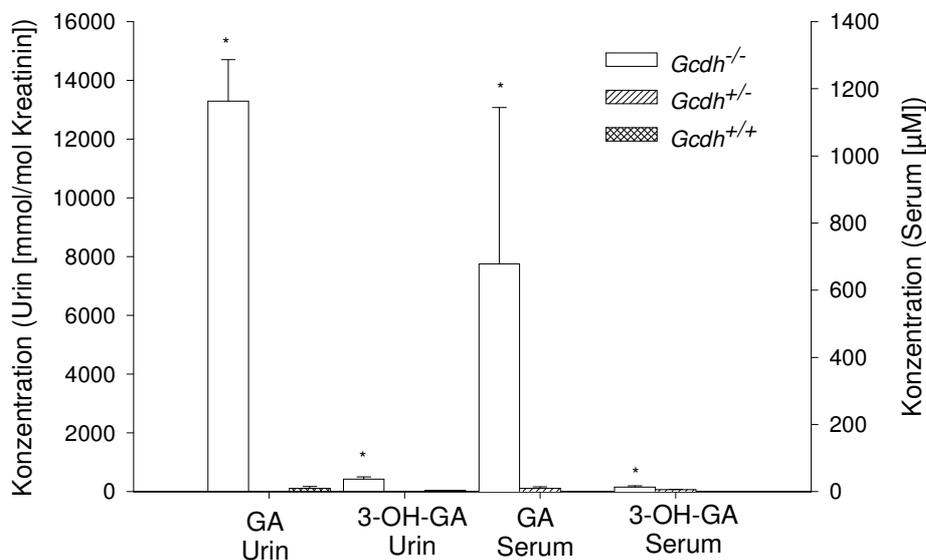


Abbildung (9) GA- und 3-OH-GA-Konzentrationen im Urin und Serum von *Gcdh*^{-/-}, *Gcdh*^{+/-}- und *Gcdh*^{+/+}-Mäusen. Die Konzentrationen sind angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung [*Gcdh*^{-/-} (n = 5), *Gcdh*^{+/-} (n = 6) und *Gcdh*^{+/+}-Mäusen (n = 10)] in mmol/mol Kreatinin für den Urin (primäre Y-Achse) und µM für das Serum (sekundäre Y-Achse). **p* < 0,05 vs. *Gcdh*^{+/+}-Mäuse.

Tabelle (7) Vergleich der Konzentrationen von GA und 3-OH-GA in Gehirnhomogenaten und Serum von *Gcdh*^{-/-}, *Gcdh*^{+/-} und *Gcdh*^{+/+}-Mäusen. Die Konzentrationen sind angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung [*Gcdh*^{-/-} (n = 13), *Gcdh*^{+/-} (n = 14) und *Gcdh*^{+/+}-Mäuse (n = 14)] in µM.

Genotyp	Gehirn GA	Serum GA	Gehirn 3-OH-GA	Serum 3-OH-GA
<i>Gcdh</i> ^{-/-}	1686,18 ± 742,86	310,53 ± 245,70	78,07 ± 39,07	13,33 ± 4,08
<i>Gcdh</i> ^{+/-}	12,31 ± 10,95	9,80 ± 4,27	4,15 ± 9,48	6,00 ± 0,82
<i>Gcdh</i> ^{+/+}	4,90 ± 8,48	9,89 ± 6,66	1,69 ± 5,60	5,03 ± 0,99

4.1.3.2 Gewebespezifische Konzentrationen von Glutarylarnitin

Die Bildung von Acylcarnitinen stellt einen physiologischen Detoxifikationsmechanismus dar, der eine Ausscheidung akkumulierender organischer Säuren mittels Urin erleichtert und so den intrazellulären CoA-Pool regeneriert. Bei einer GCDH-Defizienz können erhöhte Glutarylarnitin-Konzentrationen in Plasma, Trockenblut und Urin gemessen werden (Schulze *et al.* 2003; Tortorelli *et al.* 2005), was u.a. für das *Neugeborenen-Screening* auf GCDH-Defizienz diagnostisch bedeutsam ist.

Analog waren in *Gcdh*^{-/-}-Mäusen (n = 13) die Glutarylarnitin-Konzentrationen in Gewebekomponenten (Skelettmuskel, Gehirn, Leber), Trockenblut und Serum im Vergleich zu *Gcdh*^{+/-} (n = 14) und *Gcdh*^{+/+}-Mäusen (n = 14) signifikant erhöht ($p < 0,05$; Abbildung 10).

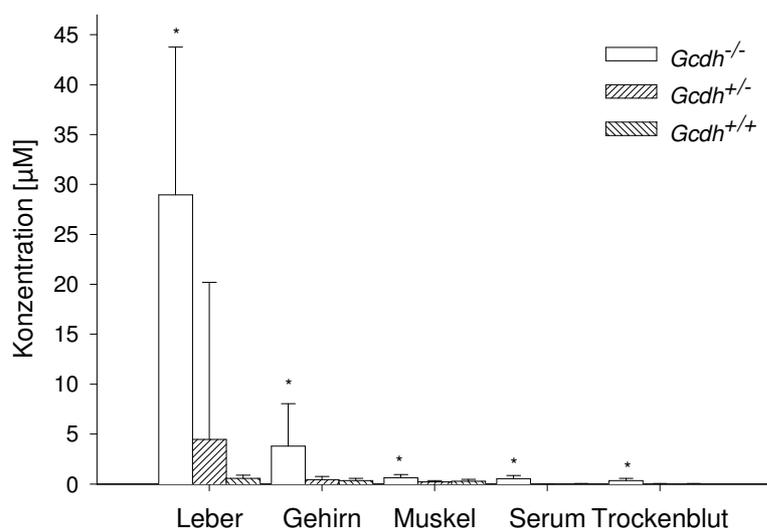


Abbildung (10) Glutarylarnitin-Konzentrationen in Gewebekomponenten (Leber, Gehirn und Skelettmuskel), Trockenblut und Serum von *Gcdh*^{-/-}, *Gcdh*^{+/-} und *Gcdh*^{+/+}-Mäusen. Die Konzentrationen sind angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung [*Gcdh*^{-/-} (n = 13), *Gcdh*^{+/-} (n = 14) und *Gcdh*^{+/+}-Mäuse (n = 14)] in µM. * $p < 0,05$ vs. *Gcdh*^{+/+}-Mäuse.

In Gehirnhomogenaten der *Gcdh*^{-/-}-Mäuse wurde zudem ein signifikant erniedrigtes freies Carnitin nachgewiesen ($p < 0,05$ vs. *Gcdh*^{+/+}-Mäusen; Abbildung 11).

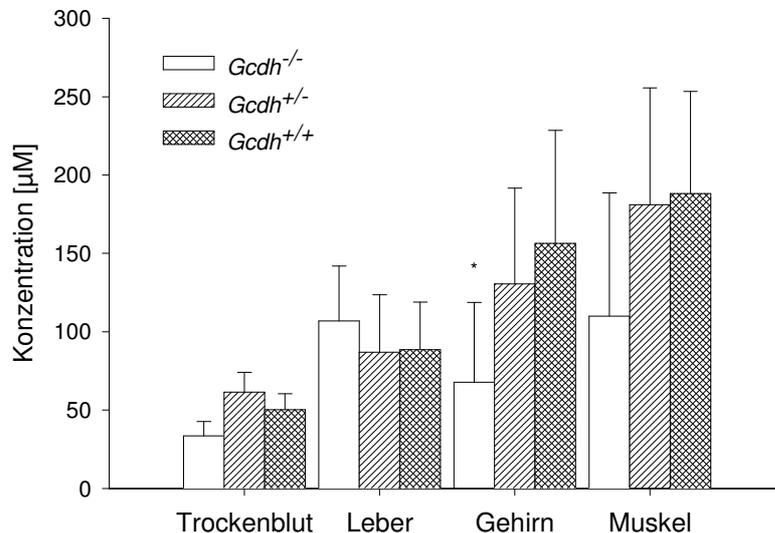


Abbildung (11) Konzentrationen des freien Carnitins in Trockenblut, Leber, Gehirn und Skelettmuskel von *Gcdh*^{-/-}, *Gcdh*^{+/-} und *Gcdh*^{+/+}-Mäusen. Die Konzentrationen sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung [*Gcdh*^{-/-} (n = 13), *Gcdh*^{+/-} (n = 14) und *Gcdh*^{+/+}-Mäuse (n = 14)] in μM . * $p < 0,05$ vs. *Gcdh*^{+/+}-Mäuse.

Eine weitere Detoxifikationsmöglichkeit für akkumulierende CoA-Ester bildet die Glycinkonjugation und anschließende Ausscheidung der Konjugate im Urin. *Gcdh*^{-/-}-Mäuse wiesen erhöhte Glutaryl-glycinmengen im Urin ($28,23 \pm 6,47$ mmol/mol Kreatinin; n = 9) auf, wohingegen dieser Metabolit im Urin von *Gcdh*^{+/+}-Mäusen (n = 3) nicht detektierbar war (Sauer *et al.* 2006).

4.1.3.3 GA- und 3-OH-GA-Konzentrationen in hepatozytären *Gcdh*^{-/-}-Mäusen

Nachdem die zerebralen Konzentrationen von GA und 3-OH-GA in *Gcdh*^{-/-}-Mäusen so unerwartet hoch waren, stellte sich die Frage, ob dieses Resultat durch eine zerebrale *de novo*-Synthese und durch anschließende Akkumulation dieser organischen Säuren im Gehirn oder durch eine Akkumulation zirkulierender Metabolite aus der Leber entstehen. Deshalb wurde mittels Hepatozytentransfusion ein Mausmodell erstellt, das über eine reduzierte *Gcdh*-Aktivität in den Hepatozyten verfügt (11 % der Wildtyp-Aktivität) aber eine normale *Gcdh*-Aktivität in *extrahepatischen* Geweben besitzt (Tabelle 5). In Übereinstimmung mit der enzymatischen Analyse, ergab die *Western Blot*-Analyse in hepatozytären *Gcdh*^{-/-}-Mäusen

einen geschätzten Gcdh-Proteingehalt von 10 % von Wildtyp-Mäusen (Abbildung 12) (Sauer *et al.* 2006).

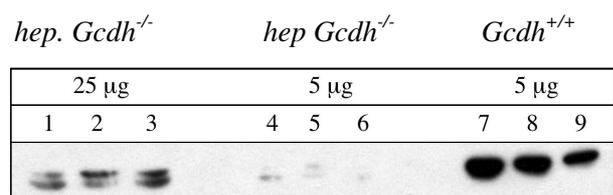


Abbildung (12) Western Blot-Analyse der Gcdh-Expression in der Leber von hepatozytären $Gcdh^{-/-}$ - und $Gcdh^{+/+}$ -Mäusen. Es wurden für die hepatozytäre $Gcdh^{-/-}$ -Maus 5 und 25 µg Protein und für $Gcdh^{+/+}$ -Maus 5 µg Protein aufgetragen.

Die Konzentrationen von GA und 3-OH-GA in der Leber von hepatozytären $Gcdh^{-/-}$ -Mäusen ($n = 4$) waren im Vergleich zu $Gcdh^{+/+}$ -Mäusen ($n = 3$) signifikant erhöht (Tabelle 8), entsprachen aber nur 40 - 50 % der Konzentrationen von $Gcdh^{-/-}$ -Mäusen. Die zerebralen Konzentrationen dieser Dicarbonsäuren waren im Gegensatz zum hepatischen Gewebe und zu $Gcdh^{-/-}$ -Mäusen sehr niedrig (Abbildung 13). Der hepatische und zerebrale Konzentrationsunterschied war für GA stärker ausgeprägt als für 3-OH-GA. Hepatozytäre $Gcdh^{-/-}$ -Mäuse besaßen zerebrale GA-Konzentrationen, die kleiner als 4 % der Konzentrationen in Gehirnhomogenaten von $Gcdh^{-/-}$ -Mäusen waren. Die zerebralen 3-OH-GA-Konzentrationen entsprachen ca. 20 % der Konzentrationen von $Gcdh^{-/-}$ -Mäusen.

Hepatozytäre $Gcdh^{-/-}$ -Mäuse besaßen signifikant erhöhte GA- und 3-OH-GA-Konzentrationen im Urin (Tabelle 8), diese entsprachen 50 % bzw. 20 % der Urinkonzentrationen von $Gcdh^{-/-}$ -Mäusen. Die GA-Konzentrationen waren auch im Serum signifikant erhöht (Tabelle 8) und entsprachen ungefähr 5 % der Serumkonzentrationen im Serum von $Gcdh^{-/-}$ -Mäusen. 3-OH-GA konnte im Serum nicht detektiert werden.

Tabelle (8) GA- und 3-OH-GA-Konzentrationen in Leber, Gehirn, Serum und Urin von hepatozytären $Gcdh^{-/-}$ - und $Gcdh^{+/+}$ -Mäusen. Die Konzentrationen sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung [hepatozytäre $Gcdh^{-/-}$ ($n = 4$) und $Gcdh^{+/+}$ -Mäuse ($n = 3$)] in nmol/mg. * $p < 0,05$ vs. $Gcdh^{+/+}$ -Mäuse.

Matrix	Metabolit	hep. $Gcdh^{-/-}$	$Gcdh^{+/+}$
Leber (nmol/mg)	GA	4,32* \pm 1,19	0
	3-OH-GA	0,26* \pm 0,06	0,02 \pm 0,02
Gehirn (nmol/mg)	GA	0,42* \pm 0,13	0
	3-OH-GA	0,15* \pm 0,08	0,02 \pm 0,03
Serum (µM)	GA	14,66* \pm 4,73	0
	3-OH-GA	0	0
Urin (mmol/mol Kreatinin)	GA	8411,24* \pm 2677,35	113,9 \pm 58,08
	3-OH-GA	141,96* \pm 17,82	41,9 \pm 6,79

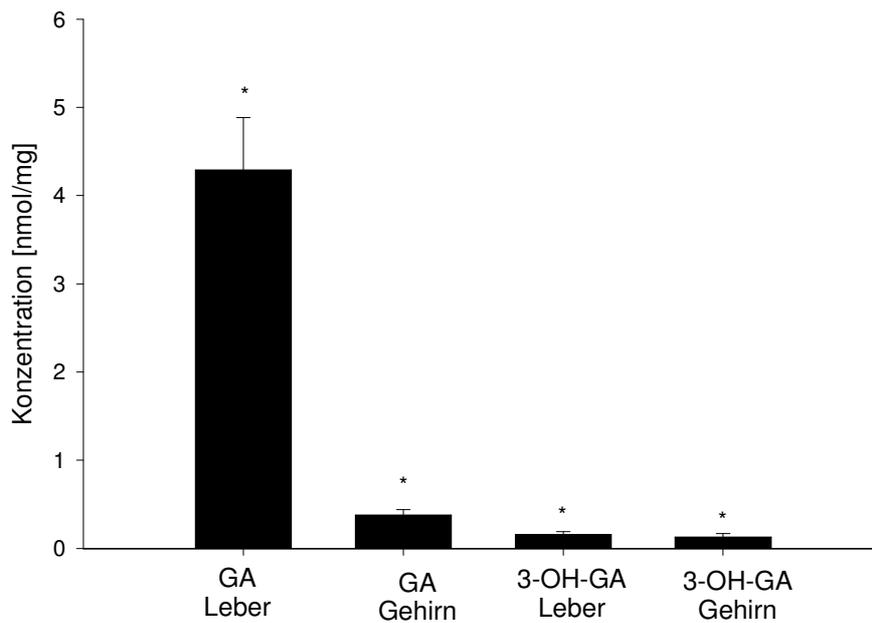


Abbildung (13) GA- und 3-OH-GA-Konzentration in Leber- und Gehirnhomogenaten von *hepatozytären Gcdh^{-/-}* und *Gcdh^{+/+}*-Mäusen. Die Konzentrationen sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung [*hepatozytäre Gcdh^{-/-}* (n = 4) und *Gcdh^{+/+}*-Mäuse (n = 3)] in nmol/mg. * $p < 0,05$ vs. *Gcdh^{+/+}*-Mäuse

Um die *zerebralen* Konzentrationen mit den Serumkonzentrationen zu vergleichen und so einen möglichen Transport über die BBB abschätzen zu können, wurden die *zerebralen* Konzentrationen wie zuvor beschrieben auf Stoffmenge pro Flüssigkeitsvolumen umgerechnet (Tabelle 9). Diese Umrechnung zeigt auch bei diesem Mausmodell einen Konzentrationsgradienten zwischen Gehirn und Serum (Gehirn > Serum), der jedoch deutlich schwächer ausgeprägt war als bei *Gcdh^{-/-}*-Mäusen.

Tabelle (9) Vergleich der Konzentrationen von GA und 3-OH-GA Gehirn und Serum in *hepatozytären Gcdh^{-/-}* und *Gcdh^{+/+}*-Mäusen. Die Konzentrationen sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung [*hepatozytäre Gcdh^{-/-}* (n = 4) und *Gcdh^{+/+}*-Mäuse (n = 3)] in μ M.

Genotyp	Gehirn GA	Serum GA	Gehirn 3-OH-GA	Serum 3-OH-GA
<i>hepatozytäre Gcdh^{-/-}</i>	56,34 \pm 18,97	14,57 \pm 4,73	19,59 \pm 11,70	0
<i>Gcdh^{+/+}</i>	0	0	2,55 \pm 2,42	0

Die Glutarylcaritin -Konzentrationen in Leber, Gehirn und Serum waren im Vergleich zu *Gcdh^{+/+}*-Mäusen signifikant erhöht ($p < 0,05$; Abbildung 14). Dieser Anstieg war im Verhältnis zu systemisch *Gcdh*-defizienten Mäusen jedoch schwächer ausgeprägt aus. Die

Glutarylarnitin-Konzentrationen waren in Leber- und Gehirnhomogenaten ungefähr zehnmal und im Serum ungefähr zweimal niedriger als bei *Gcdh*^{-/-}-Mäusen.

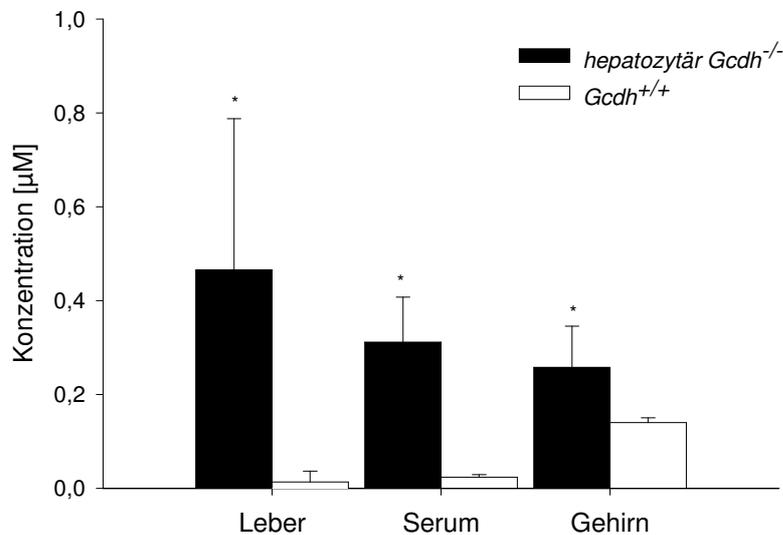


Abbildung (14) Glutarylarnitin-Konzentrationen in Leber, Serum und Gehirn von *hepatozytären Gcdh*^{-/-}- und *Gcdh*^{+/+}-Mäusen. Die Konzentrationen sind angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung [*hepatozytäre Gcdh*^{-/-} (n = 4) und *Gcdh*^{+/+}-Mäuse (n = 3)] in μM. **p* < 0,05 vs. *Gcdh*^{+/+}-Mäuse.

4.1.3.4 d₄-GA- und d₅-3-OH-GA-Konzentrationen nach intraperitonealer Injektion

Es wurde untersucht, ob eine systemische Injektion von hohen Dosen deuterierter GA und 3-OH-GA zu einem Anstieg dieser organischen Säuren im Gehirn führen. C57Bl/6-Mäusen wurde d₄-GA oder d₅-3-OH-GA (jeweils 5 mmol/kg Körpergewicht) intraperitoneal injiziert, und es wurden die zeitabhängigen Gewebe- und Serumkonzentrationen mittels quantitativer GC/MS-Analytik ermittelt. Die höchsten Serum- und Leberkonzentrationen von GA (Abbildung 15A) und 3-OH-GA (Abbildung 15B) wurden eine Stunde nach der Intraperitoneal-Injektion gemessen. Diese Konzentrationen fielen jedoch innerhalb der nächsten vier Stunden schnell ab. Im Gegensatz zu den Leber- und Serumkonzentrationen, blieben die *zerebralen* Konzentrationen von GA und 3-OH-GA sehr niedrig. Es konnten keine arealspezifischen Unterschiede zwischen den Konzentrationen im Cortex, Striatum und Cerebellum gefunden werden. Um die *zerebralen* Konzentrationen mit den Serumkonzentrationen zu vergleichen und so einen möglichen Transport über die BBB abschätzen zu können, wurden die *zerebralen* Konzentrationen wie zuvor beschrieben auf Stoffmenge pro Flüssigkeitsvolumen umgerechnet (Tabelle 10). Die *zerebralen* Konzentrationen beider Isotope waren kleiner als 1/4 der Konzentrationen im Serum.

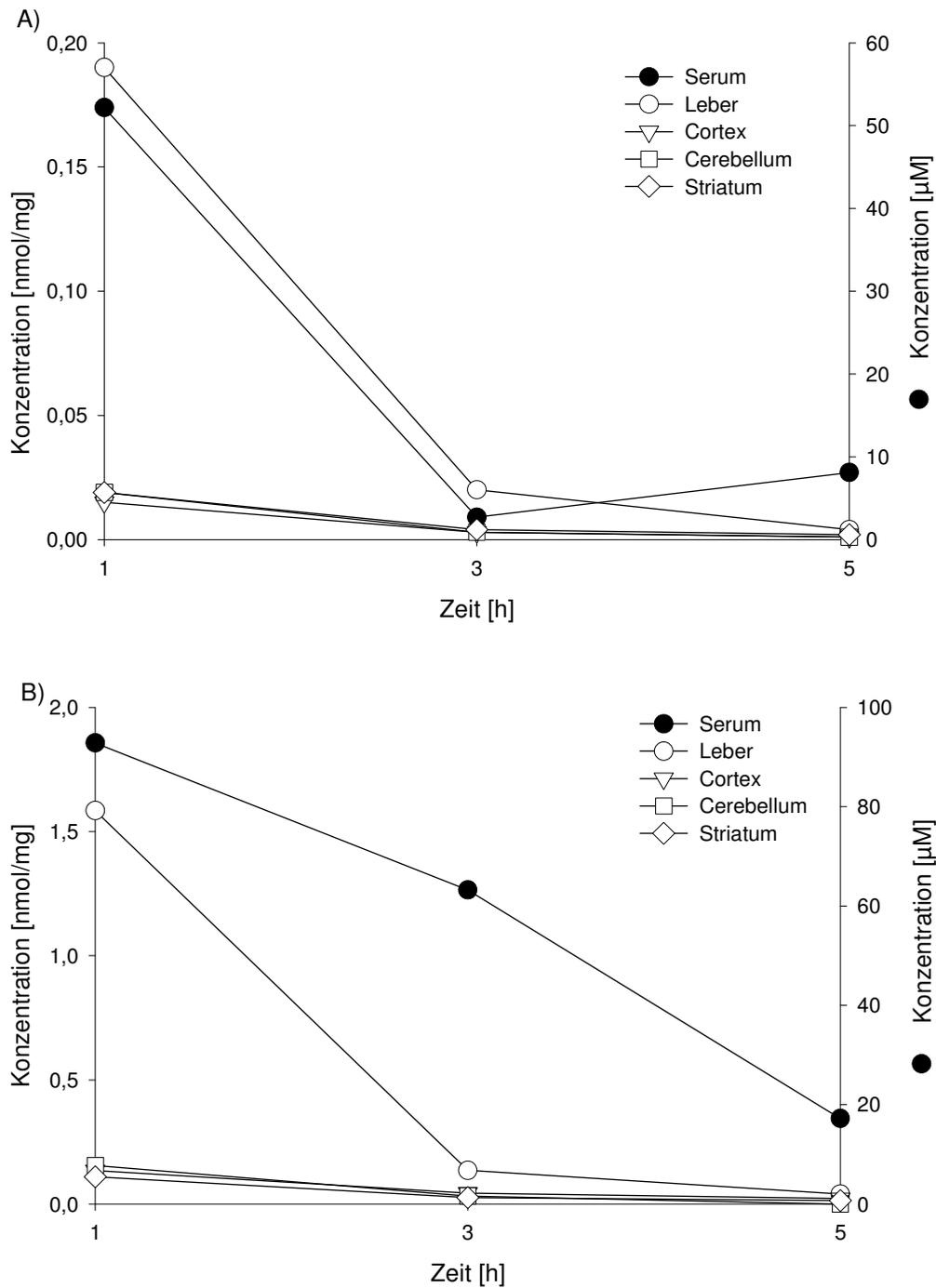


Abbildung (15) Zeitlicher Verlauf der A) d₄-GA- und B) d₅-3-OH-GA-Konzentrationen in Leber, Cortex, Cerebellum, Striatum und Serum von C57Bl/6-Mäusen nach einer intraperitonealen Injektion dieser stabilen Isotope. Die Konzentrationen sind angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung (n = 3) für Leber und Hirnareale (primäre Y-Achse) in nmol/mg und für das Serum (sekundäre Y-Achse) in µM.

Tabelle (10) Vergleich der Konzentrationen von a) d₄-GA und b) d₅-3-OH-GA in Cortex, Striatum, Cerebellum und Serum von C57Bl/6-Mäusen nach einer intraperitonealen Injektion dieser stabilen Isotope. Die Konzentrationen sind angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung (n = 3) in µM.

d ₄ -GA µM	Cortex	Cerebellum	Striatum	Serum
MW 1h	2,31 ± 1,18	2,88 ± 1,47	2,81 ± 1,87	52,17 ± 32,39
MW 3h	0,46 ± 0,18	0,48 ± 0,34	0,60 ± 0,21	2,69 ± 2,04
MW 5h	0,19 ± 0,13	0,18 ± 0,16	0,32 ± 0,05	8,09 ± 5,69

d ₅ -3-OH-GA µM	Cortex	Cerebellum	Striatum	Serum
MW 1h	20,05 ± 9,91	23,23 ± 12,26	16,33 ± 3,57	92,84 ± 59,17
MW 3h	6,60 ± 2,26	4,78 ± 1,63	3,92 ± 0,24	63,16 ± 37,36
MW 5h	3,30 ± 2,24	0	2,06 ± 1,89	17,18 ± 16,34

4.1.3.5 Transport von GA und 3-OH-GA über BCEC

In diesem Experiment wurde der spezifische Transport von d₄-GA und d₅-3-OH-GA über die BBB an BCEC aus Schweinehirn, einem *in vitro*-Modell der BBB, untersucht.

Der Permeabilitätskoeffizient (P) des Kontrollexperimentes mit Carboxyfluorescein war bei allen Experimenten $\leq 1,7 \times 10^{-5}$ cm/s und bestätigte so die Konfluenz und Intaktheit des Monolayers. Für den Transport von d₄-GA und d₅-3-OH-GA von apical (blutseitig) nach basolateral (hirnseitig) wurde ein P von $1,8 \times 10^{-5} \pm 0,5 \times 10^{-5}$ cm/s für 1 mM d₄-GA und von $1,9 \times 10^{-5} \pm 0,7 \times 10^{-5}$ cm/s für 1 mM d₅-3-OH-GA ermittelt. Für die entgegengesetzte Richtung (basolateral nach apical, den Effluxtransport) ergab sich ein P von $2,3 \times 10^{-5} \pm 0,3 \times 10^{-5}$ cm/s für 1 mM GA und $2,3 \times 10^{-5} \pm 0,8 \times 10^{-5}$ cm/s für 1 mM d₅-3-OH-GA.

Weiterhin wurde überprüft, ob der Unterschied (Efflux > Influx) im Transport von GA und 3-OH-GA durch OAT3 vermittelt wird. Es konnte ein schwach stimulierender Effekt der PAH auf den Efflux von d₄-GA ($p < 0,05$ vs. GA alleine) im Experiment (d₄-GA basolateral und PAH apical vs. d₄-GA basolateral und KRB apical) gefunden werden. Wohingegen eine Umkehrung der Versuchsbedingungen (PAH basolateral und d₄-GA apical vs. KRB basolateral und d₄-GA apical) auch eine Umkehrung des Effektes auf den Transport, also eine Reduzierung des Influxes bewirkte (Abbildung 16).

Unter pathophysiologischen Bedingungen (100 µM d₄-GA/ d₅-3-OH-GA apical und 1000 µM GA/ 3-OH-GA basolateral) wurde ein leicht niedrigerer Transport der stabilen Isotope der Dicarbonsäuren gefunden (d₅-3-OH-GA: $P = 7,1 \times 10^{-06} \pm 4,0 \times 10^{-06}$; d₄-GA: $P = 1,3 \times 10^{-05} \pm 7,5 \times 10^{-07}$) als bei einer Applikation von 1 mM d₄-GA oder d₅-3-OH-GA apical und KRB basolateral.

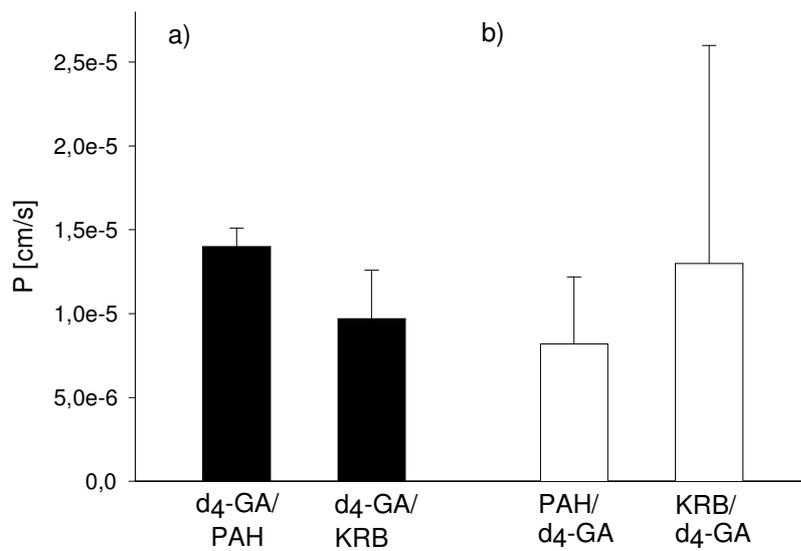


Abbildung (16) Darstellung der Permeationskoeffizienten nach einer *trans*-Stimulation durch PAH. A) d₄-GA basolateral und PAH apical vs. d₄-GA basolateral und KRB apical, B) PAH basolateral und d₄-GA apical vs. d₄-GA apical und KRB basolateral. Die P-Werte sind angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung (n = 3) in cm/s.

4.1.3.6 Diätstudien

Die Ergebnisse der Diätstudien [Kontrolle (Ko); 100 mg/kg Körpergewicht und Tag Carnitin (C I), 400 mg/kg Körpergewicht und Tag Carnitin (C II); 100 mg/kg Körpergewicht und Tag Arginin (A I) und 500 mg/kg Körpergewicht und Tag Arginin (A II); 100 mg/kg Körpergewicht und Tag Ornithin (O I) und 500 mg/kg Körpergewicht und Tag Ornithin (O II); Lysinreduzierte Diät L-Lysin (L-Lys)] waren wie folgt:

Leber (Abbildung 17)

- Die Carnitin-Supplementation führte zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der GA-Konzentrationen (Kontrolle: $13,44 \pm 0,56$ nmol/mg und Tag; 100 mg/kg und Tag: $9,04 \pm 0,56$; 500 mg/kg und Tag: $5,6 \pm 0,43$ nmol/mg). Diese Abnahme wurde allerdings nicht signifikant.

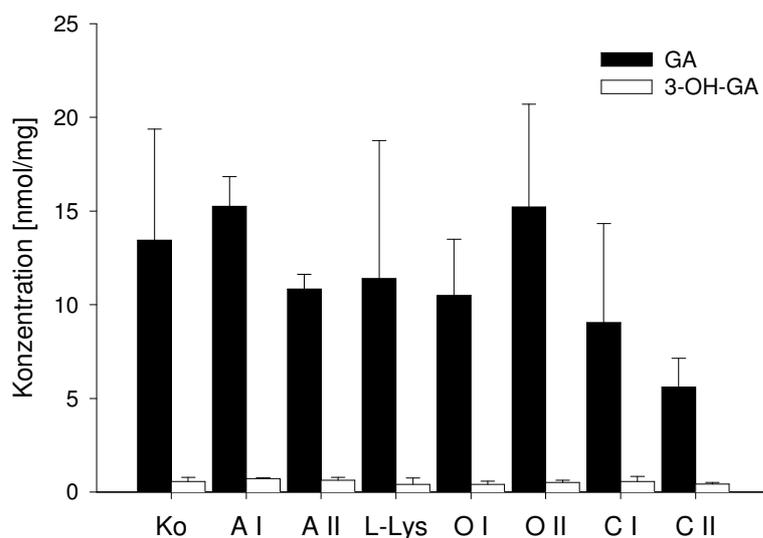


Abbildung (17) GA- und 3-OH-GA-Konzentrationen in Leberhomogenaten von *Gcdh*^{-/-}-Mäusen in Abhängigkeit verschiedener Diätformen. Die Konzentrationen sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung (n = 3) in nmol/mg.

Gehirn (Abbildung 18)

- die Applikation von 100 und 500 mg/kg und Tag Arginin führte zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der GA-Konzentrationen (Kontrolle: $8,16 \pm 0,31$ nmol/mg und Tag; 100 mg/kg und Tag: $7,57 \pm 0,45$ nmol/mg; 500 mg/kg und Tag: $5,02 \pm 0,30$ nmol/mg). Diese wurde für die Dosis 500 mg/kg und Tag signifikant ($p < 0,05$ vs. Kontrolldiät).

- die Applikation von 100 und 500 mg/kg und Tag Ornithin führte zu einer signifikanten, konzentrationsabhängigen Abnahme ($p < 0,05$ vs. Kontrolldiät) der GA-Konzentrationen (Kontrolle: $8,16 \pm 0,31$ nmol/mg und Tag; 100 mg/kg und Tag: $5,24 \pm 0,33$ nmol/mg; 500 mg/kg und Tag: $4,77 \pm 0,26$ nmol/mg).
- die Applikation von 500 mg/kg und Tag Carnitin führte zu einer signifikanten Abnahme ($p < 0,05$ vs. Kontrolldiät) der GA-Konzentrationen (Kontrolle: $8,16 \pm 0,31$ nmol/mg und Tag; 500 mg/kg und Tag: $5,07 \pm 0,31$ nmol/mg).

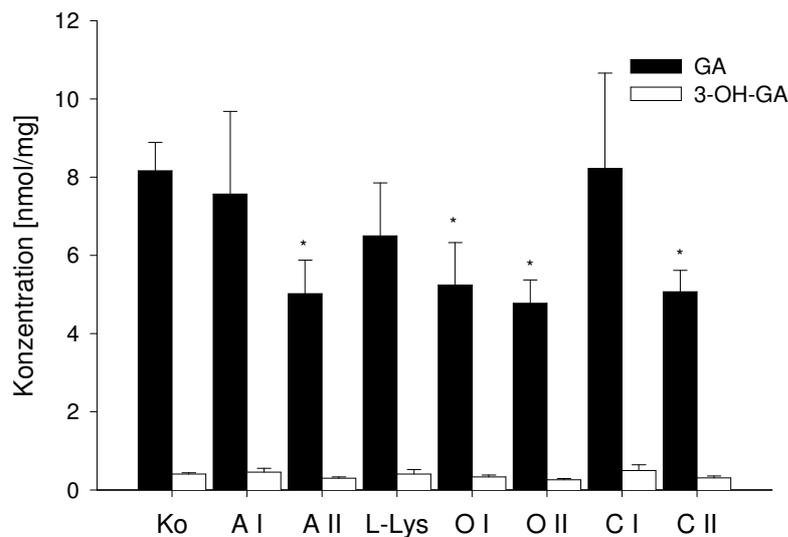


Abbildung (18) GA- und 3-OH-GA-Konzentrationen in Gehirnhomogenaten von *Gcdh*^{-/-}-Mäusen in Abhängigkeit verschiedener Diätformen. Die Konzentrationen sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung (n = 3) in nmol/mg. * $p < 0,05$ vs. Kontrolldiät.

Urin (Abbildung 19)

- die Applikation von 100 und 500 mg/kg und Tag Arginin führte zu einem Anstieg der GA-Konzentrationen (Kontrolle: $13291,15 \pm 423,27$ mmol/mol Kreatinin; 100 mg/kg und Tag: $19878,80 \pm 435,86$ mmol/mol Kreatinin; 500 mg/kg und Tag: $19490,22 \pm 378,48$ mmol/mol Kreatinin). Dieser wurde allerdings nur für die Dosis 500 mg/kg und Tag signifikant ($p < 0,05$ vs. Kontrolldiät).
- die Applikation von 100 und 500 mg/kg und Tag Ornithin führte zu einem signifikanten Anstieg ($p < 0,05$ vs. Kontrolldiät) der GA-Konzentrationen (Kontrolle: $13291,15 \pm 423,27$ mmol/mol Kreatinin; 100 mg/kg und Tag: $17738,38 \pm 405,84$ mmol/mol Kreatinin; 500 mg/kg und Tag: $17814,04 \pm 330,87$ mmol/mol Kreatinin).
- die Applikation von 100 und 500 mg/kg und Tag Carnitin führte zu einem Anstieg der GA-Konzentrationen (Kontrolle: $13291,15 \pm 423,27$ mmol/mol Kreatinin; 100 mg/kg und Tag: $21330,62 \pm 450,98$ mmol/mol Kreatinin; 500 mg/kg und Tag: $20359,59 \pm 373,99$ mmol/mol Kreatinin).

mmol/mol Kreatinin). Diese wurde allerdings nur für die Dosis 100 mg/kg und Tag signifikant ($p < 0,05$ vs. Kontrolldiät).

- die L-Lysinreduzierte Diät führte zu einer signifikanten Abnahme ($p < 0,05$ vs. Kontrolldiät) der GA-Konzentrationen. (Kontrolle: $13291,15 \pm 423,27$ mmol/mol Kreatinin; L-Lysin reduziert: $9947,42 \pm 287,60$ mmol/mol Kreatinin).

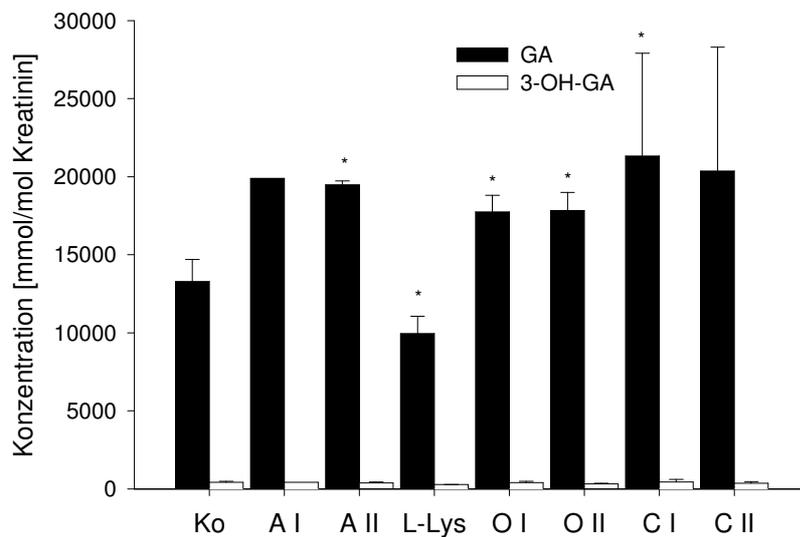


Abbildung (19) GA- und 3-OH-GA-Konzentrationen in Urin von *Gcdh*^{-/-}-Mäusen in Abhängigkeit verschiedener Diätformen. Die Konzentrationen sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 3$) in mmol/mol Kreatinin. * $p < 0,05$ vs. Kontrolldiät.

Serum (Abbildung 20)

- die Applikation von 100 und 500 mg/kg und Tag Arginin führte zu einem Anstieg der GA-Konzentrationen (Kontrolle: $61,33 \pm 17,97$ μ M; 100 mg/kg und Tag: $105,60 \pm 30,80$ μ M; 500 mg/kg und Tag: $510,25 \pm 77,63$ μ M). Diese wurde allerdings nur für die Dosis 500 mg/kg und Tag signifikant ($p < 0,05$ vs. Kontrolldiät).
- die Applikation von 100 und 500 mg/kg und Tag Carnitin führte zu einem signifikanten, konzentrationsabhängigen Anstieg ($p < 0,05$ vs. Kontrolldiät) der GA-Konzentrationen (Kontrolle: $61,33 \pm 17,97$ μ M; 100 mg/kg und Tag: $169,67 \pm 14,97$ μ M; 500 mg/kg und Tag: $278,07 \pm 19,10$ μ M).

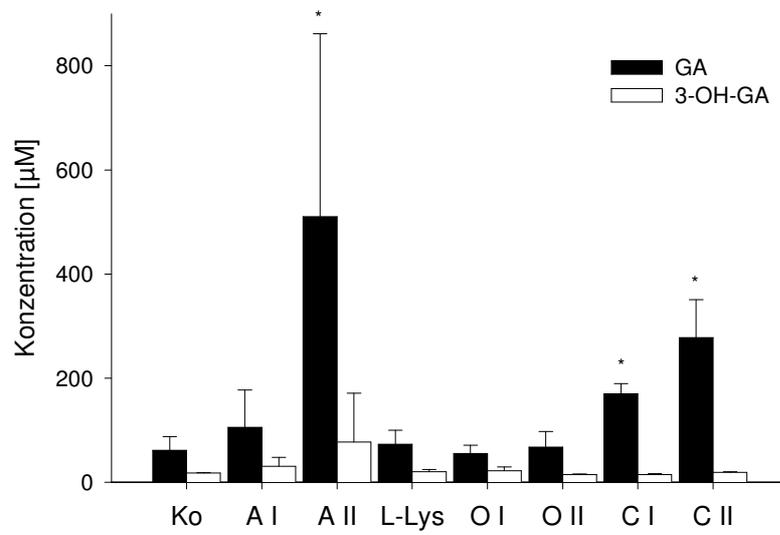


Abbildung (20) GA- und 3-OH-GA-Konzentrationen in Serum von *Gcdh*^{-/-}-Mäusen in Abhängigkeit verschiedener Diätformen. Die Konzentrationen sind angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung (n = 3) in µM. **p* < 0,05 vs. Kontrolldiät.

4.2 SSADH-Defizienz

4.2.1 Bioenergetik

4.2.1.1 Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe I-V in Gewebehomogenaten

Um zu überprüfen, ob regulatorische Veränderungen der mitochondrialen Atmungskette am Pathomechanismus der SSADH beteiligt sind, wurden die Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe I-V in Gewebehomogenaten (Cerebellum, Cortex, Hippocampus, Hirnstamm, Leber, Niere und Skelettmuskel) von *Aldh5a1*^{-/-} (*n* = 9), *Aldh5a1*^{+/-} (*n* = 7) und *Aldh5a1*^{+/+}-Mäusen (*n* = 6) spektrophotometrisch untersucht. Es konnten keine signifikanten Unterschiede dieser fünf Multi-Proteinkomplexe zwischen den unterschiedlichen Genotypen gefunden werden (Tabelle 11). Im Hippocampus deuteten die Mittelwerte einen Trend zu einer verringerten Aktivität der Komplexe I-V an, der jedoch nicht signifikant wurde (Abbildung 21). Eine solche Tendenz war in keinem der anderen Geweben festzustellen.

Tabelle (11) Spektrophotometrische Analyse der Atmungskettenkomplexe I-V in Gewebehomogenaten (Cerebellum, Cortex, Hippocampus, Hirnstamm, Leber, Niere und Skelettmuskel) von *Aldh5a1*^{-/-}, *Aldh5a1*^{+/-}- und *Aldh5a1*^{+/+}-Mäusen. Die spezifischen Aktivitäten sind angegeben als Mittelwerte ± Standardabweichung [*Aldh5a1*^{-/-} (*n* = 9), *Aldh5a1*^{+/-} (*n* = 7) und *Aldh5a1*^{+/+}-Mäuse (*n* = 6)] in mU/mg.

Gewebe	Genotyp	Komplex I	Komplex II	Komplex III	Komplex IV	Komplex V
Cerebellum	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	3,61 ± 1,19	4,49 ± 0,70	3,37 ± 0,67	72,17 ± 7,95	22,56 ± 3,64
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	2,74 ± 0,36	5,25 ± 0,50	3,02 ± 0,41	70,97 ± 5,05	25,19 ± 4,62
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	3,06 ± 0,50	4,86 ± 0,45	3,82 ± 0,40	68,68 ± 8,02	22,79 ± 4,02
Cortex	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	6,90 ± 1,35	10,77 ± 1,99	24,84 ± 5,57	88,60 ± 9,25	22,81 ± 6,32
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	6,29 ± 1,37	10,67 ± 1,89	20,64 ± 7,12	82,68 ± 13,89	22,79 ± 5,36
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	7,25 ± 0,60	10,24 ± 1,32	23,24 ± 4,06	91,98 ± 13,59	22,88 ± 6,22
Hippocampus	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	6,99 ± 1,61	3,34 ± 0,66	16,43 ± 4,20	59,82 ± 17,31	14,88 ± 3,73
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	7,19 ± 1,17	4,09 ± 0,38	15,00 ± 3,74	65,25 ± 10,58	17,20 ± 2,77
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	7,96 ± 1,17	4,12 ± 0,82	19,13 ± 2,93	71,58 ± 12,10	16,99 ± 4,37
Hirnstamm	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	9,41 ± 3,14	6,91 ± 2,57	31,76 ± 13,52	90,75 ± 32,88	23,22 ± 7,85
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	7,84 ± 2,30	6,98 ± 1,38	26,34 ± 9,04	88,76 ± 26,03	21,64 ± 5,35
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	7,66 ± 3,11	6,00 ± 1,45	26,33 ± 4,17	76,28 ± 16,50	17,76 ± 3,90
Leber	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	2,96 ± 0,88	6,92 ± 1,47	9,55 ± 5,63	41,46 ± 14,33	23,37 ± 5,84
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	2,59 ± 0,97	6,48 ± 1,52	7,51 ± 3,68	31,22 ± 8,58	19,82 ± 5,08
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	2,54 ± 0,80	8,49 ± 2,57	11,56 ± 8,01	35,59 ± 14,83	21,27 ± 7,34

Gewebe	Genotyp	Komplex I	Komplex II	Komplex III	Komplex IV	Komplex V
Niere	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	5,90 ± 1,73	10,56 ± 3,59	10,84 ± 5,37	58,80 ± 17,99	22,39 ± 6,55
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	6,95 ± 1,88	13,72 ± 3,23	15,00 ± 6,38	64,37 ± 13,11	28,94 ± 7,10
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	7,81 ± 1,98	12,61 ± 3,71	16,39 ± 6,64	60,45 ± 14,40	24,86 ± 4,35
Skelettmuskel	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	3,46 ± 1,28	5,41 ± 1,64	7,66 ± 5,07	27,95 ± 9,13	54,29 ± 24,77
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	2,60 ± 0,78	4,86 ± 1,16	5,62 ± 2,44	24,17 ± 1,99	43,24 ± 11,54
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	4,35 ± 2,23	5,76 ± 1,37	10,17 ± 4,14	26,40 ± 5,61	51,01 ± 12,72

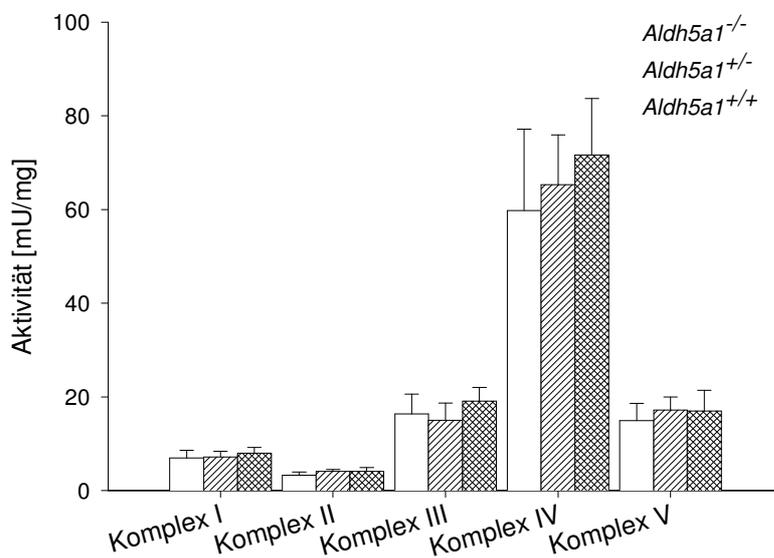


Abbildung (21) Spektrophotometrische Analyse der Atmungskettenkomplexe I-V im Hippocampus von *Aldh5a1*^{-/-}, *Aldh5a1*^{+/-} und *Aldh5a1*^{+/+}-Mäusen. Die spezifischen Aktivitäten sind angegeben als Mittelwerte ± Standardabweichung [*Aldh5a1*^{-/-} (n = 9), *Aldh5a1*^{+/-} (n = 7) und *Aldh5a1*^{+/+}-Mäuse (n = 6)] in mU/mg.

4.2.1.2 Einfluss von GABA, GHB, SSA und 4,5-DHHA auf die Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe I-V

Der Einfluss von GABA, GHB, SSA und 4,5-DHHA auf die Atmungskettenaktivität wurde in SMPs untersucht. Es konnte kein direkter Einfluss von einem dieser Metabolite (jeweils 1 mM) auf die Einzelenzymkomplexe I-V in SMPs gefunden werden. Die Zugabe von Standard Atmungsketteninhibitoren zu den SMPs erzeugte hingegen eine gute inhibitorische Antwort ($p < 0,001$ vs. Kontrolle; Abbildung 22)

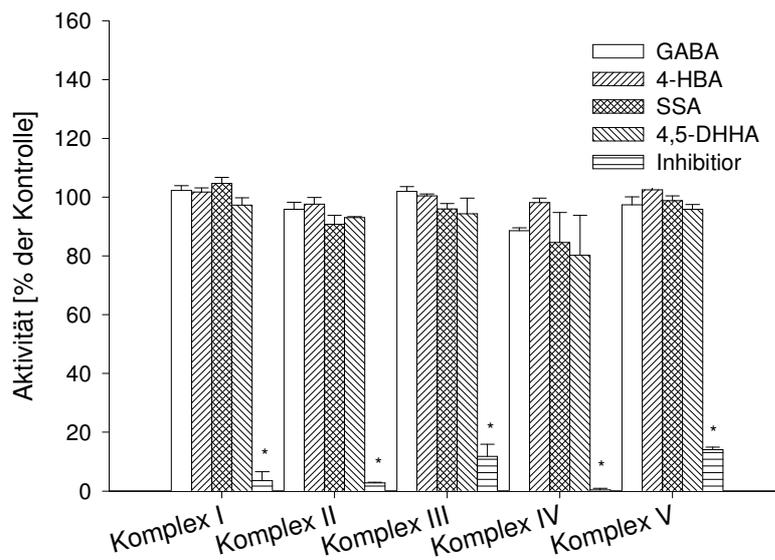


Abbildung (22) Spektrophotometrische Analyse der Atmungskettenkomplexe I-V in SMPs nach einer Inkubation mit GABA, GHB, SSA oder 4,5-DHHA. Die Aktivitäten sind angegeben als Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 4$) in % der Kontrollaktivität. * $p < 0,001$ vs. Kontrolle. Inhibitoren: Komplex I DQA (1 μ M); Komplex II: TTFA (8 mM); Komplex III: Stigmatellin (2 μ M); Komplex IV: NaCN (2 mM); Komplex V: Oligomycin (80 μ M).

4.2.1.3 Der Einfluss von GABA, GHB, SSA und 4,5-DHHA auf die Enzyme des Citratzyklusses

Der Einfluss von GABA, GHB, SSA und 4,5-DHHA auf den Citratzyklus wurde an isolierten Enzymen aus Schweineherz untersucht. Es wurde kein direkter Einfluss von einem dieser Metabolite (jeweils 1 mM) auf ein Enzym des Citratzyklusses gefunden (Abbildung 23).

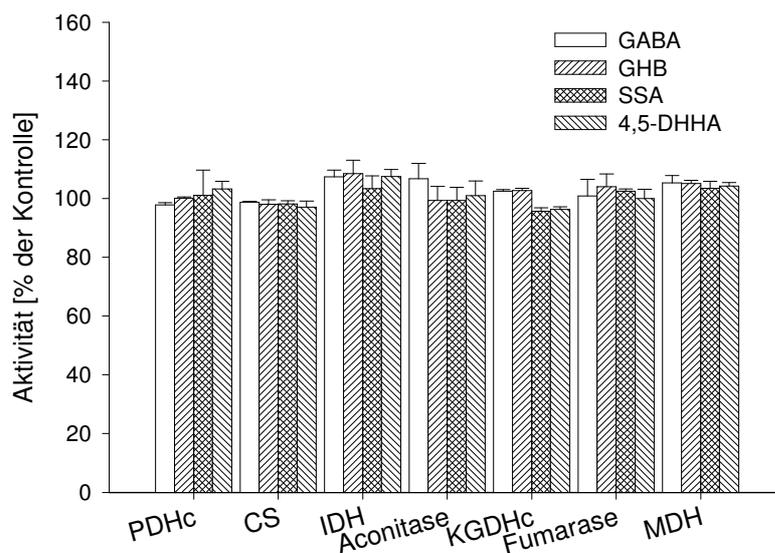


Abbildung (23) Einfluss von GABA, GHB, SSA, 4,5-DHHA auf die Citratzyklusenzyme PDHc, CS, IDH, Aconitase, KGDHc, Fumarase und MDH. Die Aktivitäten sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 4$) in % der Kontrollaktivität.

4.2.2 Glutathion-Konzentrationen in Gewebehomogenaten

Als Marker für oxidativen Stress wurden die Glutathion-Konzentrationen in Homogenaten (Cerebellum, Cortex, Hirnstamm, Hippocampus und Leber) von *Aldh5a1*^{-/-} (*n* = 9), *Aldh5a1*^{+/-} (*n* = 7) und *Aldh5a1*^{+/+}-Mäusen (*n* = 6) ermittelt. Die Glutathion-Konzentrationen der Homogenate aus Cortex und Hippocampus von *Aldh5a1*^{-/-}-Mäusen waren im Vergleich zu *Aldh5a1*^{+/+}-Mäusen signifikant erniedrigt (*p* < 0,05 vs. *Aldh5a1*^{+/+}-Mäuse; Abbildung 24). Im Hirnstamm und Cerebellum deuteten die Mittelwerte einen Trend zu verringerten Glutathion-Konzentrationen an, der allerdings nicht signifikant wurde. In Leberhomogenaten unterschieden sich die unterschiedlichen Genotypen nicht.

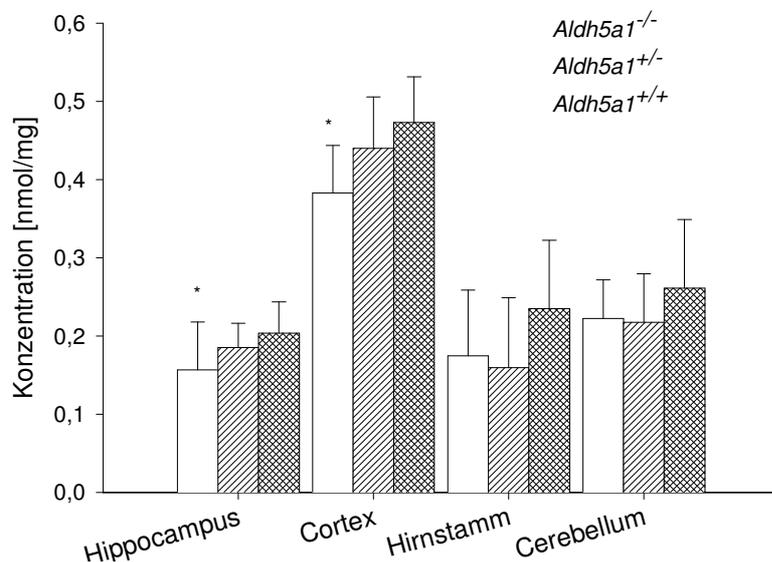


Abbildung (24) Glutathion-Konzentrationen in Homogenaten aus Hippocampus, Cortex, Hirnstamm, und Cerebellum von *Aldh5a1*^{-/-}, *Aldh5a1*^{+/-} und *Aldh5a1*^{+/+}-Mäusen. Die Konzentrationen sind angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung [*Aldh5a1*^{-/-} (*n* = 9), *Aldh5a1*^{+/-} (*n* = 7) und *Aldh5a1*^{+/+}-Mäuse (*n* = 6)] in nmol/mg. **p* < 0,05 vs. *Aldh5a1*^{+/+}-Mäuse.

5 Diskussion

5.1 Bioenergetische Untersuchungen zur SSADH-Defizienz

Auf bioenergetischer Ebene wurde untersucht, ob ein Ungleichgewicht oder eine durch akkumulierende Metabolite (GABA, GHB, SSA oder 4,5-DHHA) induzierte Inhibition der Enzyme des Energiestoffwechsels an der Pathogenese der SSADH-Defizienz beteiligt ist. Es wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt. Chronische und regulative Effekte auf endogene Enzymaktivitäten wurden durch den Vergleich von Gewebehomogenaten aus *Aldh5a1*^{-/-}-, *Aldh5a1*^{+/-}- und *Aldh5a1*^{+/+}-Mäusen untersucht. Kurzzeiteffekte durch akkumulierende Metabolite auf Enzymaktivitäten der Atmungskette und des Citratzyklusses sind in SMPs und an isolierten Enzymen überprüft worden. Abschließend wurden die Glutathion-Konzentrationen in den Gewebehomogenaten bestimmt, um die Rolle von oxidativem Stress im Pathomechanismus der Erkrankung zu bewerten.

5.1.1 Reduzierte Glutathion-Konzentration in Hirnarealen der *Aldh5a1*^{-/-}-Mäuse

Das wichtigste Ergebnis der Untersuchung von *Aldh5a1*^{-/-}-Mäusen waren erniedrigte Glutathion-Konzentrationen im Hippocampus und Cortex und tendenziell erniedrigte Glutathion-Konzentrationen im Cerebellum und Hirnstamm von Ssadh-defizienten Mäusen. Dieses Ergebnis deutet auf oxidativen Stress in diesen Arealen hin.

Das Tripeptid Glutathion besteht aus Glutamat, Cystein und Glycin. Die Sulfhydrylgruppe des Cysteinylnrestes wirkt als Elektronendonator in vielen Reaktionen der oxidativen Stressantwort, z.B. der Entgiftung von Sauerstoffradikalen und organischen Peroxiden (Beutler 1989). Das entstehende Disulfid wird mittels NADPH regeneriert. Reaktionen mit elektrophilen Metaboliten und Xenobiotika verbrauchen Glutathion irreversibel und erniedrigen so die intrazellulären Konzentrationen dieses Radikalfängers. Reaktive Sauerstoffspezies, wie Superoxid, Hydroxyradikale, Peroxynitrit, Nitrit und Wasserstoffperoxid entstehen im Rahmen physiologischer oxidativer Stoffwechselprozesse in der Zelle.

Im antioxidativen Abwehrsystem ist Glutathion einer der zentralen Schutzmechanismen (Beutler 1989; Commandeur *et al.* 1995). Kommt es zu einer vermehrten Generation von Radikalen und wird die Kapazität der zellulären Abwehrmechanismen überschritten, wird die Zelle auf molekularer und genetischer Ebene geschädigt (Reed und Fariss 1984). Besonders das Gehirn ist aufgrund seines starken oxidativen Metabolismus und des hohen Anteils an Lipiden in Myelinscheiden vulnerabel gegenüber freien Radikalen. Oxidativer Stress ist eine

häufige Komponente bei Krampfanfällen (Abbot *et al.* 1990) und neurodegenerativen Erkrankungen (Bains und Chaw 1997). Vermehrte Radikalbildung ist oft eine Folge von exzitotoxischen Prozessen (Dykens *et al.* 1994) durch eine Überstimulation der exzitatorischen Neurotransmission.

5.1.2 Ssadh-Defizienz und oxidativer Stress

Die Ssadh-Defizienz ist durch ein Ungleichgewicht der inhibitorischen und exzitatorischen Neurotransmission gekennzeichnet. Die Untersuchungen an Ssadh-defizienten Mäusen legen eine Verschiebung dieses Ungleichgewichts im Laufe der Pathogenese nahe (Cortez *et al.* 2004). Während anfangs eine verstärkte inhibitorische Neurotransmission vorliegt, kommt es durch regulative Prozesse auf Ebene der GABA-Rezeptoren im Verlauf der Erkrankung zu einem relativen Übergewicht der exzitatorischen Neurotransmission. Dies führt letztlich zu letalen, generalisierenden Krampfanfällen bei den Mäusen. Es kann postuliert werden, dass diese Phase der Pathogenese mit primären exzitotoxischen Prozessen durch eine Überstimulation der exzitatorischen Neurotransmission verbunden ist.

Eine Überstimulation von NMDA-Rezeptoren, Ca²⁺-permeablen AMPA- und Kainat-Rezeptoren und spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle führt zu einem Einstrom von Ca²⁺ in die Zelle. Die Akkumulation von Ca²⁺ in der Zelle aktiviert prooxidative Stoffwechselwege, wie Phospholipase A2 (Dumuis *et al.* 1988), Xanthin Oxidase (Atlante *et al.* 1997) und neuronale NO-Synthase (Dawson *et al.* 1993a). Das akkumulierende Ca²⁺ aus dem Cytosol tritt in das Mitochondrium ein und kann dort infolge einer Depolarisation der inneren Mitochondrienmembran zu einer vermehrten Generierung von ROS und einer ATP-Depletion führen (Dykens 1994; Dugan *et al.* 1995).

5.1.3 Kein Einfluss von GABA, GHB, SSA und 4,5-DHHA auf die Enzyme der Atmungskette und des Citratzyklusses

Im Rahmen der vorliegenden Studie konnte kein Einfluss der bei der SSADH-Defizienz akkumulierenden Metabolite - GABA, GHB, SSA und 4,5-DHHA - auf die Einzelenzyme der Atmungskette und des Citratzyklusses gezeigt werden. Es ergab sich daher kein Hinweis auf sekundäre exzitotoxische Prozesse im Pathomechanismus der Erkrankung. Dass eine Akkumulation dieser Metabolite *in vivo* den Energiestoffwechsel durch eine vermehrte Beanspruchung von Stoffwechselprozessen wie die Umwandlung von SSA zu GHB oder durch Konkurrenz um mitochondriale Transporter ungünstig beeinflusst, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

5.1.4 Oxidativer Stress und die Atmungskette

Die Untersuchung der Atmungsketteneinzelenzyme von *Aldh5a1*^{-/-}-Mäusen ergab eine tendenzielle Verringerung der Aktivität der Einzelenzymkomplexe I-V im Hippocampus. Dieser könnte im Zusammenhang mit oxidativem Stress stehen.

Die Atmungskette - vor allem Komplex I (Herrero und Barja 2000) und Komplex III (Chen *et al.* 2003) - ist ein wichtiger Produzent von ROS aber auch besonders vulnerabel gegenüber freien Radikalen. Die meisten mitochondrialen Proteine entstammen nukleär codierten Genen, werden im Cytoplasma synthetisiert und in das Mitochondrium transportiert (Paschen und Neupert 2001). Auf mitochondrialer (mt) DNA Ebene werden aber unter anderem hydrophobe Untereinheiten der Atmungskett Komplexe und mRNAs und tRNAs der mitochondrialen Proteinbiosynthese codiert (Di Mauro und Wallace 1993). Eine Schädigung von mtDNA-Elementen durch ROS kann zu veränderten Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe und zu einer Reduktion der Aktivität von betroffenen Untereinheiten führen (Lenaz *et al.* 1999; Ozawa 1997). Reduzierte Aktivitäten von Atmungskettenkomplexen sind wiederum Quelle von ROS, wie Studien mit spezifischen Atmungsketteninhibitoren (z.B. Rotenon: Komplex I; Antimycin A: Komplex III) zeigen konnten (Turrens 1997; Murphy *et al.* 1999; Lenaz 2001). Auf diesem Zusammenhang gründete unter anderem eine Theorie zur Zellalterung (Linanne *et al.* 1989).

Arbeiten von Garcia-Ruiz *et al.* (1995) und Cardoso *et al.* (1999) konnten eine Verbindung zwischen antioxidativen Abwehrmechanismen und der Aktivität von Atmungskettenkomplexen zeigen. Während oxidativer Stress die Aktivität der Atmungskettenkomplexe direkt reduzierte, konnte die Gabe von Antioxidanzien (z.B. Glutathion) dieser Reduktion entgegenwirken.

Es lässt sich daher postulieren, dass die Reduktion der Aktivitäten der Atmungskettenenzyme I-V durch ROS im Mitochondrium erzeugt wird. Hierbei könnte es sich um einen schädigenden Effekt auf mtDNA Ebene oder Proteinebene handeln.

5.1.5 Ssadh-Defizienz und Hippocampus

Es gibt vermehrte Hinweise, dass der Hippocampus eine besondere Rolle in der Pathogenese der Ssadh-Defizienz spielt. In den dorsalen hippocampalen Kommissuren (Hogema *et al.* 2001b) von Ssadh-defizienten Mäusen wurde Astrogliose - eine Sekundärfolge von neurotoxischen, inflammatorischen und neurodegenerativen Prozessen - festgestellt. In der vorliegenden Arbeit wurden erniedrigte Glutathion-Konzentrationen und eine reduzierte Aktivität der Atmungskettenkomplexe I-V im Hippocampus nachgewiesen.

Oxidativer Stress im Hippocampus wurde auch bei Epilepsie, einer weiteren Störung im Gleichgewicht der inhibitorischen und exzitatorischen Neurotransmission, (Magloczky und Freund 2005) beschrieben. Patienten mit Epilepsie zeigten signifikant geringere Glutathion-Konzentrationen im Hippocampus (Mueller *et al.* 2001).

5.1.6 Zusammenfassung des bioenergetischen Teils

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur SSADH-Defizienz die Hypothese einer Beteiligung des Energiestoffwechsels als amplifizierende Größe im Pathomechanismus nicht bestätigen konnte. Die Ergebnisse deuten vielmehr auf den epileptischen Phänotyp und die daraus resultierenden primär exzitotoxischen Prozesse als relevante Größe in der Pathogenese der Erkrankung hin.

5.2 Bioenergetische Untersuchungen zur GCDH-Defizienz

Das Ziel der bioenergetischen Studien zur GCDH-Defizienz war die Klärung der Frage, ob eine Störung des mitochondrialen Energiestoffwechsels durch GA, 3-OH-GA oder Glutaryl-CoA als amplifizierender Mechanismus an der Pathogenese der Erkrankung beteiligt ist.

Chronische und regulative Effekte auf endogene Enzymaktivitäten der Atmungskette und der β -Oxidation wurden durch den Vergleich von Gewebehomogenaten aus *Gcdh*^{-/-}, *Gcdh*^{+/-}- und *Gcdh*^{+/+}-Mäusen untersucht. Für die Bestimmung von Kurzzeiteffekten wurde ein kombinierter Einsatz von SMPs, Gewebehomogenaten und isolierten Enzymen verwendet. Eine Beteiligung von oxidativem Stress am Pathomechanismus der Erkrankung wurde über die Glutathion-Konzentrationen bewertet.

5.2.1 Hemmung der α -Ketosäure-Dehydrogenase-Komplexe, insbesondere des KGDHc, durch Glutaryl-CoA

Das wichtigste Ergebnis der bioenergetischen Untersuchungen ist eine Hemmung der α -Ketosäure-Dehydrogenasen durch Glutaryl-CoA. Die stärkste und pathophysiologisch relevanteste Hemmung ist die des KGDHc.

Die Gruppe der α -Ketosäure-Dehydrogenasen-Komplexe umfasst drei Enzymkomplexe in zentralen Positionen des mitochondrialen Stoffwechsels. Der KGDHc ist ein Schlüsselenzym des Citratzyklus. Er besitzt in peripheren (Hansford 1980) und neuronalen (Lai *et al.* 1977) Zellen die langsamste Aktivität aller Citratzyklusenzyme und ist somit auch das geschwindigkeitsbestimmende Enzym dieses Zyklusses. In Neuronen ist er ein Bindeglied zwischen dem Metabolismus der Neurotransmitter GABA und Glutamat und dem Citratzyklus. Der BCKDHc ist ein zentrales Enzym im Abbau der verzweigtkettigen Aminosäuren L-Valin, L-Leucin und L-Isoleucin. Er katalysiert im Abbau dieser verzweigtkettigen Aminosäuren insgesamt den ersten irreversiblen Schritt und den zweiten Schritt nach der verzweigtkettigen-Aminosäuren-Aminotransferase. Der PDHc ist das Bindeglied zwischen Glykolyse und Citratzyklus. Aus diesem tritt das Reaktionsäquivalent Pyruvat über die PDHc in den Citratzyklus ein und treibt diesen an.

Alle drei Komplexe sind ähnlich aufgebaut. Sie bestehen aus zahlreichen Kopien dreier Untereinheiten (E1k, E2k, E3), wobei die E2k-Untereinheiten den Kern bilden, der die E1k- und E3-Untereinheiten bindet. Der KGDHc besteht aus der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase (E1k, EC 1.2.4.2.) und der Dihydrolipoyl-Succinyltransferase (E2k, EC 2.3.1.61), der PDHc aus der Pyruvat-Dehydrogenase (E1k, EC 1.2.4.1) und Dihydrolipoyl-Acetyltransferase (E2k,

EC 2.3.1.12), der BCKDHc aus der verzweigt-kettigen-Ketosäure-Dehydrogenase (E1k, EC 1.2.4.4) und der Dihydrolipoyl-Transacylase (E2k, EC 2.3.1.168). Die gemeinsame dritte Untereinheit dieser drei α -Ketosäure-Dehydrogenasen-Komplexe ist die Dihydrolipoyl-Dehydrogenase (E3, EC 1.8.1.4). Vereinfacht können die katalysierten Reaktionsschritte wie folgt beschrieben werden:

1. $\text{RCOCOOH} + \text{TPP-E1} \rightarrow (\text{RCHOH-TPP})\text{-E1} + \text{CO}_2$
2. $(\text{RCHOH-TPP})\text{-E1} + (\text{LipS2})\text{-E2} \rightarrow (\text{RCO-SLipSH})\text{-E2} + \text{TPP-E1}$
3. $(\text{RCO-SLipSH})\text{-E2} + \text{HSCoA} \rightarrow (\text{Lip(SH)}_2)\text{-E2} + \text{RCO-SCoA}$
4. $(\text{Lip(SH)}_2)\text{-E2} + \text{E3-FAD} \rightarrow (\text{LipS2})\text{-E2} + \text{E3-FADH}_2$
5. $\text{E3-FADH}_2 + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{E3-FAD} + \text{NADH}$

Abbildung (25) Schematische Darstellung der von den α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplexen katalysierten Reaktionsschritte. RCOCOOH: α -Ketosäure, TPP: Thiaminpyrophosphat, LipS2: Lipoamid, oxidiert, Lip(SH)₂: Lipoamid, reduziert

Die Enzymaktivität dieser drei α -Ketosäure-Dehydrogenasen wird über Produkt-Feedback-Hemmung durch die entstehenden CoA-Ester (Butterwoth *et al.* 1975; Hamada *et al.* 1975; Boyer und Odessey 1990) und die NAD/ NADH-Ratio (Bunik 2003) reguliert. Der PDHc und der BCKDHc werden außerdem über ein Kinase/ Phosphatase System reguliert (Linn *et al.* 1969a,b; Cook *et al.* 1983; Damuni *et al.* 1984). Phosphoryliert sind die Komplexe inaktiv, dephosphoryliert aktiv.

5.2.2 Unkompetitive Hemmung des KGDHc durch Glutaryl-CoA

Es konnte gezeigt werden, dass Glutaryl-CoA den KGDHc in Bezug auf α -Ketoglutarat unkompetitiv hemmt und Glutaryl-CoA die E2k Untereinheit des KGDHc, aber nicht die E1k oder E3 Untereinheit inhibiert. Die E2k spaltet in ihrer reversen Reaktion Succinyl-CoA zu freiem CoA und S-Succinyldihydrolipoamid. Da sie auch mit Glutaryl-CoA als Substrat eine Aktivität zeigt, liegt es nahe, dass es sich bei dieser Inhibition um eine Produkt-Feedback-Inhibition des E2k handelt. Auch die Unkompetitivität der Inhibition, also die Wechselwirkung des Inhibitors mit dem Enzym-Substratkomplex, spricht für diese Hypothese. Die Inhibitionsexperimente mit α -Keto adipat als Substrat für KGDHc erzielten analoge Resultate und zeigen so die α -Keto adipat-Dehydrogenase-Aktivität der KGDHc. Das Endprodukt dieser Reaktion ist Glutaryl-CoA.

5.2.3 Biochemische Hinweise aus GCDH-defizienten Patienten

Eine KGDHc Inhibition in Patienten mit einer GCDH-Defizienz wird von der Anwesenheit erhöhter α -Ketoglutarat Exkretion im Urin, besonders während einer metabolischen Dekompensation (Lindner *et al.* 2004; S. Kölker, unveröffentlichte Beobachtung) unterstützt.

5.2.4 KGDHc und Neurodegeneration

Eine reduzierte zerebrale KGDHc-Aktivität wurde bei einigen neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson (PD; Mizuno *et al.* 1994; Mizuno *et al.* 1995) und Morbus Alzheimer (AD; Gibson *et al.* 1988) gezeigt. Vor kurzem konnte eine stark reduzierte KGDHc-Aktivität im Putamen von Patienten mit Morbus Huntington nachgewiesen werden (HD; Klivenyi *et al.* 2004). Interessanterweise besitzen diese Patienten neuropathologische Ähnlichkeiten mit GA I Patienten (Strauss und Morton 2003).

Genetische Studien konnten einen Zusammenhang zwischen einem Polymorphismus im *DLST* (codierend für die E2k)- oder im *DLD* (codierend für E3)-Gen und einer Prädisposition für die Manifestation von PD oder AD (Kobayashi *et al.* 1998; Sheu *et al.* 1999) zeigen.

Eine mögliche Verbindung zwischen reduzierter KGDHc-Aktivität und Neurodegeneration stellt erhöhter oxidativer Stress dar. Der KGDHc enthält ein labiles Fe-S Zentrum und ist so anfällig für eine große Anzahl an Oxidanzien wie 4-Hydroxy-2-Nonenal, H_2O_2 , NO, Peroxynitrit, Wasserstoffperoxid und Mono-*N*-Chloramine (Humphries und Szweda 1998; Jeitner *et al.* 2005; Kumar *et al.* 2003; Park *et al.* 1999).

Auch für die GCDH-Defizienz spielt dieser Zusammenhang möglicherweise eine Rolle. *In vitro*- und *in vivo*-Studien konnten eine verstärkte Formation von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies nach einer Inkubation mit GA oder 3-OH-GA zeigen (Latini *et al.* 2002; Kölker *et al.* 2001a; de Oliveira *et al.* 2003). Die reduzierten Glutathion-Konzentrationen in *Gcdh*^{-/-}-Mäusen unterstützen die Annahme von oxidativem Stress bei der GCDH-Defizienz. Dieser könnte die Inhibition des KGDHc durch Glutaryl-CoA amplifizieren und synergistisch den Flux durch den Citratzyklus reduzieren.

Sollte eine reduzierte KGDHc-Aktivität an der Neuropathogenese der GCDH-Defizienz beteiligt sein, wäre eine mit Thiamin und α -Lipoat supplementierte Diät in Verbindung mit weiteren Antioxidanzien wie α -Tocopherol und *N*-Acetylcystein ein potentieller Therapieansatz, um die KGDHc Funktion und den Glutathionspiegel wiederherzustellen.

5.2.4.1 Potentielle Mechanismen für eine neuronale Schädigung durch reduzierte KGDHc-Aktivität

Der exakte Mechanismus der neuronalen Schädigung durch eine Inhibition des KGDHc ist noch nicht vollständig geklärt. Eine *in vitro*-Studie konnte zeigen, dass eine partielle Inhibition des KGDHc durch α -keto- β -methyl-n-Valeriansäure eine Cytochrom *c*-Freisetzung, Caspase-3-Aktivierung und nekrotischen Zelltod induziert. Sie veränderte jedoch nicht das mitochondriale Membranpotential (Huang *et al.* 2003), wie bei einem Block im Energiestoffwechsel durch sukzessive ATP-Verarmung zu erwarten wäre.

Huang und Kollegen (2003) spekulierten, dass Thiolgruppen der KGDHc Untereinheiten die zelluläre antioxidative Kapazität und den Disulfid-Redox-Status über eine Thioredoxin vermittelte Kaskade unterstützen und somit ein Teil des antioxidativen Systems sind. Weiterhin postulieren sie eine funktionelle Kopplung zwischen der KGDHc Inhibition und dem Öffnen der mitochondrialen *permeability transition pore*. Diese wird unter anderem durch den Disulfid-Redox-Status reguliert (Bernadi *et al.* 1994; Chen *et al.* 2002).

Permeability transition beschreibt den Zustand einer erhöhten Permeabilität der Mitochondrien für Kationen und gelöste Moleküle bis zu einer Größe von 1500 Da unter Ca^{2+} -Akkumulation und oxidativem Stress/ verändertem Disulfid-Redox-Status. Als Ursache hierfür wird ein nicht-selektiver, spannungsabhängiger „Mega“-Kanal - *permeability transition pore* - angenommen. Dieser Kanal wechselt unter Standardbedingungen schnell zwischen offenem und geschlossenem Zustand. Ein veränderter Disulfid-Redox-Status führt dazu, dass die Pore länger geöffnet bleibt. Die genauen Implikationen dieses Effektes für das Mitochondrium und für neurodegenerative Mechanismen im Allgemeinen sind noch unbekannt. Als Folgen dieser verlängerten Öffnung konnten ein Ausstrom von Kationen (z.B. Ca^{2+}), Cytochrom *c* und Pyridinnukleotide (z.B. NAD^+) gezeigt werden. Der Ausstrom der Pyridinnukleotide führt möglicherweise dazu, dass diese nicht mehr als Elektronenakzeptoren für mitochondriale Dehydrogenasen (z.B. KGDHc) bereitstehen und so deren Aktivität beeinflussen. Knock Out-Mausmodelle, denen Proteine dieser Pore fehlten, waren weniger anfällig für nekrotischen aber unverändert anfällig für apoptotischen Zelltod (Übersicht Bernardi 1999; Chinopoulos und Adam-Vizi 2006).

Ein Zusammenhang von Thioredoxin und der Hemmung des KGDHc wird durch Thioredoxin-defiziente Mäuse unterstützt. Dieses Mausmodell weist die Symptome einer KGDHc-Inhibition auf (Tanaka *et al.* 2002).

Thioredoxin kann in der E3 Untereinheit verankert werden und so direkt mit der Lipoyl-Domäne der E2k Untereinheit interagieren (Bunik *et al.* 1997). Dies könnte ein zusätzlicher

Mechanismus gegen oxidativen Stress sein (Shi *et al.* 2005). Ein analoger Mechanismus wurde in *Mycobacterium tuberculosis* gezeigt (Bryk *et al.* 2002).

In Dihydrolipoamid-Dehydrogenase defizienten Mäusen wurde nachgewiesen werden, dass eine reduzierte Aktivität des KGDHc auch zu einer erhöhten Vulnerabilität der heterozygoten Tiere (*Dld*^{+/-}) für 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin, Malonat und 3-NPA (Klivenyi *et al.* 2004) führt. Zusätzlich konnte eine verringerte Komplex II-Aktivität in isolierten Mitochondrien dieser Mäuse gezeigt werden. Eine erniedrigte Komplex II-Aktivität in Hirnen von *Gcdh*^{-/-}-Mäusen konnte nicht nachgewiesen werden. Es ist jedoch anzumerken, dass die enzymatischen Analysen der Atmungsketteneinzelenzyme in Mausgeweben unter artifiziellen Bedingungen, d.h. mit einem Substratüberschuss und der direkten Ansteuerung einzelner Komplexe, durchgeführt worden ist (Kölker *et al.* 2003b; Okun *et al.* 2002). Dieser Ansatz erlaubt jedoch keine Aussagen über den sekundären Effekt (im folgenden Abschnitt beschrieben) einer reduzierten KGDHc-Aktivität auf den Komplex II *in vivo*.

5.2.4.2 Sekundäre Effekte einer KGDHc-Inhibition

Der KGDHc ist mit der inneren mitochondriale Membran auf der Matrixseite verbunden (Maas und Bisswanger 1990). Er bindet auch den Komplex I (Sumegi und Srere 1984) und kann so NADH direkt in diesen Komplex einspeisen. Weiterhin steuert er über die Bildung von Succinyl-CoA indirekt den Komplex II an, der Succinat zu Fumarat oxidiert. Deshalb könnte eine Inhibition der KGDHc-Aktivität sekundär die Aktivität der Komplexe I und II reduzieren (Jeitner *et al.* 2005). Neben einer sekundären Verringerung der Komplex I- und II-Aktivität, könnte sich eine Inhibition des KGDHc auch ungünstig auf die „Reservekapazität der Atmungskette“ auswirken. Die „Reservekapazität der Atmungskette“ beschreibt die Fähigkeit einer Zelle, sich durch Anheben des metabolischen Umsatzes auf schnelle Änderungen des metabolischen/ energetischen Bedarfs anzupassen. Sie berechnet sich aus dem Verhältnis von lokaler Expression der Atmungskettenkomplexe und Glukoseverbrauchsrate in einem Gewebe. Unter metabolischem Stress bildet eine Reduzierung der Reservekapazität der Atmungskette einen Risikofaktor für eine neuronale Schädigung in gefährdeten Regionen des Gehirns. Das Striatum, das vor allem bei der GCDH-Defizienz betroffen ist, gehört zu den *zerebralen* Strukturen mit den geringsten Reservekapazitäten für die Komplexe I und II (Fern 2003).

5.2.5 Potentielle Rolle der KGDHc Hemmung *in vivo*

Interessanterweise sind erhöhte α -Ketoglutaratwerte im Urin, wie sie bei einer KGDHc-Defizienz (ein angeborener Defekt der E1k) zu finden sind, bei GCDH-defiziente Patienten kein „Standardmarker“ der Erkrankung. Vielmehr konnten erhöhte Konzentrationen von α -Ketoglutarat vor allem nach einer metabolischen Dekompensation nachgewiesen werden (Lindner *et al.* 2004). Dies deutet daraufhin, dass sich der Effekt der gefundenen Inhibition des KGDHc in einer Analogie zu seiner zweifachen Funktion - Enzym im Metabolismus und im Disulfid-Redox-Status - in zwei Komponenten aufteilt. Zum einen könnte eine reduzierte KGDHc-Aktivität als erste Komponente eine Reduktion der antioxidativen Kapazität und Veränderung des Disulfid-Redox-Status zur Folge haben. Zum anderen könnte sich eine zweite Komponente in Phasen eines erhöhten Energiebedarfs, wie einer fiebrigen Infektion, die zu einer katabolen Stoffwechsellage führen, manifestieren. Stoffwechselaktive Organe wie die Leber besitzen relativ große Reservekapazitäten der Atmungskette und können auf diesen erhöhten Bedarf reagieren. Das Gehirn und besonders die glutamaterge Neurotransmission besitzt jedoch einen sehr hohen Energiebedarf bei einer gleichzeitig geringen Reservekapazität der Atmungskette. In einer katabolen Stoffwechsellage könnte die Inhibition des KGDHc im Gehirn direkt über eine Reduzierung des Flusses durch den Citratzyklus und indirekt durch die Reduzierung der bioenergetischen Reservekapazitäten zu einem Ungleichgewicht des mitochondrialen Energiestoffwechsels führen. Ein solcher Effekt würde durch die Tatsache verstärkt, dass der KGDHc das langsamste und somit das geschwindigkeitsbestimmende Enzym des Citratzyklusses ist.

In diesem Zusammenhang ist auch ein Mausmodell zu sehen, in dem durch eine thiaminfreie Diät eine KGDHc Hemmung untersucht wurde (Gibson *et al.* 2005). In Mäusen mit thiaminfreier Diät konnte nur ein neuronaler Zelltod gezeigt werden. Mikroglia, Astrozyten und Endothelzellen waren hingegen nicht beeinflusst und wiesen sogar eine erhöhte KGDHc-Aktivität auf. Dies könnte darauf hinweisen, dass eine KGDHc Hemmung vor allem neuronale Zellen betrifft, andere Zelltypen jedoch nicht oder nur gering und deshalb vornehmlich eine neuronale Schädigung erzeugt.

5.2.6 Limitierung des Zeitraums einer enzephalopathischen Krise bei GCDH-defizienten Patienten durch den KGDHc

Der KGDHc zählt zu den postnatalen Spätentwicklern unter den Citratzyklus Enzymen. Im Striatum der Ratte steigt die KGDHc-Aktivität zwischen dem 10. und 17. postnatalen Tag an und erreicht das adulte Level am 30. postnatalen Tag (Buerstatte *et al.* 2000). Die späte Hochregulation der KGDHc-Aktivität während der postnatalen Entwicklung erhöht die Ansprechbarkeit auf eine Glutaryl-CoA induzierte Inhibition während dieser Periode. Dies kann ein relevanter Risikofaktor für das Auftreten einer akuten enzephalopathischen Krise sein, die bei GA I Patienten exklusive in der frühen Kindheit auftritt.

5.2.7 Leichte Hemmung des BCKDHc durch Glutaryl-CoA

Die Hemmung des BCKDHc fiel im Vergleich zu dem KGDHc deutlich schwächer aus, war jedoch stärker ausgeprägt als die Inhibition des PDHc (Mittelwert: KGDHc: 31,80 %; BCKDHc: 44,98 %; PDHc: 64,24 % der Kontrollaktivität bei 1 mM Glutaryl-CoA). Die Tatsache, dass vor allem GA zu einer Steigerung der messbaren Enzymaktivität führte, spricht dafür, dass diese Dicarbonsäure ein Substrat des Komplexes ist. Folglich scheint die Inhibition des BCKDHc in Analogie zum KGDHc zu stehen und auf einer Produkt-Feedback-Hemmung des Ek2 zu beruhen.

Die pathophysiologische Rolle dieses Effektes bleibt allerdings fraglich. Vor allem die bioenergetischen Eigenschaften dieses Enzyms machen eine Beteiligung dieses Effektes am Pathomechanismus der GCDH-Defizienz unwahrscheinlich, da der BCKDHc eine hohe gewebespezifische Reservekapazität besitzt (Harris *et al.* 2005). Das Enzym liegt unter Standardbedingungen, d.h. einer ausgeglichenen Stoffwechsellage, zu einem Teil phosphoryliert, also inaktiv vor. Auf erhöhte verzweigtkettige Aminosäure-Konzentrationen kann die Zelle mit einer Dephosphorylierung des Enzyms und somit Mobilisierung der enzymatischen Reserven antworten. Es ist anzunehmen, dass dieser Mechanismus auch die Hemmung des Komplexes durch Glutaryl-CoA zumindest partiell ausgleichen kann.

Ferner sind die höchsten Konzentrationen des BCKDHc im Skelettmuskel zu finden (Brosnan und Brosnan 2006), in dem jedoch nur relativ geringe GA-Konzentrationen bei der *Gcdh*^{-/-}-Maus nachgewiesen wurden.

Außerdem ist der BCKDHc nur indirekt über die Einspeisung der Abbauprodukte des verzweigtkettigen Aminosäurenstoffwechsels in die β -Oxidation mit dem Energiestoffwechsel verbunden, der KGDHc hingegen ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym des

Citratzyklusses. Eine Verbindung zwischen Disulfid-Redox-Status/ antioxidativer Kapazität und BCKDHc (wie für den KGDHc gezeigt), ist nicht bekannt.

Eine *in vivo* Inhibition des BCKDHc würde zudem zu einer Akkumulation der verzweigtkettigen Aminosäuren im Plasma führen. Dies ist jedoch charakteristisch für die Ahornsirupkrankheit (MSUD), die durch einen Defekt des BCKDHc gekennzeichnet ist. GCDH-defiziente Patienten weisen auch während einer enzephalopathischen Krise normale Plasmakonzentrationen dieser Aminosäuren auf.

5.2.8 Schwache Hemmung des PDHc durch Glutaryl-CoA

Die Hemmung der PDHc-Aktivität war im Vergleich zur Hemmung des KGDHc und der BCKDHc wesentlich schwächer ausgeprägt. Welche Bedeutung die leichte Hemmung des PDHc für die Pathophysiologie der GCDH-Defizienz besitzt, bleibt aufgrund der geringen Effektstärke fraglich. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass dieser Effekt bei erschöpften Reserven der Atmungskette eine amplifizierende Rolle spielt. Die Hemmung der PDHc lässt sich in Analogie zu KGDHc und BCKDHc durch Produkt-Feedback-Inhibition erklären. Akkumulierendes Acetyl-CoA hemmt die PDHc-Aktivität (Pettit *et al.* 1975) und reguliert so den Fluss des Glykolyse-Endprodukts Pyruvat in den Citratzyklus. Auch für andere kurzkettige CoA-Ester konnte ein hemmender Einfluss auf die PDHc gezeigt werden (Brock und Buckel 2004; Schwab *et al.* 2006).

5.2.9 Einfluss von Glutaryl-CoA auf CS, MDH, IDH und Fumarase

Die Hemmung der CS durch Glutaryl-CoA war sehr gering und daher wahrscheinlich nicht von pathophysiologischer Bedeutung. Sie könnte durch eine Konkurrenz von Glutaryl-CoA mit Acetyl-CoA (mit Oxalacetat das physiologische Substrat des Enzyms) um die Substratbindungsstelle entstehen. Die apparente Inhibition der MDH und Fumarase ist ein Artefakt und liegt in der Hemmung der CS begründet. Da das Gleichgewicht der MDH katalysierten Reaktion die Bildung von Malat favorisiert, führt der Anstau von Oxalacetat durch eine Hemmung der CS in diesem artifiziellen System zu einer sekundären Inhibition der MDH durch Glutaryl-CoA. Für die Fumarase gilt dasselbe Prinzip, da die Aktivität dieses Enzyms im verwendeten Assay nur indirekt über MDH-Aktivität gemessen wird.

5.2.10 Störung der mitochondrialen β -Oxidation

Es konnte gezeigt werden, dass vor allem die mitochondriale β -Oxidation langkettiger Fettsäuren bei *Gcdh*^{-/-}-Mäusen leicht reduziert ist. Ein direkter Einfluss von GA, 3-OH-GA und Glutaryl-CoA auf die Scad-, Mcad-, oder Vlcad-Aktivität konnte jedoch ausgeschlossen werden. Dieses Ergebnis schließt eine Erniedrigung der Enzymaktivitäten in *Gcdh*^{-/-}-Mäusen durch eine Akkumulation von GA, 3-OH-GA und Glutaryl-CoA in der Probe aus. Es deutet vielmehr darauf hin, dass es sich um einen regulatorischen Effekt handelt.

Die pathophysiologische Relevanz dieses Effektes ist nicht eindeutig. Ein möglicher Link zwischen der verringerten Vlcad-Aktivität und der *Gcdh*-Defizienz liegt im inhibitorischen Potential der langkettigen Acyl-CoA-Ester, besonders Palmitoyl-CoA. Es konnte eine hemmende Wirkung dieser Acyl-CoA-Ester auf den Energiemetabolismus einschließlich KGDHc (Lenartowicz und Olson 1978), PDHc (Butterworth *et al.* 1975) und Komplex I (Ventura *et al.* 1996) beschrieben werden. Rhabdomyolyse, eine charakteristische Komplikation von langkettigen Fettsäureoxidationsstörungen, wurde während einer akuten Krise in zwei Patienten mit einer GCDH-Defizienz beschrieben (Wilson *et al.* 1999; Chow *et al.* 2003). Eine Fettinfiltration der Leber konnte in *post mortem*-Untersuchungen nach tödlichen Krisen gefunden werden (Bennet *et al.* 1986; Goodman *et al.* 1977).

Eine sekundäre Carnitin-Depletion infolge einer verstärkten Glutarylcarnitin Ausscheidung über den Urin könnte die Oxidation langkettiger Fettsäuren weiter ins Ungleichgewicht bringen.

Einen anderen Erklärungsansatz bietet die Metabolontheorie (Eaton *et al.* 2000). Die Metabolontheorie beschreibt den Aufbau der β -Oxidation nicht als eine Aneinanderreihung einzelner Enzyme, sondern als einen „Super“-Komplex aus einzelnen Enzymen, in dem die Intermediate in „Kanälen“ zwischen den einzelnen Enzymen fließen. Diese Theorie basiert auf der Tatsache, dass unter normalen Bedingungen nur geringe Spuren der Intermediate der β -Oxidation messbar sind. Da der Abbau von L-Lysin, L-Hydroxylysin und L-Tryptophan auf Ebene der GCDH in die β -Oxidation mündet, lässt sich spekulieren, dass die GCDH ein Teil dieses Metabolons bildet. Eine Defizienz oder eine nicht funktionierende GCDH könnte den Fluss in diesem Metabolon behindern. Die Tatsache, dass alle drei Enzyme - Scad, Mcad und Vlcad - eine reduzierte Aktivität aufweisen, könnte anhand dieser Theorie erklärt werden.

Ein FAD-Mangel in *Gcdh*^{-/-}-Maus Leberhomogenaten, der den gleichen Effekt hätte, kann in diesem artifiziellen System durch die Überschusskonzentration an FAD im Puffer ausgeschlossen werden.

5.2.11 Verringerte Glutathion-Konzentrationen in *Gcdh*^{-/-}-Mäusen

Im Hirngewebe von *Gcdh*^{-/-}-Mäusen wurden erniedrigte Glutathion-Konzentrationen nachgewiesen. Dieser Befund unterstützt die *in vitro* und *in vivo* gefundenen Hinweise auf oxidativen Stress (Kölker *et al.* 2001a; Latini *et al.* 2002; Kölker *et al.* 2001c) als wichtige Größe in der Pathogenese der GCDH-Defizienz. Interessanterweise konnten auch im Leberhomogenat von *Gcdh*^{-/-}-Mäusen reduzierte Glutathion-Konzentrationen gefunden werden. Da in diesem Organ keine exzitotoxischen Prozesse stattfinden, könnte dieses Ergebnis ein Hinweis auf eine Störung des mitochondrialen Energiestoffwechsels aufgrund einer Inhibition des KGDHc durch Glutaryl-CoA und der daraus resultierenden ROS-Bildung sein.

5.2.12 Zusammenfassung des bioenergetischen Teils

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass eine Inhibition des Citratzyklus auf Ebene der KGDHc als amplifizierende Größe in einem exzitotoxischen Schädigungsmodell für die GCDH-Defizienz eine wichtige Rolle spielen könnte. Weiterhin könnte dieser Effekt sowohl durch eine milde Inhibition des BCKDHc und PDHc als auch durch eine Reduktion der β -Oxidationsaktivität verstärkt werden.

5.3 Biochemische Untersuchungen zur GCDH-Defizienz

Das Ziel der biochemischen Studien zur GCDH-Defizienz war es, gewebespezifische Konzentrationen und BBB-Permeabilität von pathologisch relevanten Metaboliten der GCDH-Defizienz zu untersuchen. In diesem Zusammenhang sind die gewebespezifischen Konzentrationen von GA und 3-OH-GA in *Gcdh*^{-/-}-Mäusen, *hepatozytären Gcdh*^{-/-}-Mäusen und nach intraperitonealer Injektion in C57Bl/6-Mäusen gemessen worden. Weiterhin wurde der Transport dieser beiden organischen Säuren über kapilläre Endothelzellen aus Schweinehirn untersucht.

5.3.1 Zerebrale Akkumulation von GA und 3-OH-GA in der GCDH-Defizienz

Die wichtigsten Ergebnisse dieser Untersuchung waren: 1) ein äquimolarer Anstieg *zerebraler* und *hepatischer* GA- und 3-OH-GA-Konzentrationen in *Gcdh*^{-/-}-Mäusen bei gleichzeitig deutlich geringeren Serumkonzentrationen, 2) ein großer Unterschied in Leber- und Hirnkonzentrationen von GA in *hepatozytären Gcdh*^{-/-}-Mäusen und von GA und 3-OH-GA nach intraperitonealer Injektion ihrer deuterierten Isotope und 3) eine geringe Permeabilität kultivierter BCEC für GA und 3-OH-GA (Efflux > Influx).

5.3.2 Zerebrale GA- und 3-OH-GA-Konzentrationen stehen in keinem Zusammenhang mit GCDH-Aktivität oder den Konzentrationen im Serum

5.3.2.1 Post mortem-Untersuchungen

Post mortem-Studien und eine Hirnbiopsie in neun Patienten, die keine strenge oder keine Therapie erhalten haben, wurden publiziert (Goodman *et al.* 1977; Leibel *et al.* 1980; Funk *et al.* 2005; Kulkens *et al.* 2005). Die biochemische Analyse von insgesamt sieben der genannten Patienten wurde vom Autor der vorliegenden Arbeit durchgeführt (Funk *et al.* 2005; Kulkens *et al.* 2005). Diese Patienten besaßen *zerebrale* Konzentrationen der GA (Bereich 500-5,000 μM , Mittelwerte 1750 μM) und 3-OH-GA (Bereich 40-200 μM , Mittelwert 80 μM), die den *zerebralen* Konzentrationen von *Gcdh*^{-/-}-Mäusen (GA: $1,686 \pm 206 \mu\text{M}$; 3-OH-GA: $78 \pm 11 \mu\text{M}$) glichen (Tabelle 12). Dieses Ergebnis unterstreicht die Eignung der *Gcdh*^{-/-}-Maus zur biochemischen Beschreibung der GCDH-Defizienz.

Tabelle (12) Zerebrale GA und 3-OH-GA Konzentrationen in *post mortem*-Untersuchungen und einer Hirnbiopsie von GA I Patienten im Vergleich zu *Gcdh*^{-/-}-Mäusen. Die Konzentrationen sind angegeben als Mittelwert in μM (unter der Annahme eines zerebralen Proteingehaltes von 12 % und eines Wassergehaltes von 80 %). *Patienten wurden mit einer streng L-Lysinrestringierten und L-Tryptophan reduzierten Diät behandelt und hatten ein gutes biochemisches Ansprechverhalten auf diese Diät in Urin und Plasma. BG, Basalganglien; C, frontaler Cortex; HE, „high excretor“; LE, „low excretor“; n.d., nicht gemessen.

Referenz	Post mortem Studien					Hirn- biopsie	<i>Gcdh</i> ^{-/-} Mäuse
	Goodman <i>et al.</i> (1977)	Leibel <i>et al.</i> (1980)	Bennett <i>et al.</i> (1986)	Kölker <i>et al.</i> (2003)	Funk <i>et al.</i> (2005)	Külkens <i>et al.</i> (2005)	
Anzahl	n=1	n=1	n=1	n=1	n=6	n=1	n=13
Biochemischer Phänotyp	HE	HE	HE	HE	LE	HE	HE
GA (μM)	1040 ^(C)	840 ^(C) , 1250 ^(BG)	39 ^{(C)*}	5 ^{(C)*} , 9 ^{(BG)*}	876 ^(C) , 1070 ^(BG)	5,280 ^(C)	1,686
3-OH-GA ($\mu\text{mol/L}$)	n.d.	n.d.	n.d.	7 ^{(C)*} , 7 ^{(BG)*}	46 ^(C) , 59 ^(BG)	198 ^(C)	78

Eine Evaluation biochemischer Daten von über 200 Patienten ergab, dass die GA- und 3-OH-GA-Konzentrationen in Plasma und Urin negativ mit der residualen GCDH-Aktivität in Fibroblasten und Leukozyten korreliert (Christensen *et al.* 2004). Da das Lebergewebe die höchste spezifische GCDH-Aktivität aufweist, (McMillan *et al.* 1988; Reichmann *et al.* 1988; Woontner *et al.* 2000; Koeller *et al.* 2002) liegt es nahe, dass die biochemischen Unterschiede dieser Untergruppen in Plasma und Urin die residuale *hepatische* GCDH-Aktivität widerspiegeln. Unerwarteterweise ergaben die *post mortem*-Untersuchungen an GA I Patienten jedoch ähnliche *zerebrale* GA- und 3-OH-GA-Konzentrationen in „*high*“ und „*low excretors*“ (Goodman *et al.* 1977; Leibel *et al.* 1980; Funk *et al.* 2005; Külkens *et al.* 2005). Besonders deutlich wurde dieser Befund in einer Gruppe von „*low excretors*“ - den kanadischen *Oji-Cree*-Indianern (Funk *et al.* 2005), die ähnliche *zerebrale* Konzentrationen wie „*high excretors*“ aufwiesen.

Zerebrale GA- und 3-OH-GA-Konzentrationen scheinen folglich unabhängig von der *hepatischen* GCDH-Aktivität zu sein. Diese Hypothese wird auch durch das Fehlen neurologischer Symptome in einem natürlichen Modell der *hepatischen* GCDH-Defizienz, *Rousettus aegypticus* (McMillan *et al.* 1988), unterstützt. Weiterhin konnte keine Korrelation zwischen Genotyp oder residualer GCDH-Aktivität und dem klinischen Phänotyp in Patienten mit GCDH-Defizienz gefunden werden (Christensen *et al.* 2004). Da GA und 3-OH-GA postulierte endogene Neurotoxine (Kölker *et al.* 2004a; Sauer *et al.* 2005, 2006) sind, könnten gleiche *zerebrale* Konzentrationen der GA und 3-OH-GA in „*high*“ und „*low excretors*“ eine Erklärung für die klinische Ähnlichkeit beider Untergruppen sein.

5.3.2.2 Gewebespezifische Verteilung von GA, 3-OH-GA und Glutarylcarnitin bei der *Gcdh*^{-/-}-Maus

Die Untersuchung der gewebespezifischen Verteilung der GA- und 3-OH-GA-Konzentrationen in *Gcdh*^{-/-}-Mäusen ergab hohe Konzentrationen dieser beiden Dicarbonsäuren im Lebergewebe und geringe Konzentrationen in Herz- und Skelettmuskel. Dieses Ergebnis spiegelt die spezifischen Unterschiede in der *Gcdh*-Expression wieder (Woontner *et al.* 2000). Unerwarteterweise waren jedoch die Konzentrationen dieser organischen Säuren in Leber und Gehirn fast äquimolar, obwohl die *zerebrale* *Gcdh*-Expression (Woontner *et al.* 2000) und die *zerebrale* *Gcdh*-Aktivität (Tabelle 5) im Vergleich zur Leber sehr gering war. Der Vergleich der Gehirn- und Serumkonzentrationen in *Gcdh*^{-/-}-Mäusen von GA- und 3-OH-GA zeigte einen hohen Konzentrationsgradienten (Gehirn >> Serum). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den *post mortem*-Untersuchungen bei GA I Patienten.

Die Analyse der Glutarylcarnitin-Konzentrationen von *Gcdh*^{-/-}-Mäusen weisen auf eine metabolische Schwachstelle des Gehirns hin. Die *zerebralen* Glutarylcarnitin-Konzentrationen waren ungefähr zehnmal niedriger als in Leberhomogenat. Diese niedrigen Konzentrationen deuten eine geringe *zerebrale* Kapazität zur Carnitinkonjugation und damit geringere Detoxifikationsmöglichkeiten für akkumulierende GA an. Das reduzierte freie Carnitin in Gehirnhomogenaten von *Gcdh*^{-/-}-Mäusen bei gleichzeitig leicht erhöhten Konzentrationen im Lebergewebe verdeutlicht die unterschiedliche Kapazität der Carnitinkonjugation von Gehirn und Leber. Unter metabolischem Stress durch akkumulierende GA kann die Leber mehr freies Carnitin für die Konjugation bereitstellen. Der Pool an freiem Carnitin im Gehirn ist jedoch unter dieser Belastungssituation relativ begrenzt und verarmt.

Erhöhte Glutarylglycin-Konzentrationen im Urin der *Gcdh*^{-/-}-Maus deuten an, dass die Glycinkonjugation eine alternative Detoxifikationsstrategie für Glutaryl-CoA in *Gcdh*^{-/-}-Mäusen ist.

5.3.3 Streng limitierter Transport von GA und 3-OH-GA über die BBB

5.3.3.1 Hepatozytäre *Gcdh*^{-/-}-Maus

Um die Produktion und den Transport von GA und 3-OH-GA zu beschreiben, ist eine *hepatozytäre Gcdh*^{-/-}-Maus generiert worden. Diese Mäuse wiesen signifikant erhöhte GA-, 3-OH-GA- und Glutarylcarnitin-Konzentrationen in Leber, Gehirn, Urin auf. Im Serum war nur GA und Glutarylcarnitin erhöht. Der Vergleich der Serum- und Hirnkonzentrationen ergab,

dass GA limitiert über die BBB in das Gehirn eintreten kann. Im Gegensatz zur *Gcdh*^{-/-}-Maus zeichnete sich die *hepatozytäre Gcdh*^{-/-}-Maus jedoch durch einen starken Konzentrationsunterschied zwischen Leber- und Hirngewebe für GA und 3-OH-GA aus. Dieser starke Konzentrationsunterschied widerspricht der Hypothese einer *zerebralen* Anreicherung von GA und 3-OH-GA aus der systemischen Zirkulation als Mechanismus für die stark erhöhten Konzentrationen im Gehirn von GA I Patienten und *Gcdh*^{-/-}-Mäusen. Während *Gcdh*^{-/-}-Mäuse äquimolare Konzentrationen beider Dicarbonsäuren in Leber- und Gehirnhomogenaten besaßen, konnten bei *hepatozytären Gcdh*^{-/-}-Mäusen nur weniger als 4 % der hepatischen GA-Konzentrationen im Hirngewebe gefunden werden. Ein unerwarteter Befund war, dass die *zerebralen* 3-OH-GA-Konzentrationen im Vergleich zum Leberhomogenat stärker erhöht waren als die GA-Konzentrationen, obwohl 3-OH-GA im Serum nicht detektierbar war. Da die Hirne vor der Entnahme perfundiert worden sind, ist eine Kontamination mit Blut unwahrscheinlich. Es kann postuliert werden, dass 3-OH-GA im Gehirn aus GA *de novo*-synthetisiert worden ist und daher relativ zur Leber stärker erhöht ist als GA.

Da die GA-, 3-OH-GA- und Glutarylcaritin-Konzentrationen bei der *hepatozytären Gcdh*-Defizienz kleiner als 50 % der Konzentrationen einer systemischen *Gcdh*-Defizienz sind, kann postuliert werden, dass *extrahepatisches* Gewebe an der systemischen Akkumulation dieser Metabolite beteiligt ist. Dies entspricht genetischen Analysen, in denen u.a. auch eine hohe *Gcdh*-Expression in der Niere festgestellt werden konnte (Woontner *et al.* 2000).

5.3.3.2 Intraperitoneale Injektion von deuterierter GA und 3-OH-GA

Um die Spezifität der Untersuchungen zum Transport von GA und 3-OH-GA zu erhöhen, wurde C57Bl/6-Mäusen deuterierte GA und 3-OH-GA intraperitoneal injiziert. Während hohe Konzentrationen beider Metabolite in Leber und Serum eine Stunde nach der Injektion nachweisbar waren, blieben die *zerebralen* Konzentrationen sehr niedrig. Da keine Konzentrationsunterschiede in verschiedenen Hirnregionen gefunden wurden, kann angenommen werden, dass es für diesen Transport keine arealspezifischen Unterschiede gibt. Der Vergleich der Serum-, Leber- und Gehirnkonzentrationen beider Dicarbonsäuren zeigte, dass nur ein geringer Bruchteil der Serumkonzentrationen (< 20 %) und der Leberkonzentrationen (< 9 %) im Gehirn zu finden waren. Dies weist auf einen streng limitierten Transport beider Dicarbonsäuren über die BBB ins Gehirn hin.

Die rasche Abnahme der d₄-GA- und d₅-3-OH-GA-Konzentrationen in Leber und Serum nach einer Stunde deuten auf einen effektiven Exportmechanismus aus der Leber über das Serum

und die Niere hin. Die geringeren Konzentrationen von d₄-GA bei gleich hoch eingesetzter Konzentration wie bei d₅-3-OH-GA sind darauf zurückzuführen, dass d₄-GA teilweise verstoffwechselt werden kann. Die kurzfristig hohe eingesetzte Menge überschreitet jedoch die zelluläre Kapazität für diesen Abbau und sorgt dafür, dass genügend d₄-GA für die Transportuntersuchungen bereitsteht. Für 3-OH-GA ist kein abbauendes Enzym bekannt, folglich bleiben die Konzentrationen höher und die Konzentrationsabnahme über die Zeit ist nur auf Exportmechanismen zurückzuführen.

5.3.3.3 Untersuchungen zum Transport von GA und 3-OH-GA über BCEC

Die Untersuchungen zur Herkunft zerebraler GA und 3-OH-GA an beiden Mausmodellen legten einen stark limitierten Transport von GA und 3-OH-GA über die BBB nahe. Da die gemessenen zerebralen Konzentrationen in beiden Experimenten sehr niedrig waren und am unteren Detektionslimit der Methode lagen, bestand jedoch die Gefahr den Transport noch zu überschätzen. Deshalb wurde der Transport von d₄-GA und d₅-3-OH-GA über kultivierte *zerebrale* kapilläre Endothelzellen aus Schweinhirn als Modellsystem für die BBB untersucht. Es konnte weder ein relevanter Influx noch Efflux dieser beiden Dicarbonsäuren über den Monolayer nachgewiesen werden. Die Permeabilitätskoeffizienten beider Dicarbonsäuren lagen sowohl für den Influx als auch für den Efflux nur minimal über dem Permeabilitätskoeffizienten des Carboxyfluoresceins. Für diesen *para*-zellulären Marker sind keine Transporter bekannt. Auch in andere Studien wurde ein stark limitierter Flux von Dicarbonsäuren über die BBB (Hassel *et al.* 2002) beobachtet.

Eine Beteiligung des OAT3 am Transport von GA und 3-OH-GA über die BBB konnte nicht eindeutig geklärt werden. Es wurde zwar eine leichte Erhöhung des Effluxes durch basolateral applizierte PAH und eine Umkehrung des Effektes durch apical applizierte PAH nachgewiesen, jedoch ist dieser Effekt relativ klein und seine physiologische Relevanz daher fraglich. Auch die Tatsache, dass der OAT3 vor allem im proximalen tubulären Epithelium und im *Plexus choroideus* exprimiert (Ohtsuki *et al.* 2002; Sweet *et al.* 2003) wird, macht seine Rolle im quantitativen Effluxtransport von Dicarbonsäuren wie GA und 3-OH-GA über die BBB unsicher. Weiterhin koppelt der vom OAT3 katalysierte Mechanismus den Einstrom einer organischen Säure (z.B. PAH) an den Ausstrom der Dicarbonsäure aus der Zelle (Kikuchi *et al.* 2003; Ohtsuki *et al.* 2002; Sweet *et al.* 2003). Ein effektiver OAT3-vermittelter Efflux über die BBB würde also zuerst einen Influx Transporter für die Dicarbonsäure in die Endothelzelle notwendig machen. Ein solcher ist jedoch noch nicht bekannt.

Ein weiterer Faktor der gegen einen effektiven Influx ins Gehirn spricht, ist der hohe GA und 3-OH-GA Gradient von der Gehirn- zur Blutseite, wie in *Gcdh*^{-/-}-Mäusen und humanen Patienten mit einer GCDH-Defizienz gezeigt werden konnte. Die treibende Kraft eines solchen Influxes ist aufgrund dieses Gradienten als sehr gering zu betrachten. Diese Annahme wird durch das Experiment unter pathophysiologischen Bedingungen – also ein hoher Konzentrationsgradient zwischen Gehirn und Blut - an den BCEC unterstrichen. Die Influxraten beider Dicarbonsäuren ins Gehirn fielen in diesem Experiment im Vergleich zu einer alleinigen Applikation von ihnen auf der Blutseite ab.

5.3.4 Keine schädigende Wirkung der GA und 3-OH-GA auf die BBB

Im Rahmen dieser Arbeit konnten keine Hinweise auf eine toxische Wirkung von GA oder 3-OH-GA auf die BBB *in vitro* oder *in vivo* gefunden werden. Eine eineinhalbstündige Inkubation der BCEC mit 3-OH-GA oder GA veränderte die Intaktheit des Monolayers nicht. Eine chronische Schädigung durch GA oder 3-OH-GA erscheint in Anbetracht des hohen Gehirn/ Serumkonzentrationsgradienten bei der *Gcdh*^{-/-}-Maus und GA I Patienten unwahrscheinlich.

Im Gegensatz hierzu konnten Mühlhausen und Kollegen (2006) zeigen, dass sehr hohe 3-OH-GA-Konzentrationen die Angiogenese humaner, dermaler, mikrovaskulärer Endothelzellen störte. Als kritisch anzusehen sind bei dieser Arbeit jedoch die sehr hoch gewählten 3-OH-GA-Konzentrationen (2-6 mM) für die Belastung der Zellen. Konzentrationen in diesem Bereich konnten weder im Mausmodell ($78 \pm 11 \mu\text{M}$) noch bei humanen GA I Patienten (20 - 200 μM) gefunden werden. In einem pathophysiologisch relevanten Konzentrationsbereich wurde in der Studie von Mühlhausen und Kollegen (2006) hingegen kein schädigender Effekt nachgewiesen. Ein weiterer Kritikpunkt ist die Wahl des Testsystems. Die kapillären Endothelzellen der BBB sind in Bezug auf ihre Membraneigenschaften, Expression von Transportern und Stoffwechselwege einzigartig (Ribatti *et al.* 2006). Ob Aussagen über humane, dermale, mikrovaskulärer Endothelzellen direkt auf die kapillären Endothelzellen der BBB übertragbar sind, scheint folglich fraglich.

5.3.5 Zusammenfassung des biochemischen Teils

Die limitierende Größe des Transportes von Metaboliten in das Gehirn, ist die BBB. Die BBB sichert und reguliert die Zufuhr von Nährstoffen aus der systemischen Zirkulation und isoliert das Gehirn vor Toxinen. Die BBB weist jedoch zwei Schwachstellen auf:

- 1) eine Sättigung des Aminosäuretransports und eine Konkurrenz zwischen den Substraten machen das Gehirn verwundbar gegenüber großen Ungleichgewichten in den Plasmakonzentrationen von Aminosäuren, wie bei der Phenylketonurie (Pietz *et al.* 1999).
- 2) eine pathologisch erhöhte *zerebrale de novo*-Synthese von nicht permeablen hydrophilen Metaboliten fördert deren *zerebrale* Akkumulation. Der zweite Mechanismus scheint für die Pathogenese der GCDH-Defizienz von Bedeutung.

Für GA I Patienten wurde gezeigt, dass:

- es keine Korrelation zwischen *hepatischer* GCDH-Aktivität und *zerebralen* GA- und 3-OH-GA-Konzentrationen gibt.
- es einen starken Konzentrationsgradienten zwischen Gehirn- und Serumkonzentrationen (Gehirn >> Serum) von GA und 3-OH-GA gibt.
- es keine Korrelation zwischen peripheren GA- und 3-OH-GA-Konzentrationen und klinischem Phänotyp gibt.

In der vorliegenden Arbeit ist gezeigt worden, dass:

- es einen starken Konzentrationsgradienten zwischen Gehirn- und Serumkonzentrationen (Gehirn >> Serum) von GA und 3-OH-GA bei *Gcdh*^{-/-}-Mäusen gibt.
- die GA- und 3-OH-GA-Konzentrationen in Leber- und Gehirnhomogenaten von *Gcdh*^{-/-}-Mäusen äquimolar sind, obwohl die *zerebrale* Gcdh-Aktivität deutlich niedriger als die *hepatische* ist.
- eine *hepatozytäre* Gcdh-Defizienz nicht ausreicht, um die massiv erhöhten *zerebralen* Konzentrationen beider Dicarbonsäuren von *Gcdh*^{-/-}-Mäusen zu erreichen.
- der Transport von GA und 3-OH-GA über die BBB *in vivo* und *in vitro* streng limitiert ist.
- GA und 3-OH-GA die BBB in pathophysiologisch relevanten Konzentrationen nicht schädigt.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass diese Faktoren für eine *zerebrale de novo*-Synthese und anschließendes *intrazerebrales Trapping* von GA und 3-OH-GA sprechen. Die Hypothese von Strauss und Morton (2003) einer zerebralen Anreicherung von GA und 3-OH-GA aus der systemischen Zirkulation erscheint jedoch unwahrscheinlich. Ferner ist festzuhalten, dass die bei *Gcdh*^{-/-}-Mäusen und GA I Patienten nachgewiesenen GA- und 3-

OH-GA-Konzentrationen in *in vitro*- und *in vivo*-Modellen neurotoxische Effekte erzeugt haben (Kölker *et al.* 2004a). Folglich können die Ergebnisse dieser Arbeit die Rolle eines exzitotoxischen Schädigungsmechanismus in der Pathogenese der GCDH-Defizienz bestärken.

5.4 Synopsis eines potentiellen Pathomechanismus

5.4.1 Der zerebrale Energiemetabolismus

Wie diese Studie und andere Studien zeigen konnten, beeinträchtigen akkumulierende GA-, 3-OH-GA- und Glutaryl-CoA-Konzentrationen den *zerebralen* Energiemetabolismus durch:

- (1) die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren verbunden mit einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen und der Bildung von ROS durch 3-OH-GA (De Mello *et al.* 2001; Flott-Rahmel *et al.* 1997; Kölker *et al.* 2000a; Kölker *et al.* 2001a,b; Kölker *et al.* 2002a; Kölker *et al.* 2004a; Latini *et al.* 2002; Rosa *et al.* 2004; Ullrich *et al.* 1999),
- (2) die Inhibition des KGDHc und zu einem geringeren Ausmaß des BCKDHc und PDHc (Sauer *et al.* 2005) durch Glutaryl-CoA,
- (3) die Depletion des intrazellulären Kreatinphosphatpools durch 3-OH-GA (Ulrich *et al.* 1999),
- (4) die Inhibition der synaptosomalen Glutamataufnahme durch GA (Bennett *et al.* 1973; Porciuncula *et al.* 2000),
- (5) die Inhibition der GABA Synthese durch GA und 3-OH-GA (Stokke *et al.* 1976) und
- (6) die Inhibition der Na^+/K^+ -ATPase durch GA (Kölker *et al.* 2002b).

In einer alternativen, aber noch nicht experimentell überprüften Hypothese wurde Chinolinsäure, ein Metabolit des Kynureninstoffwechselweges im Abbau von L-Tryptophan und bekannter Agonist des NMDA-Rezeptors, als endogenes Toxin in der Neurodegeneration der GCDH-Defizienz postuliert. (Heyes 1987; Varadkar und Surtees 2004).

Es kann angenommen werden (Kölker *et al.* 2004a; Sauer *et al.* 2006), dass die beschriebenen Einzeleffekte vor allem während einer stark energieverbrauchenden Überstimulation der glutamatergen Neurotransmission konvergieren und sich synergistisch amplifizieren.

5.4.2 Bioenergetische und metabolische Kopplung zwischen Nervenzellen und Astrozyten

Neben dem Einfluss einer Inhibition der KGDHc auf den Energiestoffwechsel, könnte diesem Effekt noch eine weitere Bedeutung zukommen. Neurone sind von einer astrozytären Versorgung mit Citratzyklus Intermediaten abhängig. Die neuronale Synthese von Glutamat aus α -Ketoglutarat *per se* erzeugt einen Abfluss dieses Dicarbonsäureintermediates aus dem neuronalen Citratzyklus. Dieser Abfluss reduziert die Kapazität des oxidativen Metabolismus und der ATP-Synthese. Deshalb muss er durch anaplerotische Reaktionen wie die Carboxylierung von Pyruvat zu Malat oder Oxalacetat regeneriert werden. Da den meisten Neuronen im Gegensatz zu Astrozyten eine Pyruvat-Carboxylase-Aktivität fehlt, sind Neurone von einer konstanten Versorgung durch Citratzyklus Intermediaten, wie Citrat, α -Ketoglutarat, Malat und Succinat aus der Synthese in Astrozyten abhängig (Schousboe *et al.* 1997; Hassel *et al.* 2000).

Über den Transport von Dicarbonsäuren im Gehirn ist noch wenig bekannt. Vor kurzem konnte der Natrium-abhängige Transporter hNaDC3 beschrieben werden (Wang *et al.* 2000). Dieser könnte eine wichtige Rolle im *intra cerebralen* Transport von Dicarbonsäuren mit einer Kettenlänge von vier bis sechs Kohlenstoffatomen spielen. hNaDC3 wies eine hohe Substratspezifität für GA und α -Ketoglutarat auf. Weiterhin bestand bei diesem Transporter eine starke Konkurrenz von GA und α -Ketoglutarat mit dem Succinattransport (Wang *et al.* 2000). Eine aktuelle Studie von Yodoya und Kollegen (2006) konnte zeigen, dass 2 mM GA (*zerebrale* Konzentrationen bei GA I Patienten: 0,5 - 5 mM GA) die Aufnahme von Succinat in Astrozyten und in Neurone um ca. 95 % hemmt. Daher lässt sich postulieren, dass die hohen *zerebralen* GA-Konzentrationen durch eine Konkurrenz den Transport von Dicarbonsäure-Citratzyklus-Intermediaten zwischen Astrozyten und Neuronen stören.

Dieser Mechanismus könnte glutamaterge Neurone vor allem während einer Überstimulation besonders vulnerabel für den Effekt einer KGDHc-Inhibition durch Glutaryl-CoA machen.

Abbildung (26) stellt die Synopsis eines potentiellen Pathomechanismus vereinfacht dar (Sauer *et al.* 2006).

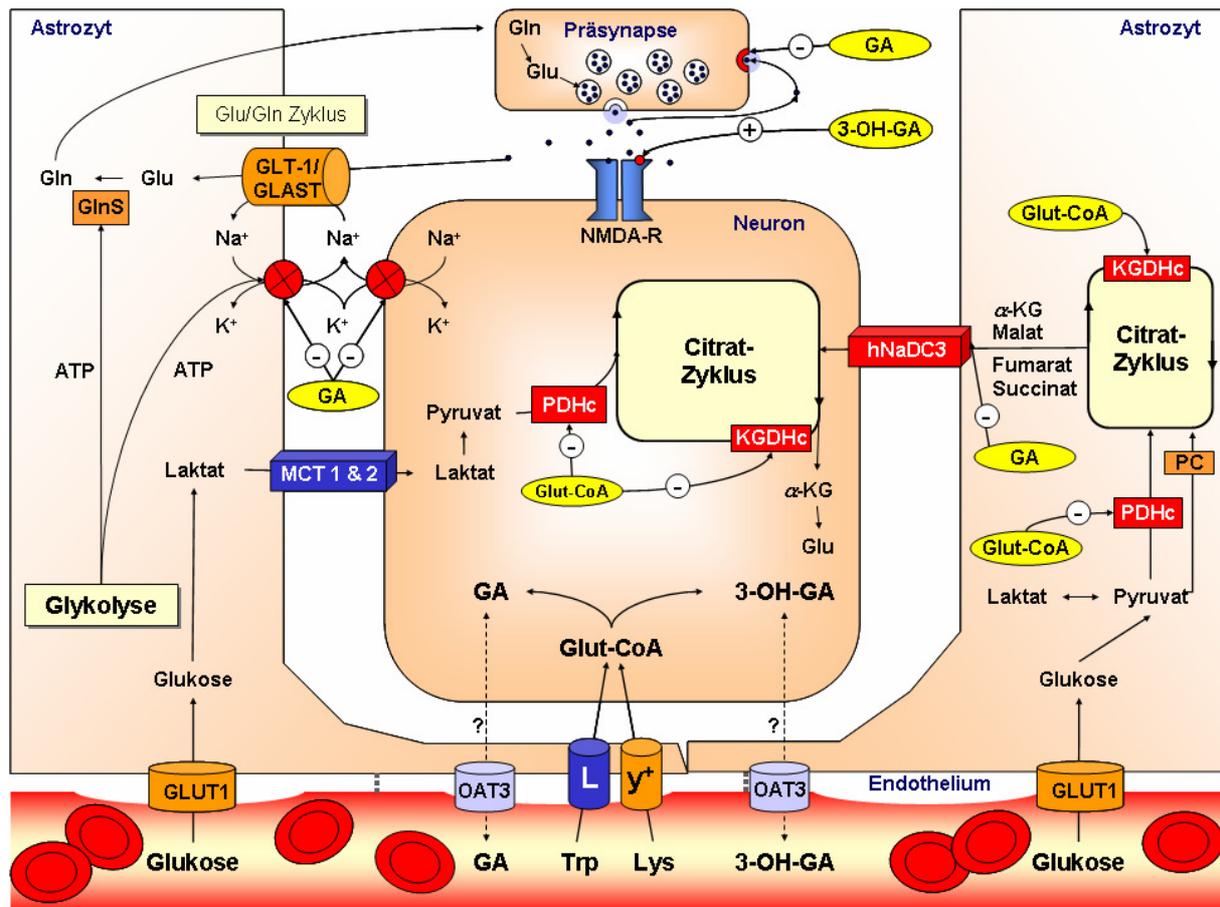


Abbildung (26) Synopsis der postulierten Effekte von GA und 3-OH-GA auf die metabolische Kopplung von Astrozyten und Neuronen und die glutamaterge Neurotransmission. GLT-1/ GLAST: Natrium-abhängiger astrozytärer Glutamattransporter, hNaDC3: humaner Natrium-abhängiger Dicarbonsäuretransporter, Gln: Glutamin, GlnS: Glutamin-Synthase, Glu: Glutamat, α -KG: α -Ketoglutarat, KGDHc: α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex, MCT 1&2: Monocarbonsäuretransporter 1 und 2, NMDA-R: N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor, OAT3: organische Anionen Transporter 3, PC: Pyruvatcarboxylase, PDHc: Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex.

Die linke Seite stellt den Laktat-Shuttle zwischen Neuronen und Astrozyten und den Glutamat/ Glutamin Zyklus (glu/gln) dar. Dies verdeutlicht die enge Verknüpfung der exzitatorischen (glutamatergen) Neurotransmission und dem zerebralen Glukose Metabolismus (Magistretti *et al.* 1999; Pellerin und Magistretti 1994). Die rechte Seite stellt die Versorgung der Neurone mit Dicarbonsäureintermediaten aus dem Citratzyklus durch Astrozyten dar. Diese Versorgung ist notwendig, um den konstanten Abfluss von α -Ketoglutarat, das für die Glutamatsynthese der Neurone notwendig ist, auszugleichen (Schousboe *et al.* 1997; Hassel *et al.* 2002). Der untere Teil der Abbildung stellt die BBB (Endothelium mit *tight junctions*) und selektive Transporter für hydrophile Nährstoffe wie Glukose, L-Lysin (Lys) und L-Tryptophan (Trp) mittels spezifischer Transporter (GLUT1, Systeme L und γ^+) dar. Die Aminosäuren L-Lysin und L-Tryptophan überqueren die BBB mittels spezifischer Transporter und werden anschließend *intrazerebral* bis zu Glutaryl-CoA verstoffwechselt. Aufgrund der GCDH-Defizienz führt dies zu einer Akkumulation von

Glutaryl-CoA, GA und 3-OH-GA, da die BBB für Dicarbonsäuren nur geringfügig permeabel ist. Mittels organischer Anionentransporter wie OAT3 (Ohtsuki *et al.* 2002; Kikuchi *et al.* 2003) könnte ein schwacher Efflux von GA und 3-OH-GA erfolgen. Es wird postuliert, dass inhibitorische (-) oder stimulatorische (+) Effekte von GA, 3-OH-GA und Glutaryl-CoA (Glut-CoA) auf verschiedene Rezeptoren, Transporter und Enzyme mit der energetischen und metabolischen Kopplung von Astrozyten und Neuronen interferieren. Hieraus resultiert ein Ungleichgewicht der glutamatergen Neurotransmission und des zerebralen Energiestoffwechsels (Kölker *et al.* 2004a; Sauer *et al.* 2006). Mögliche Angriffspunkte von GA, 3-OH-GA und Glutaryl-CoA sind rot markiert.

Es lässt sich ferner postulieren, dass eine *zerebrale de novo*-Synthese von krankheitsspezifischen Dicarbonsäuren durch einen Enzymdefekt auch bei anderen Organoazidopathien, die durch eine Akkumulation von Dicarbonsäuren und neurodegenerative Prozesse charakterisiert sind (z.B. EMA, MMA, D-2-, L-2-Hydroxyglutarazidurie), einen biochemischen Risikofaktor darstellt.

Folgende Hypothesen können formuliert werden:

- (1) Da der Transport von Dicarbonsäuren über die BBB streng limitiert ist (Hassel *et al.* 2002; Sauer *et al.* 2006), führt eine *zerebrale de novo*-Synthese von krankheitsspezifischen Dicarbonsäuren zu einer Akkumulation dieser Säuren im Gehirn. Dies kann eine potentielle neurotoxische Wirkung dieser Säuren oder ihrer Derivate (z.B. MMA, Okun *et al.* 2002) ermöglichen oder verstärken.
- (2) Da die neuronalen, zellulären Dicarbonsäuretransporter NaDC2 und NaDC3 (Wang *et al.* 2000; Yodoya *et al.* 2006) eine relativ breite Substratspezifität für Dicarbonsäuren mit einer Kettenlänge von C3 - C5 besitzen, führt diese Akkumulation zu einer Inhibition anaplerotischer Transportprozesse von Citratzyklus Dicarbonsäureintermediaten zwischen Astrozyten und Neuronen. Dies macht glutamaterge Neurone besonders vulnerabel gegenüber primären und sekundären exzitotoxischen Prozessen.

5.5 Vom biochemischen Risikofaktor zu therapeutischen Optionen

Die oben beschriebenen Mechanismen legen nahe, dass eine *zerebrale* Akkumulation von GA und 3-OH-GA einen biochemischen Risikofaktor für die Manifestation der neurologischen Veränderungen in Patienten mit GCDH-Defizienz darstellt. Hieraus kann man als Ziel für therapeutische Strategien ableiten, die *intrazerebrale* Akkumulation dieser Metabolite zu verringern. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass die *zerebralen* Konzentrationen von GA und 3-OH-GA vor allem auf eine *zerebrale de novo*-Synthese zurückzuführen sind. Eine diätetisch reduzierte Versorgung des Hirns mit L-Lysin und L-Tryptophan aus dem Plasma ist eine Möglichkeit eine *zerebrale de novo*-Synthese dieser Dicarbonsäuren zu begrenzen. Der Effekt einer diätetische Restriktion oral zugeführten L-Lysins wurde kürzlich durch eine internationale Querschnittsstudie an 279 Patienten belegt (Kölker *et al.* 2006). Die Nutzung einer Konkurrenz zwischen Aminosäuren um spezifische Transporter, z.B. Arginin, Ornithin und L-Lysin um das System y^+ , könnte einen alternativen oder zusätzlichen Therapieansatz darstellen. Eine erhöhte orale Gabe von Arginin und Ornithin fand schon bei Harnstoffzyklusdefekten (Arginin) oder Guanidinoacetatmethyltransferase-Defizienz (Ornithin) Anwendung und ließe sich auch praktisch einfach durchführen. Eine systematische Anwendung im Rahmen einer GCDH-Defizienz wurde jedoch noch nicht untersucht.

An *Gcdh*^{-/-}-Mäusen wurden die oben genannten drei Diätstrategien – Carnitin-, Ornithin- und Arginin-Applikation und reduziertes L-Lysin in der Nahrung - untersucht.

Das wichtigste Ergebnis der Diätstudien an *Gcdh*^{-/-}-Mäusen war, dass durch die Applikation von Ornithin und Arginin die *zerebralen* GA-Konzentrationen gesenkt werden konnten. Überraschenderweise folgten auf die Applikation von Arginin erhöhte Serumkonzentrationen und auf die Applikation von Arginin und Ornithin erhöhte Urinkonzentrationen von GA. Der diesem Effekt zugrunde liegende Mechanismus ist unklar. Als Ursache könnte angenommen werden, dass durch den reduzierten Transport von L-Lysin ins Gehirn die peripheren L-Lysin-Konzentrationen steigen, in der Niere und Leber akkumulieren und als GA ausgeschieden werden. Alternativ könnte postuliert werden, dass Arginin und Ornithin direkt oder indirekt über ihre Abbauprodukte zelluläre und renale Transporter wie den OAT3 (Sweet *et al.* 2003) stimulieren.

Die Applikation von Carnitin senkte die GA-Konzentrationen in der Leber und erhöhte gleichzeitig ihre Konzentration im Serum und Urin. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass eine Carnitin-Supplementation den Export von GA aus der Zelle ins Blut und die anschließende Ausscheidung über den Urin fördert.

Interessanterweise konnte Carnitin auch die *zerebralen* GA-Konzentrationen senken. Carnitin kann durch den Transporter OCTN2 (Tamai *et al.* 1998) über die BBB transportiert werden. Es lässt sich vermuten, dass die Carnitingabe die verarmten *zerebralen* Carnitinspeicher der *Gcdh*^{-/-}-Maus regeneriert und so die Exportrate dieser Dicarbonsäure aus der Zelle erhöht. Die exportierte GA könnte aus dem Interstitium in die Zerebrospinalflüssigkeit gelangen und dort akkumulieren. Wie in dieser Arbeit gezeigt, ist der Export über die BBB für GA limitiert. Ein Transporter für Carnitinkonjugate in der BBB ist nicht bekannt. Die ependymalen und pialen Zellen, die Interstitium und Zerebrospinalflüssigkeit trennen, bilden jedoch keine *tight junctions* aus und sind so permeable für kleine Moleküle wie GA. Typischerweise können auch erhöhte GA-Konzentrationen in der Zerebrospinalflüssigkeit von GA I Patienten gemessen werden (Hoffmann *et al.* 1980; Baric *et al.* 1999).

Eine L-Lysinrestringierte Diät konnte zwar in Leber, Gehirn, Serum und Urin die GA-Konzentrationen leicht senken, dieser Effekt fiel allerdings relativ schwach aus. Dies lässt darauf schließen, dass die eingesetzte Diät immer noch zuviel L-Lysin enthielt. Die Obergrenze für die L-Lysin-Konzentrationen in einer L-Lysinrestringierten Diät für GA I Patienten liegt bei 100 mg/kg Körpergewicht und Tag, d.h. ist 3,5fach kleiner als der Mindestbedarf der Maus an L-Lysin und die in dieser Arbeit eingesetzten Konzentrationen. Um den Effekt einer L-Lysinrestriktion auf *Gcdh*^{-/-}-Mäuse genauer zu untersuchen, müssen zukünftige Studien überprüfen, wie weit die L-Lysin-Konzentration in der Mausdiät noch gesenkt werden kann.

Die 3-OH-GA-Konzentrationen blieben bei den einzelnen Diätformen weitgehend unbeeinflusst. Dies könnte darauf hindeuten, dass die GA-Konzentrationen die Sättigungskinetik der 3-OH-GA Synthese weit übersteigt. Weitere Studien müssen zeigen, ob dieser Zusammenhang besteht und ab welcher GA-Konzentration auch die 3-OH-GA-Konzentration sinkt.

Insgesamt kann festgestellt werden, dass die Supplementation mit Carnitin, Ornithin und Arginin ein effektiver Zusatz zu einer L-Lysinrestringierten Diät sein kann. Vor allem die Applikation von Arginin und Ornithin scheint sinnvoll, um die *zerebralen* GA und vielleicht auch 3-OH-GA-Konzentrationen zu senken.

6 Aussichten

6.1 SSADH-Defizienz

In dieser Arbeit konnte kein Hinweis für ein Ungleichgewicht des Energiestoffwechsels in der Pathogenese der SSADH-Defizienz gefunden werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass akkumulierende Metabolite dieser Erkrankung *in vivo* einen Einfluss auf den Energiestoffwechsel haben. Eine Möglichkeit eine *in vivo* Situation zu simulieren besteht darin, den Einfluss von GABA, SSA, GHB oder 4,5-DHHA auf intakte Mitochondrien radiometrisch zu untersuchen (Kölker *et al.* 2003).

Da die Rolle unserer Arbeitsgruppe in der Untersuchung möglicher bioenergetischer Pathomechanismen lag, werden sich keine weiteren Studien zu diesem Thema anschließen.

Aktuelle Ergebnisse auf dem Gebiet der SSADH-Defizienz sind:

- Veränderung der strukturellen Zusammensetzung und Funktionalität von GABA_A-Rezeptoren in *Aldh5a1*^{-/-}-Mäusen (Wu *et al.* 2006).
- erhöhte d-2-Hydroxyglutarsäure-Konzentrationen in Patienten mit SSADH-Defizienz (Struys *et al.* 2006). Es wird postuliert, dass eine Transhydrogenase die Bildung von d-2-Hydroxyglutarsäure aus α -Ketoglutarat katalysiert. An diese Reaktion koppelt die Transhydrogenase die Oxidation von GHB zu SSA. Aufgrund der beschränkten Patientenzahl mit erhöhten d-2-Hydroxyglutarsäure-Konzentrationen scheint die Implikation dieses Stoffwechselweges für die SSADH-Defizienz nicht eindeutig.
- Bildung von Guanidinverbindungen (z.B. Guanidinobutyrat) aus GHB durch die Arginin-Glycin-Amidino-transferase in *Ssadh*-defizienten Mäusen (Jansen *et al.* 2006).

6.2 GCDH-Defizienz

Aus dieser Arbeit lassen sich folgende Aussagen zur GCDH-Defizienz ableiten:

Bioenergetik:	Glutaryl-CoA hemmt den KGDHc.
Biochemie:	<i>Zerebrale de novo</i> -Synthese und anschließendes <i>Trapping</i> von GA und 3-OH-GA durch eine streng limitierte Permeabilität der BBB führt zu einer Akkumulation dieser Dicarbonsäuren im Gehirn.
Diätstrategien:	L-Lysinrestringierte Diät verbunden mit einer Ornithin- oder Arginin-Supplementation kann die zerebralen GA-Konzentrationen senken.

Um die Relevanz der Hemmung des KGDHc genauer in den Pathomechanismus der GCDH-Defizienz einzuordnen, muss die intrazelluläre und intramitochondriale Glutaryl-CoA-

Konzentration bestimmt werden. Eine Methode von Kasuya und Kollegen (2004) könnte eine Möglichkeit sein, die Konzentrationen von Glutaryl-CoA zu untersuchen. Diese Arbeitsgruppe konnte mittels einer kombinierten Methode aus Flüssigkeitschromatographie und MS-MS die Konzentration mittelkettige CoA-Ester in Mausgeweben bestimmen.

Ein weiterer wichtiger Punkt wird sein, den *intrazerebralen* Transport von GA und 3-OH-GA zu charakterisieren. Es muss untersucht werden, inwieweit akkumulierende GA und 3-OH-GA mit der Versorgung des Neurons durch Dicarbonsäureintermediate aus Astrozyten interferieren. Zwar konnte eine Inhibition der astrozytären und neuronalen Aufnahme von Succinat mittels NaDC3 durch GA gezeigt werden (Yodoya *et al.* 2006), dieser Ansatz spiegelt jedoch die pathophysiologischen Bedingungen der GCDH-Defizienz (intrazelluläre Akkumulation von GA und 3-OH-GA) nur begrenzt wider. Es könnte interessant sein, die astrozytäre und neuronale Aufnahme von Dicarbonsäuren in primären Kulturen aus *Gcdh*^{-/-}-Mäusen zu untersuchen. Ferner wäre ein Experiment denkbar, in dem man Astrozyten und striatale Neurone aus *Gcdh*^{-/-}-Mäusen kokultiviert, diese jedoch in Analogie zu den BBB Experimenten durch einen Filter trennt. An einem solchen experimentellen Design könnte man den Transport von Dicarbonsäuren zwischen Neuronen und Astrozyten während oder nach einer Glutamat Stimulation durch Bestimmung der intrazellulären Konzentration radioaktiv markierter oder deuterierter Dicarbonsäuren beschreiben.

Neben dem Transport von GA und 3-OH-GA über die BBB sollte auch der Transport dieser Dicarbonsäuren über den *Plexus choroideus* untersucht werden. Da dieser die Schnittstelle zwischen Zerebrospinalflüssigkeit und dem Blut bildet, könnte ein Austausch von GA oder 3-OH-GA über den *Plexus choroideus* einen Einfluss auf ihre *zerebralen* Konzentrationen haben. Diese Experimente lassen sich in Analogie zu den hier beschriebenen BBB Experimenten mit *Plexus choroideus*-Epithelzellen aus Schweinehirn gestalten (Angelow *et al.* 2004).

Es wird auch interessant sein zu untersuchen, ob akkumulierende GA und 3-OH-GA mit dem intrazellulären Austausch von Dicarbonsäureintermediaten zwischen Cytosol und Mitochondrium über mitochondriale Transporter wie den 2-Oxoglutarat Transporter (Palmisano *et al.* 1998) und den Dicarbonsäuretransporter (Fiermonte *et al.* 1999) interferieren.

Im Zusammenhang mit den Transportstudien muss auch eine Verbindung zwischen GA, 3-OH-GA und dem Glutathiontransport beachtet werden. Für den Transport von Glutathion in renale Zellen konnten Studien eine Beteiligung des NaDC2 (Chen *et al.* 1999) und des OAT3

(Lash und Putt 1999) zeigen. Eine Rolle des 2-Oxoglutarat Transporters und des Dicarbonsäuretransporters im Transport von Glutathion in das Mitochondrium wurde von Chen und Lash (1998) beschrieben.

Ein neuer Aspekt der GCDH-Defizienz Forschung ergibt sich durch eine aktuelle Arbeit von Zinnanti und Kollegen (2006). Diese Arbeitsgruppe konnte durch exzessive Protein oder L-Lysin Belastung von *Gcdh*^{-/-}-Mäusen einen Phänotyp erzeugen, der dem klinischen und neuroradiologischen Bild humaner GA I Patienten teilweise ähnelt. Sie konnten unter anderem auch eine altersabhängige striatale Nekrose bei Tieren unter einer solchen Diät aufzeigen. Die Applikation der exzessiven Protein- oder L-Lysin-Konzentrationen war in einem Großteil der Mäuse letal.

Die Ergebnisse dieser Studie weisen aber auch einige elementare Unterschiede zu dem heutigen Konzept der GCDH-Defizienz auf:

Ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Proteinaufnahme und dem Beginn einer enzephalopathischen Krise ist bei GA I Patienten noch nicht beschrieben worden (Kölker *et al.* 2006).

Zinnanti und Kollegen (2006) konnten nach einer Protein oder L-Lysin Belastung keine erhöhten 3-OH-GA-Konzentrationen messen. Dieser Metabolit ist jedoch wie Koeller *et al.* (2002) und die vorliegende Arbeit zeigen konnten, in der *Gcdh*^{-/-}-Maus unter einer normalen Diät signifikant erhöht. Außerdem ist 3-OH-GA ein charakteristischer Marker humaner GA I Patienten und potentiell am Pathomechanismus der Erkrankung als Neurotoxin beteiligt (Kölker *et al.* 2004a).

Nach einer Protein oder L-Lysin Belastung lagen die gemessenen Serumkonzentrationen von GA (2,5 mM) 10-1000fach höher als bei humanen Patienten oder der „normalen“ *Gcdh*^{-/-}-Maus (Baric *et al.* 1999; Koeller *et al.* 2002; Sauer *et al.* 2006).

Zinnanti und Kollegen postulieren einen Zusammenbruch der BBB als wichtiges Ereignis in der Pathogenese der GCDH-Defizienz und belegen diese Hypothese mit *subarachnoiden* Blutungen in *Gcdh*-defizienten Mäusen nach einer Protein oder L-Lysin Belastung. In *Gcdh*^{-/-}-Mäusen unter einer normalen Diät, in *hepatozytären Gcdh*^{-/-}-Mäusen und bei den BBB Experimenten konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch kein Hinweis auf einen solchen Mechanismus gefunden werden. Ferner fallen GA I Patienten durch *subdurale* Hämatome auf. Der wohl wichtigste Unterschied sind erhöhte Serumkonzentrationen von verzweigtkettigen Aminosäuren - vor allem Leucin - nach einer Protein oder L-Lysin Belastung der *Gcdh*-defizienten Mäuse. Diese Metabolite sind typischerweise bei einer MSUD aber nicht bei einer

GCDH-Defizienz erhöht. Eine unbehandelte MSUD führt zu einer progredienten Enzephalopathie, Hirnödemen und dem Tod (Morton *et al.* 2002). Schon relativ milde Anstiege der Leucin-Konzentration sind toxisch (Korein *et al.* 1994).

Der Anstieg verzweigkettiger Aminosäuren lässt sich - wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte - durch eine Hemmung des BCKDHc durch Glutaryl-CoA infolge der exzessiven L-Lysin-Belastung der Zelle erklären. Die Bedeutung dieses Effektes für die GCDH-Defizienz scheint zum einen durch normale verzweigkettige Aminosäurekonzentrationen in GA I Patienten und zum anderen durch die in dieser Arbeit beschriebenen Eigenschaften des BCKDHc fraglich.

Insgesamt scheint es viel versprechend das Modell einer Protein oder L-Lysin Belastung von *Gcdh*^{-/-}-Mäusen näher zu untersuchen und zu spezifizieren (z.B. Abhängigkeit der Effekte von der L-Lysin-Konzentration).

Die Studie von Zinnanti und Kollegen (2006) verdeutlicht aber auch die Rolle der Vorläufer Aminosäure L-Lysin für die Pathophysiologie der GCDH-Defizienz und unterstreicht so die Relevanz diätetischer Maßnahmen mit dem Ziel die zerebralen Konzentrationen dieser Aminosäure zu senken. Daher müssen die präliminaren Daten der Diätstudien der vorliegenden Arbeit an *Gcdh*^{-/-}-Mäusen durch weitere Experimente unterstützt werden. Zum einen sollten die verschiedenen diätetischen Strategien über einen längeren Zeitraum untersucht werden, zum anderen müssen die eingesetzten Konzentrationen optimiert werden, vor allem für die L-Lysinrestringierte Diät.

7 Referenzen

A

- Abbott LC, Nejad HH, Bottje WG und Hassan AS (1990). Glutathione levels in specific brain regions of genetically epileptic (tg/tg) mice. *Brain. Res. Bull.* **25**: 629-631.
- Akaboshi S, Hogema BM, Novelletto A, Malaspina P, Salomons GS, Maropoulos GD, Jakobs C, Grompe M und Gibson KM (2003). Mutational spectrum of the succinate semialdehyde dehydrogenase (ALDH5A1) gene and functional analysis of 27 novel disease-causing mutations in patients with SSADH deficiency. *Hum. Mutat.* **22**: 442-450.
- Albin RL und Greenamyre JT (1992). Alternative excitotoxic hypotheses. *Neurology* **42**: 733-738.
- Angelow S, Zeni P und Galla HJ (2004). Usefulness and limitation of primary cultured porcine choroid plexus epithelial cells as an in vitro model to study drug transport at the blood-CSF barrier. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **56**: 1859-73.
- Ankarcrona M, Dybbukt JM und Bonfoco E (1995). Glutamate-induced neuronal death: A succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* **15**: 961-973.
- Aoshima T, Kajita M, Sekido Y, Ishiguro Y, Tsuge I, Kimura M, Yamaguchi S, Watanabe K, Shimokata K und Niwa T (2002). Mutation analysis in a patient with succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency: a compound heterozygote with 103-121del and 1460T>A of the ALDH5A1 gene. *Hum. Hered.* **53**: 42-44.
- Araujo IM und Carvalho CM (2005). Role of nitric oxide and calpain activation in neuronal death and survival. *Curr. Drug. Targets. CNS Neurol. Disord.* **4**: 319-24.
- Atlante A, Gagliardi S, Minervini GM, Ciotti MT, Marra E und Calissano P (1997). Glutamate neurotoxicity in rat cerebellar granule cells: a major role for xanthine oxidase in oxygen radical formation. *J. Neurochem.* **68**: 2038-45.

B

- Bacci A, Verderio C, Pravettoni E, und Matteoli M (1999). The role of glial cells in synaptic function. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **354**: 403-409.
- Bains JS und Shaw CA (1997). Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Res.* **25**: 335-358.
- Bakhiya N, Bahn A, Burckhardt G und Wolff NA (2003). Human organic anion transporter 3 (hOAT3) can operate as an exchanger and mediate secretory urate flux. *Cell Physiol. Biochem.* **13**: 249-256.
- Baric I, Zschocke J, Christensen E, Duran M, Goodman SI, Leonard JV, Muller E, Morton DH, Superti-Furga A und Hoffmann GF (1998). Diagnosis and management of glutaric aciduria type I. *J. Inherit. Metab. Dis.* **21**: 326-40.

- Baric I, Wagner L, Feyh P, Liesert M, Buckel W und Hoffmann GF (1999). Sensitivity and specificity of free and total glutaric acid and 3-hydroxyglutaric acid measurements by stable-isotope dilution assays for the diagnosis of glutaric aciduria type I. *J. Inherit. Metab. Dis.* **22**: 867-881.
- Beal MF, Kowall NW, Swartz KJ, Ferrante RJ und Martin JB (1988). Systemic approaches to modifying quinolinic acid striatal lesions in rats. *J. Neurosci.* **8**: 3901-8.
- Beal MF, Swartz KJ, Hyman BT, Storey E, Finn SF und Koroshetz W (1991). Aminooxyacetic acid results in excitotoxic lesions by a novel indirect mechanism. *J. Neurochem.* **57**: 1068-1073.
- Beal MF (1992). Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? *Ann. Neuro* **31**: 119-130.
- Beal MF, Brouillet E, Jenkins B, Henshaw R, Rosen B und Hyman BT (1993). Age-dependent striatal excitotoxic lesions produced by the endogenous mitochondrial inhibitor malonate. *J. Neurochem.* **61**: 1147-1150.
- Bekri S, Fossoud C, Plaza G, Guenne A, Salomons GS, Jakobs C und Van Obberghen E (2004). The molecular basis of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency in one family. *Mol. Genet. Metab.* **81**: 347-351.
- Benjamin AM und Quastel JH (1972). Locations of amino acids in brain slices from the rat. Tetrodotoxin-sensitive release of amino acids. *Biochem. J.* **128**: 631-46.
- Bennett JP, Logan WJ und Snyder SH (1973). Amino acids as central nervous transmitters: the influence of ions, amino acid analogues, and ontogeny on transport systems for L-glutamic and L-aspartic acids and glycine into central nervous synaptosomes of the rat. *J. Neurochem.* **21**: 1533-1550.
- Bennett MJ, Marlow N, Pollitt RJ und Wales JK (1986). Glutaric aciduria type 1: biochemical investigations and postmortem findings. *Eur. J. Pediatr.* **145**: 403-405.
- Benveniste H, Drejer J und Schousboe A (1984). Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J. Neurochem.* **43**: 1369-1374.
- Berg D, Youdim MB und Riederer P (2004). Redox imbalance. *Cell. Tissue Res.* **318**: 201-13.
- van den Berg CJ und Garfinkel D (1971). A stimulation study of brain compartments. Metabolism of glutamate and related substances in mouse brain. *Biochem. J.* **123**: 211-8.
- Bernardi P, Broekemeier KM und Pfeiffer DR (1994). Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *J. Bioenerg. Biomembr.* **26**: 509-517.
- Bernardi P (1999). Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol. Rev.* **79**: 1127-55.

- Bernasconi R, Mathivet P, Bischof S und Marescaux C (1999). Gamma-hydroxybutyric acid: an endogenous neuromodulator with abuse potential? *Trends Pharmacol. Sci.* **20**: 135-141.
- Beutler E (1989). Nutritional and metabolic aspects of glutathione. *Annu. Rev. Nutr.* **9**: 287-302.
- Bjugstad KB, Zawada, WM, Goodman S und Freed CR (2001). Age at symptom onset predicts severity of motor impairment and clinical outcome of glutaric acidemia type 1. *J. Inherit. Metab. Dis.* **24**: 631-647.
- Bonfoco E, Krainc D und Ankarcrona M (1995). Apoptosis and necrosis: Two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 7162-7166.
- Bowling AC und Beal MF (1995). Bioenergetic and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Life. Sci.* **56**: 1151-71.
- Boyer B und Odessey R. (1990). Quantitative control analysis of branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase complex activity by feedback inhibition. *Biochem. J.* **271**: 523-8.
- Brandt U und Okun JG. (1997). Role of deprotonation events in ubihydroquinone:cytochrome c oxidoreductase from bovine heart and yeast mitochondria. *Biochemistry* **37**: 11234-40.
- Brightman MW (1977). Morphology of blood-brain interfaces. *Exp. Eye. Res.* **25**: 1-25.
- Brock M. und Buckel W. (2004). The mechanism of action of the antifungal agent propionate. *Eur. J. Biochem.* **271**: 3227-41.
- Brosnan JT und Brosnan ME (2006). Branched-chain amino acids: enzyme and substrate regulation. *J. Nutr.* **136**: 207S-11S.
- Brown GK, Cromby CH, Manning NJ und Pollitt RJ (1987). Urinary organic acids in succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency: evidence of alpha-oxidation of 4-hydroxybutyric acid, interaction of succinic semialdehyde with pyruvate dehydrogenase and possible secondary inhibition of mitochondrial beta-oxidation. *J. Inherit. Metab. Dis.* **10**: 367-375.
- Bruno V, Copani A und Knopfel T (1995). Activation of metabotropic glutamate receptors coupled to inositol phospholipid hydrolysis amplifies NMDA-induced neuronal degeneration in cultured cortical cells. *Neuropharmacology* **34**: 1089-1098.
- Bruno V, Battaglia G und Kingston A (1999). Neuroprotective activity of the potent and selective mGlu1a metabotropic glutamate receptor antagonist, (+)2-methyl-4-carboxyphenylglycine (LY367385): comparison with LY357366, a broader spectrum antagonist with equal affinity for mGlu1a and mGlu5 receptors. *Neuropharmacology* **38**: (2) 199-207.
- Bruyn RP und Stoof JC. (1990). The quinolinic acid hypothesis in Huntington's chorea. *J. Neurol. Sci.* **95**:29-38.

- Bryk R, Lima CD, Erdjument-Bromage H, Tempst P und Nathan C (2002). Metabolic enzymes of mycobacteria linked to antioxidant defense by a thioredoxin-like protein. *Science* **295**: 1073-1077.
- Buerstette CR, Behar KL, Novotny EJ und Lai JC (2000). Brain regional development of the activity of alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex in the rat. *Brain. Res. Dev. Brain. Res.* **125**: 139-145.
- Bunik V, Follmann H und Bisswanger H (1997). Activation of mitochondrial 2-oxoacid dehydrogenases by thioredoxin. *Biol. Chem.* **378**: 1125-1130.
- Bunik VI (2003). 2-Oxo acid dehydrogenase complexes in redox regulation. *Eur. J. Biochem.* **270**: 1036-42.
- Butterworth PJ, Tsai CS, Eley MH, Roche TE und Reed LJ (1975). A kinetic study of dihydrolipoyl transacetylase from bovine kidney. *J. Biol. Chem.* **250**: 1921-1925.
- Busquets C, Merinero B, Christensen E, Gelpi JL, Campistol J, Pineda M, Fernandez-Alvarez E, Prats JM, Sans A, Arteaga R, Marti M, Campos J, Martinez-Pardo M, Martinez-Bermejo A, Ruiz-Falco ML, Vaquerizo J, Orozco M, Ugarte M, Coll MJ und Ribes A (2000). Glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency in Spain: evidence of two groups of patients, genetically, and biochemically distinct. *Pediatr. Res.* **48**: 315-322.
- Buzzi A, WuY und Perez-Velazquez J (2003). Altered GABA B receptor (GABA_BR) function and lethal status epilepticus in mice deficient for succinic semialdehyde dehydrogenase. Program No 303.2. Washington, DC: Society for Neuroscience.
- C
- Calabresi P, Centonze D, Pisani A, Sancesario G, Gubellini P, Marfia GA und Bernardi G (1998). Striatal spiny neurons and cholinergic interneurons express differential ionotropic glutamatergic responses and vulnerability: implications for ischemia and Huntington's disease. *Ann. Neurol.* **43**: 586-97.
- Calabresi P, Centonze D und Bernardi G (2000). Cellular factors controlling neuronal vulnerability in the brain: a lesson from the striatum. *Neurology* **55**: 1249-55.
- Canzoniero LM und Snider BJ (2005). Calcium in Alzheimer's disease pathogenesis: too much, too little or in the wrong place? *J. Alzheimers Dis.* **8**: 147-54.
- Cardoso SM, Pereira C und Oliveira R. (1999). Mitochondrial function is differentially affected upon oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **26**: 3-13.
- Cash CD (1994). Gamma-hydroxybutyrate: an overview of the pros and cons for it being a neurotransmitter and/or a useful therapeutic agent. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **18**: 291-304.
- Chambliss KL, Zhang Y-A, Rossier E, Vollmer B und Gibson KM (1995b). Enzymatic and immunologic identification of succinic semialdehyde dehydrogenase in rat and human neural and non-neural tissues. *J. Neurochem.* **65**: 851-855.

- Chapman AG, Durmuller N, Lees GJ und Meldrum BS (1989). Excitotoxicity of NMDA and kainic acid is modulated by nigrostriatal dopaminergic fibres. *Neurosci. Lett.* **107**: 256-60.
- Chavas, J und Marty, A (2003). Coexistence of excitatory and inhibitory GABA synapses in the cerebellar interneuron network. *J. Neurosci.* **23**: 2019–2031.
- Chen Z und Lash LH (1998). Evidence for mitochondrial uptake of glutathione by dicarboxylate and 2-oxoglutarate carriers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **285**: 608–618.
- Chen X, Tsukaguchi H, Chen XZ, Berger UV und Hediger MA (1999). Molecular and functional analysis of SDCT2, a novel rat sodium-dependent dicarboxylate transporter. *J. Clin. Invest.* **103**: 1159–1168.
- Chen Y, Cai J, Murphy TJ und Jones DP (2002). Overexpressed human mitochondrial thioredoxin confers resistance to oxidant-induced apoptosis in human osteosarcoma cells. *J. Biol. Chem.* **277**: 33242–33248.
- Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL und Lesnefsky EJ (2003). Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J. Biol. Chem.* **278**: 36027-31.
- Cherubini E, Gaiarsa JL und Ben-Ari Y (1991). GABA, an excitatory transmitter in early postnatal life. *TINS.* **14**: 515–519.
- Chinopoulos C und Adam-Vizi V (2006). Calcium, mitochondria and oxidative stress in neuronal pathology. Novel aspects of an enduring theme. *FEBS J.* **273**: 433-50.
- Christensen E (1993). A fibroblast glutaryl-CoA dehydrogenase assay using detritiation of 3H-labelled glutaryl-CoA: application in the genotyping of the glutaryl-CoA dehydrogenase locus. *Clin. Chim. Acta.* **220**: 71-80.
- Christensen E, Ribes A, Merinero B und Zschocke J (2004). Correlation of genotype and phenotype in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* **27**: 861-868.
- Choi DW (1987). Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J. Neurosci.* **7**: 369-379.
- Choi DW (1996). Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Curr. Opin. Neurobiol.* **6**: 667-672.
- Chow SL, Rohan C und Morris AA (2003). Rhabdomyolysis in glutaric aciduria type I. *J. Inherit. Metab. Dis.* **26**: 711-712
- Churchwell KB, Wright SH und Emma F (1996). NMDA receptor activation inhibits neuronal volume regulation after swelling induced by veratridine-stimulated Na⁺ influx in rat cortical cultures. *J. Neurosci.* **16**: 7447-7457.
- Cohen I, Navarro V, Clemenceau S, Baulac M und Miles R (2002). On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro. *Science* **298**: 1418–1421.
- Commandeur JN, Stijntjes GJ und Vermeulen NP (1995). Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. Role in

- bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics. *Pharmacol. Rev.* **47**: 271-330.
- Cook KG, Lawson R und Yeaman SJ (1983). Multi-site phosphorylation of bovine kidney branched-chain 2-oxoacid dehydrogenase complex. *FEBS Lett.* **157**: 59-62.
- Cortez MA, Wu Y, Gibson KM und Snead OC (2004). Absence seizures in succinic semialdehyde dehydrogenase deficient mice: a model of juvenile absence epilepsy. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **79**: 547-553.
- D
- Damuni Z, Merryfield ML, Humphreys JS und Reed LJ (1984). Purification and properties of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase phosphatase from bovine kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**: 4335-8.
- Danner DJ, Lemmon SK, Besharse JC und Elsas LJ 2nd (1979). Purification and characterization of branched chain alpha-ketoacid dehydrogenase from bovine liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **254**: 5522-6.
- Dawson VL, Dawson TM und Bartley DA (1993a). Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures. *J. Neurosci.* **13**: 2651-2661.
- Dawson TM, Steiner JP und Dawson VL (1993b). Immunosuppressant FK506 enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and protects against glutamate neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 9808-9812.
- Dawson VL, Kizushi VM und Huang PL (1996). Resistance to neurotoxicity in cortical cultures from neuronal nitric oxide synthase-deficient mice. *J. Neurosci.* **16**: 2479-2487.
- Deitmer JW (2001). Strategies for metabolic exchange between glial cells and neurons. *Respir. Physiol.* **129**: 71-81.
- de Mello CF, Begnini J, Jimenez-Bernal RE, Rubin MA, de Bastiani J, da Costa E Jr und Wajner M (1996). Intrastratial methylmalonic acid administration induces rotational behavior and convulsions through glutamatergic mechanisms. *Brain. Res.* **721**: 120-125.
- de Mello CF, Kölker S, Ahlemeyer B, de Souza FR, Figuera MR, Mayatepek E, Krieglstein J, Hoffmann GF und Wajner M (2001). Intrastratial administration of 3-hydroxyglutaric acid induces convulsions and excitotoxic lesions in rats. *Brain Res.* **916**: 70-75.
- de Oliveira Marques F, Hagen ME, Pederzolli CD, Sgaravatti AM, Durigon K, Testa CG, Wannmacher CM, de Souza Wyse AT, Wajner M und Dutra-Filho CS (2003). Glutaric acid induces oxidative stress in brain of young rats. *Brain. Res.* **964**: 153-158.
- Desjardins P und Butterworth RF (2005). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of selective neuronal loss in Wernicke's encephalopathy. *Mol. Neurobiol.* **31**: 17-25.

- Dessi F, Charriaut MC und Ben Ari Y (1994). Glutamate-induced neuronal death in cerebellar culture is mediated by two distinct components: a sodium chloride component and a calcium component. *Brain. Res.* **650**: 49-55.
- Di Mauro S und Wallace DC (1993). *Mitochondrial DNA in Human Pathology*. Raven Press, New York.
- Doherty JD, Hattox SE, Snead OC und Roth RH (1978). Identification of endogenous gamma-hydroxybutyrate in human and bovine brain and its regional distribution in human, guinea pig and rhesus monkey brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **207**: 130-139.
- Drejer J, Benveniste H und Diemer NH (1985). Cellular origin of ischemia-induced glutamate release from brain tissue in vivo and in vitro. *J. Neurochem.* **45**: 145-151.
- Dugan LL, Sensi SL, Canzoniero LM, Handran SD, Rothman SM, Lin TS, Goldberg MP und Choi DW (1995). Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate. *J. Neurosci.* **15**: 6377-88.
- Dumuis A, Sebben M und Haynes L (1988). NMDA receptors activate the arachidonic acid cascade system in striatal neurons. *Nature* **336**: 68-70.
- Dykens JA (1994). Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated CA^{2+} and Na^+ : implications for neurodegeneration. *J. Neurochem.* **63**: 584-591.
- E
- Eaton S, Bursby T, Middleton B, Pourfarzam M, Mills K, Johnson AW und Bartlett K (2000). The mitochondrial trifunctional protein: centre of a beta-oxidation metabolon? *Biochem. Soc. Trans.* **28**: 177-82.
- Engel WD, Schägger H und von Jagow G (1983). Isolation of complex III from various mitochondria. Comparison of the structural and functional properties of the preparations from beef heart, calf liver and *Neurospora crassa*. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **364**: 1753-1763.
- Enna SJ (2001). A GABA(B) mystery: the search for pharmacologically distinct GABA(B) receptors. *Mol. Interventions.* **1**: 208-218.
- F
- Fellner S, Bauer B, Miller DS, Schaffrik M, Fankhanel M, Spruss T, Bernhardt G, Graeff C, Farber L, Gschaidmeier H, Buschauer A und Fricker G.(2002). Transport of paclitaxel (Taxol) across the blood-brain barrier in vitro and in vivo. *J. Clin. Invest.* **110**: 1309-1318.
- Fern R (2003). Variations in spare electron transport chain capacity: The answer to an old riddle? *J. Neurosci. Res.* **71**: 759-762.
- Fiermonte G, Dolce V, Arrigoni R, Runswick MJ, Walker JE und Palmieri F (1999). Organization and sequence of the gene for the human mitochondrial dicarboxylate carrier: evolution of the carrier family. *Biochem. J.* **344**: 953-60.

- Flott-Rahmel B, Falter C, Schluff P, Fingerhut R, Christensen E, Jakobs C, Musshoff U, Fautek JD, Deufel T, Ludolph A und Ullrich K (1997). Nerve cell lesions caused by 3-hydroxyglutaric acid: a possible mechanism for neurodegeneration in glutaric acidaemia type I. *J. Inherit. Metab. Dis.* **20**: 387-390.
- Freudenberg F, Lukacs Z und Ullrich K (2004). 3-Hydroxyglutaric acid fail to affect the viability of primary neuronal rat cells. *Neurobiol. Dis.* **16**: 581-584.
- Funk CB, Prasad AN und Del Bigio MR (2004). Attempts to establish a rat model of striatal injury in glutaric acidaemia type I. *J. Inherit. Metab. Dis.* **27**: 819-24.
- Funk CB, Prasad AN, Frosk P, Sauer S, Kölker S, Greenberg CR und del Bigio MR (2005). Neuropathological, biochemical and molecular findings in a glutaric acidemia type 1 cohort. *Brain* **128**: 711-722.
- G
- Garcia-Ruiz C, Colell A, Morales A, Kaplowitz N und Fernandez-Checa JC (1995). Role of oxidative stress generated from the mitochondrial electron transport chain and mitochondrial glutathione status in loss of mitochondrial function and activation of transcription factor nuclear factor-kappa B: studies with isolated mitochondria and rat hepatocytes. *Mol. Pharmacol.* **48**: 825-34.
- Gerstner B, Gratopp A, Marcinkowski M, Sifringer M, Obladen M und Bührer C (2005). Glutaric acid and its metabolites cause apoptosis in immature oligodendrocytes: a novel mechanism of white matter degeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatr. Res.* **57**: 771-776.
- Gibson GE, Sheu RKF, Blass JP, Baker A, Carlson KC, Harding B und Perrino P (1988). Reduced activities of thiamine-dependent enzymes in the brains and peripheral tissues of patients with Alzheimer's disease. *Arch. Neurol.* **45**: 836-840.
- Gibson GE, Blass JP, Beal MF und Bunik V (2005). The alpha-ketoglutarate-dehydrogenase complex: a mediator between mitochondria and oxidative stress in neurodegeneration. *Mol. Neurobiol.* **31**: 43-64.
- Gibson KM, Jakobs C, Ogier H, Hagenfeldt L, Eeg-Olofsson KE, Eeg-Olofsson O, Aksu F, Weber HP, Rossier E, und Vollmer B (1995). Vigabatrin therapy in six patients with succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* **18**: 143-146.
- Gibson KM, Hoffmann GF, Hodson AK, Bottiglieri T und Jakobs C (1998). 4-Hydroxybutyric acid and the clinical phenotype of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency, an inborn error of GABA metabolism. *Neuropediatrics* **29**: 14-22.
- Gibson KM, Christensen E, Jakobs C, Fowler B, Clarke MA, Hammersen G, Raab K, Kobori J, Moosa A, Vollmer B, Rossier E, Iafolla AK, Matern D, Brouwer OF, Finkelstein J, Aksu F, Weber HP, Bakkeren JA, Gabreels FJ, Bluestone D, Barron TF, Beauvais P, Rabier D, Santos C und Lehnert W (1997). The clinical phenotype of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency (4-hydroxybutyric aciduria): case reports of 23 new patients. *Pediatrics* **99**: 567-74.

- Gibson KM, Schor DS, Gupta M, Guerand WS, Senephansiri H, Burlingame TG, Bartels H, Hogema BM, Bottiglieri T, Froestl W, Snead OC, Grompe M und Jakobs C (2002). Focal neurotransmitter alterations in mice deficient for succinate semialdehyde dehydrogenase. *J. Neurochem.* **81**: 71-79.
- Gibson KM, Gupta M, Pearl PL, Tuchman M, Vezina LG, Snead OC^{3rd}, Smit LM und Jakobs C (2003). Significant behavioral disturbances in succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH) deficiency (gamma-hydroxybutyric aciduria). *Biol. Psychiatr.* **54**: 763-768.
- Greenberg CR, Reimer D, Singal R, Triggs-Raine B, Chudley AE, Dilling LA, Philipps S, Haworth JC, Seargeant LE und Goodman SI (1995). A G-to-T transversion at the +5 position of intron 1 in the glutaryl CoA dehydrogenase gene is associated with the Island Lake variant of glutaric acidemia type I. *Hum. Mol. Genet.* **4**: 493-495.
- Greenberg CR, Prasad AN, Dilling LA, Thompson JR, Haworth JC, Martin B, Wood-Steiman P, Seargeant LE, Seifert B, Booth FA, und Prasad C (2002). Outcome of the first 3-years of a DNA-based neonatal screening program for glutaric acidemia type 1 in Manitoba and northwestern Ontario, Canada. *Mol. Genet. Metab.* **75**: 70-78
- Greene JG, Porter RH, Eller RV und Greenamyre JT (1993). Inhibition of succinate dehydrogenase by malonic acid produces an "excitotoxic" lesion in rat striatum. *J. Neurochem.* **61**: 1151-4.
- Grompe M, Laconi E und Shafritz DA (1999). Principles of therapeutic liver repopulation. *Semin. Liver Dis.* **19**: 7-14.
- Goodman SI, Norenberg MD, Shikes RH, Breslich DJ und Moe PG (1977). Glutaric aciduria: biochemical and morphologic considerations. *J. Pediatr.* **90**: 746-750.
- Goodman SI, Stein DE, Schlesinger S, Christensen E, Schwartz M, Greenberg CR und Elpeleg ON (1998). Glutaryl-CoA dehydrogenase mutations in glutaric acidemia (type I): review and report of thirty novel mutations. *Hum. Mutat.* **12**: 141-144.
- Gulledge AT und Stuart GJ (2003). Excitatory actions of GABA in the cortex. *Neuron* **37**: 299-309.
- Gupta M, Greven R, Jansen EE, Jakobs C, Hogema BM, Froestl W, Snead OC, Bartels H, Grompe M und Gibson KM (2002). Therapeutic intervention in mice deficient for succinate semialdehyde dehydrogenase (gamma-hydroxybutyric aciduria). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **302**: 180-187.
- Gupta M, Polinsky M, Senephansiri H, Snead OC, Jansen EE, Jakobs C und Gibson KM (2004a). Seizure evolution and amino acid imbalances in murine succinate semialdehyde dehydrogenase (SSADH) deficiency. *Neurobiol. Dis.* **16**: 556-562.
- Gupta M, Jansen EE, Senephansiri H, Jakobs C, Snead OC, Grompe M und Gibson KM (2004b). Liver-directed adenoviral gene transfer in murine succinate semialdehyde dehydrogenase deficiency. *Mol. Ther.* **9**: 527-539.

H

- Haddad GG und Jiang C (1993). O₂ deprivation in the central nervous system: on the mechanisms of neuronal response, differential sensitivity and injury. *Prog. Neurobiol.* **40**: 277–318.
- Hamada M, Koike K, Nakaula Y, Hiraoka T und Koike MA (1975). Kinetic study of the alpha-keto acid dehydrogenase complexes from pig heart mitochondria. *J. Biochem.* **77**: 1047-56.
- Hamman K, Clark H, Montini E, Al-Dhalimy M, Grompe M, Finegold M und Harding CO (2005). Low therapeutic threshold for hepatocyte replacement in murine phenylketonuria. *Mol. Ther.* **12**: 337-344.
- Hansford RG (1980). Control of mitochondrial substrate oxidation. *Curr. Top. Bioenerg.* **10**: 217-278.
- Harris RA, Joshi M, Jeoung NH und Obayashi M (2005). Overview of the molecular and biochemical basis of branched-chain amino acid catabolism. *J. Nutr.* **135**: 1527S-30S.
- Hassel B und Brathe A (2000). Cerebral metabolism of lactate in vivo: evidence for neuronal pyruvate carboxylation. *J. Neurosci.* **20**: 1342-1347.
- Hassel B, Brathe A und Petersen DJ (2002). Cerebral dicarboxylate transport and metabolism studied with isotopically labelled fumarate, malate and malonate. *J. Neurochem.* **82**: 410-419.
- Hechler V, Ratomponirina C und Maitre M (1997). Gamma-hydroxybutyrate conversion into GABA induces displacement of GABAB binding that is blocked by valproate and ethosuximide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **281**: 753-760.
- Helenius A und Simons K (1972). The binding of detergents to lipophilic and hydrophilic proteins. *J. Biol. Chem.* **247**: 3656-3661.
- Herrero A und Barja G (2000). Localization of the site of oxygen radical generation inside the Complex I of heart and nonsynaptic brain mammalian mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **32**: 609–615.
- Heyes MP (1987). Hypothesis: a role for quinolinic acid in the neuropathology of glutaric aciduria type I. *Can. J. Neurol. Sci.* **14**: 441-443.
- Hirsch JA und Gibson GE (1984). Selective alteration of neurotransmitter release by low oxygen in vitro. *Neurochem Res.* **9**: 1039-1049.
- Hoffmann GF, Trefz FK, Barth PG, Bohles HJ, Biggemann B, Bremer HJ, Christensen E, Frosch M, Hanefeld F, Hunneman DH, *et al.* (1991). Glutaryl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: a distinct encephalopathy. *Pediatrics* **88**: 1194-203.
- Hoffmann GF, Athanassopoulos S, Burlina AB, Duran M, de Klerk JB, Lehnert W, Leonard JV, Monavari AA, Muller E, Muntau AC, Naughten ER, Plecko-Starting B, Superti-Furga A, Zschocke J und Christensen E (1996). Clinical course, early diagnosis, treatment, and prevention of disease in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Neuropediatrics* **27**: 115-123.

- Hogema BM, Akaboshi S, Taylor M, Salomons GS, Jakobs C, Schutgens RB, Wilcken B, Worthington S, Maropoulos G, Grompe M und Gibson KM (2001a). Prenatal diagnosis of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency: increased accuracy employing DNA, enzyme, and metabolite analyses. *Mol. Genet. Metab.* **72**: 218-222.
- Hogema BM, Gupta M, Senephansiri H, Burlingame TG, Taylor M, Jakobs C, Schutgens RB, Froestl W, Snead OC, Diaz-Arrastia R, Bottiglieri T, Grompe M und Gibson KM (2001b). Pharmacologic rescue of lethal seizures in mice deficient in succinate semialdehyde dehydrogenase. *Nature Genetics* **29**: 212-216.
- Holm S (1979). A Simple Sequentially Rejective Multiple Test Procedure. *Scandinavian Journal of Statistics* **6**: 65-70.
- Hosford DA, Clark S, Cao Z, Wilson WA Jr, Lin FH, Morrisett RA und Huin A (1992). Role of GABAB receptor activation in absence seizures of lethargic (lh/lh) mice. *Science* **257**: 398-401.
- Hu RQ, Cortez MA, Man HY, Roder J, Jia Z, Wang YT und Snead OC^{3rd} (2001). Gamma-hydroxybutyric acid-induced absence seizures in GluR2 null mutant mice. *Brain Res.* **897**: 27-35.
- Huang HM, Ou HC, Xu H, Chen HL, Fowler C und Gibson GE (2003). Inhibition of alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex promotes cytochrome c release from mitochondria, caspase-3 activation, and necrotic cell death. *J. Neurosci. Res.* **74**: 309-317.
- Humphries KM und Szweda LI (1998). Selective inactivation of alpha-ketoglutarate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase: reaction of lipoic acid with 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochemistry* **37**: 15835-15841.
- Huwylar J, Drewe J, Klusemann C und Fricker G (1996). Evidence for P-glycoprotein-modulated penetration of morphine-6-glucuronide into brain capillary endothelium. *Br. J. Pharmacol.* **118**: 1879-85.
- I
- Inglefield JR und Schwartz-Bloom RD (1998). Activation of excitatory amino acid receptors in the rat hippocampal slice increases intracellular Cl and cell volume. *J. Neurochem.* **71**: 1396-1404.
- Isokawa M (1996). Decrement of GABAA receptor-mediated inhibitory postsynaptic currents in dentate granule cells in epileptic hippocampus. *J. Neurophysiol.* **75**: 1901-1908.
- Ito A, Ogishima T, Ou W, Omura T, Aoyagi H, Lee S, Mihara H und Izumiya N (1985). Effects of synthetic model peptides resembling the extension peptides of mitochondrial enzyme precursors on import of the precursors into mitochondria. *J. Biochem.* **98**: 1571-1582.
- J
- Jakobs C, Bojasch M, Monch E, Rating D, Siemes H und Hanefeld F (1981). Urinary excretion of gamma-hydroxybutyric acid in a patient with neurological abnormalities. The probability of a new inborn error of metabolism. *Clin. Chim. Acta.* **111**: 169-178.

- Jakobs C, Jaeken J und Gibson KM (1993). Inherited disorders of GABA metabolism. *J. Inherit. Metab. Dis.* **16**: 704–715.
- Jansen EE, Verhoeven NM, Jakobs C, Schulze A, Senephansiri H, Gupta M, Snead OC und Gibson KM (2006). Increased guanidino species in murine and human succinate semialdehyde dehydrogenase (SSADH) deficiency. *Biochim. Biophys. Acta.* **1762**: 494-8.
- Jeitner TM, Xu H und Gibson GE (2005). Inhibition of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex by the myeloperoxidase products, hypochlorous acid and mono-N-chloramine. *J. Neurochem.* **92**: 302-310.
- Jelitai M, Anderova M, Marko K, Kekesi K, Koncz P, Sykova E und Madarasz E (2004). Role of g-aminobutyric acid in early neuronal development: studies with an embryonic neuroectodermal stem cell clone. *J. Neurosci. Res.* **76**: 801-811.
- K
- Kasuya F, Oti Y, Tatsuki T und Igarashi K (2004). Analysis of medium-chain acyl-coenzyme A esters in mouse tissues by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **325**: 196-205.
- Kaupmann K, Cryan JF, Wellendorph P, Mombereau C, Sansig G, Klebs K, Schmutz M, Froestl W, van der Putten H, Mosbacher J, Brauner-Osborne H, Waldmeier P und Bettler B (2003). Specific gamma-hydroxybutyrate-binding sites but loss of pharmacological effects of g-hydroxybutyrate in GABAB(1)-deficient mice. *Eur. J. Neurosci.* **18**: 2722-2730.
- Khalilov I, Holmes GL und Ben-Ari Y (2003). In vitro formation of a secondary epileptogenic mirror focus by interhippocampal propagation of seizures. *Nat. Neurosci.* **6**: 1079–1085.
- Kikuchi R, Kusuhara H, Sugiyama D und Sugiyama Y (2003). Contribution of the organic anion transporter 3 (*Slc22a8*) to the elimination of *p*-aminohippuric acid and benzylpenicillin across the blood-brain barrier. *J. Pharmacol. Exper. Therap.* **306**: 51-58.
- Kim GW, Copin JC, Kawase M, Chen SF, Sato S, Gobbel GT und Chan PH (2000). Excitotoxicity is required for induction of oxidative stress and apoptosis in mouse striatum by the mitochondrial toxin, 3-nitropropionic acid. *J. Cereb. Blood. Flow Metab.* **20**: 119-29.
- Kingston AE, O'Neill MJ und Bond A (1999). Neuroprotective actions of novel and potent ligands of group I and group II metabotropic glutamate receptors. *Ann. NY Acad. Sci.* **890**: 438-449.
- Klivenyi P, Starkov AA, Calingasan NY, Gardian G, Browne SE, Yang L, Bubber P, Gibson GE, Patel MS und Beal MF (2004). Mice deficient in dihydrolipoamide dehydrogenase show increased vulnerability to MPTP, malonate and 3-nitropropionic acid neurotoxicity. *J. Neurochem.* **88**: 1352-1360.

- Kobayashi T, Matsumine H, Matuda S und Mizuno Y (1998). Association between the gene encoding the E2 subunit of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex and Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **43**: 120-123.
- Koeller DM, DiGiulio KA, Angeloni SV, Dowler LL, Frerman FE, White RA und Goodman SI (1995). Cloning, structure, and chromosome localization of the mouse glutaryl-CoA dehydrogenase gene. *Genomics* **28**: 508-512.
- Koeller DM, Woontner M, Crnic LS, Kleinschmidt-DeMasters B, Stephens J, Hunt EL und Goodman SI (2002). Biochemical, pathologic and behavioral analysis of a mouse model of glutaric acidemia type I. *Hum. Mol. Genet.* **11**: 347-357.
- Kölker S, Ahlemeyer B, Krieglstein J und Hoffmann GF (1999). 3-Hydroxyglutaric and glutaric acids are neurotoxic through NMDA receptors in vitro. *J. Inherit. Metab. Dis.* **22**: 259-62.
- Kölker S, Ahlemeyer B, Krieglstein J und Hoffmann GF (2000a). Maturation-dependent neurotoxicity of 3-hydroxyglutaric and glutaric acids in vitro: A new pathophysiologic approach to glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatr. Res.* **47**: 495-503.
- Kölker S, Ahlemeyer B, Krieglstein J und Hoffmann GF (2000b). Evaluation of trigger factors of acute encephalopathy in glutaric aciduria type I: fever and tumour necrosis factor-alpha. *J. Inherit. Metab. Dis.* **23**: 359-62.
- Kölker S, Ahlemeyer B, Krieglstein J und Hoffmann GF (2001a). Contribution of reactive oxygen species to 3-hydroxyglutarate neurotoxicity in primary neuronal cultures from chick embryo telencephalons. *Pediatr. Res.* **50**: 76-82.
- Kölker S, Ahlemeyer B, Hühne R, Mayatepek E, Krieglstein J und Hoffmann GF (2001b). Potentiation of 3-hydroxyglutarate neurotoxicity following induction of astrocytic iNOS in neonatal rat hippocampal cultures. *Eur. J. Neurosci.* **13**: 2115-2122.
- Kölker S, Köhr G, Ahlemeyer B, Okun JG, Pawlak V, Hörster F, Mayatepek E, Krieglstein J und Hoffmann GF (2002a). Ca²⁺ and Na⁺ dependence of 3-hydroxyglutarate-induced excitotoxicity in primary neuronal cultures from chick embryo telencephalons. *Pediatr. Res.* **52**: 199-206.
- Kölker S, Okun JG, Ahlemeyer B, Wyse AT, Hörster F, Wajner M, Kohlmüller D, Mayatepek E, Krieglstein J und Hoffmann GF (2002b). Chronic treatment with glutaric acid induces partial tolerance to excitotoxicity in neuronal cultures from chick embryo telencephalons. *J. Neurosci. Res.* **68**: 424-431.
- Kölker S, Hoffmann GF, Schor DS, Feyh P, Wagner L, Jeffrey I, Pourfarzam M, Okun JG, Zschocke J, Baric I, Bain MD, Jakobs C und Chalmers RA (2003a). Glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency: region-specific analysis of organic acids and acylcarnitines in post mortem brain predicts vulnerability of the putamen. *Neuropediatrics* **34**: 253-260.
- Kölker S, Schwab M, Hörster F, Sauer S, Hinz A, Wolf NI, Mayatepek E, Hoffmann GF, Smeitink JAM und Okun JG (2003b). Methylmalonic acid, a biochemical hallmark of methylmalonic acidurias but no inhibitor of mitochondrial respiratory chain. *J. Biol. Chem.* **278**: 47388-47393.

- Kölker S, Koeller DM, Okun JG und Hoffmann GF (2004a). Pathomechanisms of neurodegeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Ann. Neurol.* **55**: 7-12.
- Kölker S, Greenberg CR, Müller E, Naughten ER und Hoffmann GF (2004b). Emergency treatment in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* **27**: 893-902.
- Kölker S, Garbade SF, Greenberg CR *et al.* (2006) Natural history, outcome, and treatment efficacy in children and adults with glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Ped. Res.* (Epub ahead of print).
- Korein J, Sansaricq C, Kalmijn M, Honig J und Lange B (1994). Maple syrup urine disease: clinical, EEG, and plasma amino acid correlations with a theoretical mechanism of acute neurotoxicity. *Int. J. Neurosci.* **79**: 21-45.
- Kruskal WH und Wallis WA (1952). Use of ranks in one criterion variance analysis. *J. Amer. Stat. Ass.* **47**: 583-621.
- Kumar MJ, Nicholis DG und Andersen JK (2003). Oxidative alpha-ketoglutarate dehydrogenase inhibition via subtle elevations in monoamine oxidase B levels results in loss of spare respiratory capacity: implications for Parkinson's disease. *J. Biol. Chem.* **47**: 46432-46439.
- Külkens S, Harting I, Sauer S, Zschocke J, Hoffmann GF, Gruber S, Bodamer OA und Kölker S (2005). Late-onset neurologic disease in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Neurology* **64**: 2142-2144.
- Kyllerman M, Skjeldal O, Christensen E, Hagberg G, Holme E, Lonquist T, Skov L, Rotwelt T und von Dobeln U (2004). Long-term follow-up, neurological outcome and survival rate in 28 Nordic patients with glutaric aciduria type 1. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* **8**: 121-129
- L
- Lai JC, Walsh JM, Dennis SC und Clark JB (1977). Synaptic and non-synaptic mitochondria from rat brain: isolation and characterization. *J. Neurochem.* **28**: 625-631.
- Lash LH und Putt DA. (1999). Renal cellular transport of exogenous glutathione: heterogeneity at physiological and pharmacological concentrations. *Biochem. Pharmacol.* **58**: 897-907.
- Laterra J, Rndurti R und Goldstein GW (1994). Regulation of *in vitro* glia-induced microvessel morphogenesis by urokinase. *J. Cell Physiol.* **158**: 317-324.
- Latini A, Borba Rosa R, Scussiato K, Llesuy S, Bello-Klein A und Wajner M (2002). 3-Hydroxyglutaric acid induces oxidative stress and decreases the antioxidant defenses in cerebral cortex of young rats. *Brain Res.* **956**: 367-373.
- Lee JM, Zipfel GJ und Choi DW (1999). The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature* **399**: A7-14.

- Leibel RL, Shih VE, Goodman SI, Bauman ML, McCabe ER, Zwerdling RG, Berman I und Costello C. (1980). Glutaric acidemia: a metabolic disorder causing progressive choreoathetosis. *Neurology* **30**: 1163-1168.
- Leinekugel X, Khalilov I, McLean H, Caillard O, Gaiarsa JL, Ben-Ari Y und Khazipov R (1999). GABA is the principal fast-acting excitatory transmitter in the neonatal brain. *Adv. Neurol.* **79**: 189–201.
- Lenartowicz E und Olson MS (1978). The inhibition of alpha-ketoglutarate oxidation by fatty acids in rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **253**: 5990-5996.
- Lenaz G, Bovina C, Formiggini G und Parenti Castelli G (1999). Mitochondria, oxidative stress, and antioxidant defences. *Acta Biochim. Polon.* **46**: 1-21.
- Lenaz G (2001). The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. *IUBMB Life* **52**: 159–164.
- Lima TT, Begnini J, de Bastiani J, Fialho DB, Jurach A, Ribeiro MC, Wajner M und de Mello CF (1998). Pharmacological evidence for GABAergic and glutamatergic involvement in the convulsant and behavioral effects of glutaric acid. *Brain. Res.* **802**: 55-60.
- Linnane AW, Marzuki S, Ozawa T und Tanaka M (1989). Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases. *Lancet* **1**: 642-645.
- Lindner M, Kölker S, Schulze A, Christensen E, Greenberg CR und Hoffmann GF (2004). Neonatal screening for glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Inherit. Metab. Dis.* **27**: 851-859.
- Lindstedt S, Holme E, Lock EA, Hjalmarson O und Strandvik B (1992). Treatment of hereditary tyrosinaemia type I by inhibition of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Lancet* **340**: 813-817.
- Lingenhoehl K, Brom R, Heid J, Beck P, Froestl W, Kaupmann K, Bettler B und Mosbacher J (1999). Gamma-hydroxybutyrate is a weak agonist at recombinant GABA(B) receptors. *Neuropharmacology* **38**: 1667-1673.
- Linn TC, Pettit FH, Hucho F und Reed LJ (1969a). Alpha-keto acid dehydrogenase complexes. XI. Comparative studies of regulatory properties of the pyruvate dehydrogenase complexes from kidney, heart, and liver mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **64**: 227-34.
- Linn TC, Pettit FH und Reed LJ. (1969b). Alpha-keto acid dehydrogenase complexes. X. Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex from beef kidney mitochondria by phosphorylation and dephosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **62**: 234-41.
- Lipton SA, Choi YB und Pan ZH (1993). A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitrosocompounds. *Nature* **364**: 626-632.
- Lodi R, Rajagopalan B, Bradley JL, Taylor DJ, Crilley JG, Hart PE, Blamire AM, Manners D, Styles P, Schapira AH und Cooper JM (2002). Mitochondrial dysfunction in

- Friedreich's ataxia: from pathogenesis to treatment perspectives. *Free. Radic. Res.* **36**: 461-6.
- Lowry OH, Roseborough NR und Farr AJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Loup F, Wieser HG, Yonekawa Y, Aguzzi A und Fritschy JM (2000). Selective alterations in GABAA receptor subtypes in human temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci.* **20**: 5401–5419.
- Lund TM, Christensen E, Kristensen E, Schousboe A und Lund AM (2004). On the neurotoxicity of glutaric, 3-hydroxyglutaric, and *trans*-glutaconic acids in glutaric aciduria type 1. *J. Neurosci. Res.* **77**: 143-147.
- Lu YM, Yin HZ und Chiang J (1996). Ca⁽²⁺⁾-permeable AMPA/kainate and NMDA channels: high rate of Ca²⁺ influx underlies potent induction of injury. *J Neurosci* **16**: 5457-5465.
- M
- Mann HB und Whitney DR (1947). On a test of wether one of 2 random variables is stochastically larger than the other. *Annals of Mathematical Statistics* **18**: 50-60.
- Maas E und Bisswanger H (1990). Localization of the alpha-oxoacid dehydrogenase multienzyme complexes within the mitochondrion. *FEBS Lett.* **277**: 189–190.
- Magistretti PJ, Pellerin L, Rothman DL und Shulman RG (1999). Energy on demand. *Science* **283**: 496-497.
- Magloczky Z und Freund TF (2005). Impaired and repaired inhibitory circuits in the epileptic human hippocampus. *Trends Neurosci.* **28**: 334-40.
- Maitre M, Andriamampandry C, Kemmel V, Schmidt C, Hode Y, Hechler V und Gobaille S (2000). Gamma-hydroxybutyric acid as a signaling molecule in brain. *Alcohol* **20**: 277-283.
- Manfredi G und Xu Z (2005). Dysfunction and its role in motor neuron degeneration in ALS. *Mitochondrion* **5**: 77-87.
- Matern D, Lehnert W, Gibson KM und Korinthenberg R (1996). Seizures in a boy with succinic semialdehyde dehydrogenase deefciency treated with vigabatrin (g-vinyl-GABA). *J. Inherit. Metab. Dis.* **19**: 313-318.
- McMillan TA, Gibson KM, Sweetman L, Meyers GS und Green R (1988). Conservation of central nervous system glutaryl-coenzyme A dehydrogenase in fruit-eating bats with glutaric aciduria and deficient hepatic glutaryl-coenzyme A dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **263**: 17258-17261.
- Mizuno Y, Matsuda S, Yoshino H, Mori H, Hattori N und Ikebe SI (1994). An immunohistochemical study on alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **35**: 204-210.

- Mizuno Y, Ikebe S, Hattori N, Nakagawa-Hattori Y, Mochizuki H, Tanaka M und Ozawa T (1995). Role of mitochondria in the etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta.* **1271**: 265-274.
- Monavari AA und Naughten ER (2000). Prevention of cerebral palsy in glutaric aciduria type 1 by dietary management. *Arch. Dis. Child.* **82**: 67-70.
- Morrison JF (1954). The activation of aconitase by ferrous ions and reducing agents. *Biochem. J.* **58**: 685-692.
- Morton DH, Strauss KA, Robinson DL, Puffenberger EG und Kelley RI (2002). Diagnosis and treatment of maple syrup disease: a study of 36 patients. *Pediatrics* **109**: 999-1008.
- Mühlhausen C, Christensen E, Schwartz M, Muschol N, Ullrich K und Lukacs Z (2003). Severe phenotype despite high residual glutaryl-CoA dehydrogenase activity: a novel mutation in a Turkish patient with glutaric aciduria type I. *J. Inherit. Metab. Dis.* **26**: 713-714.
- Mukhin A, Fan L und Faden AI (1996). Activation of metabotropic glutamate receptor subtype mGluR1 contributes to posttraumatic neuronal injury. *J. Neurosci.* **16**: 6012-6020.
- Mueller SG, Trabesinger AH, Boesiger P und Wieser HG (2001). Brain glutathione levels in patients with epilepsy measured by in vivo (1)H-MRS. *Neurology* **57**: 1422-7.
- Murphy AN, Fiskum G und Beal MF (1999). Mitochondria in neurodegeneration: bioenergetic function in cell life and death. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **19**: 231-245.
- Murphy TC, Poppe C, Porter JE, Montine TJ und Picklo MJ (2004). 4-Hydroxy-trans-2-nonenic acid is a gamma-hydroxybutyrate receptor ligand in the cerebral cortex and hippocampus. *J. Neurochem.* **89**: 1462-1470.
- N
- Nakao N, Kokaia Z, Odin P und Lindvall O (1995). Protective effects of BDNF and NT-3 but not PDGF against hypoglycemic injury to cultured striatal neurons. *Exp. Neurol.* **131**: 1-10.
- Naughten ER, Mayne PD, Monavari AA, Goodman SI, Sulaiman G und Croke DT (2004). Glutaric aciduria type I: outcome in the Republic of Ireland. *J. Inherit. Metab. Dis.* **27**: 917-920.
- Nicholls D und Attwell D (1990). The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol. Sci.* **11**: 462-468.
- Nicholls DG (2004). Mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity studied in primary neuronal cultures. *Curr. Mol. Med.* **4**: 149-77.
- Nishino H, Shimano Y, Kumazaki M und Sakurai T (1995). Chronically administered 3-nitropropionic acid induces striatal lesions attributed to dysfunction of the blood-brain barrier. *Neurosci. Lett.* **186**: 161-164.

- Nishino H, Hida H, Kumazaki M, Shimano Y, Nakajima K, Shimizu H, Ooiwa T und Baba H (2000). The striatum is the most vulnerable region in the brain to mitochondrial energy compromise: a hypothesis to explain its specific vulnerability. *J. Neurotrauma* **17**: 251-60.
- Novelli A, Reilly JA, Lysko PG und Henneberry RC (1988). Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain Res.* **451**: 205-212.
- O
- Obrenovitch TP und Richards DA (1995). Extracellular neurotransmitter changes in cerebral ischaemia. *Cerebrovasc. Brain. Metab. Rev.* **7**: 1-54.
- Obrietan K und van den Pol AN (1995). GABA neurotransmission in the hypothalamus: developmental reversal from Ca^{2+} elevating to depressing. *J. Neurosci.* **15**: 5065–5077.
- Ohtsuki S, Asaba H, Takanaga H, Deguchi T, Hosoya K, Otagiri M und Terasaki T (2002). Role of blood-brain barrier organic anion transporter 3 (OAT3) in the efflux of indoxyl sulphate, a uremic toxin: its involvement in the neurotransmitter metabolite clearance from the brain. *J. Neurochem.* **83**: 57-66.
- Okun JG, Lummen P und Brandt U (1999). Three classes of inhibitors share a common binding domain in mitochondrial complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase). *J. Biol. Chem.* **274**: 2625-30.
- Okun JG, Hörster F, Farkas LM, Feyh P, Hinz A, Sauer S, Hoffmann GF, Unsicker K, Mayatepek E und Kölker S (2002). Neurodegeneration in methylmalonic aciduria involves inhibition of complex II and the tricarboxylic acid cycle, and synergistically acting excitotoxicity. *J. Biol. Chem.* **277**: 14674-14680.
- Okun JG, Sauer S, Bahr S, Lenhartz H und Mayatepek EJ (2004). S-Acetylglutathione normalizes intracellular glutathione content in cultured fibroblasts from patients with glutathione synthetase deficiency. *Inherit. Metab. Dis.* **27**: 783-786.
- Olney JW und Sharpe LG (1969). Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate. *Science.* **166**: 386-388.
- Olney JW und Ho OL (1970). Brain damage in infant mice following oral intake of glutamate, aspartate or cysteine. *Nature* **227**: 609-611.
- Olney JW (1971). Glutamate-induced neuronal necrosis in the infant mouse hypothalamus. An electron microscopic study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **30**: 75-90.
- Olney JW, Sharpe LG und Feigin RD (1972). Glutamate-induced brain damage in infant primates. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **31**: 464-488.
- Olney JW (1986). Inciting excitotoxic cytochrome among central neurons. *Adv. Exp. Med. Biol.* **203**: 631-645.
- Ozawa T (1997). Genetic and functional changes in mitochondria associated with aging. *Physiol. Rev.* **77**: 425-464

P

- Palmisano A, Zara V, Honlinger A, Vozza A, Dekker PJ, Pfanner N und Palmieri F (1998). Targeting and assembly of the oxoglutarate carrier: general principles for biogenesis of carrier proteins of the mitochondrial inner membrane. *Biochem. J.* **333**: 151-8.
- Park LC, Zhang H, Sheu KF, Calingasan NY, Kristal BS, Lindsay JG und Gibson GE (1999). Metabolic impairment induces oxidative stress, compromises inflammatory responses, and inactivates a key mitochondrial enzyme in microglia. *J. Neurochem.* **72**: 1948-1958.
- Paschen SA und Neupert W (2001). Protein import into mitochondria. *IUBMB Life* **52**: 101-112.
- Pastore A, Federici G, Bertini E und Piemonte F (2003). Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin. Chim. Acta.* **333**: 19-39.
- Patel AJ, Regan CM, Annunziata P, Meier E und Balazs R (1982). Biochemical characterization and interaction of neuronal and glial cells in culture. *Biochem. Soc. Trans.* **10**: 419-21.
- Pellerin L und Magistretti PJ (1994). Glutamate uptake into astrocytes stimulates anaerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 10625-10629.
- Pearl PL, Gibson KM, Acosta MT, Vezina LG, Theodore WH, Rogawski MA, Novotny EJ, Gropman A, Conry JA., Berry GT und Tuchman M (2003). Clinical spectrum of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency. *Neurology* **60**: 1413-1417.
- Pearl PL, Wallis DD und Gibson KM (2004). Pediatric neurotransmitter diseases. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **4**: 147-152.
- Pellerin L und Magistretti PJ (2003). Food for thought: challenging the dogmas. *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* **23**: 1282-6.
- Percy JM, Pryde JG und Apps DK (1985). Isolation of ATPase I, the proton pump of chromaffin-granule membranes. *Biochem. J.* **3**: 557-64.
- Pettit, FH, Pelly JW und Reed LJ (1975). Regulation of pyruvate dehydrogenase kinase and phosphatase by acetyl CoA/CoA and NADH/NAD⁺ ratios. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **65**: 575-582.
- Pfriegeer FW und Barres BA (1996). New views on synapse-glia interactions. *Curr. Opin. Neurobiol.* **6**: 615-621
- Pietz J, Kreis R, Rupp A, Mayatepek E, Rating D, Boesch C und Bremer HJ (1999). Large neutral amino acids block phenylalanine transport into brain tissue in patients with phenylketonuria. *J. Clin. Invest.* **103**: 1169-1178.
- Porciuncula LO, Dal-Pizzol A Jr, Coitinho AS, Emanuelli T, Souza DO und Wajner M (2000). Inhibition of synaptosomal [³H]glutamate uptake and [³H]glutamate binding to plasma membranes from brain of young rats by glutaric acid in vitro. *J. Neurol. Sci.* **73**: 93-96.

Pulsinelli WA, Brierley JB und Plum F (1982). Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann. Neurol.* **11**: 491–498.

R

Reed DJ und Fariss MW (1984). Glutathione depletion and susceptibility. *Pharmacol. Rev.* **36**: 25S-33S.

Rego AC und Oliveira CR (2003). Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity and apoptosis: implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Neurochem. Res.* **28**: 1563-74.

Reichmann H, Maltese WA und de Vivo DC (1988). Enzymes of fatty acid beta-oxidation in developing brain. *J. Neurochem.* **51**: 339-344.

Ribatti D, Nico B, Crivellato E und Artico M (2006). Development of the blood-brain barrier: a historical point of view. *Anat. Rec. B. New Anat.* **2891**: 3-8.

Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Lahtinen H, Lamsa K, Pirvola U, Saarma M und Kaila K (1999). The K⁺/Cl⁻co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* **397**: 251–255.

Rosa RB, Schwarzbald C, Dalcin KB, Ghisleni GC, Ribeiro CA, Moretto MB, Frizzo ME, Hoffmann GF, Souza DO und Wajner M (2004). Evidence that 3-hydroxyglutaric acid interacts with NMDA receptors in synaptic plasma membranes from cerebral cortex of young rats. *Neurochem. Int.* **45**: 1087-1094.

Rothman S (1984). Synaptic release of excitatory amino acid neurotransmitter mediates anoxic neuronal death. *J. Neurosci.* **4**: 1884-1891.

Rothman SM und Olney JW (1986). Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. *Ann. Neurol.* **19**: 105-111.

Rothman DL, Sibson NR, Hyder F, Shen J, Behar KL und Shulman RG (1999). In vivo nuclear magnetic resonance spectroscopy studies of the relationship between the glutamate-glutamine neurotransmitter cycle and functional neuroenergetics. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **354**: 1165-1177.

Rubin LL, Hall DE und Porter SB (1991). A cell culture model of the blood—brain barrier. *J. Cell. Biol.* **115**: 1725-1735.

S

Sagara Y und Schubert D (1998). The activation of metabotropic glutamate receptors protects nerve cells from oxidative stress. *J. Neurosci.* **18**: 6662-6671.

Sauer SW, Okun JG, Schwab MA, Crnic LR, Hoffmann GF, Goodman SI, Koeller DM und Kölker S (2005). Bioenergetics in glutaryl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: a role for glutaryl-coenzyme A. *J. Biol. Chem.* **280**: 21830-21836.

Sauer SW, Okun JG, Fricker G, Mahringer A, Muller I, Crnic LR, Muhlhausen C, Hoffmann GF, Horster F, Goodman SI, Harding CO, Koeller DM und Kölker S (2006). Intracerebral accumulation of glutaric and 3-hydroxyglutaric acids secondary to

- limited flux across the blood-brain barrier constitute a biochemical risk factor for neurodegeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J. Neurochem.* (Epub ahead of print).
- Schinder AF, Olson EC und Spitzer NC (1996). Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. *J. Neurosci.* **16**: 6125-6133.
- Schoerken U und Sprenger GA (1998). Thiamin-dependent enzymes as catalysts in chemoenzymatic syntheses. *Biochim. Biophys. Acta* **1385**: 229-243.
- Schor DS, Verhoeven N, Struys E, ten Brink H und Jakobs C (2002). Quantification of 3-hydroxyglutaric acid in urine, plasma, cerebrospinal fluid and amniotic fluid by sTabelle-isotope dilution negative chemical ionization gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **780**: 199-204.
- Schousboe A, Westergaard N, Waagepetersen HS, Larsson OM, Barken IJ und Sonnewald U (1997). Trafficking between glia and neurons of TCA cycle intermediates and related metabolites. *Glia* **21**: 99-105.
- Schwab MA, Kolker S, van den Heuvel LP, Sauer SW, Wolf NI, Rating D, Hoffmann GF, Smeitink JA und Okun JG (2005). Optimized Spectrophotometric Assay for the Completely Activated Pyruvate Dehydrogenase Complex in Fibroblasts. *Clin. Chem.* **51**: 151-60.
- Schwab MA, Sauer SW, Okun J, Nijtmans LGJ, Rodenburg RJT, van den Heuvel LP, Dröse D, Brandt U, Hoffmann GF, ter Laak H, Kölker S und Smeitink JAM (2006). Bioenergetics in propionic aciduria. *Biochem. J.* (revidiertes Manuskript eingereicht).
- Schulze A, Lindner M, Kohlmüller D, Olgemöller K, Mayatepek E und Hoffmann GF (2003). Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism by electrospray ionization-tandem mass spectrometry: results, outcome, and implications. *Pediatrics* **111**: 1399-1406.
- Shaw LMJ und Westerfeld WW (1968). A study of the enzymatic reactions involved in the formation of 5-hydroxy-4-ketohexanoic acid and its isomer, 5-keto-4-hydroxyhexanoic acid. *Biochemistry* **7**: 1333-1338.
- Sheu KF, Brown AM, Kristal BS, Kalaria RN, Lilius L, Lannfelt L und Blass JP (1999). Modulation by DLST of the genetic risk of Alzheimer's disease in a very elderly population. *Ann. Neurol.* **45**: 312-318.
- Shi Q, Chen HL, Xu H und Gibson GE (2005). Reduction in the E2k subunit of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex has effects independent of complex activity. *J. Biol. Chem.* **280**: 10888-96.
- Shumate MD, Lin DD, Gibbs JW^{3rd}, Holloway KL und Coulter DA (1998). GABAA receptor function in epileptic human dentate granule cells: comparison to epileptic and control rat. *Epilepsy Res.* **32**: 114-128.
- Siman R und Noszek JC (1988). Excitatory amino acids activate calpain I and induce structural protein breakdown in vivo. *Neuron* **1**: 279-287.

- Sinjorgo KM, Hakvoort TB, Durak I, Draijer JW, Post JK und Muijsers AO (1987). Human cytochrome c oxidase isoenzymes from heart and skeletal muscle; purification and properties. *Biochim. Biophys. Acta* **2**: 144-50.
- Smith AL (1967). Preparation, properties, and conditions for assay of mitochondria: Slaughterhouse material, small-scale. *Methods Enzymol.* **X**: 81-86.
- Snead OC (1978). Gamma hydroxybutyrate in the monkey: electroencephalographic, behavioral, and pharmacokinetic studies. *Neurology* **28**: 636-642.
- Snead OC (2000). Evidence for a G protein-coupled gamma-hydroxybutyric acid receptor. *J. Neurochem.* **75**: 1986-1996.
- Staley KJ, Soldo BL und Proctor WR (1995). Ionic mechanisms of neuronal excitation by inhibitory GABAA receptors. *Science* **269**: 977-81.
- Starling AJ, Andre VM, Cepeda C, de Lima M, Chandler SH und Levine MS. (2005). Alterations in N-methyl-D-aspartate receptor sensitivity and magnesium blockade occur early in development in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *J. Neurosci. Res. Nov.* **82**: 377-86.
- Stokke O, Goodman SI und Moe PG (1976). Inhibition of brain glutamate decarboxylase by glutarate, glutaconate, and beta-hydroxyglutarate: explanation of the symptoms in glutaric aciduria? *Clin. Chim. Acta.* **66**: 411-415.
- Storey E, Hyman BT, Jenkins BT, Brouillet E, Miller JM, Rosen BR und Beal MF (1992). MPP produces excitotoxic lesions in rat striatum due to impairment of oxidative metabolism. *J. Neurochem.* **58**: 1975-1978.
- Strasser U, Lobner D und Behrens MM (1998). Antagonists for group I mGluRs attenuate excitotoxic neuronal death in cortical cultures. *Eur. J. Neurosci.* **10**: 2848-2855.
- Strauss KA, Puffenberger EG, Robinson DL und Morton DH (2003). Type I glutaric aciduria, part 1: natural history of 77 patients. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* **121**: 38-52.
- Strauss KA und Morton HM (2003). Type I glutaric aciduria, part 2: a model of acute striatal necrosis. *Am. J. Med. Genet. C Sem. Med. Genet.* **121**: 53-70.
- Struys EA, Verhoeven NM, Salomons GS, Berthelot J, Vianay-Saban C, Chabrier S, Thomas JA, Tsai AC, Gibson KM und Jakobs C (2006). d-2-Hydroxyglutaric aciduria in three patients with proven SSADH deficiency: Genetic coincidence or a related biochemical epiphenomenon? *Mol. Genet. Metab. (Epub ahead of print)*.
- Sumegi B und Srere PA (1984). Complex I binds several mitochondrial NAD-coupled dehydrogenases. *J Biol Chem* **259**: 15040-15045.
- Sweet DH, Chan LMS, Walden R, Yang XP, Miller DS und Pritchard JB (2003). Organic anion transporter 3 (*Slc22a8*) is a dicarboxylate exchanger indirectly coupled to the Na⁺ gradient. *Am. J. Renal Physiol.* **284**: F763-F769.

Szatkowski M und Attwell D (1994). Triggering and execution of neuronal death in brain ischaemia: two phases of glutamate release by different mechanisms. *Trends. Neurosci.* **17**: 359-365.

T

Tabakman R, Lazarovici P und Kohen R (2002). Neuroprotective effects of carnosine and homocarnosine on pheochromocytoma PC12 cells exposed to ischemia. *J. Neurosci. Res.* **68**: 463-469.

Takakura Y, Kuentzel SL, Raub TJ, Davies A, Baldwin SA und Borchardt RT (1991). Hexose uptake in primary cultures of bovine brain microvessel endothelial cells. I. Basic characteristics and effects of D-glucose and insulin. *Biochim. Biophys. Acta* **1070**: 1-10.

Tamai I, Ohashi R, Nezu J, Yabuuchi H, Oku A, Shimane M, Sai Y und Tsuji A (1998). Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2. *J. Biol.Chem.* **273**: 20378 –20382.

Tamai I und Tsuji A (2000). Transporter-mediated permeation of drugs across the blood-brain barrier. *J. Pharm. Sci.* **89**: 1371-1388.

Tanaka T, Hosoi F, Yamaguchi-Iwai Y, Nakamura H, Masutani H, Ueda S, Nishiyama A, Takeda S, Wada H, Spyrou G und Yodoi J (2002). *EMBO J.* **21**: 1695-1703.

Torok M, Huwyler J, Drewe J, Gutmann H und Fricker G (1998). Transport of the beta-lactam antibiotic benzylpenicillin and the dipeptide glycylsarcosine by brain capillary endothelial cells in vitro. *Drug. Metab. Dispos.* **26**: 1144-1148.

Tortorelli S, Hahn SH, Cowan TM, Brewster TG, Rinaldo P und Matern D (2005). The urinary excretion of glutaryl carnitine is an informative tool in the biochemical diagnosis of glutaric aciduria type I. *Mol. Genet. Metab.* **84**: 137-143.

Torok M, Huwyler J, Drewe J, Gutmann H und Fricker G (1998). Transport of the beta-lactam antibiotic benzylpenicillin and the dipeptide glycylsarcosine by brain capillary endothelial cells in vitro. *Drug Metab. Dispos.* **26**: 1144-8.

Trettel F, Malaspina P, Jodice C, Novelletto A, Slaughter CA, Caudle DL, Hinson DD, Chambliss KL und Gibson KM (1997). Human succinic semialdehyde dehydrogenase: molecular cloning and chromosomal localization. *Adv. Exp. Med. Biol.* **414**: 253–260.

Tsacopoulos M und Magistretti PJ (1996). Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci.* **16**: 877-885.

Turrens JF (1997). Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci. Report* **17**: 3–8.

U

Ullrich K, Flott-Rahmel B, Schluff P, Musshoff U, Das A, Lucke T, Steinfeld R, Christensen E, Jakobs C, Ludolph A, Neu A und Roper R (1999). Glutaric aciduria type I: pathomechanisms of neurodegeneration. *J. Inherit. Metab. Dis.* **22**: 392-403.

V

- Varadkar S und Surtees R (2004). Glutaric aciduria type I and kynurenine pathway metabolites: a modified hypothesis. *J. Inherit. Metab. Dis.* **27**: 835-842.
- Vayer P, Mandel P und Maitre M (1985). Conversion of gamma-hydroxybutyrate to gamma-aminobutyrate in vitro. *J. Neurochem.* **45**: 810-814.
- Ventura FV, Ruiten JP, Ijst L, de Almeida IT und Wanders RJ (1996). Inhibitory effect of 3-hydroxyacyl-CoAs and other long-chain fatty acid beta-oxidation intermediates on mitochondrial oxidative phosphorylation. *J. Inherit. Metab. Dis.* **19**: 161-164.

W

- Wang H, Fei YJ, Kekuda R, Yang-Feng TL, Devoe LD, Leibach FH, Prasad PD und Ganapathy V (2000). Structure, function, and genomic organization of human Na⁽⁺⁾-dependent high-affinity dicarboxylate transporter. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **278**: C1019-C1030.
- Wang YF, Gao XB und van den Pol AN (2001). Membrane properties underlying patterns of GABA-dependent action potentials in developing mouse hypothalamic neurons. *J. Neurophysiol.* **86**: 1252–1265.
- Wilson CJ, Collins JE und Leonard JV (1999). Recurrent rhabdomyolysis in a child with glutaric aciduria type I. *J. Inherit. Metab. Dis.* **22**: 663-664.
- Woontner M, Crnic LS und Koeller DM (2000). Analysis of the expression of murine glutaryl-CoA dehydrogenase: in vitro and in vivo studies. *Mol. Genet. Metab.* **69**: 116-122.
- Wu Y, Ali S, Ahmadian G, Liu CC, Wang YT, Gibson KM, Calver AR, Francis J, Pangalos MN und Carter Snead O^{3rd} (2004). Gamma-Hydroxybutyric acid (GHB) and gamma-aminobutyric acid B receptor (GABABR) binding sites are distinctive from one another: molecular evidence. *Neuropharmacology* **47**: 1146-1156.
- Wu Y, Buzzi A, Frantseva M, Velazquez JP, Cortez M, Liu C, Shen L, Gibson KM und Snead OC^{3rd} (2006). Status epilepticus in mice deficient for succinate semialdehyde dehydrogenase: GABAA receptor-mediated mechanisms. *Ann. Neurol.* **59**: 42-52.

Y

- Yodoya E, Wada M, Shimada A, Katsukawa H, Okada N, Yamamoto A, Ganapathy V und Fujita T (2006). Functional and molecular identification of sodium-coupled dicarboxylate transporters in rat primary cultured cerebrocortical astrocytes and neurons. *J. Neurochem.* **97**: 162-173.

Z

- Zeevalk GD und Nicklas WJ (1990). Chemically induced hypoglycemia and anoxia: relationship to glutamate receptor-mediated toxicity in retina. *J. Pharm. Exp. Ther.* **253**: 1285-1292.

- Zeevalk GD und Nicklas WJ (1991). Mechanisms underlying initiation of excitotoxicity associated with metabolic inhibition. *J. Pharm. Exp. Ther.* **257**: 870-878.
- Ziegler D und Rieske JS (1967). Preparation and properties of succinate dehydrogenase-coenzyme Q reductase. *Methods Enzymol.* **10**: 231–234.
- Zinnanti WJ, Lazovic J, Wolpert EB, Antonetti DA, Smith MB, Connor JR, Woontner M, Goodman SI und Cheng KC. (2006). A diet-induced mouse model for glutaric aciduria type I. *Brain* **129**: 899-910.
- Zschocke J, Quak E, Guldberg P und Hoffmann GF (2000). Mutation analysis in glutaric aciduria type I. *J. Med. Genet.* **37**: 177-181.
- Zchoke J und Hoffmann GF (2004). Diagnose und Therapie erblicher Stoffwechselkrankheiten. *Vademecum Metabolicum*, 3.Auflage, Schattauer.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
AD	Morbus Alzheimer
ADP	Adenosin 5'-Diphosphat
ATP	Adenosin 5'-Triphosphat
BBB	Bluthirnschranke
BCEC	kultivierte kapilläre Endothelzellen aus Schweinehirn
BCKDHc	verzweigt-kettige-Ketosäure-Dehydrogenase-Komplex
CoA	Coenzym A
CS	Citrat-Synthase
d ₄ -GA	[2,2,4,4- ² H ₄]-GA
d ₅ -3-OH-GA	[2,2,3,4,4- ² H ₅]-3-OH-GA
DBH	Decylubihydrochinon
DBQ	3-Dimethoxy-5-Methyl-6-Decyl-1,4-Benzochinon
DCPIP	Dichlorophenolindophenol
4,5-DHHA	4,5-Dihydroxyhexansäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DQA	2-n-Decylquinazolin-4-yl-Amin 2
DTNB	5',5''-Dithiobis-(2-Nitrobenzoat)
EDTA	Ethylendiamin- <i>N, N, N', N'</i> -Tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-Aminoethylether)- <i>N, N, N', N'</i> -Tetraessigsäure
FAD	Flavinadenindinukleotid, oxidiert
FADH ₂	Flavinadenindinukleotid, reduziert
g	Erdbeschleunigung
GA	Glutarsäure
GABA	γ -Aminobuttersäure
GA I	Glutarazidurie I
GC/MS	Gaschromatographie/ Massenspektrometrie
GCDH	Glutaryl-CoA-Dehydrogenase
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GHB	γ -Hydroxybuttersäure
HD	Morbus Huntington
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
Kb	Kilobasenpaar
KGDHc	α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex
K _M	Michaelis-Menten Konstante
KPi	K ₂ HPO ₄
KRB	Krebs-Ringer Puffern
MDH	Malat-Dehydrogenase
MSUD	Marple sirup urine disease - Ahornsirupkrankheit
mt	mitochondrial
NAD	β -Nicotinamid Adenin Dinucleotid, oxidiert
NADH	β -Nicotinamid Adenin Dinucleotid, reduziert
NADP	Nikotinamidadeninucleotidphosphat, oxidiert
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nNOS	neuronale NO-Synthase
3-NPA	3-Nitropropionsäure

NTBC	2-(2-Nitro-4-Trifluoromethylbenzoyl)-1,3-Cyclohexanedion
OAT3	organische Anionen Transporter 3
3-OH-GA	3-Hydroxyglutarsäure
<i>p</i>	Wahrscheinlichkeit, dass die Nullhypothese richtig ist
P	Permeabilitätskoeffizient
PAH	<i>p</i> -Aminohippursäure
PBS	Phosphate-buffered saline
PD	Morbus Parkinson
PDHc	Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SMPs	submitochondriale Partikel
SSA	Succinatsemialdehyd
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TTFA	Thenoyltrifluoroacetone
U/mg	Units pro mg [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$], spezifische Aktivität
upm	Umdrehungen pro Minute
V_{\max}	Maximalgeschwindigkeit

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung (1) Hanes-Woolf Diagramm, K_m und V_{max}	40
Abbildung (2) Gegenüberstellung der konzentrationsabhängigen Inhibition des BCKDHc, KGDHc, und PDHc durch Glutaryl-CoA.....	45
Abbildung (3) Hanes-Woolf-Diagramm: Unkompetitive Hemmung des KGDHc durch Glutaryl-CoA.....	46
Abbildung (4) Einfluss von GA, 3-OH-GA und Glutaryl-CoA auf die Citratzyklusenzyme CS, IDH, Aconitase, Fumarase und MDH.....	47
Abbildung (5) Spezifische Scad-, Mcad-, Vlcad-Aktivitäten in Leberhomogenaten von $Gcdh^{-/-}$, $Gcdh^{+/-}$, $Gcdh^{+/+}$ -Mäusen.....	48
Abbildung (6) Einfluss von GA, 3-OH-GA und Glutaryl-CoA auf die Aktivitäten von Scad, Mcad und Vlcad in Leberhomogenaten von Wildtyp-Mäusen.....	49
Abbildung (7) Glutathion-Konzentrationen in Leber- und Gehirnhomogenaten von $Gcdh^{-/-}$, $Gcdh^{+/-}$ und $Gcdh^{+/+}$ -Mäusen.....	50
Abbildung (8) A) GA- und B) 3-OH-GA-Konzentrationen in Gewebekomogenaten (Leber, Gehirn, Skelett- und Herzmuskel) von $Gcdh^{-/-}$, $Gcdh^{+/-}$ und $Gcdh^{+/+}$ -Mäusen.....	52
Abbildung (9) GA- und 3-OH-GA-Konzentrationen im Urin und Serum von $Gcdh^{-/-}$, $Gcdh^{+/-}$ und $Gcdh^{+/+}$ -Mäusen.....	52
Abbildung (10) Glutarylcarnitin-Konzentrationen in Gewebekomogenaten (Leber, Gehirn und Skelettmuskel), Trockenblut und Serum von $Gcdh^{-/-}$, $Gcdh^{+/-}$ und $Gcdh^{+/+}$ -Mäusen.....	53
Abbildung (11) Konzentrationen des freien Carnitins in Trockenblut, Leber, Gehirn und Skelettmuskel von $Gcdh^{-/-}$, $Gcdh^{+/-}$ und $Gcdh^{+/+}$ -Mäusen.....	54
Abbildung (12) Western Blot-Analyse der Gcdh-Expression in der Leber von hepatozytären $Gcdh^{-/-}$ und $Gcdh^{+/+}$ -Mäusen.....	55
Abbildung (13) GA- und 3-OH-GA-Konzentration in Leber- und Gehirnhomogenat von hepatozytären $Gcdh^{-/-}$ und $Gcdh^{+/+}$ -Mäusen.....	56
Abbildung (14) Glutarylcarnitin-Konzentration in Leber, Serum und Gehirn von hepatozytären $Gcdh^{-/-}$ und $Gcdh^{+/+}$ -Mäusen.....	57
Abbildung (15) Zeitlicher Verlauf der A) d_4 -GA- und B) d_5 -3-OH-GA-Konzentrationen in Leber, Cortex, Cerebellum, Striatum und Serum von C57Bl/6-Mäusen nach einer intraperitonealen Injektion dieser stabilen Isotope.....	58
Abbildung (16) Darstellung der Permeationskoeffizienten nach einer <i>trans</i> -Stimulation durch PAH.....	60
Abbildung (17) GA- und 3-OH-GA-Konzentrationen in Leberhomogenaten von $Gcdh^{-/-}$ -Mäusen in Abhängigkeit verschiedener Diätformen.....	61
Abbildung (18) GA- und 3-OH-GA-Konzentrationen in Gehirnhomogenaten von $Gcdh^{-/-}$ -Mäusen in Abhängigkeit verschiedener Diätformen.....	62
Abbildung (19) GA- und 3-OH-GA-Konzentrationen in Urin von $Gcdh^{-/-}$ -Mäusen in Abhängigkeit verschiedener Diätformen.....	63
Abbildung (20) GA- und 3-OH-GA-Konzentrationen in Serum von $Gcdh^{-/-}$ -Mäusen in Abhängigkeit verschiedener Diätformen.....	64
Abbildung (21) Spektrophotometrische Analyse der Atmungskettenkomplexe I-V im Hippocampus von $Aldh5a1^{-/-}$, $Aldh5a1^{+/-}$ und $Aldh5a1^{+/+}$ -Mäusen.....	66
Abbildung (22) Spektrophotometrische Analyse der Atmungskettenkomplexe I-V in SMPs nach einer Inkubation mit GABA, GHB, SSA oder 4,5-DHHA.....	67
Abbildung (23) Einfluss von GABA, GHB, SSA, 4,5-DHHA auf die Citratzyklusenzyme PDHc, CS, IDH, Aconitase, KGDHc, Fumarase und MDH.....	67
Abbildung (24) Glutathion-Konzentrationen in Homogenaten aus Hippocampus, Cortex, Hirnstamm, und Cerebellum von $Aldh5a1^{-/-}$, $Aldh5a1^{+/-}$ und $Aldh5a1^{+/+}$ -Mäusen.....	68

Abbildung (25) Schematische Darstellung der von den α -Ketoglutar säure-Dehydrogenase-Komplexen katalysierten Reaktionsschritte..... 74

Abbildung (26) Synopsis der postulierten Effekte von GA und 3-OH-GA auf die metabolische Kopplung von Astrozyten und Neuronen und die glutamaterge Neurotransmission. 92

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle (1) Aufbau der Experimente zum Transport von GA und 3-OH-GA über die BBB	39
Tabelle (2) Spektrophotometrische Analyse der Atmungskettenkomplexe I-V in Gewebehomogenaten (Gehirn, Leber, Herz- und Skelettmuskel) von <i>Gcdh</i> ^{-/-} , <i>Gcdh</i> ^{+/-} und <i>Gcdh</i> ^{+/+} -Mäusen..	43
Tabelle (3) Spektrophotometrische Analyse der Atmungskettenkomplexe I-V in SMPs nach einer Inkubation mit GA, 3-OH-GA und Glutaryl-CoA.....	44
Tabelle (4) Inhibition des KGDHc durch Glutaryl-CoA mit α -Ketoacidat als Substrat.	46
Tabelle (5) Spezifische Gcdh-Aktivität in <i>Gcdh</i> ^{-/-} , hepatozytären <i>Gcdh</i> ^{-/-} , <i>Gcdh</i> ^{+/-} und <i>Gcdh</i> ^{+/+} -Mäusen.....	47
Tabelle (6) Analyse der langkettigen Acylcarnitine in der Gallenflüssigkeit Gcdh-defizienter Mäuse..	48
Tabelle (7) Vergleich der Konzentration von GA und 3-OH-GA in Gehirnhomogenaten und Serum von <i>Gcdh</i> ^{-/-} , <i>Gcdh</i> ^{+/-} und <i>Gcdh</i> ^{+/+} -Mäusen.....	53
Tabelle (8) GA- und 3-OH-GA-Konzentrationen in Leber, Gehirn, Serum und Urin von hepatozytären <i>Gcdh</i> ^{-/-} und <i>Gcdh</i> ^{+/+} -Mäusen.....	55
Tabelle (9) Vergleich der Konzentrationen von GA und 3-OH-GA Gehirn und Serum in hepatozytären <i>Gcdh</i> ^{-/-} und <i>Gcdh</i> ^{+/+} -Mäusen.....	56
Tabelle (10) Vergleich der Konzentrationen von a) d ₄ -GA und b) d ₅ -3-OH-GA in Cortex, Striatum, Cerebellum und Serum von C57Bl/6-Mäusen nach einer intraperitonealen Injektion dieser stabilen Isotope.....	59
Tabelle (11) Spektrophotometrische Analyse der Atmungskettenkomplexe I-V in Gewebehomogenaten (Cerebellum, Cortex, Hippocampus, Hirnstamm, Leber, Niere und Skelettmuskel) von <i>Aldh5a1</i> ^{-/-} , <i>Aldh5a1</i> ^{+/-} und <i>Aldh5a1</i> ^{+/+} -Mäusen.....	65
Tabelle (12) Zerebrale GA und 3-OH-GA Konzentrationen in <i>post mortem</i> -Untersuchungen und einer Hirnbiopsie von GA I Patienten im Vergleich zu <i>Gcdh</i> ^{-/-} -Mäusen.	84

8.4 Statistische Verfahren zur *Aldh5a1*^{-/-}-Maus

8.4.1 Test auf Normalverteilung nach Kolmogorov-Smirnov

Testvariable	Genotyp	Statistik	Signifikanz	Testvariable	Genotyp	Statistik	Signifikanz
Cerebellum Komplex I	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	0,237	0,200	Leber Komplex I	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	0,206	0,200
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	0,196	0,200		<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	0,242	0,200
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	0,231	0,200		<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	0,216	0,200
Cerebellum Komplex II	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	0,155	0,200	Leber Komplex II	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	0,204	0,200
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	0,283	0,095		<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	0,292	0,072
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	0,237	0,200		<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	0,237	0,200
Cerebellum Komplex III	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	0,217	0,200	Leber Komplex III	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	0,160	0,200
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	0,249	0,200		<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	0,298	0,060
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	0,217	0,200		<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	0,192	0,200
Cerebellum Komplex IV	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	0,225	0,200	Leber Komplex IV	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	0,210	0,200
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	0,188	0,200		<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	0,165	0,200
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	0,197	0,200		<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	0,127	0,200
Cerebellum Komplex V	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	0,135	0,200	Leber Komplex V	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	0,189	0,200
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	0,250	0,200		<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	0,168	0,200
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	0,267	0,141		<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	0,222	0,200
Cortex Komplex I	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	0,226	0,200	Skelettmuskel Komplex I	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	0,188	0,200
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	0,136	0,200		<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	0,314	0,035
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	0,294	0,068		<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	0,199	0,200
Cortex Komplex II	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	0,270	0,087	Skelettmuskel Komplex II	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	0,206	0,200
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	0,154	0,200		<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	0,226	0,200
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	0,187	0,200		<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	0,263	0,153
Cortex Komplex III	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	0,238	0,200	Skelettmuskel Komplex III	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	0,363	0,003
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	0,193	0,200		<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	0,311	0,039
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	0,247	0,200		<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	0,199	0,200
Cortex Komplex IV	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	0,204	0,200	Skelettmuskel Komplex IV	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	0,198	0,200
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	0,208	0,200		<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	0,229	0,200
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	0,275	0,117		<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	0,226	0,200
Cortex Komplex V	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	0,181	0,200	Skelettmuskel Komplex V	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	0,282	0,060
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	0,214	0,200		<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	0,227	0,200
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	0,308	0,044		<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	0,241	0,200
Hippocampus Komplex I	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	0,225	0,200	Niere Komplex I	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	0,319	0,016
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	0,214	0,200		<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	0,217	0,200
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	0,255	0,189		<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	0,205	0,200
Hippocampus Komplex II	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	0,161	0,200	Niere Komplex II	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	0,166	0,200
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	0,183	0,200		<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	0,275	0,117
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	0,174	0,200		<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	0,122	0,200
Hippocampus Komplex III	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	0,169	0,200	Niere Komplex III	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	0,195	0,200
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	0,213	0,200		<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	0,274	0,120
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	0,196	0,200		<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	0,171	0,200
Hippocampus Komplex IV	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	0,167	0,200	Niere Komplex IV	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	0,159	0,200
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	0,251	0,200		<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	0,239	0,200
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	0,179	0,200		<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	0,180	0,200
Hippocampus Komplex V	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	0,170	0,200	Niere Komplex V	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	0,254	0,138
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	0,185	0,200		<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	0,266	0,144
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	0,228	0,200		<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	0,190	0,200
Hirnstamm Komplex I	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	0,230	0,200	Hippocampus	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	0,245	0,126
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	0,314	0,036		<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	0,257	0,179
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	0,261	0,163		<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	0,239	0,200

Hirnstamm Komplex II	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	0,166	0,200	Cortex	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	0,214	0,200
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	0,284	0,091		<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	0,165	0,200
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	0,244	0,200		<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	0,261	0,164
Hirnstamm Komplex III	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	0,200	0,200	Cerebellum	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	0,175	0,200
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	0,288	0,082		<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	0,298	0,059
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	0,205	0,200		<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	0,191	0,200
Hirnstamm Komplex IV	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	0,220	0,200	Hirnstamm	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	0,195	0,200
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	0,172	0,200		<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	0,222	0,200
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	0,211	0,200		<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	0,220	0,200
Hirnstamm Komplex V	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	0,125	0,200	Leber	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	0,158	0,200
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	0,131	0,200		<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	0,134	0,200
	<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	0,227	0,200		<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}	0,222	0,200

0,200 ist das untere Ende der echten Signifikanz.

8.4.2 Test auf Homogenität der Varianz nach Levene

Testvariable	Levene- Statistik	Signifikanz
Cerebellum Komplex I	1,425	0,265
Cerebellum Komplex II	0,846	0,445
Cerebellum Komplex III	2,539	0,105
Cerebellum Komplex IV	1,242	0,311
Cerebellum Komplex V	0,141	0,870
Cortex Komplex I	1,819	0,189
Cortex Komplex II	0,246	0,784
Cortex Komplex III	0,918	0,416
Cortex Komplex IV	1,479	0,253
Cortex Komplex V	0,463	0,637
Hippocampus Komplex I	0,291	0,750
Hippocampus Komplex II	1,099	0,354
Hippocampus Komplex III	0,783	0,471
Hippocampus Komplex IV	1,841	0,186
Hippocampus Komplex V	0,579	0,570
Hirnstamm Komplex I	1,088	0,357
Hirnstamm Komplex II	2,420	0,116
Hirnstamm Komplex III	3,296	0,059
Hirnstamm Komplex IV	0,784	0,471
Hirnstamm Komplex V	1,321	0,290

Leber Komplex I	0,527	0,599
Leber Komplex II	1,355	0,282
Leber Komplex III	1,037	0,374
Leber Komplex IV	1,220	0,317
Leber Komplex V	0,289	0,752
Skelettmuskel Komplex I	1,627	0,223
Skelettmuskel Komplex II	0,464	0,636
Skelettmuskel Komplex III	0,669	0,524
Skelettmuskel Komplex IV	4,530	0,025
Skelettmuskel Komplex V	1,067	0,364
Niere Komplex I	0,014	0,986
Niere Komplex II	0,157	0,856
Niere Komplex III	0,289	0,752
Niere Komplex IV	1,004	0,385
Niere Komplex V	1,178	0,329
Hippocampus Glutathion	0,488	0,621
Cortex Glutathion	0,151	0,861
Cerebellum Glutathion	0,020	0,980
Hirnstamm Glutathion	1,450	0,258
Leber Glutathion	0,186	0,832

8.4.3 Kruskal-Wallis H-Test und Mann-Whitney U-Test

Matrix	Testvariable	Kruskal-Wallis H-Test Signifikanz	Mann-Whitney U I	Signifikanz	Mann-Whitney U II	Signifikanz	Mann-Whitney U III	Signifikanz
Cerebellum	Komplex I	0,123	22	1,000	14	0,142	14	0,209
	Komplex II	0,081	22	1,000	14	0,142	10	0,073
	Komplex III	0,049	20	0,757	24	0,940	3	0,004
	Komplex IV	0,747	23	1,000	31	1,000	22	0,805
	Komplex V	0,474	28	1,000	22	0,702	16	0,318
Cortex	Komplex I	0,192	20	0,757	22	0,702	12	0,128
	Komplex II	0,628	21	0,897	31	1,000	21	0,710
	Komplex III	0,366	23	1,000	19	0,420	20	0,620
	Komplex IV	0,363	25	1,000	23	0,816	14	0,209
	Komplex V	0,945	28	1,000	30	1,000	24	1,000
Hippocampus	Komplex I	0,261	19	0,631	26	1,000	13	0,165
	Komplex II	0,053	14	0,213	11	0,062	21	0,710
	Komplex III	0,102	17	0,425	24	0,940	9	0,053
	Komplex IV	0,400	19	0,631	27	1,000	18	0,456
	Komplex V	0,606	28	1,000	21	0,598	22	0,805
Hirnstamm	Komplex I	0,483	17	0,696	22	1,000	23	0,902
	Komplex II	0,426	20	1,000	27	1,000	14	0,209
	Komplex III	0,855	23	1,000	25	1,000	24	1,000
	Komplex IV	0,459	18	0,843	25	1,000	17	0,383
	Komplex V	0,214	14	0,362	25	1,000	14	0,209
Leber	Komplex I	0,524	23	1,000	22	0,702	24	1,000
	Komplex II	0,132	17	0,425	26	1,000	10	0,073
	Komplex III	0,681	29	1,000	27	1,000	17	0,383
	Komplex IV	0,333	25	1,000	17	0,284	20	0,620
	Komplex V	0,543	25	1,000	21	0,598	23	0,902
Skelettmuskel	Komplex I	0,126	22	1,000	17	0,284	11	0,097
	Komplex II	0,409	24	1,000	29	1,000	13	0,165
	Komplex III	0,073	16	0,342	18	0,348	10	0,073
	Komplex IV	0,280	22	1,000	18	0,348	18	0,456
	Komplex V	0,484	31	1,000	21	0,598	17	0,383
Niere	Komplex I	0,189	14	0,213	25	1,000	17	0,383
	Komplex II	0,418	22	1,000	21	0,598	20	0,620
	Komplex III	0,310	18	0,521	21	0,598	23	0,902
	Komplex IV	0,979	31	1,000	30	1,000	23	0,902
	Komplex V	0,371	25	1,000	18	0,348	20	0,620
Hippocampus		0,019	9	0,049	12	0,084	14	0,209
Cortex		0,047	9	0,049	16	0,228	20	0,620
Cerebellum	Glutathion	0,169	15	0,456	26	1,000	11	0,097
Hirnstamm		0,602	23	1,224	30	1,000	18	0,456
Leber		0,852	26	1,819	30	1,000	22	0,805

U I = *Aldh5a1*^{-/-} vs. *Aldh5a1*^{+/+}

U II = *Aldh5a1*^{-/-} vs. *Aldh5a1*^{+/-}

U III = *Aldh5a1*^{+/-} vs. *Aldh5a1*^{+/+}

8.5 Statistische Verfahren zur *Gcdh*^{-/-}-Maus

8.5.1 Test auf Normalverteilung nach Kolmogorov-Smirnov

Testvariable	Genotyp	Statistik	Signifi- kantz	Organ Testvariable	Genotyp	Statistik	Signifi- kantz
Serum GA	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,156	0,200	Gehirn Komplex I	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,213	0,200
	<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,281	0,200		<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,113	0,200
	<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,197	0,200		<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,167	0,200
Leber GA	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,110	0,200	Leber Komplex II	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,148	0,200
	<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,336	0,000		<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,228	0,064
	<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,219	0,066		<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,273	0,006
Skelettmuskel GA	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,175	0,200	Skelettmuskel Komplex II	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,142	0,200
	<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,252	0,023		<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,196	0,183
	<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,335	0,001		<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,085	0,200
Gehirn GA	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,177	0,200	Herzmuskel Komplex II	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,216	0,200
	<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,255	0,021		<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,215	0,200
	<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,445	0,000		<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,178	0,200
Herzmuskel GA	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,198	0,200	Gehirn Komplex II	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,264	0,150
	<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,455	0,000		<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,101	0,200
	<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,392	0,004		<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,137	0,200
Urin GA	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,531	0,000	Leber Komplex III	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,187	0,200
	<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,432	0,003		<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,196	0,186
	<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,260	0,050		<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,236	0,033
Serum 3-OH-GA	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,206	0,169	Skelettmuskel Komplex III	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,134	0,200
	<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,250	a		<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,261	0,016
	<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,288	0,081		<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,098	0,200
Leber 3-OH-GA	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,295	0,003	Herzmuskel Komplex III	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,229	0,200
	<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,480	0,000		<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,294	0,040
	<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,467	0,000		<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,226	0,200
Skelettmuskel 3-OH-GA	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,188	0,197	Gehirn Komplex III	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,186	0,200
	<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,382	0,000		<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,132	0,200
	<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,335	0,001		<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,185	0,200
Gehirn 3-OH-GA	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,245	0,172	Leber Komplex IV	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,114	0,200
	<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,456	0,000		<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,178	0,200
	<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,528	0,000		<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,136	0,200
Herzmuskel 3-OH-GA	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,297	0,062	Skelettmuskel Komplex IV	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,199	0,200
	<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,443	0,000		<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,203	0,147
	<i>Gcdh</i> ^{+/+}	a	a		<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,167	0,200
Urin 3-OH-GA	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,278	0,007	Herzmuskel Komplex IV	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,268	0,095
	<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,438	0,000		<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,183	0,200
	<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,367	0,007.		<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,162	0,200
Trockenblut Glutarylarnitin	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,300	0,200	Gehirn Komplex IV	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,259	0,170
	<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,215	0,200		<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,202	0,149
	<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,222	0,200		<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,135	0,200
Serum Glutarylarnitin	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,397	0,004	Leber Komplex V	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,179	0,200
	<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,473	0,001		<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,187	0,200
	<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,212	0,200		<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,194	0,163
Leber Glutarylarnitin	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,207	0,200	Skelettmuskel Komplex V	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,151	0,200
	<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,311	0,007		<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,128	0,200
	<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,167	0,200		<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,215	0,079
Skelettmuskel Glutarylarnitin	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,277	0,200	Herzmuskel Komplex V	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,257	0,128
	<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,141	0,200		<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,158	0,200
	<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,196	0,200		<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,226	0,200

Gehirn Glutarylcarнитin	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,414	0,000	Gehirn Komplex V	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,172	0,200
	<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,165	0,200		<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,171	0,200
	<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,259	0,008		<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,161	0,200
Trockenblut freies Carnitin	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,373	.	Leber Scad	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,248	0,028
	<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,194	0,200		<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,165	0,200
	<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,185	0,200		<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,141	0,200
Leber freies Carnitin	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,526	0,000	Leber Mcad	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,161	0,200
	<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,164	0,200		<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,198	0,060
	<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,174	0,200		<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,192	0,116
Skelettmuskel freies Carnitin	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,283	0,145	Leber Vlcad	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,192	0,200
	<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,206	0,200		<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,200	0,055
	<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,181	0,200		<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,122	0,200
Gehirn freies Carnitin	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,214	0,200	Leber Gcdh	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,331	0,000
	<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,533	0,000		<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,169	0,184
	<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,221	0,036		<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,139	0,200
Leber Komplex I	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,226	0,122	Gehirn Gcdh	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	a	a
	<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,171	0,200		<i>Gcdh</i> ^{+/-}	a	a
	<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,176	0,200		<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,256	0,182
Skelettmuskel Komplex I	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,186	0,200	Leber Glutathion	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,291	0,122
	<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,268	0,011		<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,326	0,089
	<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,152	0,200		<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,223	0,200
Herzmuskel Komplex I	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,193	0,200	Gehirn Glutathion	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,136	0,200
	<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,252	0,170		<i>Gcdh</i> ^{+/-}	0,222	0,200
	<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,342	0,033		<i>Gcdh</i> ^{+/+}	0,191	0,200

a = Werte konstant null, daher ist ein Test auf Normalverteilung nach Kolmogorov-Smirnov nicht möglich.

8.5.2 Test auf Homogenität der Varianz nach Levene

Testvariable	Levene-Statistik	Signifikanz
Serum GA	7,687	0,003
Leber GA	31,299	0,000
Skelettmuskel GA	3,318	0,048
Gehirn GA	19,274	0,000
Herzmuskel GA	9,935	0,001
Serum 3-OH-GA	10,845	0,001
Leber 3-OH-GA	8,426	0,001
Skelettmuskel 3-OH-GA	2,153	0,131
Gehirn 3-OH-GA	22,717	0,000
Herzmuskel 3-OH-GA	5,209	0,040
Trockenblut Glutarylcarнитin	4,215	0,000
Serum Glutarylcarнитin	4,536	0,030
Leber Glutarylcarнитin	24,201	0,000

Skelettmuskel Glutarylcarnitin	4,334	0,026
Gehirn Glutarylcarnitin	9,128	0,001
Trockenblut freies Carnitin	3,532	0,002
Leber freies Carnitin	7,553	0,002
Skelettmuskel freies Carnitin	0,519	0,602
Gehirn freies Carnitin	2,790	0,074
Leber Komplex I	1,081	0,350
Skelettmuskel Komplex I	1,558	0,224
Herzmuskel Komplex I	0,632	0,542
Gehirn Komplex I	0,103	0,902
Leber Komplex II	0,571	0,570
Skelettmuskel Komplex II	0,248	0,782
Herzmuskel Komplex II	0,136	0,873
Gehirn Komplex II	0,284	0,754
Leber Komplex III	2,166	0,130
Skelettmuskel Komplex III	0,511	0,604
Herzmuskel Komplex III	0,099	0,906
Gehirn Komplex III	0,509	0,606
Leber Komplex IV	0,486	0,619
Skelettmuskel Komplex IV	0,509	0,605
Herzmuskel Komplex IV	0,278	0,760
Gehirn Komplex IV	0,219	0,804
Leber Komplex V	0,123	0,884
Skelettmuskel Komplex V	0,154	0,858
Herzmuskel Komplex V	0,782	0,472
Gehirn Komplex V	1,027	0,370
Leber Scad	1,633	0,207
Leber Mcad	7,417	0,002
Leber Vlcad	3,995	0,025
Leber Gcdh	5,822	0,006

Gehirn Gcdh	.(a)	
Leber Glutathion	0,617	0,553
Gehirn Glutathion	2,252	0,134

0,200 ist das untere Ende der echten Signifikanz.

a Gcdh-Aktivität für *Gcdh*^{-/-} und *Gcdh*^{+/-}-Mäuse ist null, daher ist kein Levene Test möglich.

8.5.3 Kruskal-Wallis H-Test und Mann-Whitney U-Test

Matrix	Testvariable	Kruskal-Wallis-H Test Signifikanz	Mann-Whitney U I	Signifi- kanz	Mann-Whitney U II	Signifi- kanz	Mann-Whitney U III	Signifi- kanz
Leber	Komplex I	0,171	45	0,254	51	0,504	72	0,375
	Komplex II	0,031	32	0,039	45	0,268	62	0,169
	Komplex III	0,875	69	1,000	70	1,000	82	0,685
	Komplex IV	0,153	52	0,550	66	1,000	53	0,068
	Komplex V	0,041	31	0,032	54	0,662	61	0,155
Gehirn	Komplex I	0,897	44	1,000	40	1,000	88	0,905
	Komplex II	0,411	33	0,764	31	0,550	83	0,720
	Komplex III	0,576	40	1,000	31	0,550	86	0,830
	Komplex IV	0,494	47	1,000	33	0,701	70	0,325
	Komplex V	0,460	33	0,764	33	0,701	85	0,793
Skelettmuskel	Komplex I	0,199	53	0,354	50	0,273	90	0,981
	Komplex II	0,195	67	1,000	44	0,136	73	0,402
	Komplex III	0,885	75	1,000	71	1,000	89	0,943
	Komplex IV	0,767	82	1,000	65	1,000	80	0,616
	Komplex V	0,430	71	1,000	55	0,451	76	0,488
Herzmuskel	Komplex I	0,625	18	1,000	24	0,884	22	0,852
	Komplex II	0,707	22	1,000	25	1,000	19	0,573
	Komplex III	0,383	19	1,000	22	0,656	15	0,282
	Komplex IV	0,489	20	1,000	21	0,557	19	0,573
	Komplex V	0,645	23	1,000	22	0,656	21	0,755
Leber	Scad	0,001	22	0,000	51	0,015	124	0,506
	Mcad	0,176	58	0,134	87	0,483	136	0,798
	Vlcad	0,036	43	0,020	71	0,136	138	0,851
Leber	Gcdh	0,000	0	0,000	1	0,000	52	0,001
Gehirn	Gcdh	0,000	0	0,000	0	0,000	2	0,002
Leber	Glutathion	0,006	0	0,008	1	0,032	10	0,268
		0,007	0	0,002	2	0,035	26,5	0,713
Serum	GA	0,000	0	0,000	0	0,001	16	0,876
	3-OH-GA	0,000	0	0,000	0	0,002	5,5	0,109
Leber	GA	0,000	0	0,000	0	0,000	109,5	0,536
	3-OH-GA	0,000	0	0,000	0	0,000	116,5	0,722
Gehirn	GA	0,000	0	0,000	0	0,000	42	0,093
	3-OH-GA	0,000	0	0,000	1	0,000	56	0,392
Skelettmuskel	GA	0,000	13	0,000	30	0,005	49	0,207
	3-OH-GA	0,000	13	0,000	16	0,000	69	0,910
Herzmuskel	GA	0,001	0	0,003	0	0,001	22	0,852
	3-OH-GA	0,000	0	0,003	0	0,001	18	0,491
Urin	GA	0,009	0	0,011	0	0,023	37	0,047
	3-OH-GA	0,009	0	0,011	0	0,031	23	0,042

Trockenblut		0,021	0	0,036	0	0,014	33,5	0,573
Serum		0,003	0	0,006	0	0,013	13	0,792
Leber	Glutaryl carnitin	0,003	0	0,002	0	0,001	39,5	0,436
Gehirn		0,000	0	0,000	1	0,000	104,5	0,545
Skelettmuskel		0,012	8	0,120	1	0,003	36,5	0,315
Trockenblut		0,016	4	0,400	0	0,014	20	0,083
Leber	freies Carnitin	0,199	57	0,341	71	0,247	133	0,957
Gehirn		0,018	17	0,023	32	0,128	99	0,126
Skelettmuskel		0,144	12	0,168	16	0,294	47	0,853

U I = $Gcdh^{-/-}$ vs. $Gcd^{+/+}$

U II = $Gcdh^{-/-}$ vs. $Gcdh^{+/-}$

U III = $Gcdh^{+/-}$ vs. $Gcdh^{+/+}$

8.6 Statistische Verfahren zur *hepatozytären Gcdh^{-/-}*-Maus

8.6.1 Kruskal-Wallis H-Test und Mann-Whitney U-Test

Matrix	Testvariable	Mann-Whitney U I	Signifikanz
Leber	GA	0,000	0,028
	3-OH-GA	0,000	0,034
	Glutaryl carnitin	0,000	0,031
Gehirn	GA	0,000	0,028
	3-OH-GA	0,000	0,032
	Glutaryl carnitin	0,000	0,034
Serum	GA	0,000	0,015
	3-OH-GA	10,500	1,000
	Glutaryl carnitin	0,000	0,016

U I = hepatozytäre $Gcdh^{-/-}$ vs. hepatozytäre $Gcd^{+/+}$

8.7 Statistische Verfahren zu den Diätstudien

8.7.1 Kruskal-Wallis H-Test und Mann-Whitney U-Test

Testvariable	Diättyp	Mann-Whitney U I	Signifikanz
Leber GA	Arginin I	4	0,827
	Arginin II	3	0,513
	L-Lysin 0,4 %	4	0,827
	Ornithin I	3	0,513
	Ornithin II	4	0,827
	Carnitin I	2	0,275
	Carnitin I	1	0,127
Gehirn GA	Arginin I	3	0,513
	Arginin II	0	0,050
	L-Lysin 0,4 %	1	0,127
	Ornithin I	0	0,050
	Ornithin II	0	0,050
	Carnitin I	4	0,827
	Carnitin I	0	0,050
Urin GA	Arginin I	0	0,180
	Arginin II	0	0,050
	L-Lysin 0,4 %	0	0,050
	Ornithin I	0	0,050
	Ornithin II	0	0,053
	Carnitin I	0	0,050
	Carnitin I	2	0,275
Serum GA	Arginin I	1	0,248
	Arginin II	0	0,053
	L-Lysin 0,4 %	2	0,275
	Ornithin I	4	0,827
	Ornithin II	4	0,827
	Carnitin I	0	0,050
	Carnitin I	0	0,050

U I = Diättyp vs. Kontrolldiät

8.8 Tabellarische Auflistung im Ergebnisteil nur graphisch dargestellter Messwerte der Gewebehomogenate

Messgröße	Matrix	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	<i>Gcdh</i> ^{+/-}	<i>Gcdh</i> ^{+/+}
Scad	Leber	0,37 ± 0,11	0,53 ± 0,15	0,56 ± 0,14
Mcad		0,34 ± 0,12	0,47 ± 0,27	0,49 ± 0,21
Vlcad		0,19 ± 0,07	0,26 ± 0,11	0,27 ± 0,08
Glutathion	Leber	1,62 ± 0,28	1,90 ± 0,25	2,01 ± 0,18
	Gehirn	0,09 ± 0,02	0,17 ± 0,08	0,17 ± 0,05
GA	Leber	9,94 ± 3,77	0,18 ± 0,26	0,12 ± 0,11
	Gehirn	11,24 ± 4,95	0,08 ± 0,07	0,03 ± 0,06
	Muskel	0,63 ± 0,41	0,25 ± 0,20	0,16 ± 0,13
	Herz	0,12 ± 0,04	0,00 ± 0,01	0,01 ± 0,01
	Urin	13291,15 ± 1414,99	63,90 ± 45,98	113,90 ± 57,98
	Serum	678,00 ± 465,96	9,80 ± 4,27	10,93 ± 6,63
3-OH-GA	Leber	0,49 ± 0,41	0,01 ± 0,03	0,03 ± 0,06
	Gehirn	0,52 ± 0,26	0,03 ± 0,06	0,01 ± 0,04
	Muskel	0,23 ± 0,16	0,04 ± 0,06	0,04 ± 0,05
	Herz	0,10 ± 0,05	0,00 ± 0,01	0,00 ± 0,00
	Urin	423,27 ± 75,26	23,87 ± 14,74	41,87 ± 6,74
	Serum	13,33 ± 4,08	6,00 ± 0,82	5,03 ± 0,99
Glutarylcarntin	Leber	28,96 ± 14,81	4,48 ± 15,71	0,57 ± 0,31
	Gehirn	3,79 ± 4,26	0,43 ± 0,31	0,36 ± 0,20
	Muskel	0,64 ± 0,32	0,22 ± 0,12	0,28 ± 0,19
	Serum	0,53 ± 0,31	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,02
	Trockenblut	0,34 ± 0,23	0,03 ± 0,02	0,04 ± 0,02
freies Carnitin	Leber	106,80 ± 35,18	86,84 ± 36,65	88,62 ± 30,33
	Gehirn	67,79 ± 50,78	130,40 ± 61,16	156,32 ± 72,22
	Muskel	109,83 ± 78,75	181,04 ± 74,50	188,22 ± 65,19
	Trockenblut	33,55 ± 9,09	61,47 ± 12,55	50,30 ± 10,17

Messgröße	Matrix	<i>hepatozytäre Gcdh</i> ^{-/-}	<i>Gcdh</i> ^{+/-}
Glutarylcarntin	Leber	0,46 ± 0,32	0,01 ± 0,02
	Serum	0,31 ± 0,10	0,02 ± 0,01
	Gehirn	0,25 ± 0,08	0,14 ± 0,01

Messgröße	Matrix	<i>Aldh5a1</i> ^{-/-}	<i>Aldh5a1</i> ^{+/-}	<i>Aldh5a1</i> ^{+/+}
Glutathion	Hippocampus	0,15 ± 0,06	0,18 ± 0,03	0,20 ± 0,04
	Cortex	0,38 ± 0,06	0,44 ± 0,07	0,47 ± 0,06
	Hirnstamm	0,17 ± 0,08	0,16 ± 0,09	0,24 ± 0,09
	Cerebellum	0,22 ± 0,05	0,22 ± 0,06	0,26 ± 0,09
	Leber	0,23 ± 0,10	0,22 ± 0,07	0,19 ± 0,09