

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der
Heinrich- Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Tom Lüdde

**Bedeutung des Aminosäureaustauschs von Arginin nach Serin an Position 324
für die enzymatische Aktivität der humanen Glutaminsynthetase**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Ann-Kathrin Kammer

2025

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Gez.

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Dieter Häussinger

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Philipp Lang

Für meine Familie.

Auflistung Publikationen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bisher nicht publiziert.

Zusammenfassung

Die ubiquitär im menschlichen Körper vorkommende Glutaminsynthetase (GS) katalysiert ATP-abhängig die Bildung von Glutamin aus Glutamat und Ammoniak. Durch diese Reaktion ist sie maßgeblich beteiligt an der systemischen Ammoniakhomöostase, Glutaminversorgung und Synthese von Makromolekülen wie Aminosäuren und Nukleotiden. Störungen der GS führen zu einer Hyperammonämie und einem systemischen Glutaminmangel, was zu zentralnervösen Störungen unterschiedlicher Schwere führen kann.

Die in dieser Arbeit untersuchte Mutation von Arginin nach Serin an Position 324 (R324S) im humanen Glutaminsynthetase-Gen wurde 2011 von Häberle et al. in einem sudanesischen Jungen blutsverwandter Eltern beschrieben. Sie war assoziiert mit erniedrigten Serum-Glutaminspiegeln, einer Hyperammonämie und einer epileptischen Enzephalopathie. Das vergleichsweise hohe Alter, das dieser Patient erreichte und sein im Vergleich zu anderen bekannten GS-Mutationen milderer Krankheitsbild, ließen vermuten, dass bei dieser Mutation eine residuale Aktivität der GS erhalten geblieben sein musste.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss der R324S-Mutation auf die GS-Aktivität zu untersuchen und durch Zugabe selektierter chemischer Verbindungen zu verbessern. Hierfür wurde die humane R324-Wildtyp und die humane R324S-mutierte Glutaminsynthetase in immortalisierte *Drosophila Melanogaster* Kc167 Zellen transfiziert und stabil überexprimiert. Mittels Western-Blot und Immunfluoreszenzaufnahmen wurden vergleichbare GS-Proteinspiegel in beiden transfizierten Zelllinien nachgewiesen. Die Ergebnisse der durchgeführten anti-GS Dot-Blot Untersuchungen und eines ATP-Bindungsassays legten die Vermutung nahe, dass die R324S-Mutation zu einer Störung der ATP-Bindung des Enzyms führt, während die Glutamatbindung unbeeinträchtigt bleibt.

Verglichen mit der R324-Wildtyp GS war die Aktivität der R324S-Mutante um ca. 90 % reduziert. Die Aktivität der R324S-Mutante konnte durch 3-Chloropropylamine und Chloroacetamide nicht statistisch signifikant aber tendenziell erhöht werden.

Summary

The ubiquitously expressed human glutamatesynthetase (GS) catalyzes the ATP-dependent formation of glutamine from glutamate and ammonia. Through this reaction, it plays a crucial role in systemic ammonia homeostasis, glutamine supply and the synthesis of macromolecules such as amino acids and nucleotides. Impairments of GS lead to hyperammonemia and systemic glutamine deficiency, which can result in central nervous system dysfunctions of varying severity.

The mutation investigated in this study — a substitution of arginine with serine at position 324 (R324S) in the human glutamatesynthetase gene — was described in 2011 by Häberle et al. in a Sudanese boy born to consanguineous parents. This mutation was associated with decreased serum glutamine levels, hyperammonemia, and epileptic encephalopathy. The comparatively high age of this patient, along with the milder clinical presentation compared to other known GS mutations, suggested that residual GS activity must have been preserved.

The aim of this study was to investigate the impact of the R324S mutation on GS activity and to assess the possibility of improving it through the addition of selected chemical compounds. For this purpose, human wild-type R324 GS and the human R324S mutant GS were transfected and stably overexpressed in immortalized *Drosophila melanogaster* Kc167 cells. Comparable GS protein levels were demonstrated in both transfected cell lines by Western blotting and immunofluorescence imaging.

The results of anti-GS dot blot analyses and an ATP-binding assay suggested that the R324S mutation disrupts ATP binding by the enzyme, while glutamate binding remains unaffected.

Compared to the R324 wild-type GS, the activity of the R324S mutant was reduced by approximately 90%. The activity of the R324S mutant could be increased by treatment with 3-chloropropylamine and chloroacetamidines, although this increase was not statistically significant but showed a tendency towards improvement.

Abkürzungsverzeichnis

6AH	6-Aminohexyl
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> ; Varianzanalyse
APS	Ammoniumpersulfat
As	Arsen
ATP	Adenosintriphosphat
BPYE	<i>Buffered Peptone Yeast Extract</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> / bovines Serumalbumin
CCM 3	Insektenmedium
CPS	Carbamoylphosphatsynthetase I
Cy3	Indocarbozyanin
DGRC	<i>Drosophila Genomics Resource Center</i>
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> / Desoxyribonukleinsäure
DpnI	Restriktionsenzym zur DNA-Methylierung
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EEG	Elektroenzephalogramm
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-Aminoethylether) -N, N, N',N'-Tetraazetat
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GABA	gamma-Aminobuttersäure
GLS II	Leberglutaminase II
GLT1	Glutamattransporter 1
GLUL	Glutamat Ammonium Ligase
GLULL	<i>Glutamate Ammonia Ligase Like Gene</i>
GLULP1/2	Glutamate Ammonium Ligase Pseudogen 1/2
GS	Glutaminsynthetase
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Hydrogenchlorid
HCO₃⁻	Bikarbonat
HE	Hepatische Enzephalopathie
HRPOD	<i>Horseradish peroxydase</i>
M3	Insektenmedium
Mn⁺	Mangan-Ion
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> / Boten-Ribonukleinsäure
MSO	Methionin-Sulfoximin
NH₂OH	Hydroxylamin
NH₃	Ammoniak

NH₄⁺	Ammoniumion
NKCC1	Natrium-/Kalium-/Chlorid-Cotransporters 1
NO	Stickstoffmonoxid
OAT	Ornithin Aminotransferase
ONOO⁻	Peroxynitrit
P	Monophosphat
PAA	Polyacrylamid mix
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase chain reaction
pH	Potential des Wasserstoffs
PPT	Phosphinothricin
PTN	Proteintyrosinnitrierung
rcf	<i>relative centrifugal force/</i> relative Zentifugalbeschleunigung
RhBG	<i>Rhesus family B glycoprotein</i>
ROS	Stick- und Sauerstoffspezies
RPM	<i>rounds per minute</i>
SD	Standardabweichung
SDM	Schneiders Drosophila Medium
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SN1-T	System-N-Glutamintransporter
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethyldiamin

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Abkürzungsverzeichnis.....	III
1 Einleitung	1
1.1. Die Glutaminsynthetase	1
1.2. Tertiär- und Quartärstruktur der humanen GS	2
1.3. Organ- und Entwicklungsspezifische Funktionen der Glutaminsynthese durch die Glutaminsynthetase	3
1.3.1 Bedeutung der Glutaminsynthetase in der Leber	3
1.3.2 Bedeutung der Glutaminsynthetase im Gehirn	6
1.3.3 Bedeutung der Glutaminsynthetase in Niere, Muskel und Immunsystem	9
1.3.4 Bedeutung der Glutaminsynthetase für die fetale Entwicklung.....	10
1.4. Biochemische Reaktionen der Glutaminsynthetase	12
1.5. Einflussfaktoren auf die Glutaminsynthetase-Aktivität	15
1.6. Die Glutaminsynthetase-Hemmstoffe MSO und PPT.....	16
1.7. Glutaminsynthetase-Mutationen beim Menschen	17
1.7.1 R324C-Mutation	20
1.7.2 R341C-Mutation	21
1.7.3 R41C-Mutation	22
1.7.4 Homozygote Deletion des humanen GLUL-Gens	22
1.7.5 Heterozygote Mutationen im humanen GLUL-Gen	23
1.8. R324S-Mutation	24
1.9. Ziele der vorliegenden Arbeit.....	27
2 Material und Methoden	28
2.1. Material	28
2.1.1 Chemikalien	28
2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Geräte.....	29
2.1.3 Molekularbiologische Kits	30
2.1.4 Antikörper	31
2.1.5 Oligonukleotide (Primer)	32
2.1.6 Plasmide	32
2.1.7 Zelllinien	32
2.1.8 Puffer und Lösungen	33
2.2. Methoden.....	34
2.2.1 Kultivierung der Drosophila Melanogaster Zelllinien	34
2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion	35

2.2.3	Gateway TM Klonierung	36
2.2.4	Transiente Transfektion der Drosophila Melanogaster Zelllinien	37
2.2.5	Herstellung stabil transfizierter polyklonaler Zelllinien	38
2.2.6	Experimentelle Behandlung der Zellen.....	38
2.2.7	Herstellung von Proteinlysaten aus kultivierten Kc167-Zellen	39
2.2.8	Proteinbestimmung	39
2.2.9	Immunfluoreszenzanalyse und Fluoreszenzmikroskopie	40
2.2.10	Western-Blot-Analyse.....	41
2.2.11	Dot-Blot-Analyse	43
2.2.12	ATP-Bindungsassay.....	44
2.2.13	Glutaminsynthetase-Assay	46
2.2.14	Statistische Auswertung	47
3	Ergebnisse	48
3.1.	Überexpression der humanen Glutaminsynthetase in Kc167-Zellen aus Drosophila Melanogaster	48
3.2.	Quantifizierung der Proteinspiegel der überexprimierten humanen R324-WT und R324S-MT Glutaminsynthetase	49
3.3.	Untersuchungen zur Glutamat-Bindung der überexprimierten humanen R324-WT und R324S-MT Glutaminsynthetase	51
3.3.1	Inhibition der Glutaminsynthetase in Zelllysaten durch MSO und PPT: Analyse der GS-Immunoreaktivität im Dot-Blot.....	51
3.3.2	Inkubation von Kc167-Zellen mit MSO und PPT: Auswirkungen auf die anti-GS Immunoreaktivität im Dot-Blot	53
3.3.3	Effekte von MSO und PPT auf die Proteinspiegel der überexprimierten Glutaminsynthetase in Kc167-Zellen.....	54
3.4.	Untersuchungen zur ATP-Bindung der humanen R324-WT und R324S-MT Glutaminsynthetase	56
3.5.	GS-Aktivität in untransfizierten und humane R324-WT und R324S-MT-GS überexprimierenden Kc167-Zellen.....	57
3.5.1	Effekte von MSO und PPT auf die GS-Aktivität R324-WT-GS und R324S-MT-GS exprimierender Kc167 Zellen	59
3.5.2	Effekte von Betain auf die GS-Aktivität R324-WT-GS- oder R324S-MT-GS exprimierender Kc167 Zellen	60
3.5.3	Effekte selektierter chemischer Verbindungen auf die GS-Aktivität R324-WT- und R324S-MT-GS exprimierender Kc167 Zellen	61
4	Diskussion	63
4.1.	Eignung von Kc167-Zellen als Expressionssystem für die humane GS	66
4.2.	Einfluss der R324S-Mutation auf die Glutamat- und ATP-Bindung der humanen Glutaminsynthetase	68
4.3.	Chemische Reparatur der R324S-mutierten GS.....	72
4.4.	Limitationen der Arbeit	72

4.5. Schlussfolgerung und Ausblick.....	74
5 Tabellenverzeichnis.....	75
6 Abbildungsverzeichnis	76
7 Literatur- und Quellenverzeichnis.....	77
Danksagung	93

1 Einleitung

1.1. Die Glutaminsynthetase

Die Glutaminsynthetase (GS) findet sich in Pro- und Eukaryonten und ist eines der ältesten evolutionär konservierten Enzyme (1, 2). Sie katalysiert ATP-abhängig die Bildung von Glutamin aus Glutamat und Ammoniak. So wird neurotoxisches Glutamat gebunden und Ammoniak abgebaut (3). Im Menschen ist dies zudem die einzige Reaktion über welche die nicht-essentielle und im Plasma mit 20% quantitativ am häufigsten vorkommende Aminosäure Glutamin gebildet werden kann (3, 4).

Die Glutaminsynthetase ist von großer Bedeutung für eine Vielzahl unterschiedlicher Prozesse wie z.B. die Entgiftung des Zellgifts Ammoniak, die Stickstoffbalance und die Synthese von Makromolekülen wie Aminosäuren und Nukleotiden (4-9). Zur Vereinfachung wird im nachfolgenden Text unter dem Begriff „Ammoniak“ das lösliche Ammoniumion (NH_4^+) und der gasförmige Ammoniak (NH_3) subsumiert. Unter physiologischen Bedingungen liegt im Körper der überwiegende Großteil des „Ammoniaks“ als Ammoniumion vor und nur ein geringer Teil als gasförmiges Ammoniak (10, 11).

Im Menschen variieren die Glutaminsynthetase Proteinspiegel in unterschiedlichen Zelltypen und Organen erheblich. Hohe Spiegel finden sich z.B. in spezialisierten Hepatozyten in der Leber (12-14), in Astrozyten im Gehirn (15, 16), in Myozyten in der Muskulatur (17, 18) und in Epithelzellen der Niere (19). Die Bildung von Glutamin ist in diesen Organen an spezifische intra- und interzelluläre metabolische Prozesse gekoppelt, wie in den nachfolgenden Abschnitten im Detail erläutert. So ist die GS-vermittelte Bildung von Glutamin in der Leber z.B. für die Ammoniakentgiftung bedeutsam (5, 20), während sie im Gehirn unter anderem für die Synthese des Neurotransmitters γ -Aminobuttersäure (GABA) benötigt wird (6, 21, 22).

Zudem ist die Reaktion der Glutaminsynthetase und das hierdurch gebildete Glutamin (4) beteiligt am Säure-Base-Haushalt (23-25), beeinflusst Zellproliferation und intrazelluläre Signalwege (26-28), unterstützt die Angiogenese in Endothelzellen (29) und dient als Energiequelle und Modulator des Immunsystems (30-32).

Zusammenfassend zeigt sich so die wichtige Rolle der Glutaminsynthetase und ihrer Reaktionskomponenten für viele Prozesse und Stoffwechselwege im Körper, welche in den folgenden Abschnitten im Detail erläutert werden (3, 33).

1.2. Tertiär- und Quartärstruktur der humanen GS

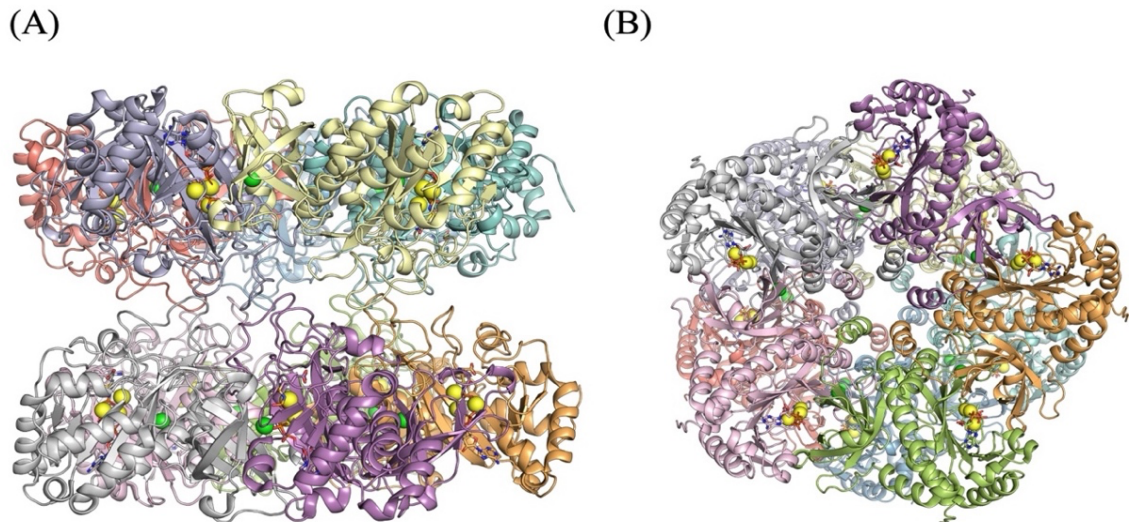


Abb. 1 Quartärstruktur der humanen Glutaminsynthetase

Quartärstruktur der humanen Glutaminsynthetase aus lateraler Sicht (A) und in der Draufsicht (B). Farblich markiert sind die 10 Monomere welche in 2 gegenüberliegenden pentameren Ringen ein Homodecamer mit 10 aktiven Zentren bildet. Die gelb markierten Kugeln symbolisieren gebundene, für die Reaktion als Kofaktoren fungierende Metallionen im aktiven Zentrum der GS. Bereitgestellt von Michele Bonus, Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, HHU, Düsseldorf.

Das für die Glutaminsynthetase kodierende *glutamate ammonia ligase* (GLUL)-Gen wird im Menschen exklusiv auf dem Chromosom 1q31.3-Locus (frühere Nomenklatur: 1q25-q31) kodiert (34). Anders als bei vielen anderen Genen existieren beim Menschen keine funktionellen Isoformen für die Glutaminsynthetase. Zwei nicht-funktionale Pseudogene (GLULP1 und GLULP2) und drei verwandte Glutamat-Ammonia Ligase-Like Gene (GLULL 1-3) befinden sich im humanen Genom (35, 36).

Obwohl das GLUL-Gen phylogenetisch stark konserviert ist (1, 2), variiert die Struktur des GS-Proteins in unterschiedlichen Spezies erheblich und besteht aus 8-12 Monomeren mit unterschiedlichem Gewicht und Aminosäureanzahl (21, 34, 37).

Im Menschen wird die Quartärstruktur der GS aus 10 Monomeren gebildet, welche jeweils aus 373 Aminosäuren (1) aufgebaut sind und ein Molekulargewicht von 42kDa aufweisen (15, 38). Dieses Homodecamer besteht aus 2 sich gegenüberliegenden pentameren Ringen (1), welche 10 aktive Zentren an den gegenüberliegenden Stellen der benachbarten Untereinheiten bilden (39, 40). Hierbei interagiert der N-Terminus des einen Monomers mit dem gekrümmten β -Faltblatt des katalytischen C-Terminals des benachbarten Monomers innerhalb des Pentamers (1). Durch diese Interaktion wird eine trichterförmige Tasche gebildet (1), welche jeweils 3 spezifische Bindungsstellen für Nukleotide, Aminosäuren und Ammoniak aufweist (21) und durch unterschiedliche kovalente Modifikation und Feedbackinhibition reguliert werden kann (41, 42).

1.3. Organ- und Entwicklungsspezifische Funktionen der Glutaminsynthese durch die Glutaminsynthetase

1.3.1 Bedeutung der Glutaminsynthetase in der Leber

In der humanen Leber wird die Glutaminsynthetase überwiegend in den sogenannten Scavenger-Zellen (5, 14), einer kleinen Gruppe perivenöser Hepatozyten gefunden (43, 44). Hier ist sie für die Ammoniakelimination und zusammen mit der periportal lokalisierten Glutaminase (13, 20) für den interzellulären Glutaminzyklus bedeutsam, wie nachfolgend erläutert (5, 13, 45, 46).

Die funktionelle Einheit der Leber ist der Leberazinus. Er ist bei Säugetieren (47) in eine periportale, intermediäre und perivenöse Zone unterteilt (48). Diese Zonierung entwickelt sich beim Menschen erst nach der Geburt und ist im jungen Erwachsenenalter vollständig abgeschlossen (48). Die exklusiv perivenöse Expression des Glutaminsynthetase-Gens wird dabei durch genetisch angesiedelte silencer Elemente in den GS negativen Hepatozyten gewährleistet (49). Der Leberazinus zeigt, wie in Abb. 2 zu sehen ist, einen physiologischen antegraden Blutfluss von der Portalvene hin zur terminalen Lebervene (45).

Die gleichzeitige Aktivität der periportalen Glutaminase (GLS) und der perivenösen Glutaminsynthetase (GS) (50-52) resultiert in dem sogenannten interzellulären Glutaminzyklus (siehe Abb. 2) (12, 45, 53). Der interzelluläre Glutaminzyklus dient sowohl der organisierten Ammoniakelimination in der Leber als auch der systemischen pH-Regulation (24, 54). Die Verringerung der Glutaminspiegel durch die Glutaminase-vermittelte Hydrolyse in den periportalen Hepatozyten wird durch die nachgeschaltete Glutaminsynthetase vermittelte Glutaminsynthese wieder ausgeglichen. In einem ausgeglichenen metabolischen Zustand erfolgt Ammoniakentgiftung überwiegend zu Harnstoff ohne eine Netto Veränderung des Glutaminhaushaltes (12, 13).

Der in den periportalen Zellen angesiedelte Harnstoffzyklus besitzt eine hohe Kapazität aber nur eine geringe Affinität Ammoniak über die Harnstoffsynthese aus dem Blutfluss zu eliminieren und wurde daher als „*high capacity, low affinity system*“ (System der hohen Kapazität aber geringen Affinität) der Ammoniakentgiftung von Professor Häussinger benannt (20). Die hier lokalisierte Glutaminase (55) hydrolysiert pH-abhängig Glutamin, erhöht dadurch die periportale Ammoniakkonzentration und steigert in der Folge die Aktivität des Harnstoffzyklus. Zudem wird die Aktivität der hepatischen Glutaminase

durch erhöhte Ammoniakkonzentrationen gesteigert (50). Dieser Mechanismus wurde von Häussinger als Verstärkungsmechanismus („*ammonia amplifier*“, siehe Abb. 2) beschrieben (13, 46, 56).

Da die Glutaminasereaktion pH-abhängig ist, steuert sie durch Anpassung des Bikarbonat-Verbrauchs im Harnstoffzyklus die Säure-Basen-Homöostase (56). Im Harnstoffzyklus werden circa 90% des Blut-Ammoniaks entgiftet und für die Synthese von Harnstoff verwendet (57).

Im Anschluss daran fließt das Blut entlang der perivenösen Hepatozyten. Hier befindet sich die Scavenger-Zellpopulation, welche in deutlich geringerem quantitativem Umfang, aber mit höherer Affinität den Ammoniak in Glutamin mit Hilfe der GS fixiert (12). Diese hohe Affinität der GS für Ammonium spiegelt sich in ihrem deutlich niedrigeren $K_{0,5}$ -Wert wider (0,11mM vs. 3,6mM bei Enzymen der Harnstoffsynthese) (58, 59). Hier wird in der Leber der Großteil des Glutamats aufgenommen und für die anschließende Synthese von Glutamin herangezogen (60, 61).

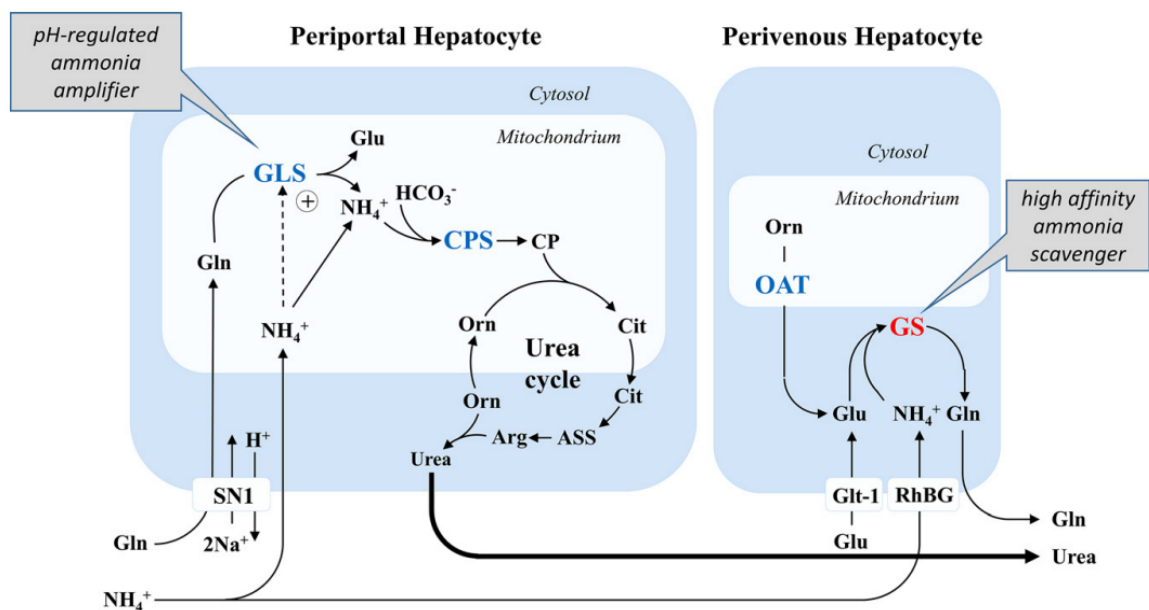


Abb. 2 Organisation der Ammoniakentgiftung in der Leber

Sequenzielle Organisation der Ammoniak (NH_4^+) Entgiftung durch die periportale Harnstoffsynthese (hohe Kapazität und geringe Affinität) über die Carbamoylphosphat-Synthetase I (CPS) und den Harnstoffzyklus (Urea Cycle) und die stomabwärts gelegene perivenöse hochaffine Glutaminsynthese durch die Glutaminsynthetase (GS). Die Leberglutaminase (GLS) dient als pH-modulierter Ammoniakverstärker und passt die Bikarbonat (HCO_3^-) verbrauchende Harnstoffsynthese an die Anforderungen der Säure-Basen-Homöostase an. Perivenöse Hepatozyten, welche die Glutaminsynthetase (GS) exprimieren (sogenannte „perivenöse Scavenger-Zellen“), exprimieren ebenfalls den Glutamatttransporter 1 (Glt1), das Rhesus family B glycoprotein (RhBG) und die Ornithine Aminotransferase (OAT), um so eine hochaffine Ammoniakentfernung durch Glutaminsynthese zu ermöglichen. (Aus: Frieg et al. 2021, Biol. Chem. 2021, 402: 1063-1072; doi:10.1515/hsz-2021-0166 – Lizenz über RightsLink erworben)

Der im Vergleich zu den Mitochondrien saurere pH-Wert des Cytosols (62) der Scavenger-Zellen führt zu einer Ammoniakakkumulation und begünstigt somit ebenso die dortige Glutaminsynthese durch die Glutaminsynthetase (12).

Diese Eigenschaften der suffizienten Ammoniakelimination auch bei niedrigen Konzentrationen spiegeln sich in der von Häussinger geprägten Bezeichnung „*low capacity, high affinity system*“ (System der geringen Kapazität und hohen Affinität) wider (20). Auf diese Weise kann der vom Harnstoffzyklus nicht abgefangene Ammoniak (ca. 10%) effizient durch die Glutaminsynthetase (12) entgiftet werden (45, 59, 63).

Diese funktionale Zonierung der Ammoniakentgiftung wurde von Herrn Professor Häussinger durch zahlreiche Leberperfusionsexperimente erarbeitet (12, 45). Verändert man in diesen Versuchen die Perfusionsrichtung, so kommt es zu charakteristischen Unterschieden in der Synthese bzw. des Abbaus des Glutamins und einer ineffizienten Ammoniakelimination durch die GS und den Harnstoffzyklus (12, 45).

Die hier gewonnenen Erkenntnisse, die zur Aufstellung der Scavenger-Zell-Theorie durch Häussinger geführt haben (14), wurden in den darauffolgenden Jahren im Tiermodell der hepatischen Glutaminsynthetase-Knockoutmaus bestätigt. In der Studie von Qvarthava et. al, induzierte der Knockout der Glutaminsynthetase in der Leber, eine systemische Hyperammonämie und zerebralen oxidativen Stress (64).

Diese Arbeit unterstreicht noch einmal die Wichtigkeit der Leber Glutaminsynthetase für die systemische Ammoniakhomöostase, wie sie bereits in den 80er und 90er Jahren von Häussinger gezeigt wurde (5, 13, 20, 45).

Die enorme Bedeutung der Glutaminsynthetase für die Ammoniakentgiftung wird in einer Reihe von Lebererkrankungen deutlich. Hierzu zählen z.B. der portosystemische Shunt (13), die Leberzirrhose (56) oder die isolierte perivenöse Leberzellnekrose, wie sie zum Beispiel durch Tetrachlorkohlenstoff Vergiftungen (65) oder Paracetamol Intoxikation (20) ausgelöst wird. Bei der perivenösen Leberzellnekrose kommt es trotz unbeeinträchtigtem Harnstoffzyklus zu einer systemischen Hyperammonämie, welche zerebrale Symptome der hepatischen Enzephalopathie induzieren kann, wie nachfolgend beschrieben (12). Diese Beobachtungen wurden in Versuchen an Ratten, welche mit dem Glutaminsynthetase Hemmstoff MSO behandelt wurden experimentell bestätigt (13).

Neben der Elimination von Ammoniak ist der interzelluläre Glutaminzyklus und hierüber indirekt auch die Glutaminsynthetase essentiell für die Regulation des Säure-Basen-Haushaltes (54, 66, 67). Die pH-Homöostase wird durch die Stabilisierung des $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ Verhältnisses im Blut aufrechterhalten (54, 68). Durch Regulation des interzellulären

Glutaminzyklus vor allem über die pH-abhängige Glutaminasereaktion wird die Ammoniakelimination zugunsten der metabolischen Situation gesteuert (24, 53). In der periportalen Harnstoffsynthese werden pro Harnstoffmolekül 2 Bikarbonat-Ionen verwendet und somit irreversibel aus dem System entfernt (69, 70), weshalb im Rahmen der metabolischen Alkalose Ammoniak primär über den Harnstoffzyklus abgebaut wird (24, 71). Unter azidotischen Zuständen ist die Harnstoffsynthese erniedrigt und Ammoniak wird vermehrt über die perivenöse GS abgebaut, wodurch Bikarbonat gespart wird und Glutamin gebildet wird, welches weiter zur Niere transportiert wird (54).

1.3.2 Bedeutung der Glutaminsynthetase im Gehirn

Im Gehirn ist die Glutaminsynthetase als neuroprotektives Enzym hauptsächlich im Zytoplasma der Astrozyten lokalisiert (15, 16). Hier ist sie ein wichtiger Bestandteil des Glutamat-Glutamin- γ -Aminobuttersäure (GABA)-Zyklus (21, 22) und dient auch der Ammoniakentgiftung (6, 72). Letzteres ist insbesondere vor dem Hintergrund bedeutsam, dass Neurone äußerst sensitiv gegenüber Ammoniak sind (73, 74).

Der Glutamat-Glutamin-GABA-Zyklus ist bedeutsam für das Recycling und die Regulation der Spiegel des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat und des inhibitorischen Neurotransmitters GABA (75, 76). Von Neuronen am synaptischen Spalt freigesetztes Glutamat vermittelt eine postsynaptische Erregung und wird nachfolgend von Astrozyten durch spezifische Transporter aufgenommen. Die damit verbundene Erniedrigung der Glutamat Konzentration im synaptischen Spalt verhindert eine Hyperexzitation (77, 78). In den Astrozyten wird Glutamat für die Synthese von Glutamin durch die GS verwendet, welches von den Astrozyten freigesetzt, durch die Neurone aufgenommen und dort für die Synthese von Glutamat oder GABA genutzt wird (6, 75). Dieser Zyklus ist wichtig für die Aufrechterhaltung exzitatorischer wie auch inhibitorischer neuronaler Aktivität (79).

Auch im Gehirn ist die Glutaminsynthetase von zentraler Bedeutung für die Entgiftung des neurotoxischen Ammoniaks (59, 76, 80). Ammoniak kann entlang des Konzentrationsgradienten direkt über die Blut-Hirn-Schranke in die perivaskulären Astrozyten diffundieren (81). Das Ammoniumion wird hingegen mit Hilfe des Natrium-/Kalium-/Chlorid-Cotransporters 1 (NKCC1) in die Astrozyten aufgenommen (82). Die Glutamin Konzentration wird in physiologischen Bedingungen durch die System-N-Transporter (SN1-Glutamintransporter) an astroglialen Membranen reguliert (83).

Neben Astrozyten wurde die Glutaminsynthetase im Gehirn auch in Mikroglia gefunden. Es wurde postuliert, dass Mikroglia ebenfalls an der Aufrechterhaltung der Glutamat-Homöostase im Gehirn beteiligt sein können. Die Aufnahme erfolgt dabei über den Glutamattransporter 1 (GLT-1). Interessanterweise kann die Glutaminbildung in den Mikroglia deren Aktivierung durch Entzündungsmediatoren beeinflussen und immunsupprimierend wirken (79).

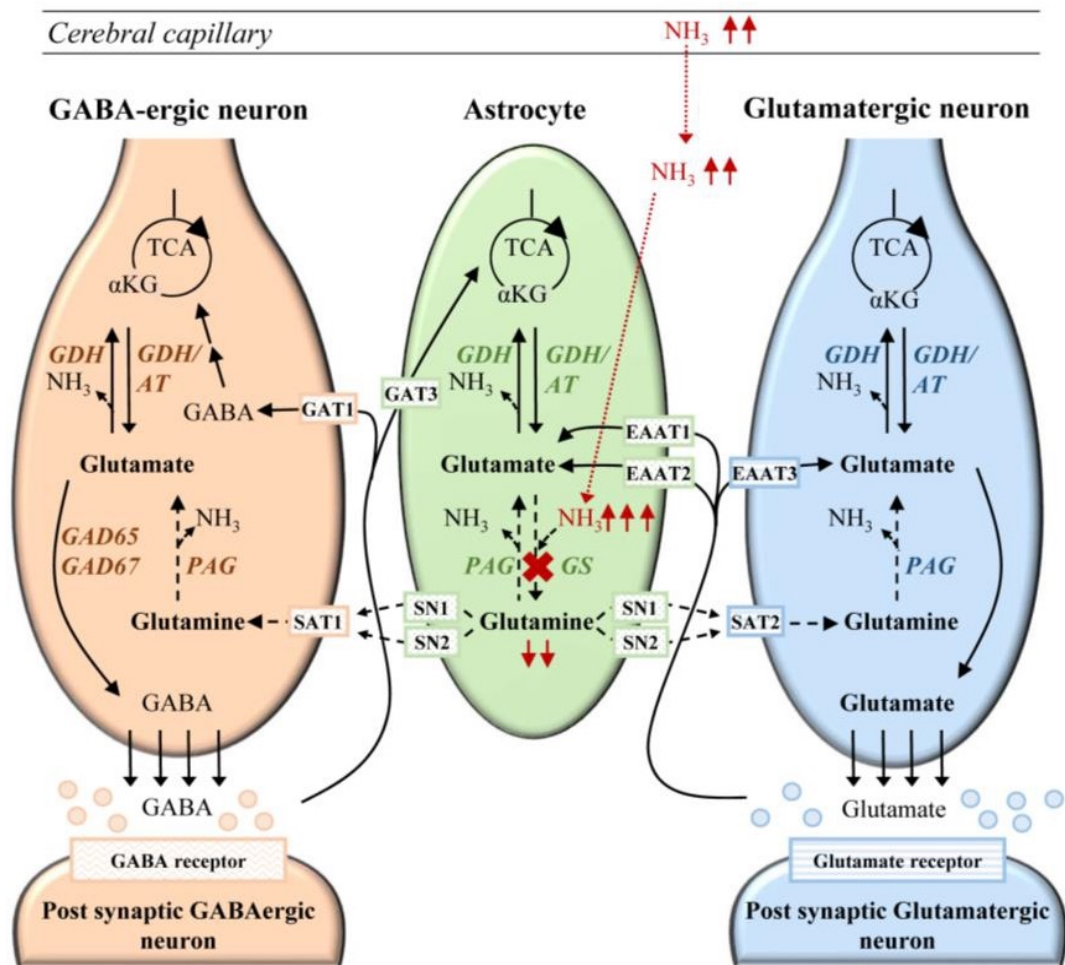


Abb. 3 Schematische Darstellung der Pathophysiologie der GS-Defizienz im Gehirn

Die rot gestrichelte Linie zeigt die Diffusion von Ammoniak, welches bei einer GS-Defizienz im Körperkreislauf erhöht ist und über die Blut-Hirn-Schranke ins Gehirn gelangt. Bei einer Aktivitätsreduktion der GS kommt es zu einer verringerten Ammoniakentgiftung und einem Überschuss an Ammoniak (rote Pfeile nach oben) und einem Mangel an Glutamin (rote Pfeile nach unten). Hierdurch kann der beschriebene Glutamin-Glutamat-GABA-Zyklus nicht mehr aufgefüllt werden.

Zwischenprodukte des TCA-Zyklus: αKG: α-Ketoglutarat; **Enzyme:** GDH: Glutamatdehydrogenase; AT: Aminotransferasen; GS: Glutaminsynthetase; GAD65: Glutamatdecarboxylase 65; GAD67: Glutamatdecarboxylase 67; PAG: Phosphat-aktivierte Glutaminase; **Transporter:** GAT1: GABA-Transporter 1; GAT3: GABA-Transporter 3; SAT1: System-A-Transporter 1; SAT2: System-A-Transporter 2; SN1: System-N-Transporter 1; EAAT1: Exzitatorischer Aminosäuretransporter 1; EAAT2: Exzitatorischer Aminosäuretransporter 2; EAAT3: Exzitatorischer Aminosäuretransporter 3; **Neurotransmitter:** GABA: Gamma-Aminobuttersäure

(Aus Spodenkiewicz et al. 2016, Biology (Basel), 5: 40, doi: 10.3390/biology5040040 - CC BY 4.0 Lizenz)

Umgekehrt steigert eine Hemmung der Glutaminsynthetase die Synthese und Freisetzung von Entzündungsmediatoren und von reaktiven Stick- und Sauerstoffspezies durch die Mikroglia (30, 84) und reduziert die insulinvermittelte Glukoseaufnahme (30).

Eine Aktivitätsreduktion der Glutaminsynthetase kann zu einer Hyperammonämie (72) oder einem Überschuss an neurotoxischem Glutamat im synaptischen Spalt führen und dadurch zerebrale Funktionen erheblich beeinträchtigen (6, 85, 86). Bei Alzheimer wurde in Liquorproben und im Frontallappen eine deutlich reduzierte GS-Aktivität festgestellt, die zurück geführt wurde auf durch oxidativen Stress vermittelte Oxidation der GS (79, 87). Zudem konnte eine reduzierte GS-Expression in Astrozyten von Alzheimer Patienten festgestellt werden (88). Im physiologischen Alterungsprozess kommt es zu einer verstärkten Expression und Aktivität der Glutaminsynthetase in Astrozyten wodurch die Glutamat-Glutamin-Homöostase zur Regulation der neuronalen Funktion im Alter beeinflusst wird (89).

Bei Patienten mit hepatischer Enzephalopathie und Epilepsie wurde eine verringerte GS-Aktivität als Folge einer durch oxidativ-/nitrosativen Stress herbeigeführten Proteintyrosinnitrierung und Oxidation der GS beschrieben (90-92). Bei Patienten mit Epilepsie wurden darüber hinaus reduzierte GS-Proteinspiegel (72, 93) im Hippocampus und eine Reduktion des Glutamat-Glutamin-Zyklus beobachtet (94). Durch die Bildung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies wird zudem die Signaltransduktion, Neurotransmission und synaptische Plastizität negativ beeinflusst (64).

Derzeitig ist unklar, ob die GS-Inaktivierung im Gehirn bei hepatischer Enzephalopathie protektive oder schädliche Konsequenzen für die Gehirnfunktion hat. Einerseits reduziert die daraus resultierende Verringerung der Glutaminakkumulation in den Astrozyten die Glutamin-vermittelte Astrozytenschwellung und Induktion von oxidativ-/nitrosativem Stress (95). Gleichzeitig wird dadurch aber auch die Ammoniakentgiftungskapazität im Gehirn reduziert (96).

Hyperammonämien werden auch im Rahmen von angeborenen Störungen des Zitratzyklus oder der Glutaminsynthetase beobachtet. Hier sind sie mit offenkundigen zerebralen Veränderungen vergesellschaftet wie z.B. Hirnatrophie, zystischen Veränderungen, Ventrikelvergrößerungen, einem Hirnödem, neuronaler Degeneration, kognitiven Beeinträchtigungen und verzögerter Myelinisierung (97-99).

1.3.3 Bedeutung der Glutaminsynthetase in Niere, Muskel und Immunsystem

Wie im Kapitel 1.3.1 bereits beschrieben, spielt die GS durch die Glutaminsynthese eine wichtige Rolle für die pH-Regulation durch Leber und Niere und für die systemische Ammoniak-Homöostase (63). Im Rahmen einer metabolischen Azidose wird Glutamin über die SN1 Transporter deutlich vermehrt in der Niere aufgenommen (100). Dort wird das Glutamin Glutaminase-vermittelt unter Bildung von Glutamat und Ammoniak hydrolysiert (13, 101). Hierbei entstehen über einen Zwischenschritt auch zwei Bikarbonat-Ionen, welche zum Säure-Base-Ausgleich ins Blut transportiert werden (102). Die Relevanz dieser gebildeten Bikarbonat-Ionen über α -Oxoglutarat für den systemischen pH-Ausgleich wird in manchen Arbeiten kritisch hinterfragt, da die in anderen Organen vorangegangene Bildung des Glutamin ebenso α -Oxoglutarat verbraucht (24). Demnach gibt es keine Netto-Bildung oder -Verbrauch von Oxoglutarat in diesem Prozess (5). Der gebildete Ammoniak wird über verschiedene Transportwege über den Urin ausgeschieden (23), wodurch zusätzlich auch die tubuläre Rückresorption von HCO_3^- - Ionen gefördert wird (102, 103). Diese gesteigerte renale Ausscheidung von Ammoniak im Rahmen der metabolischen Azidose verhindert so eine Rückzirkulation von überschüssigem Stickstoff und den daran gebundenen H^+ -Ionen und führt zu einem Verbleib von mehr HCO_3^- - Ionen im Körper (24). Um die vermehrte Glutaminaufnahme durch die Niere zu kompensieren wird die Glutaminbildung in der Skelettmuskulatur im Rahmen einer metabolischen Azidose gesteigert (23, 25, 104).

In der Leber wird wie zuvor beschrieben die Aktivität des Harnstoffzyklus reduziert, um den Verbrauch von Bikarbonat zu minimieren (12, 105) und die Ammoniakentgiftung erfolgt verstärkt Glutaminsynthetase-vermittelt über die Bildung von Glutamin in den perivenösen Scavenger-Zellen (106). Das Glutamin wird von der Leber zur Niere transportiert, wo es wie zuvor beschrieben hydrolysiert und Ammoniak über den Urin ausgeschieden wird (5, 13).

Auch die Glutaminsynthetase in den Zellen der Niere hat eine zentrale Rolle in der renalen Ammoniakhomöostase. Diese Bedeutung zeigt sich in Studien, in denen eine spezifische GS-Deletion im proximalen Tubulus zu einer erhöhten basalen Ammoniakausscheidung und zu einer deutlich eingeschränkten Fähigkeit der pH-abhängigen Steigerung der Ammoniakproduktion führte (107).

In der menschlichen Skelettmuskulatur dient die Glutaminsynthetase zusätzlich der Entgiftung von bei der Transaminierung verzweigtkettiger Aminosäuren anfallendem Ammoniak. Zudem ist sie Teil der Glutamin- und Stickstoffversorgung und damit der Proteinbiosynthese (17). Im Rahmen einer systemischen Hyperammonämie kann die Glutaminsynthetase-Aktivität im Skelettmuskel kompensatorisch ansteigen, was jedoch nicht ausreicht um die systemisch erhöhten Ammoniakspiegel auf ein physiologisches Niveau abzusenken (18, 25, 97, 108).

Zellen mit hoher Teilungsrate wie zum Beispiel Enterozyten, Endothelzellen, aber auch insbesondere Immunzellen wie Lymphozyten benötigen hohe Mengen an Glutamin als Energiesubstrat (109). Zellen des Immunsystems verwenden Glutamin und entstehende Intermediate zur Aufrechterhaltung der Zellproliferation, Phagozytose und Synthese von Zytokinen (31). Die Glutaminsynthetase beeinflusst indirekt auch eine Vielzahl von Signalwegen in den Immunzellen. So wirken z.B. hohe Glutaminspiegel einer Liganden-unabhängigen Aktivierung der CD95-vermittelten Apoptose in Immunzellen entgegen (28).

Neuere Studien beschreiben neben der enzymatischen Funktion der humanen Glutaminsynthetase auch zusätzliche sogenannte „Moonlighting“-Aufgaben, zum Beispiel als Palmitoyltransferase (29), Regulator des Anaphase Promoting Complex (110) oder Modulator des Anionenkanals BEST2 (111). Diese Aufgaben sind unabhängig von der klassischen Katalyse und vom zuvor beschriebenen Aktiven Zentrum der GS (112).

1.3.4 Bedeutung der Glutaminsynthetase für die fetale Entwicklung

Glutamin ist als Hauptenergiequelle der Zellen essentiell für die Entwicklung des humanen Fetus (113). Der fetale Glutaminbedarf ist besonders hoch und wird zu 2/3 durch die maternale Glutaminsynthese und Aufnahme über die Gebärmutter und zu 1/3 durch Glutaminsynthese im fetalen Kreislauf und in der vom Fötus stammenden Placenta gedeckt (114). Diese ausgeprägte Glutaminsynthese in der Placenta konnte auch bei Schweinen durch Self et al. bestätigt werden. In ihrer Studie wurde für Glutamin das höchste fetal:mütterliche Plasma-Verhältnis unter allen Aminosäuren nachgewiesen, was eine Produktion in der Placenta und im Fötus selbst bestätigt und den hohen fetalen Glutaminbedarf unterstreicht (115).

Tierexperimentelle Studien und humane Fallbeispiele haben gezeigt, dass die Glutaminsynthetase essentiell für die Entwicklung des Fetus ist (83). So führt ein kompletter

Verlust der Glutaminsynthetase in der Maus bereits zu einem frühen Versterben des Embryos (116). Eine Inaktivierung der Glutaminsynthetase in Astrozyten im Gehirn von Mäusen induziert über eine neuronale Dysfunktion ohne Malformationen des Gehirns ein frühes postnatales Versterben am 3. Postpartalen Tag. Die neuronale Dysfunktion wurde hier auf eine durch zerebralen Glutaminmangel bedingte Störung des Glutamat-Zyklus zurückgeführt, aber nicht auf eine Hyperammonämie. Erwartungsgemäß waren die systemischen Ammoniakspiegel in diesen Tieren aufgrund der nicht eingeschränkten Ammoniakentgiftung in der Leber gegenüber den Kontrollen unverändert (117). Die Bedeutung der GS für die embryonale Entwicklung wird auch in der Sterilität von *Drosophila Melanogaster* Weibchen mit einer GS-inaktivierenden Mutation deutlich (118).

Zellkulturuntersuchungen zeigten außerdem, dass die Glutaminsynthetase für die Zellteilung von Fibroblasten essentiell ist. So proliferieren Fibroblasten mit einer aktivitätsvermindernden GS-Mutation deutlich schlechter als solche, welche den GS-Wildtyp exprimieren (119). Darüber hinaus konnten Fibroblasten eines Patienten mit einer vollständigen GS-Deletion in der Zellkultur nicht expandiert werden (120).

Post mortem Untersuchungen an Patienten mit Glutaminsynthetase-Mutationen oder einer GLUL-Gendeletion zeigten ausgeprägte Malformationen des Gehirns, Wachstumsverzögerung und sehr niedrige zerebrale Glutaminspiegel, was darauf schließen lässt, dass das GLUL-Gen und die Glutaminsynthetase eine wichtige Rolle in der Gehirnentwicklung, Zellproliferation und im Wachstum spielen (72, 113, 120, 121).

Die Wichtigkeit von Glutamin für die fetale Entwicklung zeigt sich auch darin, dass es essentiell ist für die Implantation der Blastocyste, die Ontogenese und insbesondere auch für die Gehirnentwicklung (83). Glutamin wird über System N Transporter (SNAT1), die in Mangelsituationen hochreguliert werden können (122), in die Placenta transportiert (123). Die Glutaminsynthetase wird bereits in frühen fetalen Stadien in utero exprimiert (119), entwickelt sich jedoch bis ins junge Erwachsenenalter weiter (48). Postpartal fällt die Glutaminversorgung durch die Mutter weg, während der Glutaminbedarf aufgrund von Synaptogenese, Myelinisierung und der Entwicklung funktionaler neuronaler Netzwerke steigt (Bereitstellung von Glutamin über den Glutamat-Zyklus) (83).

Störungen der Glutaminsynthetase in der Entwicklung können eine Hyperammonämie induzieren, welche das cholinerge System und dadurch die physiologische Gehirnentwicklung erheblich beeinträchtigen kann (97). Dies kann eine Hirnatrophie, die Bildung von Zysten, eine verzögerte Myelinisierung und Vergrößerung der Ventrikel zur Folge haben (124, 125).

1.4. Biochemische Reaktionen der Glutaminsynthetase

Nach der Beschreibung der Glutaminsynthetase in Gehirnen von Schafen durch Pamiljans et al. im Jahre 1962, wurden der Reaktionsmechanismus der durch die GS-vermittelten Bildung von Glutamin und beteiligte Kofaktoren weiter charakterisiert (126, 127). Im Jahr 1966 gelang es Woofolk et al. bei der Glutaminsynthetase von *E. Coli* drei verschiedene GS-katalysierte Reaktionen nachzuweisen (33). Auch Meister beschrieb 1968 die verschiedenen Reaktionen in der Glutaminsynthetase von Schafen (128). Diese Erkenntnisse haben zur Entwicklung von sensitiven und standardisierten Enzymaktivitätsassays geführt mit denen die katalytische Aktivität der GS verlässlich gemessen werden kann.

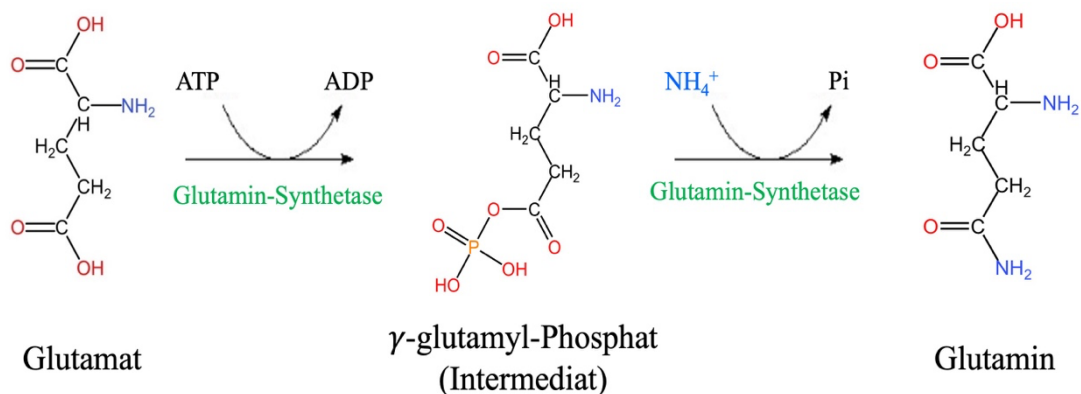


Abb. 4 Die physiologische Reaktion der Glutaminsynthetase

Nach Bindung von ATP und Glutamat an die Glutaminsynthetase wird das Zwischenprodukt γ -glutamyl-Phosphat gebildet. Nachfolgend reagiert Ammoniak mit dem γ -glutamyl-Phosphat wodurch Glutamin gebildet wird. Die Strukturformeln wurden mit dem Programm King-Draw und Powerpoint erstellt.

Unter physiologischen Bedingungen katalysiert die Glutaminsynthetase die ATP-abhängige Reaktion von Glutamat mit dem Ammoniumion zu Glutamin in Gegenwart der divalenten Kationen Magnesium oder Mangan (128). Die Glutaminsynthetase besitzt jeweils spezifische Bindungsstellen für ATP, die Substrate Glutamat und Ammonium und die Metallionen und ihre Aktivität wird durch den Kofaktor Magnesium fast um das 5-fache erhöht (8, 72, 127). Die Bindung von Metallionen unterstützt die Substratbindung, den Transfer der Phosphatgruppe und die Stabilität der Struktur durch direkte Interaktion mit Glutamat und Glutamin (112, 129, 130). Diese Stabilisierung und Unterstützung der Reaktion erfolgt durch Neutralisierung der negativen Ladungen der Substrate, wodurch der Phosphattransfer von ATP auf das Glutamat ermöglicht wird (1, 131, 132). Zudem dienen die Metallionen über polare Bindungen als Brücke zwischen Substrat und Enzym und koordinieren die katalytisch aktive Form des Enzyms (1, 21, 133).

Die Synthese von Glutamin ist eine zweischrittige Reaktion (4), bei welcher zunächst nach Bindung von ATP und Glutamat die terminale Phosphatgruppe des ATP auf das Glutamat übertragen wird (40). Dabei wird das Zwischenprodukt γ -glutamyl-Phosphat (GGP) gebildet (134). Anschließend bindet das Ammoniumion an die Glutaminsynthetase und reagiert mit GGP zu Glutamin (Abb. 4) (76).

Bei dieser zweischrittigen Reaktion (Abb. 4) wird der Kofaktor ATP am oberen Ende des Trichterförmigen aktiven Zentrums über eine Salzbrücke zwischen der γ -Phosphatgruppe des ATP und der GS gebunden (135). Hierbei nähern sich die Aminosäurereste Asp76 und Arg324 aneinander an und ermöglichen so die Bindung des β -Phosphats des Nukleotids (1). Arginin324 ist Teil des Aminosäuresequenzmotivs ASIRIP und der hier gebildeten Glutamatbindungstasche, und stabilisiert die terminale β -Phosphatgruppe von ATP durch eine ionische Salzbrücke am GGP (40). Der Arginin-Rest an Position 324 ist in Eukaryoten und Prokaryoten streng konserviert (113).

Die Bindung des ATP führt zu einer gesteigerten Flexibilität einer als Glutamat-Klappe, „Glu 327 Flap“ oder kurz „Glu-Flap“ (21) bezeichneten Schleifenregion, die aus den Aminosäureresten an Position 324-328 gebildet wird (129). Die gesteigerte Flexibilität erhöht die Affinität und erleichtert die feste Bindung der γ -Carboxylgruppe des Substrats Glutamat an der unteren Seite des aktiven Zentrums der Glutaminsynthetase und ermöglicht so eine Übertragung der terminalen Phosphatgruppe von ATP auf Glutamat (1, 21).

Dadurch entstehen GGP und ADP und das aktive Zentrum wird verschlossen, da hierbei die Klappenflexibilität verloren geht. Dies ist Folge der Bildung einer stabilisierenden Salzbrücke zwischen der positiven γ -Aminogruppe des Zwischenprodukts und dem negativ geladenen Glu327 Rest der Glutamat-Klappe (76). Der Verschluss der Klappe verhindert eine spontane Hydrolyse des Zwischenprodukts (39) und vervollständigt die Bindungsstelle für Ammonium (21, 136). Anschließend bindet durch Deprotonierung in Anwesenheit von ADP das Ammoniumion am Zwischenprodukt GGP an der Glutaminsynthetase und bildet ein tetraedrisches Zwischenprodukt (76). Die daraus resultierende weitere Konformationsänderung öffnet die Glutamatklappe und in der Folge können Glutamin, ADP und Phosphat freigesetzt werden (131).

Neben der oben beschriebenen kann die GS noch zwei weitere Reaktionen katalysieren. Ersetzt man in der „physiologischen“ Reaktion das Ammoniumion (NH_4^+) durch Hydroxylamin (NH_2OH), so kommt es in einer mit der in Abb. 4 beschriebenen ähnlichen Reaktion zur Bildung von γ -Glutamylhydroxamat (Abb. 5) (21).

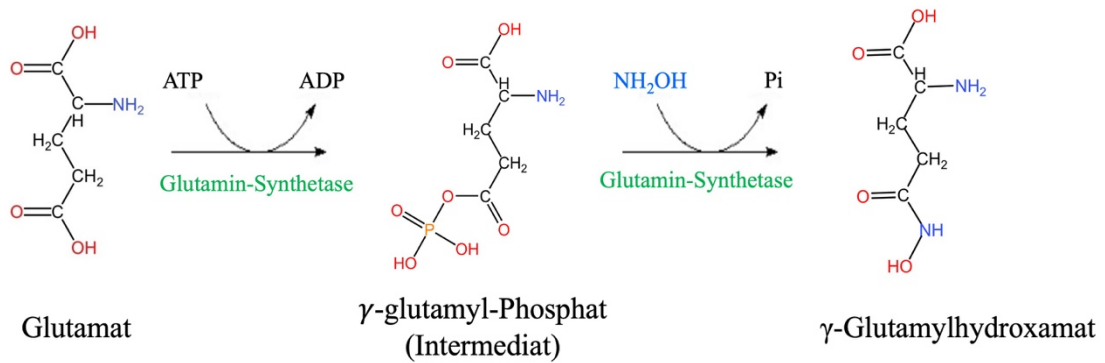


Abb. 5 Die Hydroxylamin-Reaktion der Glutaminsynthetase

Wird das Ammoniumion durch Hydroxylamin in der Reaktion ausgetauscht katalysiert die GS die Bildung von γ -Glutamylhydroxamat. Die Strukturformeln wurden mit dem Programm King-Draw und Powerpoint erstellt.

Eine dritte von der Glutaminsynthetase katalysierte Reaktion ist die sogenannte γ -Glutamyltransferase-Reaktion. Hierbei handelt es sich um eine Umkehrreaktion der in Abb.4 gezeigten Reaktion, bei welcher L-Glutamin (127) und Hydroxylamin zusammen mit ADP oder ATP, Arsenat und Mangan (137) über das instabile Zwischenprodukt γ -Glutamylarsenat zu Ammoniak und γ -Glutamylhydroxamat reagieren (Abb. 6) (21). Das Ammoniumion (in der Glutamin-bildenden physiologischen Reaktion) und das Hydroxylamin (in der Transferase-Reaktion) binden beide an die Ammoniumbindungsstelle der Glutaminsynthetase (21). Wellner et al. konnten zeigen, dass diese Reaktion mit ADP als Nukleotid deutlich stabiler ist und besser aktiviert wird als mit ATP (138).

Die Robustheit der γ -Glutamyltransferase Reaktion und die hohe Nachweissensitivität von γ -Glutamylhydroxamat haben dazu geführt, dass diese Reaktion präferentiell zur Bestimmung der Glutaminsynthetase-Aktivität genutzt wird (139, 140).

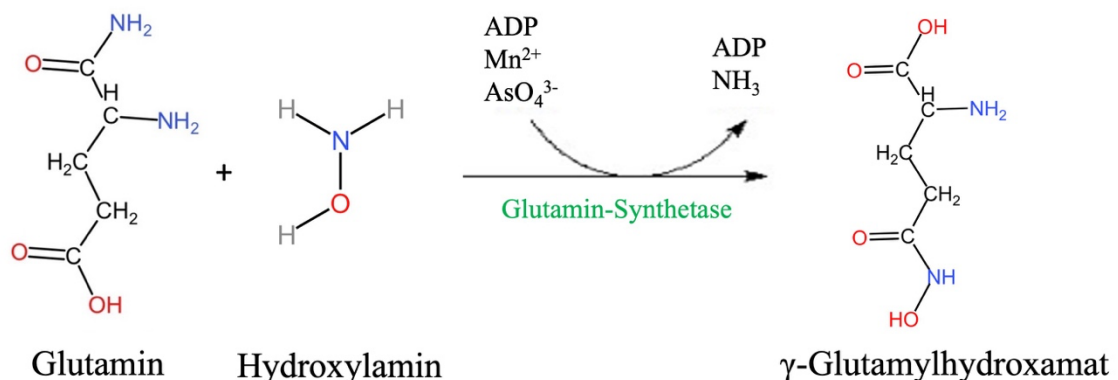


Abb. 6 Die "Glutamyltransferase"-Reaktion der Glutaminsynthetase

Glutamin und Hydroxylamin reagieren in der sogenannten Glutamyltransferase-Reaktion mit den Kofaktoren ADP und Mangan in Gegenwart von Arsenat zu γ -Glutamylhydroxamat. Die Strukturformeln wurden mit dem Programm King-Draw und Powerpoint erstellt.

1.5. Einflussfaktoren auf die Glutaminsynthetase-Aktivität

Die mRNA- und Proteinspiegel und die Aktivität der Glutaminsynthetase können durch verschiedene Mechanismen beeinflusst werden. Dies dient der Aufrechterhaltung der Ammoniak-, Glutamin- und Stickstoffhomöostase. Im Einzelnen können die Proteinspiegel der Glutaminsynthetase durch Insulin, Asparagin, Schilddrüsenhormone, Harnstoff und Glucocorticoide gesteigert werden (21, 26). Auch eine Hyperammonämie sowie erhöhte Glutamat- und erniedrigte Glutaminspiegel können die GS-Transkription, -Translation und hierüber die GS-Aktivität in einigen Geweben, jedoch nicht im Gehirn steigern (6, 26, 72).

Die Aktivität der Glutaminsynthetase kann wie zuvor beschrieben auch im Rahmen einer metabolischen Azidose gesteigert werden (25).

Im Sinne einer negativen Feedback Inhibition wirken erhöhte Glutaminspiegel (21), Aminosäuren wie Alanin, Serin, Histidin, Tryptophan und Glycin (33, 141), Cytidin-5-Triphosphat, Nukleotide wie AMP, Glucosamin-6-Phosphat, und Carbamoylphosphat. Zudem kommt es teilweise zu einer kompetitiven Inhibition durch Bindung an der ATP-(GDP, AMP, ADP) oder Glutamatbindungsstelle (Alanin, Serin, Glycin) (21, 72, 142).

Die Glutaminsynthetase kann auch durch reaktive Stick- und Sauerstoffspezies (ROS) wie Peroxynitrit (ONOO-), Stickstoffmonoxid (NO) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) gehemmt werden (59, 143). Diese können Spezies-abhängig eine Nitrierung von Tyrosin-Resten (144), eine Oxidation von Thiolgruppen in Cystein und Methionin, Tyrosin (Dityrosin), Histidin (2-Oxo-Histidin), Lysin und Arginin (Bildung von Carbonylgruppen) vermitteln (77, 145, 146). Die Nitrierung von Tyrosin-Resten in der Nähe der ATP-Bindungsstelle führt zu einer Reduktion der ATP-Bindungsfähigkeit (147). Zusätzlich kann die Proteintyrosinnitrierung (PTN) durch Lipopolysaccharidexposition (148), Benzodiazepinbehandlung (92), Ammoniakexposition und einen portocavalen Shunt (149) entstehen. Eine PTN der GS wurde auch im zerebralen Kortex von Patienten mit Leberzirrhose und hepatischer Enzephalopathie gefunden. Hier waren die GS-Proteinspiegel gegenüber Kontrollpatienten unverändert, aber die GS-Aktivität signifikant erniedrigt (90).

Eine Hyperammonämie steigert die Bildung von Glutamin im Gehirn und kann so eine Astrozytenschwellung, die Bildung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS) und hierüber eine hepatische Enzephalopathie induzieren (150, 151). Dabei werden die Signaltransduktion, Neurotransmission und synaptische Plastizität erheblich beeinträchtigt (64, 150). Der oxidative Stress in den Astrozyten führt zur oben beschriebenen Proteintyrosinnitrierung der Glutaminsynthetase. Die Inaktivierung der GS kann einerseits

einer Glutamin- und ROS-vermittelten Astrozytenschwellung entgegenwirken, andererseits wird dadurch aber auch die Ammoniakentgiftung im Gehirn beeinträchtigt (92). Auch im Gehirn von Patienten mit einer Epilepsie wurde eine PTN der GS gefunden (91).

Interessanterweise ist die PTN der GS prinzipiell reversibel (56, 147), während die Carbonylierung des Enzyms einen Abbau durch das 20S Proteasom bewirken kann (144, 152, 153). In Übereinstimmung mit der Bedeutung der Leber-GS für die systemische Ammoniakhomöostase kann eine Inaktivierung der Leber-GS durch PTN eine Hyperammonämie induzieren (148, 149).

Verringerte GS mRNA- und Proteinspiegel wurden auch in der Leber bei Leberzirrhose und Sepsis assoziiert mit einer Hyperammonämie gefunden (148, 149, 154). Zudem kann die Aktivität der GS in der Leber durch Phenylephrin aufgrund einer Hemmung des interzellulären Glutaminzyklus gehemmt werden. (155)

Die bei der bakteriellen Glutamin-Synthetase weiter verbreitete Inhibition durch Adenylierung der Glutamin-Synthetase kommt in eukaryotischer und somit auch humaner Glutamin-Synthetase nicht vor (156, 157).

1.6. Die Glutaminsynthetase-Hemmstoffe MSO und PPT

Die beiden potentesten Inhibitoren der Glutaminsynthetase sind Methionin-Sulfoximin (MSO) und Phosphinotricin (PPT) (siehe Abb. 7) (158). Sie binden beide am aktiven Zentrum der GS, werden dort durch ATP phosphoryliert und ähneln so strukturell und funktionell dem Zwischenprodukt der physiologischen GS-Reaktion (142, 158).

Der am besten charakterisierte und verwendete Inhibitor der GS ist MSO (21). Es bindet ATP-abhängig und nicht kovalent an der Glutamat- und der Ammoniakbindungsstelle der GS (159) und blockiert dadurch die Bildung von Glutamin (1). MSO bindet an der Glutamatbindungsstelle entweder direkt oder durch Interaktion mit den als Kofaktoren wirkenden Metallionen, wobei die irreversible Inhibition der GS durch MSO vor allem in Anwesenheit von ATP und Metallionen wie Mg_2^+ zustande kommt (160, 161). Hierbei bindet MSO über Wasserstoffbrücken im aktiven Zentrum und wird über ionische Verbindungen mit den Metallionen dort stabilisiert (133, 162). Die Phosphorylierung des Substrats (MSO) durch ATP findet in Anwesenheit von Metallionen und dem Arg347 Rest statt, da diese die γ -Phosphatgruppe des ATP polarisieren (21, 158). Dies führt zu einem Verschluss des Glu-Flaps, so dass dieser eine Konformation annimmt, welche dem tetraedischen Addukt im Zwischenschritt der Glutaminsynthese ähnelt. So wird die

Ammoniakbindungsstelle gestört und die Reaktion kann nicht weiter stattfinden (136). Diese Inhibition mit enger Bindung von MSO-P und ADP am Enzym (159) kann durch steigende Glutamatspiegel (128) und auch Ammoniakspiegel (142) kompetitiv gehemmt und pH-abhängig oder durch kurzzeitige Erhitzung reversiert werden (21, 159).

Der Mechanismus der Hemmung der GS durch PPT, welches auch unter dem Namen Glufosinat bekannt ist, ist mit dem von MSO vergleichbar (1, 136, 162). Die Phosphingruppe interagiert zu Bindung direkt mit dem Metallion und dem Arg368 Rest der Glutaminsynthetase. PPT gilt ebenso wie MSO auch als sogenannter „Suicide“-Inhibitor, welcher die GS irreversibel hemmt (158).

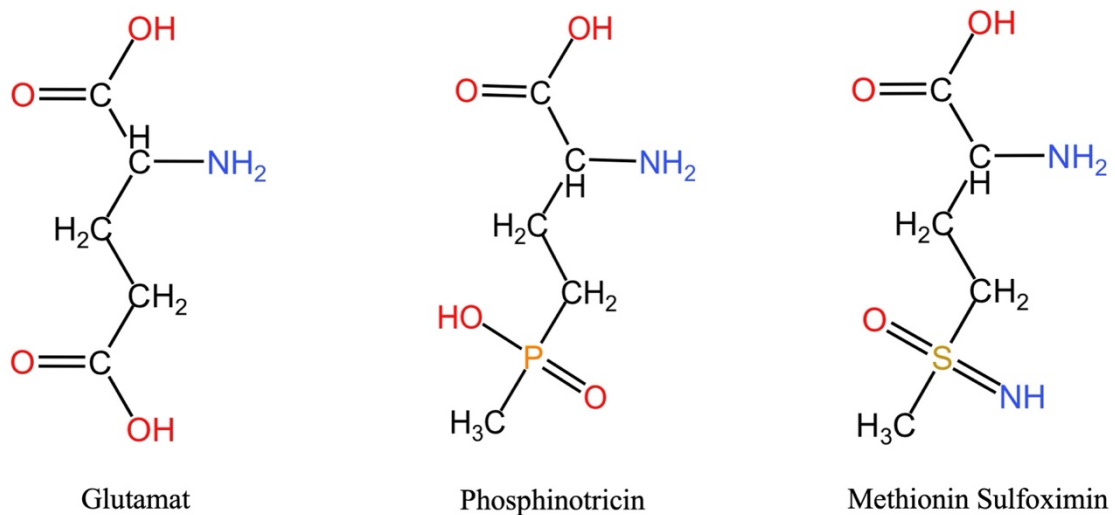


Abb. 7 Strukturformeln von Glutamat, Phosphinotricin und Methionin-Sulfoximin

Gezeigt sind die Strukturformeln von Glutamat und der beiden Glutaminsynthetase Hemmstoffe PPT und MSO, welche strukturell sehr ähnlich sind und beide ATP-abhängig an der Glutamatbindungsstelle des Enzyms binden. Die Strukturformeln wurden mit dem Programm King-Draw und Powerpoint erstellt.

1.7. Glutaminsynthetase-Mutationen beim Menschen

Im Jahr 2005 wurde erstmalig beschrieben (113), dass Mutationen im Glutaminsynthetase-Gen (GLUL-Gen) beim Menschen eine systemische Glutamindefizienz als Folge einer GS-Aktivitätsreduktion induzieren können. Alle beschriebenen relevanten Mutationen betreffen das aktive Zentrum der GS und beeinflussen dadurch negativ die Substratbindung (39).

Tabelle 1: Übersicht über homozygote Mutationen in der humanen GS

Mutation	R324S	R324C	R341C	R41C
Glutamin	-↓	↓↓	↓↓	-↓
Ammoniak	↑	unbekannt	↑	↑
Lokalisation der Mutation	ATP-Bindungsbereich	ATP/Glutamat-Bindungsbereich	ATP-Bindungsbereich	unbekannt
EEG	Epileptische Enzephalopathie	Epileptische Enzephalopathie	Epileptische Enzephalopathie	Epileptische Enzephalopathie
Morphologische Merkmale	keine Malformationen Entwicklungsverzögerung	Wachstumsstörung, zerebrale Malformation, Gesichtsdysmorphie	Zerebrale Malformation, Gesichtsdysmorphie	Mikrozephalie
Lebenszeit	6 Jahre	2 Tage	28 Tage	> 5 Jahre

Erklärung der in der Tabelle genutzten Symbole: ↑ = leicht erhöht, ↓ = leicht verringert, ↓↓ = stark verringert, - = normwertig, SSW = Schwangerschaftswoche

Tabelle 2: Übersicht über heterozygote Mutationen und Deletionen der humanen GS

Mutation	A195D + R319H	R106* + K14N	GLUL-Deletion
Glutamin	-	unbekannt	↓↓
Ammoniak	unbekannt	-	↑
Lokalisation der Mutation	Glutamat-Bindungsbereich	Dimerisierungsoberfläche zw. den Untereinheiten der GS	Komplette Deletion
EEG	Epileptische Enzephalopathie	Myoklone Epilepsie	Abort in 15+5 SSW
Morphologische Merkmale	Mikrozephalie	Entwicklungsverzögerung Keine Malformationen	Mikrozephalie/ Malformationen von Gehirn und Rückenmark
Lebenszeit	>5 Jahre	> 21 Jahre	Abort in 15+5 SSW

Erklärung der in der Tabelle genutzten Symbole: ↑ = leicht erhöht, ↓ = leicht verringert, ↓↓ = stark verringert, - = normwertig, SSW = Schwangerschaftswoche

(57, 72, 98, 113, 120, 121, 163)

Sekundäre GS-Defizienzen sind bei Patienten nach Transplantationen und im Rahmen von chronischen Erkrankungen (siehe Abschnitt 1.3.1 und 1.3.2), beschrieben worden (72).

Bislang wurden insgesamt nur 7 Mutationen im GS-Gen beschrieben (57, 72, 98, 113, 120, 121, 163). Dies könnte Folge einer diagnostischen Lücke sein aufgrund von pränataler Letalität (121) oder Unauffälligkeit der jeweiligen Mutationen (59). Mögliche Faltmutationen sind aufgrund von Proteininstabilität und -abbau nicht mit dem Überleben vereinbar (121).

Die ersten beschriebenen angeborenen Mutationen der GS (R341C und R324C) mit einer klinisch höchst auffälligen Pathologie wurden im Jahre 2005 von Häberle et al. beschrieben (113). Eine weitere Mutation (R324S) war mit einem weniger offenkundigem klinischen Bild vergesellschaftet und das betroffene Kind überlebte 6 Jahre. Dies wurde auf eine mögliche residuale Aktivität der Glutaminsynthetase zurück geführt (56).

Wie in den folgenden Abschnitten genauer beschrieben zeigten alle Patienten in unterschiedlichen Ausprägungen eine epileptische Enzephalopathie und im Falle der homozygoten Mutationen Malformationen wie Mikrozephalie, Gehirnatrophie und strukturelle Fehlbildungen (120), einen systemischen Glutaminmangel und eine milde Hyperammonämie (98). In der Zellkultur wurde beobachtet, dass die Mutationen R324C, R341C (113) und R324S (121) mit gesteigerten GS-Proteinspiegeln einhergehen. Dies wurde interpretiert als Mechanismus zur Kompensation der mutationsbedingten reduzierten Glutaminsynthese-Kapazität (119). Dieser Feedbackmechanismus konnte auch in Zellkulturen bestätigt werden, in denen die Glutaminspiegel im Medium experimentell erniedrigt wurden (72, 98, 113).

Die sowohl anatomischen, als auch funktionalen Entwicklungsstörungen des Gehirns wurden als Folge des systemischen Glutaminmangels und auch der leichten Hyperammonämie interpretiert (72). Dabei waren die maternalen Glutaminspiegel im unteren Normbereich und unter der Annahme eines ungestörten Eintritts des Glutamins in den fetalen Kreislauf über die Plazenta wurde vermutet, dass die fetale Glutaminsynthese in der Plazenta und im Organismus selbst nicht ausreichend waren für die Glutaminversorgung.

Weitere Studien durch Hu et al. zeigten, dass bei es bei einer GS Defizienz auch zu einem NAD⁺ Verlust in Fibroblasten, Leukozyten und peripheren Blutstammzellen kommt, was zu den schweren klinischen Beeinträchtigungen beiträgt (164).

1.7.1 R324C-Mutation

Der Patient mit der homozygoten autosomal rezessiven Mutation von Arginin nach Cystein an Position 324 im humanen GLUL-Gen (R324C-Mutation) war ein Sohn blutsverwandter türkischer Eltern. Er zeigte eine schwere epileptische Enzephalopathie, stark verminderte Glutaminspiegel in Serum, Urin und Liquor, eine leichte systemische Hyperammonämie und verstarb 2 Tage postpartal an Multiorganversagen. Auch bei den Eltern des Kindes wurden leicht verminderte Glutaminspiegel im Serum gefunden (113).

Klinisch waren bereits im pränatalen Ultraschall ein Polyhydramnion, eine Ventrikeldilatation und frontale paraventriculäre Zysten nachweisbar. Postpartal zeigten sich verkürzte Extremitäten mit Beugekontrakturen in Ellenbogen und Knien, eine flache Nasenwurzel bei kurzer Nase, dünne Lippen, niedrige Ohren und eine Camptodaktylie. Zudem präsentierte sich der Patient mit ausgeprägter Schlaffheit und reduziertem Muskeltonus, einer Herzinsuffizienz und einer respiratorischen Insuffizienz mit Beatmungsnotwendigkeit, während keine viszerale Malformationen nachzuweisen waren.

Im MRT zeigte sich ein deutlich unterentwickeltes Gehirn mit inkompletter Agyrie, Hyperintensitäten der weißen Substanz und vergrößerte Ventrikel. Im Elektroenzephalogramm (EEG) konnten generalisierte Krampfpotentiale und Ausbrüche von Theta-Wellen bei insgesamt kaum zerebraler Aktivität nachgewiesen werden (113).

Biochemisch bildet das Arginin an Position 324 in der GS-Aminosäurekette einen Teil des im Abschnitt 1.4 bereits erwähnten „Glu-Flaps“. Es stabilisiert hier die Bindung des β -Phosphats des Nukleotids (1) über eine Salzbrücke und ermöglicht so die stabile ATP-Bindung. In der R324C Mutation zeigt die Glu-Flap-Region in allen Reaktionsschritten eine sehr hohe Flexibilität, wodurch eine stabile Bindung verhindert wird. Es wird angenommen, dass dies eine frühe Hydrolyse von GGP, eine schlechtere Bindung von Glutamat und einen Verlust der direkten Interaktion mit ADP bewirkt. In immortalisierten Lymphozyten des Patienten konnte eine reduzierte Glutaminsynthetase-Aktivität von ca. 12% nachgewiesen werden. Diese Aktivität scheint durch eine Hochregulation der Expression gesteigert zu sein. Auch die Glutaminsynthetase-Aktivität in immortalisierten Lymphozyten der Eltern war in beiden Fällen auf 71% beim Vater bzw. 49% bei der Mutter herabgesetzt (113, 135).

1.7.2 R341C-Mutation

Die Patientin mit der homozygoten autosomal rezessiven Mutation von Arginin nach Cystein an Position 341 im humanen GLUL-Gen (R341C-Mutation) war Tochter blutsverwandter türkischer Eltern. Sie zeigte eine schwere epileptogene Enzephalopathie, stark verminderte Glutaminspiegel im Serum, Urin und Liquor und verstarb 4 Wochen postpartal an Multiorganversagen (113).

Im pränatalen Ultraschall zeigte sie eine Dilatation der hinteren Schädelgrube und postpartal eine breite Nasenwurzel und niedrige Ohren. Im EEG wurden multifokale Krampfpotentiale nachgewiesen und klinisch präsentierte sie eine ausgeprägte muskuläre Hypotonie. Zudem musste die Patientin kurz nach der Geburt bei respiratorischer Insuffizienz und Lungenödem intubiert werden und zeigte eine Enteropathie mit Diarrhoe, Aszites und ein nekrolytisches migratorisches Erythem (113).

Arginin an Position 341 ist phylogenetisch über verschiedene Spezies hinweg hoch konserviert. Es befindet sich in der Nähe der Bindungstasche für ATP und Glutamat (113). Die Positionen R341, D339 und R340 bilden eine Aminosäuretriplt, in welchem der R340-Rest Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Zwischenprodukt GGP eingeht. Diese Konformation wird durch Salzbrücken von R341 und D339 stabilisiert (40).

Die R341C Mutation schwächt die ATP-Bindung indem es die Interaktion von R341 mit R340 beeinträchtigt und hierüber das Enzym destabilisiert (40). Weiterhin reduziert die Mutation R341C die mechanische Stabilität der Helix H8 (Aminosäurereste 266-288), und verhindert so, dass die Helix eine Strukturveränderung durchführt, die für die Bindung des Glutamats essentiell ist (56). Dadurch wird die Stabilität des C-Terminus der GS reduziert und durch die fehlende Strukturveränderung von Helix 8 ist die Glutamatbindung durch die R341C Mutation indirekt gestört (40). Diese gestörte Glutamatbindung spiegelt sich auch in einem Verlust der Bindungsfähigkeit von monoklonalen Anti-GS-Antikörpern an der R341C-GS wider und erklärt die Hemmung der Glutaminsynthetase-Aktivität (113).

1.7.3 R41C-Mutation

In 2019 wurde im humanen GLUL-Gen die Mutation von Arginin nach Cystein an Position 41 (R41C-Mutation) durch Ünal et al. (163) in einem vitalen Kind blutsverwandter türkischer Eltern beschrieben. Das Kind zeigte einen milden Glutaminmangel, milde Hyperammonämie und eine therapiebedürftige Epilepsie. Es wurden neben einer Mikrozephalie keine weiteren sichtbaren Malformationen, aber eine leichte neurologische Entwicklungsstörung mit axialer Hypotonie und Hyporeflexie beschrieben. Im EEG wurde eine verlangsamte Hintergrundaktivität mit diffusen Theta- und Delta-Wellen ohne fokale epileptiforme Aktivität festgestellt. Die orale Supplementation mit Glutamin und Nicotinamid verbesserte das klinische Bild des Patienten deutlich. Der genaue biochemische Einfluss der Mutation auf die Enzymaktivität der GS wurde bislang nicht untersucht (163).

1.7.4 Homozygote Deletion des humanen GLUL-Gens

In 2020 berichteten Roifman et al. von einer homozygoten GLUL-Deletion in einem Fötus einer Zwillingschwangerschaft (120). Bei diesem Fötus wurde in der 28. Schwangerschaftswoche ein Abbruch der Schwangerschaft durchgeführt, nachdem es zuvor in der 15+5 Schwangerschaftswoche zum Spontanabort des anderen Zwillings kam. Entgegen bisheriger, auf Tiermodellen beruhender Annahmen (116, 117), war die vollständige Abwesenheit der Glutaminsynthetase aufgrund homozygoter Deletion des GLUL-Gens bis zur 28. Schwangerschaftswoche nicht letal. Der Fötus zeigte eine intrauterine Wachstumsrestriktion ohne nachweisbare Plazentainsuffizienz, eine schwere Mikrozephalie und Hirnunterentwicklung. Post mortem wurden ausgeprägte Malformationen von Gehirn, Rückenmark, Lunge und Herz, morphologische Auffälligkeiten im Gesicht und Fehlbildungen der Extremitäten festgestellt. Im fetalen Blut konnten sehr niedrige Glutaminspiegel nachgewiesen werden, während die maternale Glutamin-Konzentration im Normbereich lag, was das Überleben des Fötus bis zum genannten Punkt möglicherweise ermöglichte (120).

1.7.5 Heterozygote Mutationen im humanen GLUL-Gen

In 2020 berichteten Bennett et al. von zwei philippinischen Schwestern, welche zwei heterozygote Mutationen der Glutaminsynthetase mit R106* und K14N präsentierten. Beide Schwestern waren zuvor auffällig geworden mit einer Entwicklungsverzögerung und myoklonischer Epilepsie und waren zum Zeitpunkt der Beschreibung 12 und 21 Jahre alt. Sie zeigten eine milde Hyperammonämie bei normalen Glutaminspiegeln (57). K14 gehört zu einem Netzwerk ionischer Wechselwirkungen, welches die Stabilität zwischen den Untereinheiten der GS sicherstellt. Durch die K14N Mutation kommt es zu einem Verlust von Salzbrücken zu D174 und D213 und dadurch zu einer Destabilisierung und Aktivitätsreduktion der Glutaminsynthetase. Die R106* Mutation zeigt keinen nennenswerten Einfluss auf die Enzymaktivität (56).

Spodenkiewicz et al. berichteten 2016 in einem Übersichtsartikel zu bisher bekannten Mutationen der Glutaminsynthetase von einer bis dahin unbekannten Mutation in der GS in einem russischen Jungen. Hier wurden heterozygote Mutationen im GLUL-Gen gefunden, welche die Aminosäureaustausche A195D und R319H bewirkten. Der Patient zeigte ab einem Alter von 3 Monaten eine progrediente epileptische Enzephalopathie. Aufgrund der sich im Normbereich befindenden Glutaminspiegel wurden diese Mutationen nicht offiziell den Glutaminsynthetase-Defizienzen zugeordnet und die GS-Aktivität nicht spezifisch untersucht (98). Während A195 nicht unmittelbar an der Substratbindung beteiligt ist, bindet der phylogenetisch stark konservierte R319-Aminosäurerest an die terminale Phosphatgruppe von ATP, ermöglicht den Phosphattransfer von ATP zu Glutamat und ist essentiell für die Glutamatbindung (56).

1.8. R324S-Mutation

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Mutation von Arginin nach Serin an Position 324 der humanen Glutaminsynthetase ist eine homozygote, autosomal rezessive Mutation, welche im Jahr 2011 erstmalig durch Häberle et al. in einem sudanesischen Jungen blutsverwandter Eltern beschrieben wurde (121). Bei diesem Patienten wurden keine Auffälligkeiten im pränatalen Ultraschall beobachtet und auch nach Geburt wurde zunächst kein auffälliger Phänotyp und keine Malformationen festgestellt.

Postpartal präsentierte sich der Patient mit muskulärer Hypotonie und litt seit dem 13. Lebenstag an generalisierten tonisch-klonischen Krampfanfällen bei einer epileptogenen Enzephalopathie mit generalisierter Verlangsamung im EEG (57). Im MRT war eine milde Hirnatrophie und Hypomyelinisierung der weißen Substanz nachweisbar. Im weiteren Verlauf kam es zu einer ausgeprägten Entwicklungsverzögerung und respiratorischen Insuffizienz, welche eine Tracheotomie und invasive Beatmung notwendig machte und zu häufigen Atemwegsinfekten führte. Die Serum-Glutaminspiegel des Patienten waren postpartal zunächst im unteren Normbereich, nahmen mit zunehmendem Alter ab und die systemischen Ammoniakspiegel stiegen an (83). Dies wurde von einer Verschlechterung des Allgemeinzustands und stärkeren neurologischen Beeinträchtigungen begleitet (121). In einer klinischen Studie konnte eine Verbesserung der Vigilanz, des neurologischen Status im EEG und der allgemeinen Krankheitsschwere durch vorsichtige enterale und parenterale Supplementierung mit L-Glutamin erreicht werden, was bei anderen Aminosäure-Defizienzen zuvor bereits pränatal erfolgreich durchgeführt wurde (83, 121).

Glutamin kann in Situationen des Glutaminmangels im Sinne einer bedingt essentiellen Aminosäure intestinal aufgenommen werden und die systemischen Glutaminspiegel wurden in der genannten Studie so gesteigert (165). Da erst in einem Alter von 4 Jahren mit der Supplementation von Glutamin begonnen wurde, kann vermutet werden, dass die Behandlung nur noch von relativ geringem therapeutischem Nutzen sein konnte. Daher postulieren die Autoren, dass die Supplementation zukünftig unmittelbar nach Geburt oder bereits in utero begonnen werden sollte um die therapeutische Wirksamkeit der Behandlung zu erhöhen (83).

Der Patient verstarb im Alter von 6 Jahren an einer respiratorischen Dekompensation (57). Das vergleichsweise hohe Alter, dass dieser Patient erreichte, ließ vermuten, dass bei dieser Mutation eine residuale Aktivität der Glutaminsynthetase erhalten geblieben sein musste (40).

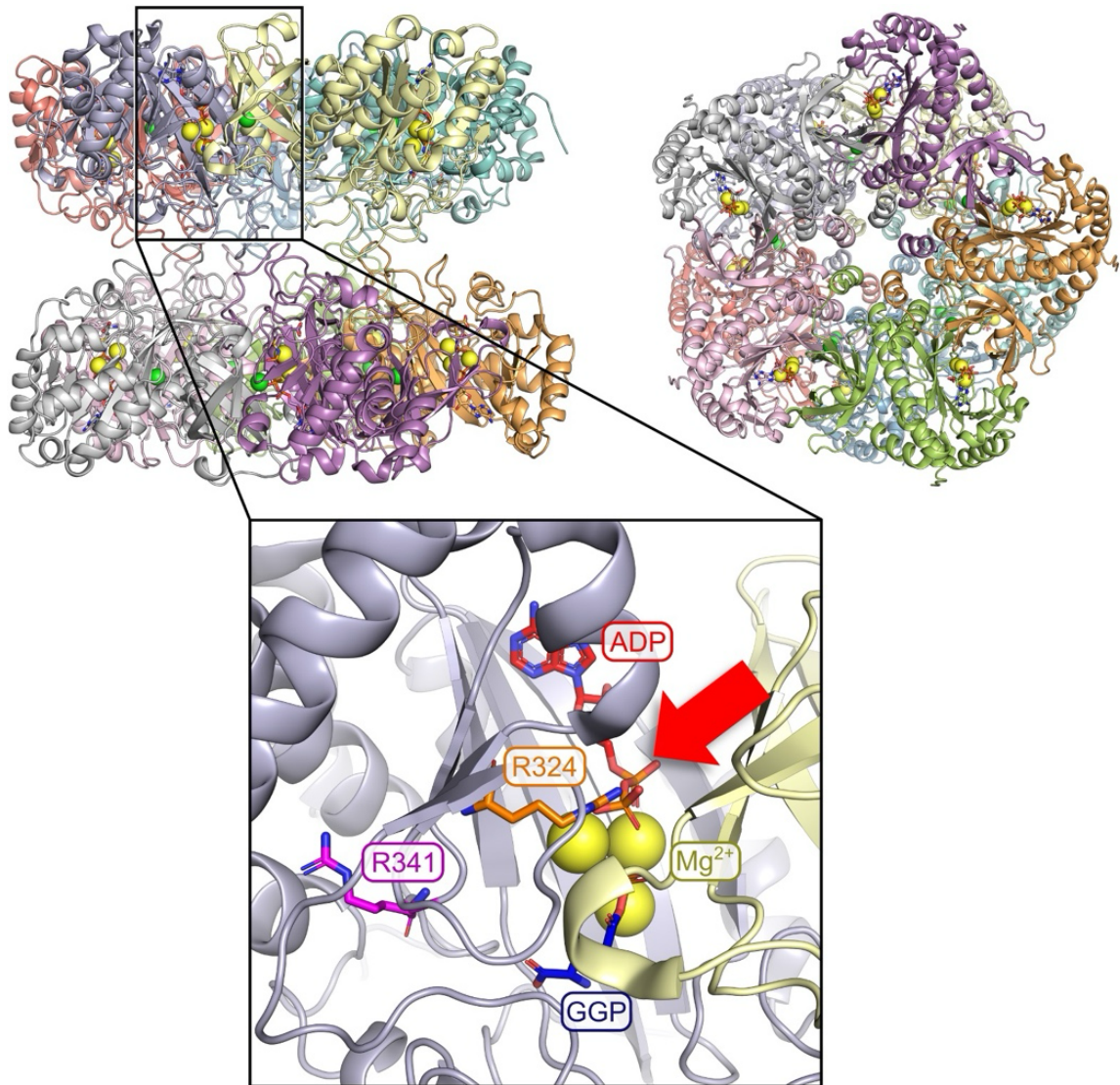


Abb. 8 Positionen von R341 und R324 im Strukturmodell der humanen GS

Position 324 in der Glutaminsynthetase stabilisiert durch ionische Salzbrücken die Bindung von ATP an das Enzym und ist so indirekt für die Katalyse im aktiven Zentrums bedeutsam. Der rote Pfeil zeigt die räumliche Nähe und Bindung zwischen R324 und ADP. Das Zwischenprodukt GGP wird durch divalente Metallionen wie Magnesium (Mg^{2+}) stabilisiert. Wie in Abschnitt 1.7.2 beschrieben ist der R341 Rest nicht direkt an der Substratbindung beteiligt und räumlich entfernt vom katalytischen Zentrum der GS. Bereitgestellt von Michele Bonus, Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie.

Die Aminosäure Arginin an Position 324 in der Aminosäurekette der GS ist Teil des Sequenzmotivs ASIRIP (113) und somit des „Glu-Flaps“. Es stabilisiert die Bindung des β -Phosphats des Nukleotids (1) und damit von ATP (siehe Abb. 8). Bioinformatische *in silico* Untersuchungen von Frieg et al. lassen vermuten, dass die R324S-Mutation die ATP-Bindung an die GS stört, aber keinen Einfluss auf die Glutamatbindung hat (40).

Die R324S Mutation verhindert die Ausbildung einer ionischen Salzbrücke die wichtig ist für die direkte Interaktion mit ATP. Dies bewirkt eine höhere Flexibilität des „Glu-Flaps“ und eine größere Distanz zwischen der Hydroxylgruppe des Serins und der β -Phosphatgruppe des ADPs. Dieser Verlust der Interaktion wird in der Mutation partiell

wiederhergestellt durch Wasserstoffbrückenbindungen und Van der Waals-Kräfte (166) zwischen der Seitenkette des Serins 324 und dem Liganden ATP. Hierdurch wird eine partielle Stabilisierung erreicht, welche die residuale Aktivität der GS erklären könnte (40). Trotz dieser partiellen Stabilisierung ist die Flexibilität des „Glu-Flaps“ im Vergleich zur Wildtyp GS aber weiterhin erhöht, was wiederum den mutationsbedingten Aktivitätsverlust erklärt (39).

Die bioinformatischen in silico Modellierungsexperimente an einem repräsentativen Dimer der humanen Glutaminsynthetase von Frieg et al. lassen weiterhin vermuten, dass die reduzierte Aktivität der R324S-Mutante durch nicht kovalent gebundene Adaptermoleküle, welche die ATP-Bindung zusätzlich stabilisieren, wieder gesteigert werden könnte (39). Auf diese Weise könnte das Enzym „chemisch“ repariert werden (40).

Die initialen Berechnungen wurden 2016 von Frieg et al. weitergeführt. Diese Untersuchungen lassen vermuten, dass Betain die durch die Mutation entstehende „Lücke“ durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit S324 und Reaktion mit einer β -Phosphatgruppe des ATP schließen könnte. Zusätzlich könnte das Betain auch mit den Metallionen in der Bindungstasche, welche auch mit ATP interagieren, reagieren. Hierdurch wird die Mobilität von ATP in der R324S Glutaminsynthetase reduziert und dadurch dessen Bindung stabilisiert. Auf diese Weise könnte die aus der R324S-GS-Mutation resultierende Funktionsbeeinträchtigung extrinsisch „repariert“ werden (167).

In ähnlicher Weise könnten auch andere chemische Verbindungen mit einer Salzbrücken-bildenden, positiv geladenen Gruppe genutzt werden. Frieg et al. stellten 2021 die Hypothese auf, dass auch andere chemische Verbindungen, welche die Interaktion zwischen Serin 324 und ATP besser überbrücken als Wasser, eine festere Anlagerung von ATP bewirken und somit die GS-Aktivität steigern könnten (56). Hierfür schlugen sie eine Untersuchung der Stoffe Betain und den strukturellen Analoga Creatin Monohydrat, β -Alanin Methylester, 2-chloroethylamid HCl, 3-chloropropylamid HCl und Chloroacetamidin HCl vor (56).

1.9. Ziele der vorliegenden Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es mit Hilfe eines Zellkultursystems und biochemischer Methoden zu untersuchen, welche Folgen die Mutation von Arginin nach Serin in der Aminosäurekettenposition 324 der humanen Glutaminsynthetase für dessen Aktivität hat.

Es sollte danach überprüft werden, ob ein eventueller mutationsbedingter Aktivitätsverlust der GS durch chemische Verbindungen, welche die bioinformatisch vorhergesagte geschwächte ATP-Bindung stabilisieren, wieder aufgehoben werden könnte.

2 Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 3: In dieser Arbeit genutzte Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
β -Alanin Methylester	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
2-chloroethylamid HCl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
3-Chloropropylamine Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Acrylamid 4K-Lösung (30%)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Adenosindiphosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Adenosintriphosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ammonium Persulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Betain	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Blasticidin-S-Hydrochlorid BioChemica	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Bradford Protein Assay; Protein Assay Dye Reagenz Concentrate	BioRad, München, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roche, Mannheim, Deutschland
Chloroacetamidinhydrochloride	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Creatin Monohydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dinatriumhydrogenarsenat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
dNTPs (desoxyNukleosidTriPhosphat)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dual Color Protein Standard	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Eisen (III) Chlorid Hexahydrat 98%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich
Glyzin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hydroxylamin Hydrochlorid, Reagent Plus, 99%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Imidazol Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
L-Glutamat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Mangan (II)-Chlorid Tetrahydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Methioninsulfoximin (MSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
NaCl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumvanadat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Penizillin/Streptomycin	Cytogen, Sinn, Deutschland
Phosphinotricin (PPT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs, Ipswich, USA
Ponceau-S-Färbelösung	Serva, Heidelberg, Deutschland
Precision Plus Protein Standards Dual Color	Bio-Rad, München, Deutschland
Rainbow Molecular Weight Marker	Amersham, Waltham, Niederlande
Schneider's Drosophila Medium, w: L-Glutamine, w: 0.4 g/L NaHCO ₃	PANBiotech, Aidenbach, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	VWR BDH Prolabo Chemicals, Darmstadt, Deutschland
Triton-X 100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tween 20	Merck, Darmstadt, Deutschland
Western Lightning Plus ECL TM Kit	Waltham, USA
β-Glycerolphosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller
100mm-Zellkulturschalen	Falcon, Heidelberg, Deutschland
14ml-Röhrchen/ Falcon	Falcon, Heidelberg, Deutschland
50ml-Röhrchen/ Falcon	Falcon, Heidelberg, Deutschland
Amicon Ultra-4 10K Centrifugal Filter Devices	Merck Millipore, Tullagreen, Irland
Einkanal-Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Einmalspritze (1ml, 20ml, 50ml)	Braun, Melsungen, Deutschland
Einwegküvetten	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Glaspipetten	Brand, Wertheim, Deutschland
Glasplatten	Biometra, Göttingen, Deutschland
ibidi TM -Schalen (30mm)	ibidi, Martinsried, Deutschland
Nitrocellulose Transfermembran Protran	Whatman, Dassel, Deutschland
Pipettenspitzen	StarLab, Ahrensburg, Deutschland

Reaktionsgefäße (Safe lock)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Röhrchen (Greiner, 14ml, 50ml)	Falcon, Heidelberg, Deutschland
Sterilfilter (Filtropur, 0,20µm)	Millipore, Eschborn, Deutschland
Stripetten (5, 10, 25ml)	Corning Costar GmbH, Bodenheim
Whatman Filterpapier	Whatman, Dassel, Deutschland
Zellkulturflasche (cellstar)	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugationsröhrchen (13x51mm, Plastik)	Beckman, Krefeld, Deutschland

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Analysenwaage (Kern 770)	Kern&Sohn, Balingen-Frommern, Deutschland
Arktik Thermal Cycler	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Brutschrank (Mettler)	Mettler, Schwabach, Deutschland
Cell Observer (Z1)	Zeiss, Jena, Deutschland
ChemiDoc MP-Imaging System	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Elektroblotting-Kammer	Amersham, Freiburg, Deutschland
Elektrophoresekammer (Biometra)	Biometra, Göttingen, Deutschland
Magnetrührer MR 2000	Heidolph Instr. GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Präzisionswaage Kern (440-47N)	Kern&Sohn, Balingen-Frommern, Deutschland
Präzisionswaage Sartorius BP210S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Roller (SRT1)	Stuart Scientific, Staffordshire, USA
Schlauchpumpe (505 S)	Watson-Marlow, Rommerskirchen, Deutschland
Schüttler (GFL-3017)	Hilab, Düsseldorf, Deutschland
Spectrophotometer Ultrospec 2100 pro	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Sterile Werkbank Hera Cell	Heraeus, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifuge (5415 D)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge (5418)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge (Rotina 420R)	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

2.1.3 Molekularbiologische Kits

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete molekularbiologische Kits

ATP AffiPur Kit III	Jena Bioscience, Jena, Deutschland
GatewayLR Clonase II enzyme mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Invitrogen Gateway System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Qiagen Effectene Transfection Reagent	Qiagen, Hilden, Deutschland
Qiagen Plasmid Mini Purification Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Western Lightning Plus ECLTM	Perkin Elmer, Waltham, USA

2.1.4 Antikörper

Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Primärantikörper

Primärantikörper	Wirt	Hersteller	Anwendung
Glutamin-Synthetase, mAb	Maus	Transduction Laboratories/ Becton Dickinson, San Diego, CA, USA	WB und DB: 1:5000 in TBS-T + 5% BSA
Glutamin-Synthetase, pAb	Kaninchen	Sigma, Taufkirchen, Deutschland	IF: 1:500 in PBS+10% BSA + 0,01% Triton-X 100 WB und DB: 1:5000 in TBS-T + 5% BSA
α -Tubulin, mAb	Maus	Sigma, Taufkirchen, Deutschland	IF: 1:1000 in PBS + 10% BSA + 0,01% Triton-X 100

WB: Western-Blot, DB: Dot Blot, IF: Immunfluoreszenz, mAb: monoclonal Antibody, pAb: polyclonal Antibody

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Wirt	Hersteller	Anwendung
Anti-Kaninchen, HRPOD gekoppelt	Ziege	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark	WB: 1:10000 in TBS-T+ 10% BSA
Anti-Maus, HRPOD gekoppelt	Ziege	Biorad, München, Deutschland	WB: 1:10000 in TBS-T+ 10% BSA
Cy TM 3 AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG	Ziege	Jackson Immunoresearch, Cambridgeshire, UK	IF: 1:200 in PBS + 10% BSA + 0,01% Triton-X 100
Fluorescein (FITC) AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG, pAb	Ziege	Jackson Immunoresearch, Cambridgeshire, UK	IF: 1:200 in PBS + 10% BSA + 0,01% Triton-X 100
Hoechst34580	-	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	IF: 1:5000 in PBS + 10% BSA + 0.01% Triton-X 100

WB: Western-Blot, DB: Dot Blot, IF: Immunfluoreszenz, mAb: monoclonal Antibody, pAb: polyclonal Antibody

2.1.5 Oligonukleotide (Primer)

Zur Vorbereitung dieser Arbeit wurden die nachfolgenden Oligonukleotide in der AG Prof. Dr. Matthias Beller in der PCR-Amplifikation, Mutagenese und Klonierung verwendet. Die Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Synthesis GmbH bezogen.

Tabelle 9: Oligonukleotide

Gene	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')	ID
GS_pENTR	GCT TGC GGC CGC CAC CAT GAC CAC CTC AGC AAG TT	GCA AGG CGC GCC CTT AAT TTT TGT ACT GGA AGG	MBD796
GS – R324S	GCC AGC ATA AGC ATT CCC CGG ACT	GCT ACG ATT GGC TAC ACC AGC AG	MBD802

2.1.6 Plasmide

Tabelle 10: Vektoren zur Klonierung und Transfektion

Gen	Bezeichnung	ID	Quelle
GS (Wildtyp Glutamin-Synthetase)	pUbiP-GS	796	AG Beller
GS-R324S (R324S mutierte Glutamin-Synthetase)	pUbiP-GS-R324S	802	AG Beller

2.1.7 Zelllinien

Tabelle 11: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien

Name	Beschreibung
Kc167 [#]	Embryonale Zelllinie aus Drosophila Melanogaster mit Plasmatozyten-ähnlichem Expressionsmuster
796 – Wildtyp GS*	Kc167 Zelllinie mit stabil- transfizierter humaner Wildtyp-GS
802 – R324S Mutation*	Kc167 Zelllinie mit stabil-transfizierter R324S-mierter humaner GS

[#] Quelle: AG Beller (Zelllinie aus Harvard); * Quelle: AG Beller

2.1.8 Puffer und Lösungen

10x Blottingpuffer:

10mmol/l SDS; 3,86mmol/l Glyzin; 4,78mmol/l Tris

1x Blottingpuffer:

500ml 10x Blottingpuffer; 1000ml Methanol; 3500ml dH₂O

5x Elektrophoresepuffer:

1,73mmol/l SDS; 125mmol/l Tris; 1,25mmol/l Glyzin

1x Elektrophoresepuffer:

5x Elektrophoresepuffer 1:5 verdünnt mit dH₂O

10x TBS Puffer:

1,98mmol/l Tris; 1,488mmol/l NaCl; pH 7,6

Waschpuffer (WB und DB):

1x Tris-gepufferte Kochsalzlösung (*Tris buffered saline*, TBS) + 0,1% Tween20 (*Tris buffered saline with tween*, TBS-T)

Protein-Lysepuffer:

10mmol/l Tris/HCl (pH 7,4), 1% Triton X-100, 150mmol/l NaCl, 1mmol/l EDTA, 1mmol/l EGTA, 20mmol/l NaF, 0,2mmol/l Phenylmethylsulfonylfluorid, 0,5% Nonidet-P-40

Auftragspuffer (SDS-Puffer):

220mmol/l Tris/HCl (pH 8,8), 22,5 mmol/l EDTA, 9% SDS, 40% Glycerin, 0,125% Bromphenolblau, 200 mmol/l DTT

Hier nicht aufgeführte Chemikalien zur Einstellung des pH-Wertes von Pufferlösungen wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland) in pro analysis (p.a.) - Qualität bezogen und sind in den vorherigen Tabellen aufgeführt.

2.2. Methoden

2.2.1 Kultivierung der *Drosophila Melanogaster* Zelllinien

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurden untransfizierte Kc167-Zellen und stabil mit humaner Wildtyp-Glutaminsynthetase (R324-WT) oder der Glutaminsynthetase-Mutante (R324S-MT) transfizierte Zellen kultiviert. Kc167-Zellen adhären nur schwach an den Zellkulturflaschen und lassen sich leicht von der Wachstumsfläche durch Schütteln, Klopfen, oder Spülen mit Nährmedium ablösen. Als Nährmedium wurde Schneider's *Drosophila* Medium (SDM) mit L-Glutamine und 0,4 g/L NaHCO₃ verwendet, welches mit steril-filtrierte 10 % FCS und 5 % Penicillin/Streptomycin versetzt wurde. Als Selektionsfaktor wurde bei den transfizierten Zellen das Medium zusätzlich mit 1 % Blastidin-S supplementiert.

Für die Anlage von Kulturen wurden die bei -80 °C tiefgefrorenen Zellen langsam auf Eis aufgetaut und mit 10 ml SDM in 15 ml Falcons aufgenommen. Nach 5-minütiger Zentrifugation (Rotina 420R - Hettich, Tuttlingen, Deutschland) bei 9 °C und 1200 RPM wurde der Überstand verworfen und das Pellet in insgesamt 10 ml SDM aufgenommen und in einer T25 Zellkulturflasche in einem Wärmeschrank bei 26 °C ohne CO₂ inkubiert.

Aufgrund der hohen Zellteilungsrate waren die Kc167-Zellen bereits nach 2-3 Tagen konfluent gewachsen, wurden dann von den 25 cm² Kulturflaschen abgelöst, verdünnt und auf neue Kulturgefäße ausplattiert. Bei diesem als Splitten bezeichneten Vorgang, wurde zunächst das vorhandene Zellkulturmedium vorsichtig abgesaugt und die Zellen nachfolgend mit frischem Medium von der Wachstumsfläche der Zellkulturflaschen abgespült. Das Medium mit den Zellen wurde dann aufgenommen und auf größere Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von erst 75 cm² und abschließend 175 cm² gegeben. Durch diesen Vorgang konnten die anfänglich zur Verfügung stehenden Zellmengen effizient expandiert und ausreichend Untersuchungsmaterial gewonnen werden.

Ein Teil der auf diese Weise expandierten Zellen wurde für die spätere Anlage von Kulturen eingefroren. Hierfür wurden die Zellen mit SDM ohne weitere Zusätze von der Oberfläche gelöst, suspendiert und in einem Falcon 5 Minuten bei 9 °C und 1200 RPM zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in einem sogenannten „Einfriermedium“ aus 60 % SDM, 20 % FCS und 20 % DMSO aufgenommen. Je 1,5 ml der so erhaltenen Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen überführt und bei -80 °C in flüssigem Stickstoff eingefroren. Alle Arbeiten an den kultivierten Zellen erfolgten unter sterilen Arbeitsbedingungen unter einer Sterilwerkbank.

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl.: *polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Methode zur *in vitro* Vervielfältigung von DNA (168). Die PCR wurde in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zur Klonierung, Mutagenese und für die Herstellung von DNA-Plasmiden verwendet. Diese Arbeiten wurden von der technischen Assistentin Frau Petra Kolkhof aus dem Institut für Mathematische Modellierung biologischer Systeme (Arbeitsgruppe: Prof. Matthias Beller) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Die Plasmide dienten als Matrizen für die *in vitro* Transkription und nachfolgender Translation der humanen R324-Wildtyp-Glutaminsynthetase und der R324-mutierten Glutaminsynthetase in Fliegenzellen.

Der Standard PCR Ansatz umfasste ein Volumen von 50 µl, in dem eine *unit* „Phusion High-Fidelity DNA Polymerase“ (New England Biolabs, Ipswich, USA), 1 µM Oligonukleotide (jeweils 0,5 µM *forward* und *reverse* Primer, siehe Tabelle 9) und 0,5 µM dNTPs enthalten waren. Die PCRs wurden in einem *Arctic Thermal Cycler* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) durchgeführt. Initial erfolgte eine Denaturierung der DNA-Doppelhelix bei 98 °C. Hierbei werden die DNA-Doppelstränge durch Aufbrechen der Wasserstoffbrücken getrennt. Die Anlagerung der Primer an die DNA (das sog. *Annealing*) erfolgte bei einer Temperatur von 50 °C.

Die zielgerichtete Mutation von Arginin nach Serin an Position 324 der humanen Glutaminsynthetase wurde durch Mutagenese PCRs durchgeführt. Hierfür wurden komplementäre Oligonukleotid-Paare erstellt in denen die korrespondierenden Basen-Triplets modifiziert wurden, um so während der PCR die gewünschte Variation in der Basenabfolge und folglich der Aminosäuresequenz zu erreichen. Die PCR wurde mit 8 ng des zu mutagenisierenden Plasmids durchgeführt analog zu dem oben beschriebenen Standard PCR-Ansatz unter Verwendung der „Phusion High-Fidelity DNA Polymerase“ (New England Biolabs, Ipswich, USA). Um das methylierte Ursprungs Plasmid zu entfernen, wurde das PCR-Produkt für eine Stunde bei 37 °C mit 5 U des Typ II Restriktionsenzym DpnI inkubiert. Nach thermischer Inaktivierung von DpnI bei 80 °C für 5 min. wurde das mutagenisierte Plasmid mit dem „Quiagen Plasmid Mini Purification Kit“ (Quiagen, Hilden) aufgereinigt.

2.2.3 Gateway™ Klonierung

Die Klonierung der Expressionsvektoren erfolgte mit Hilfe des „Invitrogen Gateway System“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Die Klonierung wurde von der technischen Assistentin Frau Petra Kolkhof aus dem Institut für Mathematische Modellierung biologischer Systeme der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf in der Arbeitsgruppe von Prof. Matthias Beller durchgeführt.

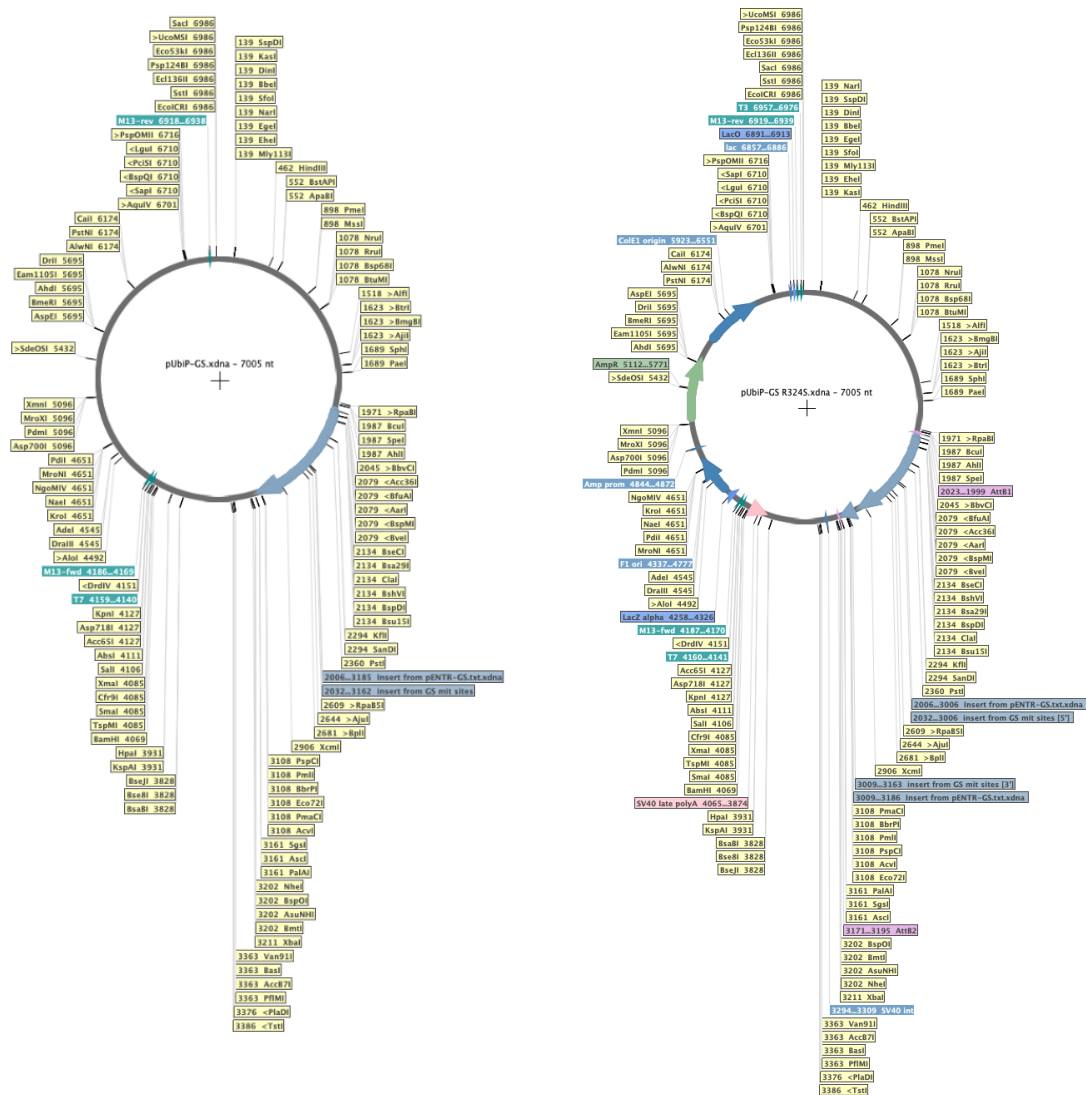


Abb. 9 Aufbau der Expressionsvektoren für die Klonierung der Glutaminsynthetase

Plasmidkarte des verwendeten Expressionsvektors für die humane R324 Wildtyp Glutamin-Synthetase (links) und die R324S-mutierte humane Glutamin-Synthetase (rechts).

Hierfür wurden Oligonukleotidpaare mit einem Überhang mit einer NotI oder AscI Schnittstelle zur Herstellung der „Entry“-Vektoren mittels PCR-Amplifikation verwendet. Nach Restriktion der DNA durch die Restriktionsenzyme NotI und AscI wurde

das Amplikon über diese Schnittstellen in ein pENTR/D-TOPO™-Plasmid ligiert. Mit dem „GatewayLR Clonase II *enzyme mix*“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) wurden die gewünschten DNA-Abschnitte dann durch eine Rekombinationsreaktion in Expressionsvektoren kloniert (siehe Abb.9).

2.2.4 Transiente Transfektion der Drosophila Melanogaster Zelllinien

Die Bedeutung des Aminosäureaustauschs von Arginin nach Serin an Position 324 (R324S) für die enzymatische Aktivität der humanen Glutaminsynthetase wurde an einem Versuchsmodell untersucht. Hierfür wurde die humane R324-Wildtyp Glutaminsynthetase und die R324S-Mutante in der die Aminosäure Arginin nach Serin an Position 324 in der Aminosäuresequenz ausgetauscht wurde in immortalisierte Drosophila Melanogaster Zellen der embryonalen Zellreihe Kc167 transfiziert (169, 170).

Die Transfektion wurde durch die technische Assistentin Frau Petra Kolkhof aus dem Institut für Mathematische Modellierung biologischer Systeme (Arbeitsgruppe Prof. Matthias Beller) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Durch Transfektion der Expressionsvektoren, welche in Tabelle 10 aufgelistet und in Abb. 9 gezeigt sind wurden die humane R324-Wildtyp Glutaminsynthetase und die humane R324S-mutierte Glutaminsynthetase in den Kc167 Drosophila Melanogaster Zellen exprimiert. Die Zellkultur erfolgte wie zuvor beschrieben. Für die Transfektion wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 70-90 % nach vorsichtigem Absaugen des alten Mediums, mit neuem Medium von der Kulturschale gelöst, auf eine Zelldichte von $2-5 \times 10^5$ Zellen je ml eingestellt und je 2 ml dieser Suspension in ein Well einer 6-Well Platte pipettiert. Daraufhin wurden die Zellen über Nacht bei 25 °C in einem Wärmeschrank ohne CO₂ inkubiert.

Das „Qiagen Effectene Transfection Reagent“ (Qiagen, Hilden) wurde zur Transfektion der Zellen verwendet. Hierfür wurde das Reagenz mit 1 µg der Expressionskonstrukte in einem Gesamtvolumen von 140 µl EC-Puffer aufgenommen in das 8 µl Enhancer gegeben wurde. Die Lösung wurde nachfolgend 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wurden erneut 10 µl Effectene hinzugegeben und die Lösung für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurde aus jedem Well 500 µl Medium entnommen, und dieses mit dem Transfektionsmix gemischt und zurück auf die Zellen gegeben. Nachfolgend wurden die Zellen für 2-4 Tage bei 25 °C ohne CO₂ inkubiert.

2.2.5 Herstellung stabil transfizierter polyklonaler Zelllinien

Als Vorlage für die Herstellung stabil transfizierter polyklonaler Zelllinien wurde das „*stable fly cell lines*“ Protokoll des Drosophila RNAi Screening Centers (DRSC) genutzt (171). Hierbei wurden die Zellen neben den Glutaminsynthetase-Expressionsplasmiden zusätzlich mit einem Selektionsplasmid kotransfiziert. Diese Arbeiten wurden von der technischen Assistentin Frau Petra Kolkhof aus dem Institut für Mathematische Modellierung biologischer Systeme (Arbeitsgruppe: Prof. Matthias Beller) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

In einem ersten Schritt wurden 4 ml einer Kc167 (Drosophila Melanogaster Zelllinie) Zellsuspension mit einer Dichte von $2,5 \times 10^5$ Zellen pro ml in eine 25 cm² Zellkulturflasche vorgelegt und bei 25 °C ohne CO₂ über Nacht inkubiert. Die Transfektion erfolgte wie zuvor beschrieben unter Verwendung des „Qiagen Effectene Transfection Reagent“ (Qiagen, Hilden) mit anschließender Inkubation für 4 Tage bei 25 °C. Hierbei wurden 2 µg des Expressionsplasmids und 50 ng eines Selektionsplasmids eingesetzt. Letzteres enthält ein Resistenzgen, welches für das Enzym Blasticidin-S-Deaminase kodiert. Dieses vermittelt Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Blasticidin und verhindert, dass erfolgreich transfizierte Zellen durch ein mit 30 µg/ml Blasticidin-S versetztes Medium abgetötet werden. Nachfolgend wurde das Medium alle 3-5 Tage ausgetauscht und die Zellen bis zur Konfluenz weiterkultiviert. Schließlich wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren und nach dem Auftauen mit Zellkulturmedium kultiviert, das 10 µg/ml Blasticidin-S-Hydrochlorid enthielt, um zu verhindern, dass Zellen, die das Transfektionsplasmid während der Kultur verlieren expandieren können.

2.2.6 Experimentelle Behandlung der Zellen

Für die experimentelle Behandlung wurden die Zellen in 100 mm Petrischalen ausgesät. Nach erfolgreichem Anwachsen wurde unmittelbar vor dem Start des Experiments das Wachstumsmedium durch sogenanntes „Hungermedium“ ersetzt. Hierbei handelt es sich um SDM, welches keine weiteren Zusätze wie FCS, Penicillin/Streptomycin oder Blasticidin-S enthält. Daraufhin blieben die Zellen entweder für den Inkubationszeitraum von 2 h unbehandelt, oder wurden mit jeweils 3 mM Methioninsulfoximin (MSO) oder Phosphinothricin (PPT) für 2 h inkubiert. Am Ende der Inkubation wurden die Zellen wie in Abschnitt 2.2.7 beschrieben geerntet und zur späteren Analyse bei -20 °C eingefroren.

2.2.7 Herstellung von Proteinlysaten aus kultivierten Kc167-Zellen

Zur Herstellung von Proteinlysaten für die nachfolgend beschriebenen Analysen, wurden die kultivierten Zellen mit 5 ml SDM von der Oberfläche gelöst, in 15 ml Falcons überführt und für 5 Minuten bei 1200 RPM und in Raumtemperatur zentrifugiert. Nachfolgend wurde der Überstand abgesaugt und verworfen und das Pellet mit 300 μ l Proteinlyse-Puffer (Zusammensetzung: Kapitel 2.1.8) versetzt, in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelegt.

Die Proben wurden dann dreimal jeweils für 3-4 Sekunden Ultraschall-behandelt (Ultrasonic Processor, Hielscher Ultrasound Technology, Programm Cycle 1, Amplitude 100 %). Auf diese Weise wurden die Membranen aufgebrochen und davon eingeschlossene intrazelluläre Bestandteile freigesetzt und in Lösung gebracht. Die Ultraschallbehandelten Proben wurden bei 4 °C, 10 Minuten bei 20000 RCF zentrifugiert (Zentrifuge 5418 - Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Das Pellet mit den unlöslichen Bestandteilen wurde verworfen und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß zur weiteren Analyse überführt.

2.2.8 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration in den Lysaten wurde mithilfe des BIO-RAD-Proteinbestimmungsassays, (BIO-RAD, München, Deutschland) der auf einer Proteinquantifizierungsmethode nach Bradford (1976) beruht, bestimmt (172). Hierfür wurde das Bradford Reagenz unmittelbar vor der Messung in einem Verhältnis von 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt. Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte durch photometrische Messung der Absorption im Wellenlängenbereich von $\lambda=595$ nm in einem Spectrophotometer (Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland). In Abhängigkeit der Ausgangsproteinkonzentration wurden die Proben in einem Verhältnis von 1:10 oder 1:5 mit Proteinlyse-Puffer (Zusammensetzung: Kapitel 2.1.8) vorverdünnt, um die Absorption im linearen Bereich messen zu können. Die so vorverdünnten Proben wurden dann im Verhältnis 1:200 mit Bradford Reagenz vermischt und die Absorption gemessen. Alle Proben wurden im Triplikat gemessen und ein Mittelwert für jede Probe errechnet.

2.2.9 Immunfluoreszenzanalyse und Fluoreszenzmikroskopie

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzanalyse können spezifische Proteine in Zellen oder Geweben lokalisiert und deren Abundanz quantifiziert werden. Hierfür werden, gegen das zu untersuchende Protein gerichtete, Primärantikörper verwendet, die in einem zweiten Schritt durch Fluorochrom-markierte Sekundärantikörper detektiert werden können. Das Fluorochrom wird mit Licht einer spezifischen Wellenlänge angeregt und das emittierte Licht höherer Wellenlänge kann nachfolgend detektiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde durch Verwendung spezifischer Antikörper die Glutaminsynthetase und das Zytoskelettprotein Tubulin nachgewiesen.

Für die Immunfluoreszenz wurden die jeweiligen Zellen auf 30 mm Kulturschalen von ibidi, die für die Mikroskopie vorgesehen sind, ausgesät. Nach erfolgreichem Anwachsen wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen wurden zweimalig vorsichtig mit PBS gewaschen. Nachfolgend wurden die Zellen mit frisch hergestelltem 4 %-igem Paraformaldehyd für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Im Anschluss wurde das Paraformaldehyd abgesaugt und die ibidi-Schalen wurden zweimalig mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen erneut mit PBS überschichtet und die ibidi-Schalen bis zur weiteren Prozessierung bei 4 °C gelagert.

Zur Verminderung einer unspezifischen Anlagerung der verwendeten Antikörper an Zellbestandteile und zur Erhöhung der Permeabilität der Zellen für Antikörper wurden die Zellen für 1 Stunde mit einer „Blockier- und Permeabilisierungslösung“ inkubiert. Diese bestand aus PBS und beinhaltete 10 % BSA und 0,01 % Triton. Nachfolgend wurden die Zellen für 3 Stunden mit 500 µl dieser Lösung, die mit den jeweiligen Primärantikörpern anti-Glutaminsynthetase (polyklonal, 1:500) und anti- α -Tubulin (monoklonal, 1:1000) versetzt wurde, bei Raumtemperatur inkubiert. Eine ibidi-Schale mit unbehandelten Zellen wurde zur Überprüfung möglicher unspezifischer Bindungen der Sekundärantikörper verwendet. Hier wurden die Zellen in der Inkubationslösung, die keine Primärantikörper enthielt, inkubiert. Am Ende der Inkubation wurden die Zellen jeweils dreimal für 15 Minuten mit PBS unter leichtem Schütteln gewaschen. Nachfolgend wurden die Zellen mit der oben beschriebenen Inkubationslösung welche die Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper enthielt für 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wurden anti-Mouse IgG-FITC (polyklonal, 1:200), anti-Rabbit IgG-Cy3TM (monoklonal, 1:200) und der DNA-bindende Farbstoff Hoechst34580 (1:5000) verwendet.

Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden die Schälchen bis zur weiteren Analyse lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

Die Hoechst34580, FITC- und Cy3-Fluoreszenzen wurden bei 250-facher Vergrößerung mit dem Weitfeldfluoreszenz-Mikroskop Observer Z1 (Zeiss, Jena, Deutschland) und der Software AxioVision mithilfe von Dr. Ayse Karababa (Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie) aufgenommen.

2.2.10 Western-Blot-Analyse

Die erfolgreiche Transfektion und Überexpression der humanen R324-Wildtyp und R324S-mutierten Glutaminsynthetase in den transfizierten Zelllinien wurde mittels Western-Blot Analyse überprüft und die Abundanz der Proteine mittels Densitometrie semiquantitativ bestimmt.

Das Prinzip des Western-Blots beruht darauf, dass Protein in Abhängigkeit ihres jeweiligen Molekulargewichts mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (engl.: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Durch Zugabe von SDS werden alle Proteinspezies einheitlich negativ geladen, so dass ursprünglich vorhandene unterschiedliche Ladungen das Migrationsverhalten im Gel nicht mehr beeinflussen können.

Nach der Elektrophorese werden die aufgetrennten Proteine über einen elektrischen Gradienten auf eine Nitrocellulose Membran transferiert. Auf dieser wird nachfolgend mittels spezifischer Antikörper das jeweilige Zielprotein markiert und das so markierte Protein mittels Chemilumineszenzreaktion sichtbar gemacht.

Zur Durchführung der SDS-PAGE wurden Sammelgele mit Polyacrylamid (PAA)-Anteilen von 4 % und Trenngele mit 12 % wie in der nachfolgenden Tabelle dargestellt verwendet.

Für die Herstellung der Gele wurde zunächst das flüssige Trenngel zwischen 2 Glasplatten (Biometra, Göttingen, Deutschland) gegossen und zur Glättung der Oberfläche mit Isopropanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation der Gele wurde das Isopropanol abgegossen und das Gel mehrmals mit Aqua-bidest überschichtet und gewaschen. Das Trenngel wurde nachfolgend mit dem flüssigen Sammelgel überschichtet, in welches ein Kamm eingebracht wurde zur Erzeugung von Taschen welche mit den Proteinproben befüllt werden können. Die Gele wurden in Elektrophoresekammern (Biometra, Göttingen, Deutschland) eingespannt und diese mit Gelelektrophoresepuffer (Zusammensetzung: Kapitel 2.1.8) befüllt. Mithilfe einer Hamilton-Spritze wurden die Taschen des Sammelgels mit den Proben befüllt.

Tabelle 12 Zusammensetzung der Lösungen zur Herstellung der PAA Gele

Substanz	12% Trenngel	4% Sammelgel
Destilliertes Wasser	4,9ml	3,4ml
30% PAA	6ml	0,83ml
1,5 mol/l Tris Puffer (pH 8,8)	3,8ml	
1,0 mol/l Tris-Puffer (pH 6,8)		0,63ml
10% SDS	0,15ml	0,05ml
10% APS	0,15ml	0,05ml
TEMED	0,006ml	0,005ml

Zusätzlich zu den Proben wurde ein Proteinstandard aufgetragen, an dem die Molekulargewichtsgröße im Gel, bzw. auf dem Blot abgelesen werden konnte (Dual Color Protein Standard, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland oder Rainbow Molecular Weight Marker, Amersham). Bei jeder Western-Blot-Analyse wurden identische Proteinmengen von allen Proben aufgetragen. Entsprechend des maximal verwendbaren Probenvolumens wurden dabei zwischen 20-80 µg Protein pro Probe eingesetzt. Zur Probenvorbereitung wurden diese mit einem identischen Volumen an Auftragspuffer (Zusammensetzung: Kapitel 2.1.8) vermischt und 5 Minuten bei 95 °C in einem Heizblock denaturiert. Nachfolgend wurden die Proben bei maximaler Umdrehung zentrifugiert, in die Taschen des Gels gefüllt und die Gelelektrophorese für 1,5-2 h durchgeführt. Das Einlaufen der Proben in das Sammelgel erfolgte bei 90 Volt und das Auftrennen der Proteine im Trenngel bei 120-160 Volt.

Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulose-Membran erfolgte bei konstantem Stromfluss von 0,8 mA/cm² für 2 Stunden im *semidry* Verfahren in einer Elektroblothing-Kammer (Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland). Hierfür wurde das PAA-Gel auf die Nitrozellulose-Membran gelegt, welche zuvor zunächst für wenige Sekunden in Aqua-bidest und nachfolgend in Transferpuffer (Zusammensetzung: Kapitel 2.1.8) inkubiert wurde. Zusätzlich wurden 6 - 8 Lagen Transferpuffer-getränkte Whatman Papiere jeweils oberhalb des Gels und unterhalb der Membran positioniert. Am Ende des Blotting-Prozesses wurde der gleichmäßige Proteintransfers durch unspezifische Anfärbung basischer Aminosäuren in den Proteinen mit Ponceau-S visuell überprüft.

Zur Absättigung freier Protein-Bindungsstellen auf der Membran wurde diese für 30 Minuten in TBS-T mit 5 % BSA inkubiert und anschließend noch 1 - 2 Stunden bei Raumtemperatur mit jeweils dem monoklonalen Maus oder dem polyklonalen Kaninchen anti-GS-Antikörper in einer Verdünnung von 1:5000 in TBS-T mit 5 % BSA inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T für jeweils 10 Minuten wurde die Membran mit einem

gegen Maus- oder Kaninchen-Immunglobulinen gerichteten, HRP-OD gekoppelten Zweitantikörper in einer Verdünnung von 1:10000 für 1- 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Mithilfe des Western Lightning Plus ECL Kits (Perkin Elmer, Waltham, USA) wurden die gebildeten Immunkomplexe mittels Chemiluminescence und manueller *exposure* im ChemiDoc MP Imaging System digital aufgenommen. Zur Überprüfung der einheitlichen Proteinbeladung wurde auf den Membranen nachträglich α -Tubulin in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS + 10% BSA + 0,01% Triton-X 100 detektiert. Als Positivkontrolle für die Detektion der Glutaminsynthetase wurde Proteinlysate verwendet, welches aus kultivierten Rattenastrozyten gewonnen wurde. Die densitometrische Quantifizierung der Bandenintensitäten erfolgt mithilfe des Programms ImageLab der Firma Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland.

Bei Western-Blot-Analysen, welche im Anschluss an die Dot-Blot Analyse mit den Hemmstoffen MSO und PPT durchgeführt wurden, wurden die Proteinlysate ebenfalls nach erfolgter Proteinbestimmung in SDS-haltigem Puffer aufgenommen und nachfolgend hitzedenaturiert. Hierdurch wird das Protein denaturiert und linearisiert, weshalb die Bindung zu den Hemmstoffen aufgehoben wird und das Epitop, dass der anti-GS-Antikörper erkennt wieder zugänglich ist. So dient der Western-Blot in diesem Fall der Untersuchung, ob die anti-GS-Immunoreaktivität im Dot-Blot der mit MSO- oder PPT behandelten Zelllysate auf einen Rückgang der GS-Proteinspiegel zurückzuführen sein kann (91).

2.2.11 Dot-Blot-Analyse

Mit Hilfe des Dot-Blots wurde die Glutamat-Bindungsfähigkeit der humanen Glutaminsynthetase (GS) untersucht. Das Prinzip dieses Nachweises beruht darauf, dass die GS-Hemmstoffe Methioninsulfoximin (MSO) und Phosphinothricin (PPT) irreversibel im Bereich der Glutamatbindungsstelle in der GS binden und dadurch der Zugang für einen in diesen Bereich bindenden monoklonalen Antikörper blockiert wird (91). Da die Bindung von MSO und PPT durch Denaturierung des Proteins aufgehoben werden kann, wurden diese Analysen mit nativen Proteinlysaten durchgeführt, die nicht durch Hitze, Detergenzien oder andere Verbindungen behandelt wurden (21, 159). Hierfür wurden entweder MSO oder PPT in die Zelllysate gegeben, oder die vitalen Zellen damit behandelt.

Für die Inkubation der Zelllysate wurden 15 μ l Probenvolumen mit 15 μ l Reaktionslösung (30 mM MSO oder PPT, 20 mM ATP, 20 mM MnCl) vermischt. Die Proben wurden vorher einheitlich auf eine Proteinkonzentration von 1 μ g/ μ l bzw. einer

Gesamtproteinmenge von 30 µg mit Proteinlyse-Puffer (Zusammensetzung: Kapitel 2.1.8) eingestellt. In einem weiteren Versuchsansatz wurde die Konzentrationsabhängigkeit der Blockierung der anti-GS-Immunoreaktivität des R324-Wildtyps und der R324S-Mutante mit MSO-Konzentrationen von 30 mM, 15 mM, 7,5 mM, 3 mM, 1,5 mM, 1 mM, 0,5 mM, 0,25 mM, 0,1 mM und 0,05 mM durchgeführt.

Der Einfluss von MSO und PPT auf die anti-GS-Immunoreaktivität im Dot-Blot wurde auch mit Proteinproben durchgeführt, die aus Zellen erhalten wurden, die vor dem Zellaufschluss für 2 Stunden mit MSO bzw. PPT inkubiert wurden.

Das Reaktionsgemisch wurde in allen Versuchen kurz mithilfe eines Vortexers durchmischt, herunterzentrifugiert und für zehn Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Im Anschluss daran wurden aus den Reaktionsgemischen 2 µl auf Nitrocellulosemembranen punktuell im Triplikat aufgebracht. Nach 30 Minuten Trocknung bei Raumtemperatur wurden die Membranen analog wie oben für die Western-Blot-Analyse beschrieben mit den Antikörperlösungen inkubiert.

Um einen möglichen Einfluss der Inkubation der Zellen mit MSO oder PPT auf die Proteinspiegel der Glutaminsynthetase in den Zellen zu untersuchen, wurden diese mittels Western-Blot-Analyse analog zum zuvor beschriebenen Vorgehen untersucht.

2.2.12 ATP-Bindungsassay

Die ATP-Bindung an die Glutaminsynthetase wurde Mithilfe des handelsüblichen ATP-Bindungsassays ATP AffiPur Kit III (Jena Bioscience) gemessen. Das ATP AffiPur Kit III beinhaltet 6-Aminohexyl (6AH) - Adenosintriphosphat (ATP)-Agarose. Die Agarose dient dabei als Trägermaterial für das Adenosintriphosphat (ATP), welches über eine 6-Aminohexyl-Verbindung (6AH) chemisch an die Agarose gebunden ist. An das ATP-bindende Proteine können damit durch Zentrifugation-vermittelte Sedimentation des Agars von den nicht gebundenen Proteinen getrennt werden. In den auf diese Weise angereicherten Proteinen wurde nachfolgend die Glutaminsynthetase wie zuvor beschrieben mittels Western-Blot nachgewiesen.

Die im Kit bereits enthaltenen Pufferlösungen wurden entsprechend der Anleitung des Herstellers folgendermaßen vor dem jeweiligen Versuchsschritt frisch hergestellt:

Zusammensetzung des Dialysepuffers:

1 im Kit enthaltene Tablette PBS in 500ml entionisiertem Wasser + 1ml 500mM EDTA + 0,5ml 1M DTT

Zusammensetzung des Waschpuffer:

1ml 5x Wasch Puffer + 3,9ml entionisiertes Wasser + 5µl 200mM Natriumorthovanadat + 50µl 100mM DTT + 50µl 100x Protease Inhibitor Mix

Zusammensetzung des Elutionspuffer:

100µl 5x Elutionspuffer + 400µl entionisiertes Wasser + 0,5µl 200mM Natriumorthovanadat + 5µl 100mM DTT + 5µl 100x Protease Inhibitor Mix

Zunächst wurden die Proteinlysate durch dreimalige Zugabe von Dialyse-Puffer und mithilfe von Amicon Ultra-4 10 K *Centrifugal Filter Devices* (Merck Millipore, Tullagreen, Irland) dialysiert. Der Zweck dieses Verfahrens ist es, in den Proben vorhandenes ATP und weitere niedermolekulare Verbindungen, die die Bindung an die ATP-Agarose beeinträchtigen könnten, aus der Probe zu entfernen und gleichzeitig Proteine mit einer Mindestgröße von 10 kDa in den Proben rückzuhalten. Im Ansatz der vorliegenden Arbeit wurde dafür eine Proteinmenge von 600 µg in einem Proteinlyse-Puffervolumen von 100 µl aufgefüllt und diese nachfolgend mit 3,9 ml Dialysepuffer auf insgesamt 4 ml eingestellt.

Nachfolgend wurden die Filter in 3 aufeinanderfolgenden Schritten jeweils nach erneuter Zugabe von 3 ml Dialysepuffer 30 Minuten bei 4 °C und 4000 rcf zentrifugiert. Durch den Filter gedrungener Dialysepuffer wurde verworfen und das nach 3 Dialyseschritten im Amicon Filter Device verbliebene Restvolumen in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde in den so erhaltenen Proben eine Proteinbestimmung nach Bradford wie im Kapitel 2.2.8 beschrieben durchgeführt. Als technische Kontrolle wurden Proben nach der Dialyse erneut mit 10 mM ATP versetzt und diese für 25 Minuten inkubiert um die Bindung ATP-bindender Proteine am ATP-Agar zu blockieren. Mithilfe dieser Kontrolle wurde die unspezifische Anlagerung von Proteinen an die ATP-Agarose erfasst. Die auf diese Weise behandelten Proben wurden nachfolgend 1:4 mit 5 x Binding-Puffer verdünnt. Pro ml Probenvolumen wurden dann 10 µl einer 100 mM DTT-Lösung und 10 µl eines 100 x Protease Inhibitor Mix zugegeben.

Da sich theoretisch auch das an die 6-Aminoethyl-Gruppe gebundene ATP im Verlaufe der Lagerung partiell ablösen kann wurde die 6AH-ATP-Agarose vor Verwendung gewaschen.

Hierfür wurden 50 µl ATP-Agarose dreimalig mit je 500 µl Waschpuffer gemischt und bei 1000 g und Raumtemperatur für eine Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen. Zur auf diese Weise behandelten ATP-Agarose wurden dann die zuvor vorbereiteten Proben zugegeben und die Reaktionsgefäße bei 4 °C für 2,5 h langsam

rotiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Proben eine Minute bei 1000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet zweimalig mit jeweils 1 ml Waschpuffer resuspendiert und anschließend zentrifugiert. Dabei wurden die Überstände jeweils verworfen. Die an die ATP-Agarose gebundenen Proteine wurden abschließend durch Zugabe von 150 µl Elutionspuffer und Inkubation unter konstanter Rotation bei 4 °C für 20 Minuten abgelöst. Daraufhin wurde die Probe bei 1000 x g für 1 Minute zentrifugiert und der Überstand aufgefangen. Durch Wiederholung des Elutionsschritts sollte sichergestellt werden, dass die an die Agarose gebundenen Proteine effektiv eluiert werden.

Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit zeigten, dass bereits in der ersten Fraktion der Großteil der Glutaminsynthetase vorhanden war und nur geringfügig in der zweiten Fraktion. Die auf diese Weise erhaltenen Proben wurden nachfolgend mittels Western-Blot wie in Kapitel 2.2.10 beschrieben analysiert.

2.2.13 Glutaminsynthetase-Assay

Die Messung der Aktivität der Glutaminsynthetase (GS) wurde nach einem Protokoll von Webb und Brown aus dem Jahre 1976 durchgeführt (137). Hierbei wird die GS-Aktivität anhand der von ihr katalysierten sogenannten „Glutamyltransferasereaktion“ (siehe Kapitel 1.4 und Abb. 5) bestimmt.

In dieser alternativen Reaktion der GS wird das GS-Substrat Glutamat durch Glutamin und das NH_4^+ durch NH_2OH ersetzt. In Gegenwart von ADP, Mn^{2+} - und As^+ -Ionen wird hier auch das stabile Endprodukt γ -Glutamylhydroxamat gebildet, welches durch Bindung von Eisen (III)-Ionen einen charakteristisch braungefärbten Komplex bildet.

Durch Messen der Absorption bei 500 nm kann die Menge des gebildeten γ -Glutamylhydroxamats photometrisch quantifiziert werden, was einen Rückschluss auf die Glutaminsynthetase-Funktion und -Aktivität zulässt.

Zur Versuchsvorbereitung wurden einzelne Stocklösungen der Substanzen Natriumarsenat, L-Glutamin, Hydroxylamine-HCl, MnCl_2 und ADP unter Verwendung von 60 mmol/L Imidazol-HCl Puffer (pH 6,8) hergestellt. Vor jeder Analyse wurde aus den Stock-Lösungen die Reaktionslösung in 60 mmol/L Imidazol-HCl (pH 6,8) Puffer hergestellt. Diese enthielt 20 mmol/L Natriumarsenat, 60 mmol/L L-Glutamin, 15 mmol/L Hydroxylamin-HCl, 3 mmol/L MnCl_2 und 0,4 mmol/L ADP. Nachfolgend wurden 900 µl der Reaktionslösung mit 100 µl Probenlysat mit definierter Proteinmenge von 300 µg Protein für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 600 μ l einer Stopplösung, die 0,2 M Trichloressigsäure, 0,67 M HCl und 0,37 M FeCl₃ enthielt, terminiert. Dabei präzipitierte Proteine wurden bei 20000 x g (Zentrifuge 5418 - Eppendorf, Hamburg, Deutschland) für zehn Minuten bei 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und im Überstand wurde die Absorption in einem Photometer (Ultrospec 2100, Biorad, Hercules, USA) bei einer Wellenlänge von 500 nm gemessen. Gleichzeitig wurde für jede Probe die Hintergrundabsorption bestimmt, indem die Stopplösung vor der Reaktionslösung in die Probe gegeben wurde. Diese Hintergrundabsorption wurde von der abgezogen, die nach der γ -Glutamyltransferasereaktion gemessen wurde. Als technische Kontrollen wurden GS-Hemmstoffe verwendet. Hierfür wurde jeweils eine Probe vor Durchführung des GS-Assays für 2 h bei 4 °C mit 3 mM MSO oder PPT inkubiert.

In weiteren Versuchen wurden die Probenlysate ähnlich wie vorhergehend für MSO und PPT beschrieben zwei Stunden vor Versuchsbeginn mit den Verbindungen Betain, Creatin Monohydrat, β -Alanin Methylester, 2-chloroethylamid HCl, 3-chloropropylamid HCl und Chloroacetamidin HCl in Konzentrationen von 0,5 bis 15 mM inkubiert.

2.2.14 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit Daten durchgeführt, die mit mindestens 3 unabhängigen Versuchen erhalten wurden. Hierfür wurden die Zellen unterschiedlicher Passagen verwendet (Zelllinie Kc167: Passage 17-40, Zelllinie 796 – R324-Wildtyp: Passage 9-40, Zelllinie 802 – R324S-Mutation: Passage 9-40). Die Werte aus n-unabhängigen Versuchen sind als arithmetische Mittelwerte $\pm$ Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Der SEM ist der Quotient aus der Standardabweichung (SD) und der n-ten Wurzel einer Stichprobe. Statistische Unterschiede und Signifikanzen wurden in Abhängigkeit vom Vorliegen normalverteilter Daten und der Anzahl der zu vergleichenden Untersuchungsgruppen durchgeführt. Mit Hilfe des Shapiro-Wilk Test wurde getestet, ob die Daten normalverteilt sind. Zwei Untersuchungsgruppen wurden mit dem t-Test nach Student und mehr als 2 Gruppen wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA: *analysis of variance*) mit Tukey's oder Dunnett's post hoc Tests bzw. Friedmann oder Kruskal Wallis und Dunn's post hoc Test analysiert. Dabei wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet. Die statistischen Berechnungen wurden mit der Software Microsoft Excel für Windows (Microsoft, Redmond, USA) und GraphPad Prism 4.0 (GraphPad, La Jolla, USA) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1. Überexpression der humanen Glutaminsynthetase in Kc167-Zellen aus *Drosophila Melanogaster*

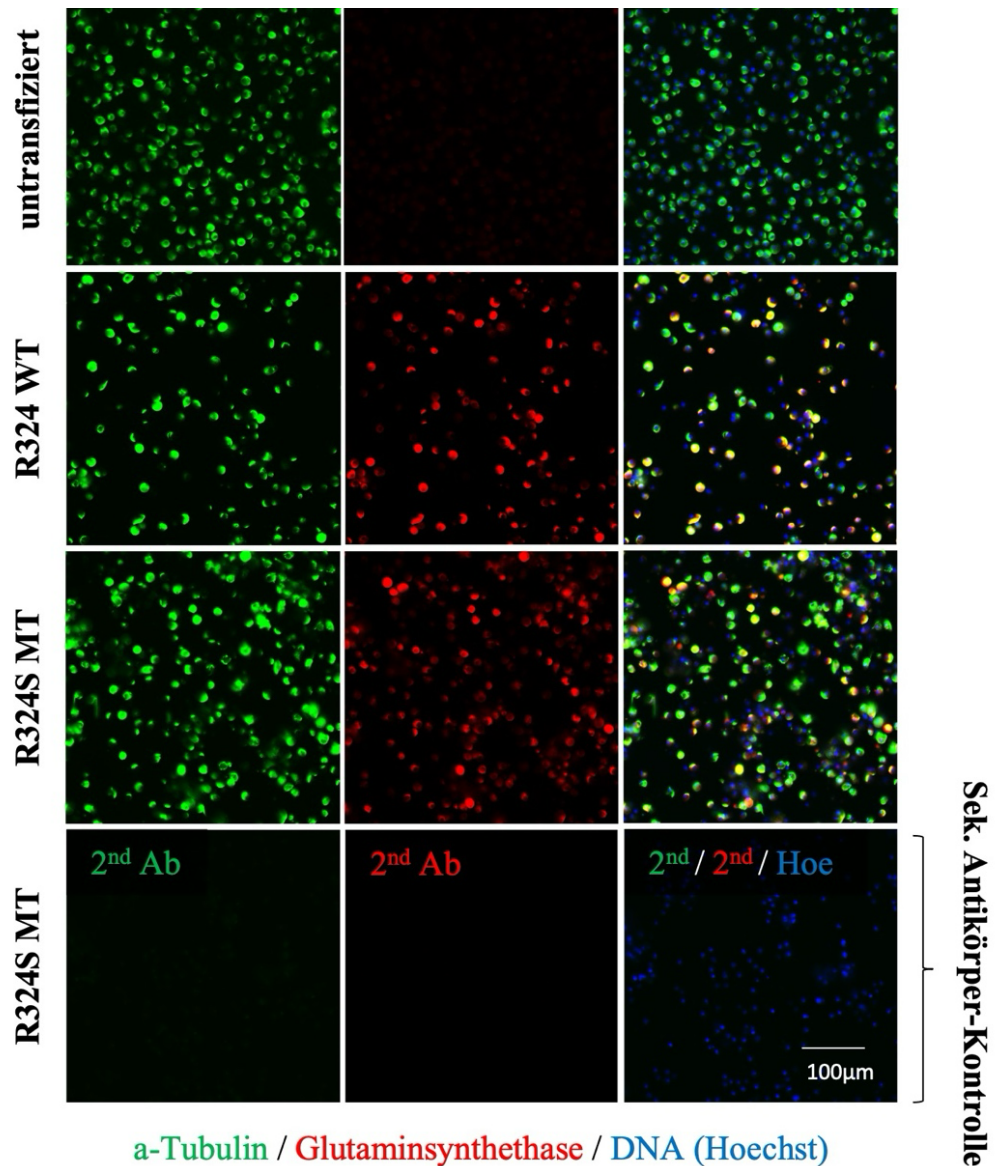


Abb. 10 Immunfluoreszenzanalyse der Glutaminsynthetase in Kc167 Zellen

Drosophila Melanogaster Kc167-Zellen blieben entweder unbehandelt oder wurden mit humaner GS transfiziert (R324-WT- oder R324S-MT-GS). Daraufhin wurden die Zellen fixiert und α -Tubulin und GS mittels Immunfluoreszenzanalyse wie in Material und Methoden beschrieben angefarbt. α -Tubulin wurde mittels FITC-konjugierten und GS mittels Cy3-markierten Sekundärantikörpern nachgewiesen und in der Abbildung in grün bzw. rot dargestellt. Zellkerne wurden mit dem Kernfarbstoff Hoechst34580 markiert (in der Abbildung in blau dargestellt). Parallel wurden Zellen ohne gegen α -Tubulin und GS gerichtete Primärantikörper aber mit den jeweiligen Sekundärantikörpern inkubiert („2nd Ab“): Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus insgesamt 4 unabhängigen Experimenten.

Maßstabsbalken: 100µm. (Objektiv: LD LCI Plan-Apochromat 25x/0.8 Imm Korr DIC M27).

Die humane Glutaminsynthetase wurde in mit humaner R324-Wildtyp und R324S-mutierter-GS transfizierten *Drosophila Melanogaster* Kc167-Zellen mittels Immunfluoreszenzanalyse nachgewiesen. Bei gleichen Aufnahmebedingungen für alle Präparate war nahezu keine anti-GS-Immunoreaktivität in den untransfizierten, aber eine sehr starke in den mit humaner GS-transfizierten Kc167-Zellen detektierbar. Zur Darstellung der Zellgrenzen wurde parallel das ubiquitär in Kc167-Zellen vorhandene α -Tubulin angefärbt. Im Gegensatz zur GS-Fluoreszenz waren die Intensitäten der α -Tubulin Fluoreszenz und auch des Kernfarbstoffs Hoechst34580 in allen experimentellen Ansätzen (transfiziert und untransfiziert) vergleichbar. In Experimenten, in denen die gegen α -Tubulin und GS gerichteten Primärantikörper ausgelassen wurden, wurde keine von den Sekundärantikörpern stammende FITC- oder Cy3-Immunoreaktivität nachgewiesen. Dies unterstreicht die Spezifität der Immunfluoreszenzanalysen.

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz zeigen, dass die humane R324-WT und R324S-mutierte Glutaminsynthetase effizient, gleichmäßig und in ähnlicher Stärke in den Kc167-Zellen nach Transfektion überexprimiert wird. Unter den hier gewählten Aufnahmebedingungen konnte die in den Kc167 endogen von den Fliegenzellen exprimierte GS nicht detektiert werden.

3.2. Quantifizierung der Proteinspiegel der überexprimierten humanen R324-WT und R324S-MT Glutaminsynthetase

Die Proteinspiegel der Glutaminsynthetase wurden nachfolgend in den untransfizierten und stabil transfizierten Kc167 Zellen mittels Western-Blot-Analyse überprüft. Sowohl in den Proteinlysaten, die aus den mit humaner GS transfizierten Kc167-Fliegenzellen, wie auch in denen, die aus Rattenastrozyten stammten, war eine starke anti-GS-Immunoreaktivität im Bereich des theoretischen Molekulargewichts der Glutaminsynthetase von ca. 45kDa erkennbar (Abb. 11).

Verglichen mit den transfizierten Kc167-Zellen und den Rattenastrozyten war die anti-GS-Immunoreaktivität in den untransfizierten Kc167-Zellen sehr schwach. Die Überexpression der humanen Glutaminsynthetase steigerte die anti-GS-Immunoreaktivität gegenüber den untransfizierten Zellen um den Faktor 14. Dabei waren die GS-Proteinspiegel

in den Kc167-Zellen, in denen die humane R324-Wildtyp GS oder die R324S-mutierte GS überexprimiert wurden, quantitativ vergleichbar.

Da in den Proteinproben die aus den R324-WT und R324S MT-GS exprimierenden Kc167-Zellen vergleichbare GS-Proteinlevel gefunden wurden, sind diese Proben ideal für den quantitativen Vergleich der GS-Aktivität von humaner Wildtyp- und mutierter Glutaminsynthetase verwendbar. Dazu trägt außerdem die sehr starke Expression der humanen Glutaminsynthetase in beiden Zelllinien bei. Diese ermöglicht es die GS-Aktivität der transfizierten humanen Wildtyp- und mutierten Glutaminsynthetase von der endogenen Fliegenzellen-GS zu differenzieren.

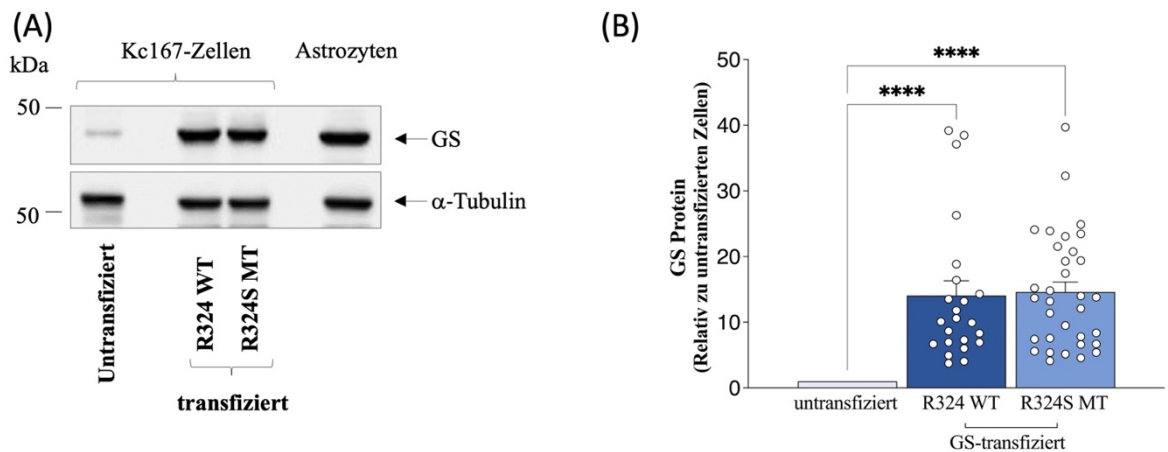


Abb. 11: Quantifizierung der Proteinspiegel der Glutaminsynthetase in untransfizierten und in mit humaner GS-transfizierten Kc167-Zellen

Drosophila Melanogaster Kc167-Zellen blieben entweder unbehandelt („Untransfiziert“) oder wurden mit humaner GS transfiziert (R324 WT oder R324S MT). (A) Am Ende der Transfektion wurden die Zellen mittels Proteinlyse-Puffer aufgeschlossen und die Proteinlysate für die Detektion der GS mittels Western-Blot wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben verwendet. α -Tubulin (Theoretisches Molekulargewicht: 52kDa) diente als Beladungskontrolle der Gele und wurde zur Normierung der GS-Proteinlevel (Theoretisches Molekulargewicht: 44kDa) verwendet. Aus kultivierten Rattenastrozyten hergestellte Proteinlysate wurden zur Überprüfung der Funktionalität des anti-GS-Antikörpers verwendet (zur Verfügung gestellt von Dr. Ayse Karababa). (B) Densitometrische Analyse der GS-Banden-Intensitäten. Gezeigt sind repräsentative Banden aus 30 unabhängigen Experimenten. Statistische Analyse: Kruskal-Wallis und Dunn's post hoc-Test. *: Statistische Signifikanz gegenüber der untransfizierten Kc167 Zellreihe (**** $p < 0.0001$)

3.3. Untersuchungen zur Glutamat-Bindung der überexprimierten humanen R324-WT und R324S-MT Glutaminsynthetase

Die Glutamatbindung der humanen R324-Wildtyp und R324S-mutierten GS wurde indirekt mit Hilfe von Dot-Blots untersucht. Hierbei wurden gleiche Mengen nativer, also nicht durch Hitze und Detergenzien denaturierter Proteinlysate auf eine Nitrozellulose-Membran punktförmig aufgebracht und die Glutaminsynthetase nachfolgend analog zum Western-Blot detektiert. In Gegenwart der strukturell dem Glutamat ähnelnden Glutaminsynthetase-Hemmstoffe Methioninsulfoximin (MSO) und Phosphinotrycin (PPT) wird die Glutamatbindungsstelle der GS durch diese irreversibel blockiert. Da Kinetiken zur Aufnahme von MSO und PPT in Kc167-Zellen unbekannt sind, wurden die Versuche einerseits an kultivierten Zellen und andererseits an Proteinlysaten durchgeführt.

3.3.1 Inhibition der Glutaminsynthetase in Zelllysaten durch MSO und PPT: Analyse der GS-Immunoreaktivität im Dot-Blot

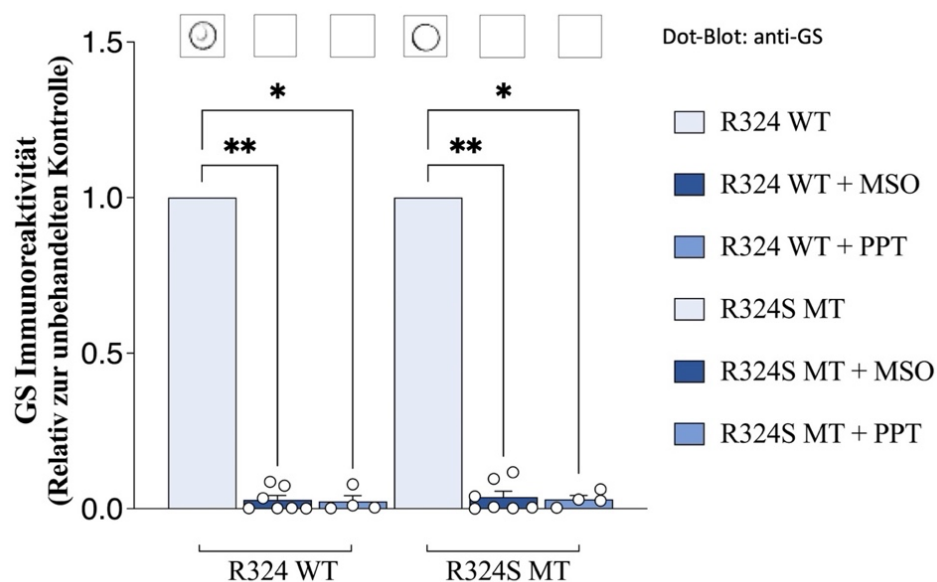


Abb. 12 Effekte der Glutaminsynthetase-Hemmstoffe MSO und PPT auf die anti-GS-Immunoreaktivität in Proteinlysaten humane GS-überexprimierender Kc167 Zellen

Drosophila Melanogaster Kc167 Zellen, welche die humane R324-WT GS oder die humane R324S- MT überexprimieren wurden wie in Material und Methoden beschrieben mittels Proteinlyse-Puffer aufgeschlossen und den Lysaten im Rahmen der Dot-Blot-Analyse je 30 mM der Hemmstoffe MSO oder PPT hinzugefügt. Densitometrische Analyse der GS Immunoreaktivität. Gezeigt sind repräsentative Blots aus 6 unabhängigen Experimenten. Statistische Analyse: Kruskal-Wallis und Dunn's post hoc-Test. *: Statistische Signifikanz gegenüber der unbehandelten Kontrolle (** p < 0,01, * p < 0,05)

In einem ersten Versuchsansatz wurde MSO oder PPT in einer Konzentration von 30 mM in die Zelllysate gegeben und die Lysate für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nachfolgend wurden die Proben mittels anti-GS Dot-Blot-Analyse untersucht und die anti-GS-Immunoreaktivität densitometrisch quantifiziert. Die Auswertung der Experimente zeigte, dass die Bindung des anti-GS-Antikörpers nahezu vollständig durch Inkubation der Proteinlysate mit MSO und PPT blockiert wurde. Dieser Effekt war in beiden Zelllinien ähnlich stark ausgeprägt (siehe Abb. 12).

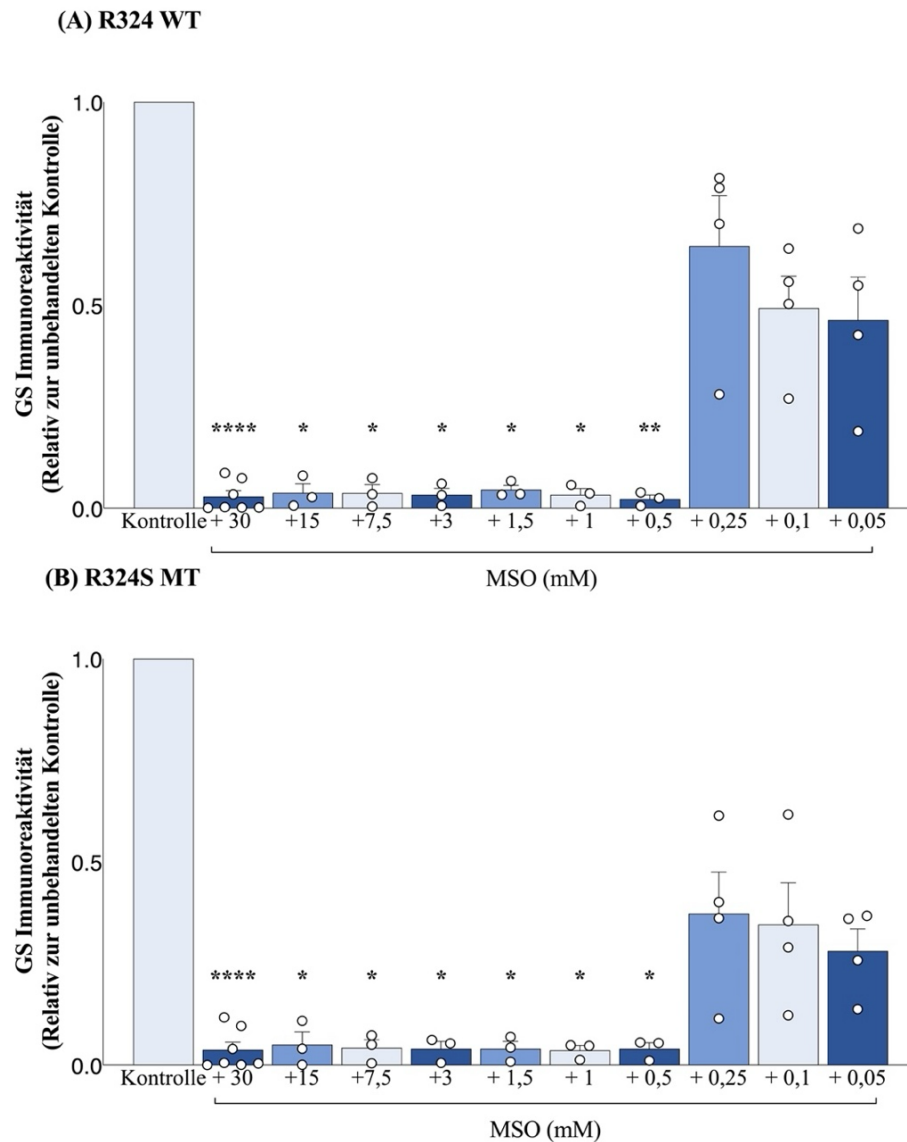


Abb. 13 Hemmung der anti-GS-Immunoreaktivität im Dot-Blot durch MSO in Proteinlysaten R324-WT GS und R324S-MT GS exprimierender Kc167-Zellen

Drosophila Melanogaster Kc167 Zellen, welche die humane R324-WT GS (A) und die humane R324S-MT (B) überexprimieren wurden wie in Material und Methoden beschrieben mittels Proteinlyse-Puffer aufgeschlossen und den Lysaten wurden im Rahmen der Dot-Blot-Analyse verschiedene Konzentrationen des Hemmstoffs MSO in einer Konzentrationsreihe von 30 bis 0,05 mM MSO hinzugefügt. Densitometrische Analyse der GS-Immunoreaktivität und statistische Analyse, bei welcher die jeweilige unbehandelte Probe als Kontrolle auf eins gesetzt und die behandelten Proben darauf bezogen wurden. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot aus drei unabhängigen Experimenten. Statistische Analyse: Kruskal-Wallis und Dunn's post hoc-Test. *: Statistische Signifikanz gegenüber der unbehandelten Kontrolle (**** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$)

In weiteren Untersuchungen wurde die Konzentrationsabhängigkeit dieses Effektes exemplarisch unter Verwendung von MSO untersucht. Dadurch sollte überprüft werden, ob die anti-GS-Immunoreaktivität durch unterschiedliche MSO-Konzentrationen in den Proteinlysaten der R324-WT GS und der R324S-MT GS exprimierenden Fliegenzellen beeinflusst werden kann. Dies könnte auf unterschiedliche Bindungsaffinitäten hindeuten.

Hierfür wurde der vorherig beschriebene Versuch mit MSO-Konzentrationen von 30, 15, 7,5, 3, 1,5, 1, 0,5, 0,25, 0,1 und 0,05 mM wiederholt.

Wie in Abb. 13 gezeigt, verringerte die Inkubation der Proteinlysate mit MSO im Konzentrationsbereich von 30mM bis 0,5mM die anti-GS-Immunoreaktivität in vergleichbarer Weise in Zelllysaten, die aus Drosophila Zellen hergestellt wurden, welche die R324-Wildtyp oder die R324S-mutierte GS exprimierten. Im geringeren Konzentrationsbereich von 0,25 bis 0,05 mM MSO war dieser Effekt deutlich geringer und statistisch nicht signifikant unterschiedlich gegenüber den jeweiligen Kontrollen.

3.3.2 Inkubation von Kc167-Zellen mit MSO und PPT: Auswirkungen auf die anti-GS Immunoreaktivität im Dot-Blot

Analog zu den oben beschriebenen Experimenten (3.3.1) wurden die Effekte von MSO und PPT auf die anti-GS-Immunoreaktivität im Dot-Blot auch in Proteinlysaten untersucht, die aus mit MSO- oder PPT-inkubierten kultivierten Zellen gewonnen wurden. Hierfür wurden die Zellen für 2 Stunden mit 3 mM MSO oder PPT inkubiert und nachfolgend überschüssiges im Zellkulturmedium-befindliches MSO oder PPT durch mehrmaliges Waschen mit PBS entfernt. Die so gewonnenen Proteinlysate wurden mittels anti-GS Dot-Blot untersucht.

Wie in Abb. 14 erkennbar ist, führte die Inkubation der Zellen mit MSO zu einer deutlichen Abnahme der anti-GS-Immunoreaktivität im Dot-Blot. Das Ausmaß des Rückgangs war in den R324-WT und R324S-MT GS überexprimierenden Zellen vergleichbar. Demgegenüber war in den mit PPT-inkubierten Zellen gegenüber den Kontrollen ein Rückgang der anti-GS-Immunoreaktivität ausschließlich in den R324-WT GS Zellen erkennbar (Abb. 14), während der Rückgang in den R324S-MT überexprimierenden Kc167-Zellen nur gering ausfiel. Im vorliegenden Versuch wurde nur jeweils eine unbehandelte Kontrollprobe, aber 5-6 unabhängige (aus unterschiedlichen Aussaaten) Proben MSO- oder PPT-behandelter Zellen analysiert. Daher wurden die Ergebnisse der Experimente nicht statistisch ausgewertet.

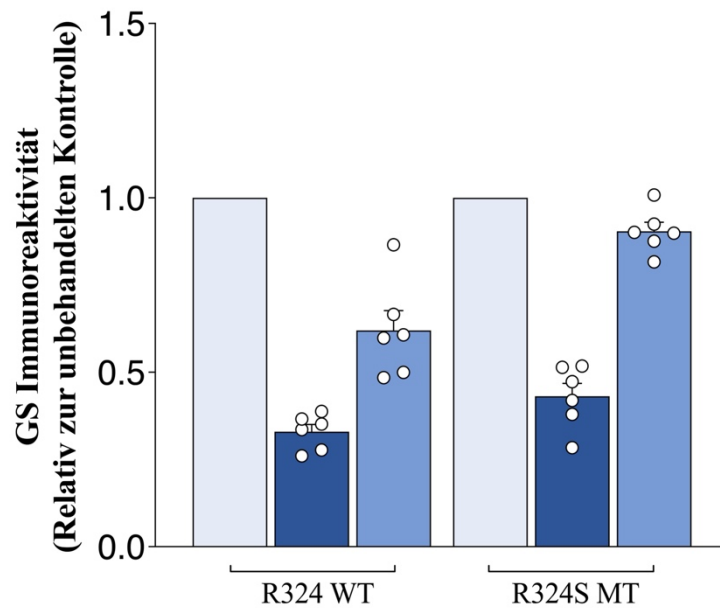


Abb. 14: Hemmung der anti-GS-Immunoreaktivität im Dot-Blot durch Behandlung der R324-WT und R324S-MT GS exprimierenden Zellen mit MSO und PPT

Drosophila melanogaster Kc167 Zellen, welche die humane R324-WT und die R324S-MT GS überexprimieren wurden in 100mm Zellkulturschalen ausgesät und für zwei Stunden mit je 3 mM MSO oder PPT behandelt. Anschließend wurden die Schälchen mit PBS gewaschen und die Zellen wie in Material und Methoden beschrieben mit Proteinlyse-Puffer aufgelöst und die Lysate mittels Dot Blot Analyse untersucht. Die GS-Immunoreaktivität wurde mittels densitometrischer Analyse ausgewertet und ist relativ zur unbehandelten Kontrolle angegeben. Keine statistische Auswertung, da es sich lediglich um technische Replikate handelt.

3.3.3 Effekte von MSO und PPT auf die Proteinspiegel der überexprimierten Glutaminsynthetase in Kc167-Zellen

Da der Rückgang der anti-GS-Immunoreaktivität im Dot-Blot in den mit MSO- oder PPT-inkubierten Proben auch auf einem Rückgang der GS-Proteinspiegel beruhen kann, wurden diese mittels Western-Blot-Analysen nach vorheriger Proteinbestimmung wie in Material und Methoden (siehe 2.2.8 und 2.2.10) beschrieben in den Kc167-Zelllinien überprüft. In diesen Analysen wurden die Proteinlysate in SDS-haltigem Auftragspuffer aufgenommen und nachfolgend hitzedenaturiert. Im Gegensatz zu dem im vorherigen Abschnitt durchgeführten Dot-Blot, wird hierdurch das Protein denaturiert und linearisiert. Dadurch wird das Epitop, dass der anti-GS-Antikörper erkennt wieder zugänglich und die Western-Blot Analyse lässt eine Aussage zu den jeweiligen Proteinleveln zu. Im Anschluss an die Western-Blot-Analyse folgte die densitometrische Auswertung der anti-GS Immunoreaktivität.

Wie in Abb. 15 gezeigt, waren die Proteinlevel in den mit MSO oder PPT inkubierten Zellen im Vergleich zu denen der unbehandelten Kontrollen unverändert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die im Dot-Blot beobachtete Hemmung der anti-GS-Immunoreaktivität nicht Folge eines durch MSO oder PPT induzierten Rückgang der GS-Proteinspiegel ist. Im vorliegenden Versuch wurde nur jeweils eine unbehandelte Kontrollprobe, aber 3 unabhängige (aus unterschiedlichen Aussaaten verwendete) Proben MSO- oder PPT-behandelter Fliegenzellen analysiert. Daher wurden die Ergebnisse der Experimente nicht statistisch ausgewertet.

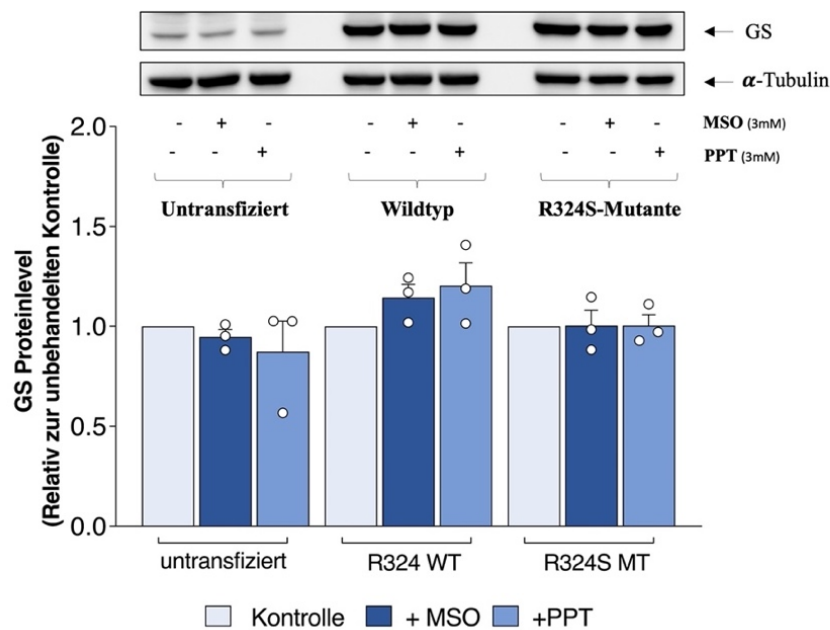


Abb. 15 Quantifizierung der GS-Proteinspiegel in untransfizierten und mit humaner R324-Wildtyp-GS und R324S-mutierter GS exprimierender Kc167-Zellen

Drosophila melanogaster Kc167 Zellen, welche die humane R324-WT GS und die humane R324S-MT überexprimieren wurden in 100mm Zellkulturschalen ausgesät und für zwei Stunden mit je 3 mM MSO oder PPT behandelt. Anschließend wurden die Schälchen mit PBS gewaschen und die Zellen wie in Material und Methoden beschrieben mit Proteinlyse-Puffer aufgelöst und die Lysate mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Die GS-Immunoreaktivität wurde mittels densitometrischer Analyse ausgewertet und ist relativ zur unbehandelten Kontrolle angegeben. Keine statistische Auswertung, da es sich lediglich um technische Replikate handelt.

3.4. Untersuchungen zur ATP-Bindung der humanen R324-WT und R324S-MT Glutaminsynthetase

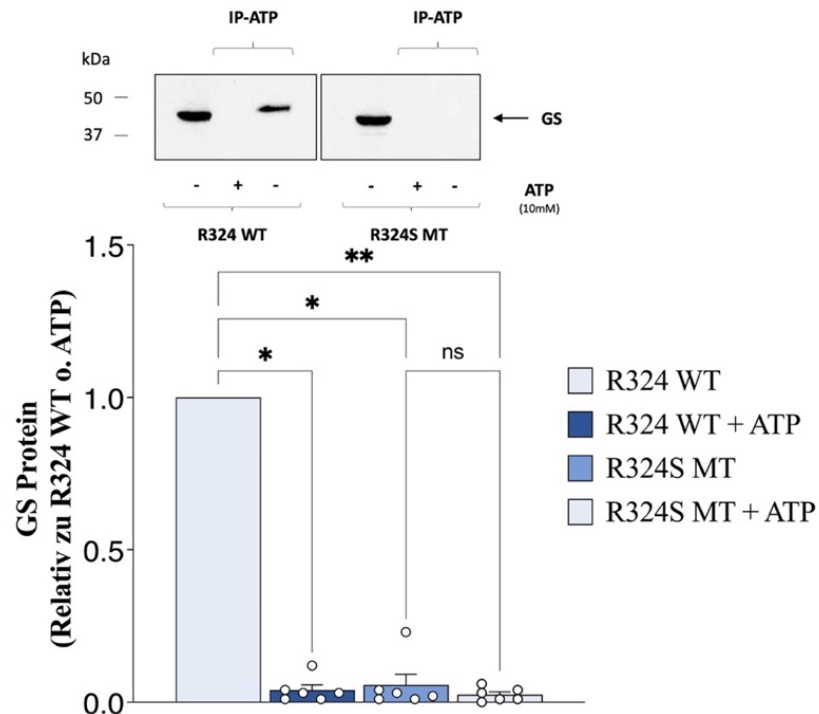


Abb. 16 ATP-Bindung der R324-WT GS und R324S-MT GS

Drosophila melanogaster Kc167 Zellen, welche die humane R324-WT GS oder die humane R324S-MT überexprimieren wurden kultiviert und für die Herstellung von Proteinlysaten wie unter Material und Methoden beschrieben verwendet. Die ATP Bindung der GS wurde nachfolgend mithilfe des ATP Bindungsassays ATP AffiPur Kit III von Jena Bioscience, Western-Blot und densitometrischer Analyse untersucht. Als technische Kontrolle zum Nachweis der Bindung des anti-GS-Antikörpers wurde zusätzlich zu den eluierten Fraktionen ein nicht mit Kit prozessiertes Proteinlysate der R324-WT GS und R324S-MT GS mit auf das Gel aufgetragen. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot aus 6 unabhängigen Experimenten. Statistische Analyse: Kruskal-Wallis und Dunn's post hoc-Test. *: Statistische Signifikanz gegenüber der unbehandelten Kontrolle (** $p < 0,01$, * $p < 0,05$)

Die ATP-Bindungsaffinität der R324-Wildtyp und R324S-mutierten humanen Glutaminsynthetase wurde mit Hilfe eines kommerziellen KITS gemessen (ATP AffiPur Kit III, Jena Bioscience). In diesem ATP-Bindungsassay werden die Proben zunächst dialysiert um sie von freiem ATP und weiteren niedermolekularen Verbindungen zu befreien. Die erhaltenen Dialysate werden nachfolgend mit einem ATP-konjugierten Agar inkubiert. Durch sequenzielle Waschschrte werden nachfolgend nicht an das Agar-konjugierte ATP-gebundene Proteine aus der Probe entfernt. Anschließend werden die an den Agar-gebundenen Proteine mit Hilfe eines Elutionspuffer vom Agar abgelöst und aufgefangen. Die auf diese Weise in den Purifikaten angereicherten Proteine wurden nachfolgend wie in Material und Methoden beschrieben mittels Western-Blot analysiert.

Wie in Abb. 16 gezeigt, wurde in den mittels ATP-Agarose angereicherten Proteinen die humane R324-WT Glutaminsynthetase, aber nicht die R324S-mutierte Glutaminsynthetase nachgewiesen. In Kontrollexperimenten wurde zur Kompetition mit dem ATP-Agar um die ATP-bindenden Proteinen im Proteinlysate ein Überschuss an ATP nach der Dialyse in das Lysat und den Elutionspuffer gegeben. Unter diesen Bedingungen zeigte sich in keiner der untersuchten Proteinlysate eine signifikante GS-Immunoreaktivität im Western-Blot. Zum Nachweis der anti-GS-Antikörperbindung, wurde im Western-Blot zusätzlich zu den gewonnen Elutionsfraktionen eine nicht durch das KIT behandelte Kontrollprobe aufgetragen. Diese Ergebnisse zeigen, dass unter den beschriebenen experimentellen Bedingungen die ATP-Bindung der R324S-mutierten humanen GS gegenüber der R324-Wildtyp GS deutlich verringert ist.

3.5. GS-Aktivität in untransfizierten und humane R324-WT und R324S-MT-GS überexprimierenden Kc167-Zellen

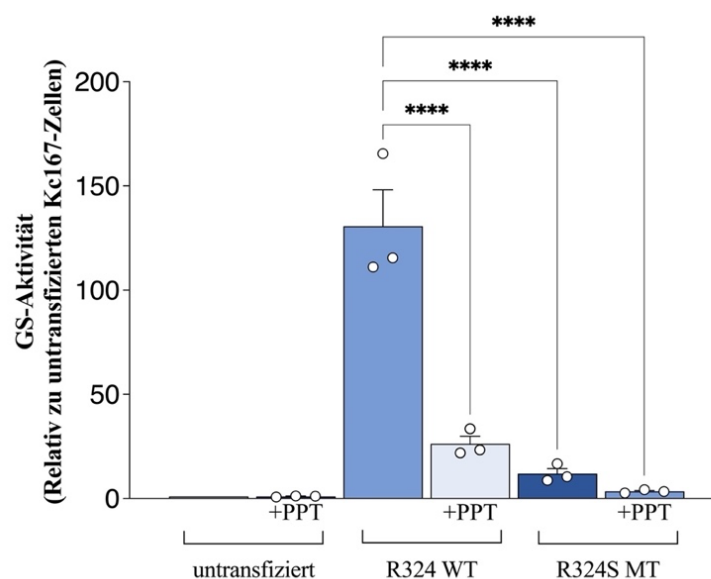


Abb. 17 Glutaminsynthetase Aktivität in Proteinlysaten aus untransfizierten Kc167 Zellen und R324-WT GS und R324S-MT GS exprimierenden Kc167-Zellen

Messung der GS-Aktivität in Proteinlysaten aus untransfizierten oder mit R324-WT GS oder R324S-MT GS transfizierten *Drosophila melanogaster* Zellen mittels γ -glutamyl-Transferase-Assay. Die Aktivität in den transfizierten Zellen ist relativ zu der angegeben, die in untransfizierten Kc167 Zellen gefunden wurde. Die Aktivitätsmessung wurde unter Verwendung jeweils 3 unabhängiger Proben durchgeführt wie in Material und Methoden beschrieben. Statistische Analyse: Kruskal-Wallis und Dunn's post hoc-Test.

*: Statistische Signifikanz gegenüber der unbehandelten Kontrolle (**** $p < 0,0001$).

In weiteren Untersuchungen wurden potentielle Effekte der R324S-Mutation auf die Aktivität der humanen Glutaminsynthetase mit Hilfe des γ -glutamyl-Transferase-Assays

nach Webb und Brown, wie in Material und Methoden beschrieben, untersucht. Zur Überprüfung der Funktionalität des Assays und als technische Kontrolle wurden Proteinlysate nicht-transfizierter und mit R324-WT GS und R324S-MT GS transfizierter Zellen separat mit dem Glutaminsynthetase-Hemmstoff Phosphinothricin inkubiert.

In den Proteinlysaten, die aus untransfizierten Kc167 Zellen stammten, lagen unter den gewählten Assay-Bedingungen die ermittelten Absorptionswerte nur geringfügig über dem Hintergrund (Assayreagenz ohne Probe).

Verglichen damit, waren die Absorptionswerte die in den R324-WT GS überexprimierenden Kc167-Zellen gemessen wurden, um mehr als den Faktor 100 höher. Die Inkubation dieser Proben mit dem GS-Hemmstoff PPT (3mM) reduzierte die GS-Aktivität in Proteinlysaten mit R324-WT GS oder R324S-MT GS transfizierten Zellen signifikant auf weniger als 1/4 der Aktivität der jeweils unbehandelten Proben (Abb. 17).

Verglichen mit den R324-WT GS überexprimierenden Kc167-Zellen war die GS-Aktivität, die in den R324S-MT GS überexprimierenden Kc167-Zellen gefunden wurde hochsignifikant um den Faktor 10 und ca. 90% niedriger (Abb. 18).

Diese Untersuchungen zeigen, dass die R324S-Mutation die Glutaminsynthetase-Aktivität hochsignifikant, aber nicht vollständig vermindert, so dass eine residuale Aktivität von ca. 12% erhalten bleibt.

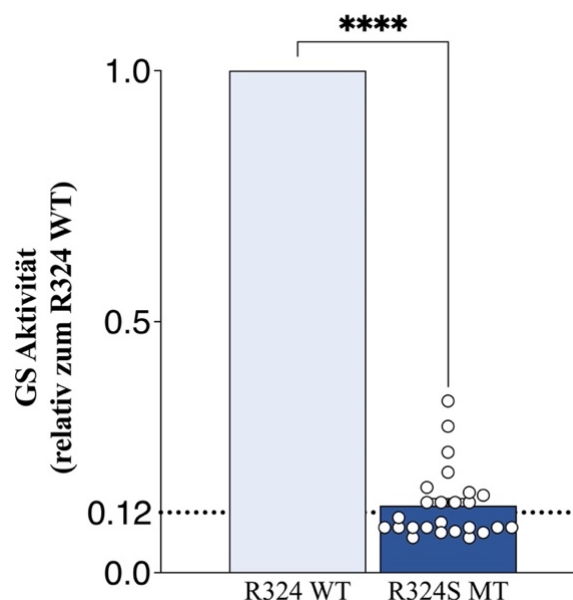


Abb. 18 Relative GS-Aktivität in Proteinlysaten R324S MT-GS transfizierter Zellen im Vergleich zu R324 WT-GS exprimierenden Kc167-Zellen.

Messung der GS-Aktivität in Proteinlysaten aus R324-WT GS oder R324S-MT GS transfizierten *Drosophila melanogaster* Zellen mittels γ -glutamyl-Transferase-Assay. Die GS-Aktivität, die in Proteinlysaten R324S-MT-GS exprimierender Zellen gefunden wurde ist relativ angegeben zu der in Proteinlysaten R324-WT GS exprimierender Zellen. Statistische Analyse: einseitiger T-Test.

*: Statistische Signifikanz gegenüber der unbehandelten Kontrolle (**** $p < 0,0001$).

3.5.1 Effekte von MSO und PPT auf die GS-Aktivität R324-WT-GS und R324S-MT-GS exprimierender Kc167 Zellen

In einem weiteren Versuchsansatz wurde der Einfluss der Glutaminsynthetase Hemmstoffe Methionin-Sulfoximin (MSO) und Phosphinothricin (PPT) auf die GS-Aktivität in Proteinlysaten R324-WT oder R324S-MT GS überexprimierender *Drosophila melanogaster* Kc167 Zellen gemessen. Die Proteinlysate unbehandelter Zellen wurden hier nachträglich im Eppendorfgefäß vor Durchführung des GS-Assays mit jeweils 3 mM MSO oder PPT bei 4 °C für 2 Stunden vorinkubiert.

Gemessen an der GS-Aktivität die in den jeweiligen unbehandelten Kontrollproben gemessen wurden, waren die GS-Aktivitäten in allen anderen untersuchten Proben erniedrigt (Abb. 19). PPT konnte in beiden Fällen die GS-Aktivität signifikant verringern, während MSO zwar eine deutliche Aktivitätsverminderung verursacht hat, diese jedoch unter den gewählten Versuchsbedingungen und n-Zahl nicht signifikant war. Die bei beiden genutzten Stoffen deutlich bestehende Aktivitätsverminderung unterstreicht, dass die R324S-GS eine residuale GS-Aktivität besitzt.

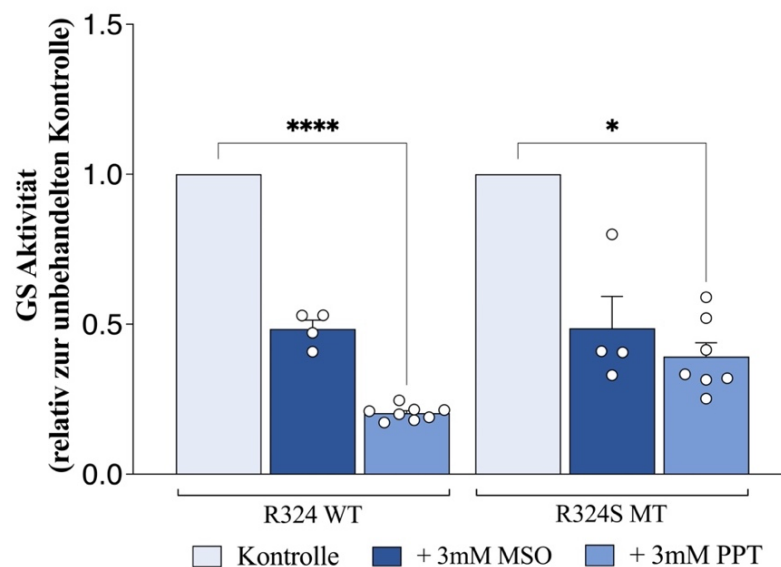


Abb. 19 Effekte der Hemmstoffe MSO und PPT auf die Aktivität der GS im humanen R324-WT und der humanen R324S-Mutante der Glutaminsynthetase

Messung der GS-Aktivität in Proteinlysaten aus R324-WT GS oder R324S-MT GS transfizierten *Drosophila melanogaster* Zellen mittels γ -glutamyl-Transferase-Assay. Die Zellysate wurden mit 3 mM MSO oder 3 mM PPT für 2 h bei 4 °C inkubiert, bevor der Assay gestartet wurde. Die GS-Aktivität in Proteinlysaten der jeweiligen Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt und die behandelten Proben relativ dazu angegeben. Die Aktivitätsmessungen wurden mit Proben durchgeführt, die aus jeweils 4 unabhängigen Versuchen gewonnen wurden. Statistische Analyse: Kruskal-Wallis und Dunn's post hoc-Test.

*: Statistische Signifikanz gegenüber der unbehandelten Kontrolle (**** $p < 0,0001$, * $p < 0,05$)

3.5.2 Effekte von Betain auf die GS-Aktivität R324-WT-GS- oder R324S-MT-GS exprimierender Kc167 Zellen

Die zuvor beschriebene durch die Mutation R324S herbeigeführte Verminderung der GS-Aktivität könnte auf eine fehlerhafte Faltung des Proteins zurück zu führen sein. Daher wurde in weiteren Experimenten untersucht, ob das chemische Chaperon Betain, welches hydrophobe Wechselwirkungen innerhalb von Proteinen stabilisieren kann, die Aktivität der Glutaminsynthetase positiv beeinflusst. Hierfür wurden die Proteinlysate mit

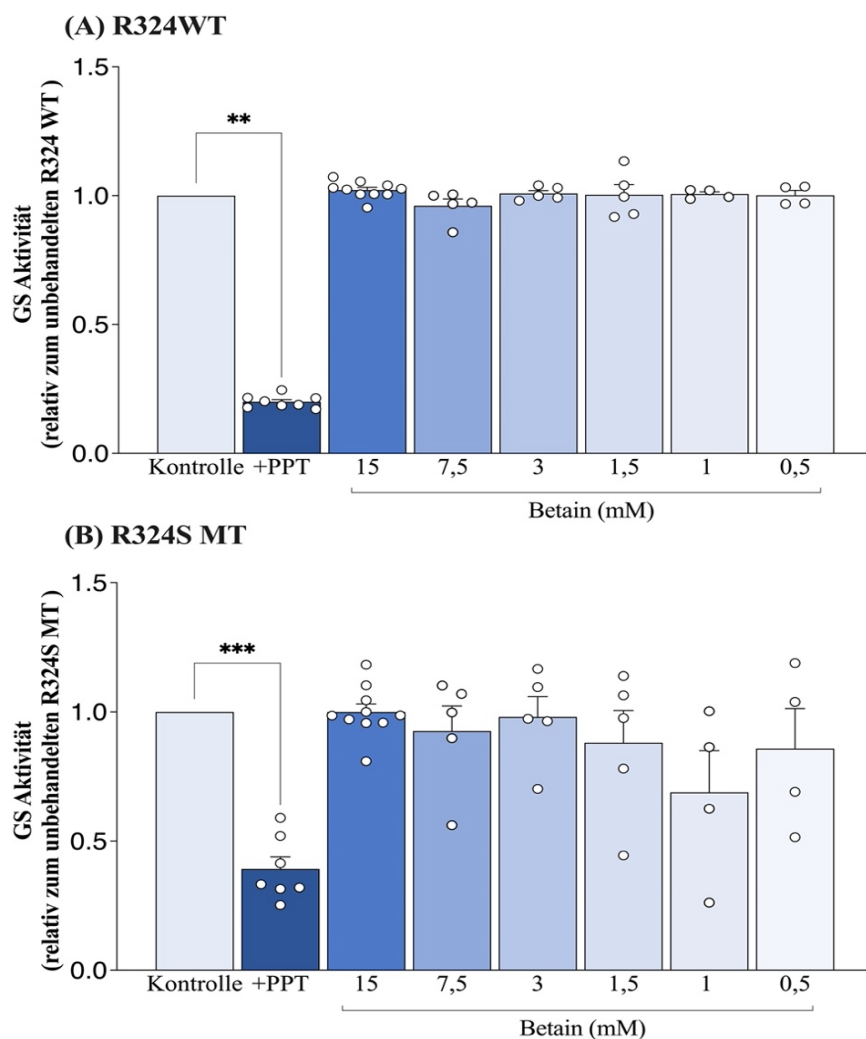


Abb. 20: Effekte von Betain auf die GS Aktivität der R324-WT und R324S-MT GS

Messung der GS-Aktivität in Proteinlysaten aus R324-WT GS oder R324S-MT GS transfizierten *Drosophila melanogaster* Kc167 Zellen mittels γ -glutamyl-Transferase-Assay. Wo angegeben wurden die Zelllysate mit Betain für 2 h bei 4 °C inkubiert, bevor der Assay gestartet wurde. Die GS-Aktivität in Proteinlysaten unbehandelter Kontrollen wurde jeweils gleich 1 gesetzt und die in den anderen Proben gefundene Aktivität ist relativ dazu angegeben. Die Aktivitätsmessungen wurden mit Proben durchgeführt, die aus jeweils 4-8 unabhängigen Versuchen gewonnen wurden. Statistische Analyse: Kruskal-Wallis und Dunn's post hoc-Test.

*: Statistische Signifikanz gegenüber der unbehandelten Kontrolle (***) $p < 0,001$, ** $p < 0,01$)

unterschiedlichen Betain-Konzentrationen von 50 bis 1500 μM vor der Aktivitätsmessung für 2 Stunden bei 4 °C inkubiert.

Wie in Abb. 20 zu erkennen ist, steigerte die Vorinkubation der Proteinlysate mit Betain die GS-Aktivität weder in Proteinlysaten aus R324-WT GS noch aus R324S-MT GS-exprimierenden Zellen gegenüber den jeweiligen unbehandelten Proben. Zur Überprüfung der Funktionalität des Assays wurden die Proteinlysate der R324-WT und R324S-MT GS-exprimierenden Zelllinien jeweils zusätzlich mit dem Glutaminsynthetase-Hemmstoff PPT inkubiert. Diese Behandlung verminderte die GS-Aktivität signifikant in Proteinlysaten beider Zelllinien (R324-WT und R324S-MT, Abb. 20).

3.5.3 Effekte selektierter chemischer Verbindungen auf die GS-Aktivität R324-WT- und R324S-MT-GS exprimierender Kc167 Zellen

In weiteren Untersuchungen wurden von der Arbeitsgruppe Professor Holger Gohlke chemische Verbindungen auf der Basis von *in silico* Analysen selektiert, die theoretisch einen Protein-stabilisierenden Effekt auf eine durch die Mutation herbeigefügte Struktur- oder Bindungsänderung des GS-Proteins vermitteln könnten. Hierzu zählen die Verbindungen Creatinmonohydrate, β -alanine-methylester, 2-chloroethylamide, 3-chloropropylamine und Chloroacetamidine.

In gleicher Weise wie zuvor für Betain beschrieben wurden diese Verbindungen mit Proteinlysaten beider transfizierter Zelllinien für 2 Stunden bei 4 °C inkubiert und nachfolgend der GS-Assay durchgeführt.

Wie Abb. 21 zeigt, hatte keine der genannten Verbindungen in den gewählten Konzentrationen in den beiden transfizierten Zelllinien einen signifikanten Einfluss auf die GS-Aktivität.

Interessanterweise steigerten 3-chloropropylamine und Chloroacetamidine in einer Konzentration von 150 μM die GS-Aktivität in den Proteinlysaten R324S-MT exprimierender Zellen reproduzierbar, aber statistisch nicht signifikant, während es in den R324-Wildtyp Zellen nicht zu einer Steigerung kam.

Diese Ergebnisse zeigen, dass unter den hier gewählten experimentellen Bedingungen keine signifikante Steigerung der GS-Aktivität durch die verwendeten chemischen Verbindungen erzielt werden kann.

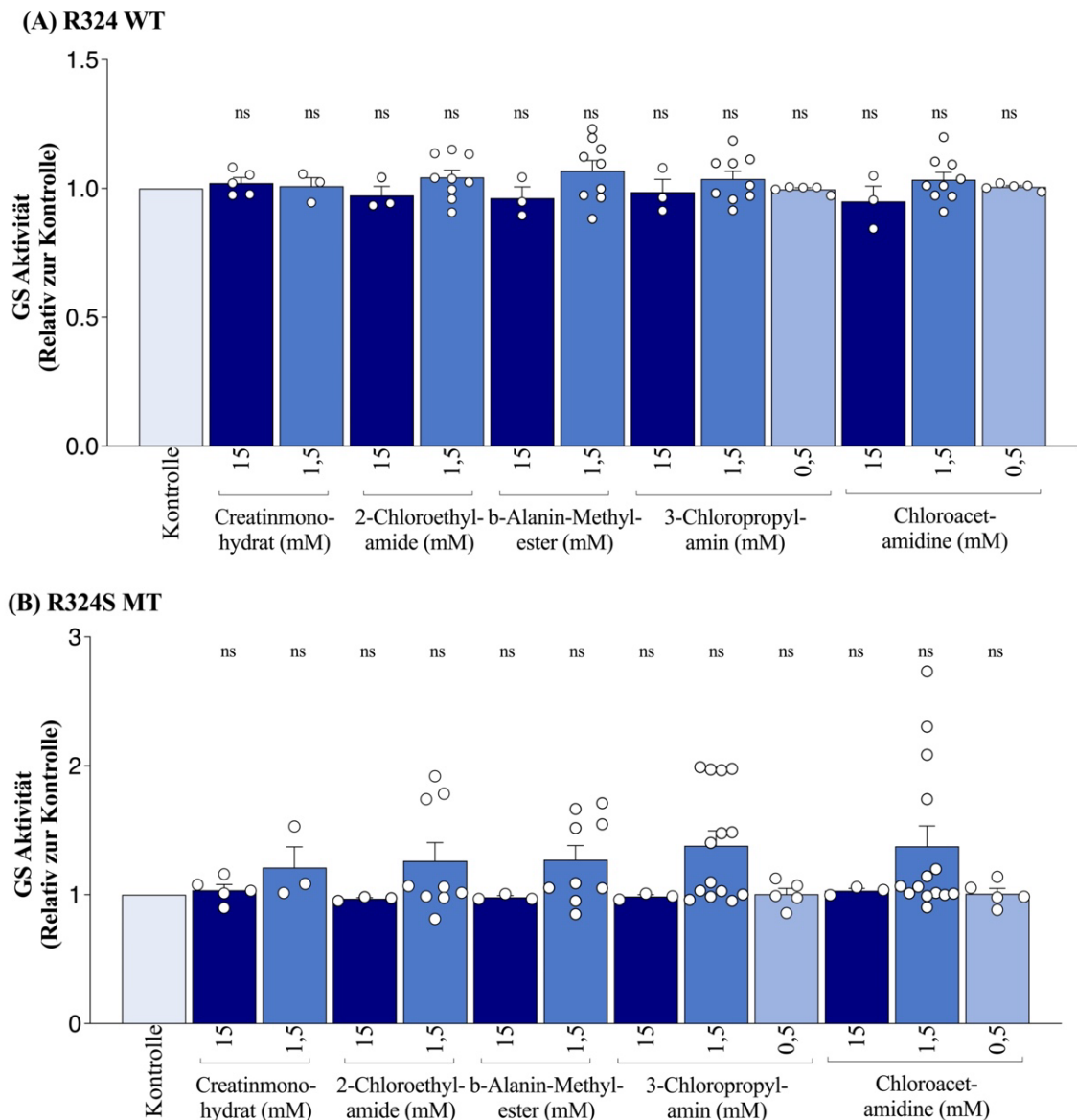


Abb. 21 Effekte selektierter chemischer Verbindungen auf die Glutaminsynthetase-Aktivität der R324-WT und R324S-MT Glutaminsynthetase

Messung der GS-Aktivität in Proteinlysaten aus R324-WT GS oder R324S-MT GS transfizierten *Drosophila melanogaster* Zellen mittels γ -glutamyl-Transferase-Assay. Wo angegeben wurden die Zelllysate mit den chemischen Verbindungen Creatinmonohydrate, β -alanine-methylester, 2-chloroethylamide, 3-chloropropylamine und Chloroacetamidine für 2 h bei 4 °C inkubiert, bevor der Assay gestartet wurde. Die GS-Aktivität in den unbehandelten Proteinlysaten R324-WT oder R324S-MT GS exprimierender Zellen wurde jeweils gleich 1 gesetzt und die in den anderen Proben gemessene Aktivität ist relativ dazu angegeben. Die Aktivitätsmessungen wurden mit Proben durchgeführt, die aus jeweils 3-12 unabhängigen Versuchen gewonnen wurden. Statistische Analyse: Kruskal-Wallis und Dunn's post hoc-Test. Keine statistische Signifikanz messbar.

4 Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine Mutation von Arginin zu Serin an Position 324 in der Aminosäuresequenz der humanen Glutaminsynthetase (R324S) deren Aktivität signifikant vermindert. Im Vergleich zum humanen Wildtyp (R324) betrug die residuale Aktivität der mutierten GS etwa 12%. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit klinischen Beobachtungen von Häberle et al. (121), die verringerte Glutaminspiegel im Serum des Patienten mit einer homozygoten R324S-Mutation in der humanen Glutaminsynthetase fanden. Die Ergebnisse bestätigen außerdem Vorhersagen bioinformatischer *in silico* Untersuchungen (40, 56), die daraufhin wiesen, dass die GS-Aktivität durch die R324S-Mutation deutlich vermindert, aber nicht vollständig inhibiert wird (113, 167). Auch die von Frieg et al. getroffene Annahme (56), dass der Aktivitätsverlust der R324S-Mutation der Glutaminsynthetase an einer geschwächten Bindung des Substrats ATP liegt, wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützt.

Interessanterweise wurde in Lymphozyten des Patienten mit der zuvor beschriebenen R324C-Mutation ebenfalls eine residuale Aktivität von 12% im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen gefunden. Hier waren die Proteinspiegel der Glutaminsynthetase beim Patienten mit der R324C-Mutation im Vergleich zu der Wildtyp Kontrolle jedoch deutlich um den Faktor 10 erhöht (113). Korrigiert man die GS-Aktivität des Patienten um diesen Faktor, ist die residuale GS-Aktivität der reinen R324C-mutierten Glutaminsynthetase gegenüber der Wildtyp Kontrolle deutlich vermindert. Die beobachtete Hochregulation der GS-Expression bei diesem Patienten und seiner Mutter, wurde als Kompensation für deren Aktivitätsverlust interpretiert. Allerdings bleibt dabei unklar, ob dieser in den Immunzellen (113) und Fibroblasten (119) des Patienten beobachtete Effekt in ähnlicher Weise auch im Gehirn oder anderen Geweben erfolgt.

Bedauerlicherweise liegen keine vergleichbaren Befunde zur Auswirkung der R324S-Mutation auf das Expressionsniveau der GS vor. In diesem Zusammenhang lässt die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte artifizielle Überexpression der GS durch Einbringung eines Plasmids keine Rückschlüsse darauf zu. Es ist aber denkbar, dass auch bei der R324S-Mutation eine kompensatorische Hochregulation der GS auf Proteinebene in ähnlicher Weise induziert würde, wie in den Lymphozyten der R324C-Mutante.

Unter der Annahme, dass diese Vermutung korrekt ist, ist auch im Patienten mit der Mutation von Arginin nach Serin an Position 324 von einer höheren residualen Aktivität gegenüber der Mutation von Arginin nach Cystein an Position 324 auszugehen, wie von

Frieg et al. bereits vermutet (167). Hierzu passt auch der deutlich mildere klinische Verlauf (siehe Kapitel 1.8) mit normalem Geburtsgewicht und postpartal höheren Glutamin- und niedrigeren Ammoniakwerten (98). Sollte diese Voraussetzung einer ebenso bestehenden Hochregulation der GS-Expression zur Kompensation der reinen residualen GS-Aktivität von 12% beim Patienten mit der R324S-Mutation nicht wie angenommen zutreffen, wäre der mildere klinische Verlauf des Patienten nur schwer erklärbar.

Eine weitere mögliche Erklärung für den milderen Verlauf könnte eine ausgewogenere intrauterine Glutaminversorgung durch die Mutter unseres Patienten sein. Diese Annahme bleibt eine Hypothese, da es in der Literatur keine Hinweise auf die GS-Aktivität der Mutter oder maternale Glutaminlevel zum Zeitpunkt der Geburt des Patienten mit der R324S-Mutation der Glutaminsynthetase gibt.

Demgegenüber stehen Untersuchungen an immortalisierten Lymphozyten der Mutter des Patienten mit der R324C-Mutation, welche eine bereits auf 49% herabgesetzte residuale Aktivität der Glutaminsynthetase zeigen (113). Auch hier scheint die gemessene Aktivität durch eine Hochregulation der GS-Expression teilweise kompensiert zu sein. Interessanterweise ist diese Hochregulation bei der Mutter des Patienten mit der R324C-Mutation stärker ausgeprägt, als bei dessen Vater, obwohl beide Elternteile eine heterozygote Mutation der Glutaminsynthetase vorwiesen. Dies lässt die Annahme zu, dass die intrauterine fetale Glutaminversorgung beim Träger der R324C-Mutante ebenso deutlich niedriger gewesen sein könnte, als beim Patienten mit der R324S-Mutation.

Dieser intrauterine Glutaminmangel, und weniger die als Folge der gestörten Ammoniakentgiftung in der Leber auftretende Hyperammonämie, könnte ursächlich für die offenkundigen zerebralen Fehlentwicklungen bei Kindern mit kongenitalen GS-Mutationen, mit Ausnahme der R324S-Mutation, gewesen sein. Die Kognitionsbeeinträchtigungen können auch als Folge der Hyperammonämie-induzierten Beeinträchtigung der Astrozyten-Funktionen und glioneuronalen Kommunikation erklärt werden (97, 173). Dafür spricht, dass bei angeborenen Harnstoffzyklusdefekten mit resultierender Hyperammonämie, aber normalen Glutaminleveln, kognitive Beeinträchtigungen und neurologische Auffälligkeiten aber eher selten Fehlbildungen beobachtet werden (99, 174-177).

Diese Annahme wird auch gestützt durch Untersuchungen, die zeigen, dass eine Hyperammonämie durch einen Leber-spezifischen Knockout der GS in der Maus kognitive und motorische Hirnfunktionen aber nicht die Hirnentwicklung stört (64). Auch ein Astrozyten-spezifischer Knockout der GS induzierte keine zerebralen Malformationen, jedoch kam es zu einer erheblichen Beeinträchtigung der zerebralen Neurotransmission und

hierüber zum frühen postnatalen Versterben der Tiere. Diese Beeinträchtigung scheint vor allem Folge eines zerebralen Glutaminmangels gewesen zu sein, in dessen Folge der Glutamat-Glutamin-GABA Zyklus gestört wurde (117). Es ist anzunehmen, dass die klinisch unauffällige Hirnentwicklung bei diesen Tieren Folge einer ausreichenden systemischen Versorgung des Gehirns mit Glutamin war.

Jedoch gibt es bei schweren Formen der angeborenen Harnstoffzyklusdefekten auch Fallberichte über zerebrale Fehlbildungen, wie kortikale Atrophie und reduzierte Myelinisierung, was auf eine teratogene Wirkung der Hyperammonämie in der embryonalen Entwicklung hindeutet (124, 178, 179). Diese teratogene Wirkung der Hyperammonämie als Ursache der cerebralen Fehlbildungen bei der in dieser Arbeit untersuchten Mutation der Glutaminsynthetase muss kritisch betrachtet werden. Dies liegt an der aktuell geltenden Annahme, dass die Neurotoxizität der Hyperammonämie zum Großteil auf einer daraus resultierenden Glutaminakkumulation und konsekutiven Zellschwellung im Gehirn beruht (150, 180-182). Da die R324S-Mutation der Glutaminsynthetase zu einer deutlich erniedrigten Aktivität führt, kommt es so auch nur zu einer geringeren Glutaminsynthese und dem zuvor bereits beschriebenen Glutaminmangel.

Neben der Glutaminakkumulation gibt es jedoch noch weitere Mechanismen, welche die Neurotoxizität der Hyperammonämie vermitteln (183). Hierzu gehört unter anderem eine Beeinträchtigung des Kalium-Puffersystems der Astrozyten was zu neuronaler Enthemmung und erhöhter Epileptogenität führt (184) und die verstärkte Bildung von Sauerstoffradikalen durch NMDA-Rezeptor-vermittelte Mechanismen (185). Ebenso führt die Hyperammonämie zu einer Beeinträchtigung des zerebralen Energiestoffwechsels (186) und zu einer oxidativen Schädigung von RNA und Astrozyten, wodurch es potentiell zu einer fehlerhaften Proteinbiosynthese kommen kann (90, 151).

Auch der von Kanamori et al. (187) beschriebene Progress der neurologischen Symptomatik bei Hyperammonämie trotz Sättigung der Glutaminsynthetase-Reaktion weist auf die glutaminunabhängige Mechanismen der Ammoniak-induzierten Neurotoxizität hin.

Auf Basis dieser Beobachtungen muss von einer kombinierten Ursache aus systemischem Glutaminmangel und Hyperammonämie für die beschriebene Symptomatik der Patienten mit GS-Mutationen ausgegangen werden. Um die genauen Entwicklungsprozesse besser zu verstehen und die wichtige Rolle von Glutamin und Ammoniak in der fetalen Entwicklung genauer zu beschreiben (72), bedarf es weiterer detaillierter Untersuchungen zum Glutaminbedarf und der teratogenen Wirkung von Ammoniak in der embryonalen Entwicklungsphase.

4.1. Eignung von Kc167-Zellen als Expressionssystem für die humane GS

Für die Überexpression der humanen R324-Wildtyp und R324S-mutierten Glutaminsynthetase wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig eine *Drosophila Melanogaster* Zelllinie verwendet (Kc167, *Drosophila* Genomics Resource Center) (188). Die erste *Drosophila Melanogaster* Zelllinie wurde bereits 1969 von Echalié et al. etabliert (189), von Cherbas et al. weiter charakterisiert (188) und seither für viele *in vitro* Untersuchungen genutzt. Insgesamt gibt es über 100 verschiedene *Drosophila*-Zelllinien aus unterschiedlichen Geweben. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten immortalisierten, embryonalen Kc167-Zellen weisen plasmatozytenähnliche Eigenschaften auf (169). Sie wurden für die Überexpression ausgewählt, da ihre Eignung für diesen Zweck bereits in zahlreichen *in vitro* Transfektionsexperimenten bestätigt wurde und sie durch das Selektionsplasmid Blasticidin S stabile Versuchsmodelle liefern (170).

Im *Drosophila*-Genom der Kc167 Zellen befinden sich 2 Gene, die für Isoenzyme der Glutaminsynthetase kodieren (35). Eines davon ist mitochondrial (GSII), das andere zytosolisch (GSI) lokalisiert. Beide Isoenzyme bilden jeweils Octamere mit einer molekularen Masse von ca. 42 kDa (118, 190). Sie haben prinzipiell die gleichen Funktionen wie die humane Glutaminsynthetase, nämlich die Ammoniakentgiftung und die Stickstoffmetabolisierung. Auch die *Drosophila*-GS kann durch Methionin-Sulfoximin gehemmt werden (118). Die Gensequenzen der beiden *Drosophila Melanogaster* GS ähneln sich stark und stimmen zu ca. 60% mit der humanen GS überein (37).

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit bestätigen die Eignung von Kc167-Zellen als Überexpressionssystem humaner Proteine. Dies wurde belegt durch Immunfluoreszenz- und Western-Blot-Analysen, die zeigten, dass die humane R324-Wildtyp und R324S-mutierte GS stabil und reproduzierbar in den Kc167-Zellen exprimiert werden und das translatierte Protein katalytisch aktiv ist. Dies zeigt sich durch ähnliche Expressionsspiegel in den unterschiedlichen Aussaaten und eine in allen Aussaaten gut messbare GS-Aktivität der transfizierten Zellen. Die Proteinprodukte der transfizierten DNA-Sequenz stimmten mit dem vorhergesagten Molekulargewicht der humanen GS von 44-45 kDa sowohl beim R324-Wildtyp, als auch bei der R324S-Mutante überein (15, 38, 59).

Neben der überexprimierten humanen Glutaminsynthetase konnte auch die endogene Glutaminsynthetase der Fliegenzellen im Western-Blot nachgewiesen werden. Dabei waren

deren Proteinspiegel erheblich niedriger als die der überexprimierten humanen GS, weshalb sie für die Ergebnisse der folgenden Untersuchungen vernachlässigbar zu sein scheinen. In der Immunfluoreszenz Untersuchung zeigte sich eine gleichmäßige Färbung der transfizierten humanen Glutaminsynthetase, während die endogene Glutaminsynthetase der Kc167 Drosophila Melanogaster Zellen nicht dargestellt werden konnte. Im Hinblick auf die Ergebnisse des Western-Blots ist dies am ehesten durch eine fehlende Reaktivität des in der Immunfluoreszenz genutzten polyklonalen Antikörpers auf die Drosophila GS zu erklären.

Bei den beiden zuvor beschriebenen Untersuchungstechniken wurden zwei verschiedene anti-GS Antikörper verwendet (monoklonaler aus der Maus stammender Anti-GS-AK im Western-Blot und polyklonaler aus dem Kaninchen stammender Anti-GS-AK in der Immunfluoreszenzfärbung). Beide Antikörper reagieren nach Herstellerangaben mit der GS verschiedener Spezies kreuz und wurden unter Verwendung eines Peptids der humanen GS hergestellt. Angaben zur Kreuzreaktivität der jeweiligen Antikörper mit der GS aus Drosophila Melanogaster liegen hingegen nicht vor.

Aus Voruntersuchungen ist bekannt, dass der in der vorliegenden Arbeit verwendete monoklonale anti-GS-Antikörper im Bereich der Glutamatbindungsstelle der humanen GS bindet (91). Durch diese Bindung an der Glutamatbindungsstelle des Enzyms, liefern die Ergebnisse des Western-Blots und der Immunfluoreszenz weiterhin erste Hinweise für eine stabile Glutamatbindung sowohl des humanen R324-Wildtyps als auch der R324S-Mutante. Diese Annahme wird durch die Beobachtung von Frieg et al. (39) unterstützt, welche bei der die Glutamatbindung störenden Mutation R341C keine Anti-GS Immunoreaktivität nachweisen konnten, durch fehlende Bindung des Anti-GS Antikörpers (113). Es ist grundsätzlich anzunehmen, dass dieser Bereich phylogenetisch stark konserviert ist. Die Bindungsbereiche der in dieser Arbeit verwendeten polyklonalen anti-GS-Antikörper sind unklar, aber grundsätzlich erhöht die Polyklonalität die Wahrscheinlichkeit für eine Reaktivität gegenüber dem Protein.

Vor diesem Hintergrund könnte die beobachtete erheblich stärkere anti-GS-Immunoreaktivität gegenüber der humanen GS im Vergleich zur Fliegenzell-GS unterschiedliche Affinitäten der anti-GS Antikörper widerspiegeln, so semiquantitativ nicht vergleichbar sein und die beobachtete Überexpression überbewertet werden. Gegen diese Annahme sprechen jedoch die Aktivitätsmessungen, die in Einklang mit den Western-Blot- und Immunfluoreszenzanalysen eine vergleichbare, stabile und deutlich stärkere GS-Aktivität in den transfizierten Zellen gegenüber den untransfizierten zeigten.

4.2. Einfluss der R324S-Mutation auf die Glutamat- und ATP-Bindung der humanen Glutaminsynthetase

In Gegenwart der strukturell dem Glutamat ähnelnden Glutaminsynthetase-Hemmstoffe Methioninsulfoximin (MSO) und Phosphinotricin (PPT) wird die GS durch diese irreversibel gehemmt (136). Diese Inhibition des Enzyms erfolgt durch die ATP-abhängige Bindung von MSO oder PPT an der Glutamatbindungsstelle der GS (1, 159). MSO und PPT interagieren beide mit dem in Kapitel 1.4 beschriebenen Glu327 Flap und dem Asp50 Loop, einer Schleifenregion mit Aspartat an Position 50, welche die Substratbindung und Positionierung des aktiven Zentrums unterstützt. Durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken, verschließt sich nach MSO- oder PPT-Bindung der Eingang zur Glutamatbindungsstelle, wodurch der Inhibitor diese irreversibel blockiert (136). Hierdurch ist somit auch das Epitop für den dort spezifisch bindenden monoklonalen anti-GS-Antikörper unzugänglich, so dass dieser nicht mehr binden kann.

In vorherigen publizierten Untersuchungen wurde dieser Glutamatbindungsdomänen-maskierende Effekt von MSO herangezogen, um den Rückgang der anti-GS-Immunoreaktivität unter Verwendung eines monoklonalen anti-GS-Antikörpers zu erklären. Kongruent zu dieser Annahme stellte in diesen Untersuchungen die Ablösung von MSO von der Glutamatbindungsstelle durch Denaturierung des Proteins die anti-GS-Immunoreaktivität wieder her. Die Ergebnisse aus diesen Versuchen wurden als ein indirektes Maß für die Glutamatbindung durch die GS interpretiert. (21, 91).

In Übereinstimmung mit den oben genannten Arbeiten wurde auch in den vorliegenden Untersuchungen ein Rückgang der anti-GS-Immunoreaktivität nach Inkubation der Kc167-Zellen mit MSO oder PPT im Dot-Blot beobachtet. Dieser Effekt war beim Wildtyp wie auch bei der GS-Mutante ähnlich ausgeprägt. In Übereinstimmung mit Literaturbefunden (40) war die durch MSO oder PPT verminderte anti-GS-Immunoreaktivität nicht Folge einer Herunterregulation des GS-Proteins, was die stabilen Proteinspiegel der behandelten und unbehandelten Zellen im Western-Blot bestätigten. Dies lässt den Schluss zu, dass die R324S-Mutation der Glutaminsynthetase, wie bereits von Frieg et al. bioinformatisch vorhergesagt, keinen Einfluss auf die Glutamatbindung des Enzyms hat (40).

Interessanterweise war der Rückgang der anti-GS-Immunoreaktivität deutlich ausgeprägter, wenn Zelllysate an Stelle der vitalen Kc167-Zellen mit MSO oder PPT inkubiert wurden. Dies deutet darauf hin, dass durch die Inkubation der vitalen Zellen keine

ausreichenden MSO- und PPT-Konzentrationen in der Zelle erreicht wurde, um die vorhandenen Glutamat-Bindungsstellen vollständig abzusättigen und zu hemmen.

Da Kinetiken zur Aufnahme von MSO und PPT in Kc167-Zellen bisher unbekannt sind, könnte der geringere Rückgang der anti-GS-Immunoreaktivität auf eine ineffiziente Aufnahme oder intrazelluläre Interaktion der Hemmstoffe mit zellulären Bestandteilen zurück zu führen sein. Diese Vermutung könnte auch erklären, weshalb die Verminderung der anti-GS-Immunoreaktivität durch PPT unter diesen Bedingungen weniger effizient war, als die durch MSO-herbeigeführte. Dies könnte durch die jeweiligen unterschiedlichen Eigenschaften der beiden Hemmstoffe erklärt werden, die strukturell zwar ähnlich sind, aber deren individuellen Eigenschaften die Wechselwirkungen mit den Spezies des Fliegenzellproteoms auch individuell beeinflussen könnten. Weitere Untersuchungen zu dieser Fragestellung stehen aktuell noch aus.

Die Untersuchungen zeigen, dass die hier gewählten Inkubationsbedingungen der vitalen Zellen ungeeignet waren um eine effiziente Hemmung der GS mit MSO und PPT in den vitalen Kc167 Zellen zu erzielen.

Um Unterschiede in der Absättigbarkeit der R324-WT und R324S-mutierten GS durch MSO erkennen zu können, wurde MSO in Konzentrationen zwischen 0,05-30 mM in Zelllysate eingesetzt. Auch hier wurden keine Unterschiede in der Absättigung der GS bei R324-Wildtyp und R324S-mutierter GS beobachtet. Interessanterweise verminderte MSO im Konzentrationsbereich zwischen 0,05-0,25 mM die anti-GS-Immunoreaktivität bei Wildtyp und Mutante vergleichbar um ca. 50 %. Ab 0,5 mM wurde die anti-GS-Immunoreaktivität sprunghaft durch MSO maximal gehemmt. In der Literatur finden sich derzeit keine Angaben zur intrazellulären Glutamatkonzentration in Kc167-Zellen anhand derer man abschätzen könnte, ob es sich hier um eine Kompetition von MSO mit Glutamat handelt. Eine solche Kompetition wäre wie bereits 1968 von Meister postuliert eine mögliche Erklärung für eine Reduktion der GS-Aktivität durch MSO (128).

Um den Einfluss unterschiedlicher ATP-Spiegel in den Proteinlysaten der transfizierten Kc167-Zellen auszuschließen, wurden in den Dot-Blot Untersuchungen der vorliegenden Arbeit die Lysate mit einem Überschuss an ATP versetzt. Dabei zeigte sich, dass die Hemmung der anti-GS-Immunoreaktivität durch die GS-Hemmstoffe MSO und PPT unabhängig davon war, ob dem Proteinlysate ATP zugegeben wurde oder nicht. Dies lässt den Schluss zu, dass in den Zelllysaten bereits ausreichend endogenes ATP vorhanden war.

Zusammengefasst spricht die vergleichbare Hemmung der anti-GS-Immunoreaktivität durch MSO und PPT in Zelllysaten der mit R324-WT-GS und R324S-MT-GS transfizierten Zellen dafür, dass die Glutamatbindung durch die R324S-Mutation nicht beeinträchtigt wird.

Aus der Literatur war bisher bekannt, dass die Bindung von Glutamat an die GS nur in Gegenwart von ATP erfolgen kann (136, 159). Einige Autoren beschreiben dies als zweischrittige Reaktion: Durch Bindung des ATP am oberen Teil einer trichterförmigen Bindungstasche (40) wird eine Konformationsänderung bewirkt (1), welche die Bindung von Glutamat im unteren Bereich verbessert (76). Die γ -Carboxylgruppe des im unteren Bereich gebundenen Glutamats reagiert mit dem γ -Phosphat des ATP und bildet γ -Glutamylphosphat und ADP (76).

Neuere Studien beschreiben ebenfalls eine zweischrittige Reaktion, welche jedoch die Aktivierung der Substrate als erste Phase und die Bildung von Glutamin als zweite Phase bestimmen (191). Issoglio et al. postulieren, dass ATP und Glutamat gleichzeitig im ersten katalytischen Schritt binden. Dieser führt demnach ebenso durch Phosphorylierung des Glutamats zur Bildung des Zwischenprodukts γ -Glutamylphosphat oder bei Bindung von MSO zum Reaktionsstop. Der zweite katalytische Schritt ist der nukleophile Angriff des Ammoniaks auf das δ -Kohlenstoffatom des γ -Glutamylphosphat. Er resultiert in der Bildung von Glutamin und ADP und wird als begrenzender Reaktionsschritt klassifiziert (192).

Auch Arbeiten von Moreira et al. postulieren diesen Mechanismus mit unabhängiger Bindung der Substrate Glutamat und ATP. Sie beschreiben die Aktivierung von Glutamat durch einen Phosphattransfer von ATP in Phase 1 und die Glutaminbildung durch Deprotonierung von Ammoniak in Phase 2 (131, 193). Diese aktivierende Deprotonierung des Ammoniaks durch Asp50 wird auch bereits in vorherigen Studien genannt (76).

Eine zufällige Reihenfolge der Substratbindung an der Glutaminsynthetase des Schafhirns wurde ebenso auch bereits von Allison et al. beschrieben (194). Auch Deuel et al. (8) postulieren eine unabhängige Bindung der einzelnen Substrate, schließen jedoch eine gegenseitige Verstärkung der Bindungsaffinität nicht aus.

Weitere Studien zur Möglichkeit der gleichzeitigen Substratbindung von Glutamat und ATP zeigten, dass eine Präinkubation der GS mit ATP die Glutaminsynthetase-Aktivität steigern kann (195).

In den vorliegenden Untersuchungen wurde für die Präzipitation ATP-bindender Proteine ein kommerzielles Kit verwendet, in dem ATP immobilisiert in einer Säule vorliegt. Nicht an das ATP-gebundene Proteine werden aus der Säule nach einem kurzen Inkubationsschritt herausgewaschen und die ATP-gebundenen Proteine im Anschluss an den

Assay mittels Western-Blot nachgewiesen. Hierbei konnte eine deutliche anti-GS-Immunoreaktivität in den mit der R324-WT GS transfizierten Zellen nachgewiesen werden, während ein Nachweis der anti-GS-Immunoreaktivität in den mit der R324S-MT GS transfizierten Zellen nicht gelang. Da für die R324S-MT GS eine Restaktivität von 12% nachgewiesen werden konnte, muss auch eine ATP-Bindung noch teilweise möglich sein.

Die Störung der ATP-Bindung in der R324S-Mutante entsteht durch Verlust der direkten ionischen Salzbrücke zwischen dem streng konservierten Argininrest an Position 324 und der β -Phosphatgruppe des ATP ohne Konformationsänderung des aktiven Zentrums (40, 113). Der Verlust dieser direkten stabilisierenden Interaktion wird teilweise durch Wasserstoffbrückenbindungen und Van der Waals Kräfte aufgehoben, was nach Frieg et al. zu der postulierten Restaktivität der mutierten Glutaminsynthetase führt (39).

Es ist denkbar, dass die geringe Affinität der R324S-mutierten GS zu ATP unter den verwendeten Assaybedingungen nicht ausreichte ATP stabil zu binden. Hier könnte eine Erhöhung der Inkubationszeit des Proteinlysats in der Säule und/ oder ein höheres Verhältnis von ATP-gekoppelten Beads zu eingesetztem Probenmaterial eine effizientere Bindung der R324S-Mutante an die ATP-Beads bewirken. Durch beide methodischen Ansätze würde eine Interaktion der mutierten GS mit dem ATP wahrscheinlicher, da z.B. die Konkurrenz mit anderen Faktoren wie endogenen ATP-bindenden Proteinen der Fliegenzellen verringert würde.

Vor dem Hintergrund der oben beschriebenen ATP-Abhängigkeit der Glutamatbindung wirken die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit, die zeigen, dass die R324S-Mutante zwar Glutamat (Abb. 13) aber nicht ATP (Abb. 16) bindet zunächst widersprüchlich. Auf der anderen Seite unterstützen diese Ergebnisse die Berechnungen von Issoglio et al. und Moreira et al., wie zuvor beschrieben. Gleichzeitig bestätigen diese Befunde die *in silico* Vorhersagen von Frieg et al. (167), welche eine geringere ATP-Affinität der R324S GS-Mutante postulieren (167).

4.3. Chemische Reparatur der R324S-mutierten GS

Der in dieser Arbeit durchgeführte GS Assay zum Nachweis der Glutaminsynthetase Aktivität wurde von Woolfolk et al. etabliert und durch Webb und Brown 1976 weiter modifiziert (33, 137). Er basiert auf der als Arsenolyse des Glutamin bezeichneten Glutamyltransferase Reaktion (21).

In früheren Studien wurde diskutiert, ob durch spezifische chemische Verbindungen die Aktivität der R324S-mutierten GS, im Sinne einer chemischen Stabilisierung der gestörten ATP-Bindung, gesteigert werden könnte (196). Hierfür wurden von Frieg et al. die in silico identifizierten, die ATP-Bindung der GS-verstärkenden, Verbindungen Betain, Creatinmonohydrate, β -alanine-methylester, 2-chloroethylamide, 3-chloropropylamine und Chloroacetamide ausgewählt (167).

Unter den Versuchsbedingungen der vorliegenden Arbeit, gelang dies für keine der getesteten, von Frieg et al. postulierten Verbindungen, in signifikantem Maße.

Lediglich 3-chloropropylamine und Chloroacetamide steigerten in einer Konzentration von 150 μ M die GS-Aktivität in Proteinlysaten R324S-MT GS überexprimierender Kc167-Zellen reproduzierbar, jedoch nicht statistisch signifikant. In den Wildtyp-Zellen wurde unter gleichen Bedingungen keine gesteigerte GS-Aktivität beobachtet.

Diese Tendenz einer Steigerung könnte auf eine mögliche chemische Stabilisierung der Bindungsstelle hindeuten. Die fehlende Signifikanz und die vergleichsweise geringen Effekte könnten dabei Folgen einer suboptimalen Konzentration der Verbindungen sein, die z.B. aus gleichzeitigen Wechselwirkungen mit anderen zellulären Bestandteilen der Kc167-Zellen resultiert. Um dies ausschließen zu können, sind Untersuchungen an aufgereinigter humaner Glutaminsynthetase zwingend notwendig.

4.4. Limitationen der Arbeit

Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen verbleiben im Hinblick auf die Fragestellung der Arbeit und die Interpretation der Ergebnisse Fragen offen.

Alle semiquantitativen/ quantitativen Untersuchungen in dieser Arbeit wurden an Kc167-Proteinlysaten durchgeführt. Die überexprimierte humane GS wurde dabei nicht von den im Lysat befindlichen Fliegenzellproteinen getrennt und aufgereinigt. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass einzelne Spezies des Fliegenzellproteoms mit der humanen GS interagierten und deren Aktivität beeinflussten.

Es kann weiterhin nicht ausgeschlossen werden, dass die Aktivität der Glutaminsynthetase durch kompetitive Inhibition einzelner Endprodukte des Glutaminstoffwechsels (21, 33) wie z.B. hohe Glutaminspiegel im Zelllysate (72, 197) oder durch reaktive Stick- und Sauerstoffspezies herbeigeführte posttranslationale Modifikationen (64, 91, 147) wie in Kapitel 1.5 beschrieben beeinflusst wurde.

Darüber hinaus kann nicht ausgeschlossen werden, dass einzelne Spezies des Drosophila-Proteoms mit den chemischen Verbindungen wechselwirken, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, um die verminderte Aktivität der mutierten GS „chemisch zu reparieren“.

Um diesen Einfluss ausschließen zu können, müsste die überexprimierte GS aus den Fliegenzelllysaten aufgereinigt werden. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Fliegenzell-Expressionssystem erscheint ungeeignet um quantitativ ausreichende Mengen an GS anzureichern bzw. zu isolieren. Dies erforderte neben einer hohen Expressionseffizienz auch eine große Zellmasse, die unter den gewählten Bedingungen nicht erreicht wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde Schneiders Drosophila Medium (SDM) für die Kultivierung der Zellen verwendet um einen möglichen GS-hemmenden Effekt hefehaltiger Drosophila-Zellkulturmedien zu verhindern (33).

Gegenüber den vom Drosophila Genomics Resource Center (DGRC) empfohlenen hefehaltigen Medien wie CCM3 oder M3 ist die Verdopplungszeit der Kc167-Zellen in SDM-Medium geringer und damit die Kulturdauer erhöht, was in unserer Arbeit jedoch ausreichend war.

In zukünftigen spezifischeren Arbeiten könnte der Einfluss der Wachstumsbedingungen, wie das genutzte Medium oder die CO₂-Konzentration der Brutschränke genauer untersucht werden, um so ein optimales Expressionsmodell zur späteren Aufreinigung des humanen Enzyms zu erhalten.

Ein alternatives Modell zur Überexpression der humanen Glutaminsynthetase wurde z.B. von Listrom et al. 1996 beschrieben (59). Die Autoren dieser Arbeit verwendeten *E. Coli* zur Überexpression und Aufreinigung der humanen Glutaminsynthetase.

Trotz der beschriebenen Limitationen der Arbeit sind die Ergebnisse gut verwertbar, da sie eine gute Reproduzierbarkeit zeigen und die genannten Einflüsse für alle untersuchten Zellreihen gleichermaßen gelten. Da die dargestellten Ergebnisse immer im Vergleich zum transfizierten humanen R324-Wildtyp, oder aber der versuchsinternen Kontrolle ausgewertet sind, sind sie trotz möglicher Einflussnahme der Verbindungen im Zelllysate vergleich- und verwertbar.

4.5. Schlussfolgerung und Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Mutation von Arginin nach Serin an Position 324 in der Aminosäuresequenz der humanen Glutaminsynthetase deren Aktivität bis auf ca. 12 % vermindert, aber nicht vollständig inhibiert. Die Ergebnisse lassen weiterhin vermuten, dass die verringerte GS-Aktivität nicht auf eine beeinträchtigte Bindung von Glutamat, sondern von ATP zurück zu führen ist.

Um einen potentiellen aktivitätssteigernden Effekt der in dieser Arbeit verwendeten chemischen Verbindungen 3-chloropropylamine und Chloroacetamide auf die GS zu untersuchen, sollten die bereits durchgeführten Versuche noch einmal am aufgereinigten humanen Enzym wiederholt werden. In Abhängig der hier erhaltenen GS-Proteinmengen könnten alternativ auch sensitivere GS-Aktivitätsassays verwendet werden, welche bereits unter Verwendung wesentlich geringerer Proteinmengen verlässliche Messungen ermöglichen, wie z.B. der Aktivitätsassay nach Seiler et al. 1990 (198) oder die radiometrische Methode nach Minet et al. (139).

Sollte die chemische Stabilisierung des Enzyms durch die oben genannten chemischen Verbindungen gelingen und dadurch die Aktivität der mutierten Glutaminsynthetase gesteigert werden, würde dies potentielle therapeutische Optionen nicht nur für die vergleichsweise seltenen Glutaminsynthetase-Mutationen, sondern möglicherweise auch für andere Enzymdefekte eröffnen.

5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über homozygote Mutationen in der humanen GS	18
Tabelle 2: Übersicht über heterozygote Mutationen und Deletionen der humanen GS.....	18
Tabelle 3: In dieser Arbeit genutzte Chemikalien.....	28
Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien	29
Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Geräte.....	30
Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete molekularbiologische Kits	30
Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Primärantikörper	31
Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Sekundärantikörper.....	31
Tabelle 9: Oligonukleotide.....	32
Tabelle 10: Vektoren zur Klonierung und Transfektion	32
Tabelle 11: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien.....	32
Tabelle 12 Zusammensetzung der Lösungen zur Herstellung der PAA Gele.....	42

6 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Quartärstruktur der humanen Glutaminsynthetase	2
Abb. 2 Organisation der Ammoniakentgiftung in der Leber	4
Abb. 3 Schematische Darstellung der Pathophysiologie der GS-Defizienz im Gehirn	7
Abb. 4 Die physiologische Reaktion der Glutaminsynthetase	12
Abb. 5 Die Hydroxylamin-Reaktion der Glutaminsynthetase	14
Abb. 6 Die "Glutamyltransferase"-Reaktion der Glutaminsynthetase	14
Abb. 7 Strukturformeln von Glutamat, Phosphinothricin und Methionin-Sulfoximin	17
Abb. 8 Positionen von R341 und R324 im Strukturmodell der humanen GS.....	25
Abb. 9 Aufbau der Expressionsvektoren für die Klonierung der Glutaminsynthetase	36
Abb. 10 Immunfluoreszenzanalyse der Glutaminsynthetase in Kc167 Zellen	48
Abb. 11: Quantifizierung der Proteinspiegel der Glutaminsynthetase in untransfizierten und in mit humaner GS-transfizierten Kc167-Zellen	50
Abb. 12 Effekte der Glutaminsynthetase-Hemmstoffe MSO und PPT auf die anti-GS- Immunoreaktivität in Proteinlysaten humane GS-überexprimierender Kc167 Zellen	51
Abb. 13 Hemmung der anti-GS-Immunoreaktivität im Dot-Blot durch MSO in Proteinlysaten R324-WT GS und R324S-MT GS exprimierender Kc167-Zellen	52
Abb. 14: Hemmung der anti-GS-Immunoreaktivität im Dot-Blot durch Behandlung der R324-WT und R324S-MT GS exprimierenden Zellen mit MSO und PPT	54
Abb. 15 Quantifizierung der GS-Proteinspiegel in untransfizierten und mit humaner R324- Wildtyp-GS und R324S-mutierter GS exprimierender Kc167-Zellen	55
Abb. 16 ATP-Bindung der R324-WT GS und R324S-MT GS.....	56
Abb. 17 Glutaminsynthetase Aktivität in Proteinlysaten aus untransfizierten Kc167 Zellen und R324- WT GS und R324S-MT GS exprimierenden Kc167-Zellen.....	57
Abb. 18 Relative GS-Aktivität in Proteinlysaten R324S MT-GS transfizierter Zellen im Vergleich zu R324 WT-GS exprimierenden Kc167-Zellen.	58
Abb. 19 Effekte der Hemmstoffe MSO und PPT auf die Aktivität der GS im humanen R324-WT und der humanen R324S-Mutante der Glutaminsynthetase	59
Abb. 20: Effekte von Betain auf die GS Aktivität der R324-WT und R324S-MT GS.....	60
Abb. 21 Effekte selektierter chemischer Verbindungen auf die Glutaminsynthetase- Aktivität der R324-WT und R324S-MT Glutaminsynthetase	62

7 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Krajewski WW, Collins R, Holmberg-Schiavone L, Jones TA, Karlberg T, Mowbray SL. Crystal structures of mammalian glutamine synthetases illustrate substrate-induced conformational changes and provide opportunities for drug and herbicide design. **J Mol Biol** 2008; 375: 217-228. DOI:10.1016/j.jmb.2007.10.029
2. Kumada Y, Benson DR, Hillemann D, Hosted TJ, Rochefort DA, Thompson CJ, Wohlleben W, Tateno Y. Evolution of the glutamine synthetase gene, one of the oldest existing and functioning genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 1993; 90: 3009-3013. DOI:doi:10.1073/pnas.90.7.3009
3. Meister A. Glutamine Synthetase of Mammals. In: Boyer PD, editor. *The Enzymes*. 10: Academic Press; 1974. p. 699-754.
4. Meister A, editor *Enzymology of Glutamine. Glutamine Metabolism in Mammalian Tissues*; 1984 1984//; Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
5. Häussinger D. Nitrogen metabolism in liver: structural and functional organization and physiological relevance. **Biochem J** 1990; 267: 281-290. DOI:10.1042/bj2670281
6. Suárez I, Bodega G, Fernández B. Glutamine synthetase in brain: effect of ammonia. **Neurochem Int** 2002; 41: 123-142. DOI:10.1016/s0197-0186(02)00033-5
7. Prusiner SB, Stadtman ER. *The Enzymes of glutamine metabolism*. 1973.
8. Deuel TF, Louie M, Lerner A. Glutamine synthetase from rat liver. Purification, properties, and preparation of specific antisera. **J Biol Chem** 1978; 253: 6111-6118. DOI:10.1016/s0021-9258(17)34587-8
9. Neidle A, Waelsch H. The Origin of the Imidazole Ring of Histidine in Escherichia coli. **Journal of Biological Chemistry** 1959; 234: 586-591. DOI:10.1016/S0021-9258(18)70250-0
10. Anand AC, Acharya SK. The Story of Ammonia in Liver Disease: An Unraveling Continuum. **J Clin Exp Hepatol** 2024; 14: 101361. DOI:10.1016/j.jceh.2024.101361
11. Bromberg PA, Robin ED, Forkner CE, Jr. The existence of ammonia in blood in vivo with observations on the significance of the NH₄ plus minus NH₃ system. **J Clin Invest** 1960; 39: 332-341. DOI:10.1172/jci104044
12. Häussinger D. Regulation of hepatic ammonia metabolism: the intercellular glutamine cycle. **Adv Enzyme Regul** 1986; 25: 159-180. DOI:10.1016/0065-2571(86)90013-0
13. Häussinger D. Liver glutamine metabolism. **JPEN J Parenter Enteral Nutr** 1990; 14: 56s-62s. DOI:10.1177/014860719001400405
14. Häussinger D, Stehle T. Hepatocyte heterogeneity in response to icosanoids. The perivenous scavenger cell hypothesis. **Eur J Biochem** 1988; 175: 395-403. DOI:10.1111/j.1432-1033.1988.tb14209.x

15. Yamamoto H, Konno H, Yamamoto T, Ito K, Mizugaki M, Iwasaki Y. Glutamine synthetase of the human brain: purification and characterization. **J Neurochem** 1987; 49: 603-609. DOI:10.1111/j.1471-4159.1987.tb02906.x
16. Norenberg MD, Martinez-Hernandez A. Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. **Brain Res** 1979; 161: 303-310. DOI:10.1016/0006-8993(79)90071-4
17. Goldberg AL, Chang TW. Regulation and significance of amino acid metabolism in skeletal muscle. **Fed Proc** 1978; 37: 2301-2307.
18. Ganda OP, Ruderman NB. Muscle nitrogen metabolism in chronic hepatic insufficiency. **Metabolism** 1976; 25: 427-435. DOI:10.1016/0026-0495(76)90075-5
19. Verlander JW, Chu D, Lee HW, Handlogten ME, Weiner ID. Expression of glutamine synthetase in the mouse kidney: localization in multiple epithelial cell types and differential regulation by hypokalemia. **Am J Physiol Renal Physiol** 2013; 305: F701-713. DOI:10.1152/ajprenal.00030.2013
20. Häussinger D, Sies H, Gerok W. Functional hepatocyte heterogeneity in ammonia metabolism. The intercellular glutamine cycle. **J Hepatol** 1985; 1: 3-14. DOI:10.1016/s0168-8278(85)80063-5
21. Eisenberg D, Gill HS, Pfluegl GMU, Rotstein SH. Structure – function relationships of glutamine synthetases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology** 2000; 1477: 122-145. DOI:10.1016/s0167-4838(99)00270-8
22. Cooper AJ, Jeitner TM. Central Role of Glutamate Metabolism in the Maintenance of Nitrogen Homeostasis in Normal and Hyperammonemic Brain. **Biomolecules** 2016; 6. DOI:10.3390/biom6020016
23. Schrock H, Goldstein L. Interorgan relationships for glutamine metabolism in normal and acidotic rats. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism** 1981; 240: E519-E525. DOI:10.1152/ajpendo.1981.240.5.E519
24. Häussinger D, Gerok W, Sies H. The effect of urea synthesis on extracellular pH in isolated perfused rat liver. **Biochem J** 1986; 236: 261-265. DOI:10.1042/bj2360261
25. Oliver J, Koelz AM, Costello J, Bourke E. Acid-base induced alterations in glutamine metabolism and ureogenesis in perfused muscle and liver of the rat. **European Journal of Clinical Investigation** 1977; 7: 445-449. DOI:10.1111/j.1365-2362.1977.tb01632.x
26. Bott AJ, Maimouni S, Zong WX. The Pleiotropic Effects of Glutamine Metabolism in Cancer. **Cancers** 2019; 11: 770. DOI:10.3390/cancers11060770
27. Rhoads JM, Argenzio RA, Chen W, Graves LM, Licato LL, Blikslager AT, Smith J, Gatzky J, Brenner DA. Glutamine metabolism stimulates intestinal cell MAPKs by a cAMP-inhibitable, Raf-independent mechanism. **Gastroenterology** 2000; 118: 90-100. DOI:10.1016/s0016-5085(00)70417-3

28. Fumarola C, Zerbini A, Guidotti GG. Glutamine deprivation-mediated cell shrinkage induces ligand-independent CD95 receptor signaling and apoptosis. **Cell Death Differ** 2001; 8: 1004-1013. DOI:10.1038/sj.cdd.4400902
29. Eelen G, Dubois C, Cantelmo AR, Goveia J, Brüning U, DeRan M, Jarugumilli G, van Rijssel J, Saladino G, Comitani F, Zecchin A, Rocha S, Chen R, Huang H, Vandekeere S, Kalucka J, Lange C, Morales-Rodriguez F, Cruys B, Treps L, Ramer L, Vinckier S, Brepoels K, Wyns S, Souffreau J, Schoonjans L, Lamers WH, Wu Y, Haustraete J, Hofkens J, Liekens S, Cubbon R, Ghesquière B, Dewerchin M, Gervasio FL, Li X, van Buul JD, Wu X, Carmeliet P. Role of glutamine synthetase in angiogenesis beyond glutamine synthesis. **Nature** 2018; 561: 63-69. DOI:10.1038/s41586-018-0466-7
30. Palmieri EM, Menga A, Lebrun A, Hooper DC, Butterfield DA, Mazzone M, Castegna A. Blockade of Glutamine Synthetase Enhances Inflammatory Response in Microglial Cells. **Antioxid Redox Signal** 2017; 26: 351-363. DOI:10.1089/ars.2016.6715
31. Bode JG, Peters-Regehr T, Kubitz R, Häussinger D. Expression of glutamine synthetase in macrophages. **J Histochem Cytochem** 2000; 48: 415-422. DOI:10.1177/002215540004800311
32. Ardawi MS, Newsholme EA. Glutamine metabolism in lymphocytes of the rat. **Biochem J** 1983; 212: 835-842. DOI:10.1042/bj2120835
33. Woolfolk CA, Shapiro B, Stadtman ER. Regulation of glutamine synthetase. I. Purification and properties of glutamine synthetase from *Escherichia coli*. **Arch Biochem Biophys** 1966; 116: 177-192. DOI:10.1016/0003-9861(66)90026-9
34. Helou K, Das AT, Lamers WH, Hoovers JM, Szpirer C, Szpirer J, Klinga-Levan K, Levan G. FISH mapping of three ammonia metabolism genes (Glul, Cps1, Glud1) in rat, and the chromosomal localization of GLUL in human and Cps1 in mouse. **Mamm Genome** 1997; 8: 362-364. DOI:10.1007/s003359900442
35. Wang Y, Kudoh J, Kubota R, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N. Chromosomal mapping of a family of human glutamine synthetase genes: functional gene (GLUL) on 1q25, pseudogene (GLULP) on 9p13, and three related genes (GLULL1, GLULL2, GLULL3) on 5q33, 11p15, and 11q24. **Genomics** 1996; 37: 195-199. DOI:10.1006/geno.1996.0542
36. Clancy KP, Berger R, Cox M, Bleskan J, Walton KA, Hart I, Patterson D. Localization of the L-glutamine synthetase gene to chromosome 1q23. **Genomics** 1996; 38: 418-420. DOI:10.1006/geno.1996.0645
37. Vitali T, Vanoni MA, Bellosta P. Quantitation of Glutamine Synthetase 1 Activity in *Drosophila melanogaster*. **Methods Mol Biol** 2023; 2675: 237-260. DOI:10.1007/978-1-0716-3247-5_18
38. Tumani H, Shen GQ, Peter JB. Purification and immunocharacterization of human brain glutamine synthetase and its detection in cerebrospinal fluid and serum by a sandwich enzyme immunoassay. **J Immunol Methods** 1995; 188: 155-163. DOI:10.1016/0022-1759(95)00215-4
39. Frieg B, Homeyer N, Häussinger D, Gohlke H. Glutamine synthetase mutations that cause glutamine deficiency: mechanistic insights from molecular dynamics

- simulations. **European Journal of Medical Research** 2014; 19: S15. DOI:10.1186/2047-783x-19-S1-S15
40. Frieg B, Görg B, Homeyer N, Keitel V, Häussinger D, Gohlke H. Molecular Mechanisms of Glutamine Synthetase Mutations that Lead to Clinically Relevant Pathologies. **PLoS Comput Biol** 2016; 12: e1004693. DOI:10.1371/journal.pcbi.1004693
 41. Almasy RJ, Janson CA, Hamlin R, Xuong NH, Eisenberg D. Novel subunit-subunit interactions in the structure of glutamine synthetase. **Nature** 1986; 323: 304-309. DOI:10.1038/323304a0
 42. Woolfolk CA, Stadtman ER. Regulation of glutamine synthetase: III. Cumulative feedback inhibition of glutamine synthetase from *Escherichia coli*. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 1967; 118: 736-755. DOI:10.1016/0003-9861(67)90412-2
 43. Gebhardt R, Mecke D, editors. Cellular Distribution and Regulation of Glutamine Synthetase in Liver. Glutamine Metabolism in Mammalian Tissues; 1984 1984//; Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
 44. Gebhardt R, Schmid H, Fitzke H. Immunohistochemical localization of glutamine synthetase in human liver. **Experientia** 1989; 45: 137-139. DOI:10.1007/BF01954848
 45. Häussinger D. Hepatocyte heterogeneity in glutamine and ammonia metabolism and the role of an intercellular glutamine cycle during ureogenesis in perfused rat liver. **Eur J Biochem** 1983; 133: 269-275. DOI:10.1111/j.1432-1033.1983.tb07458.x
 46. Häussinger D. Hepatic glutamine metabolism. **Beitr Infusionther Klin Ernähr** 1987; 17: 144-157.
 47. Smith DDJ, Campbell JW. Distribution of glutamine synthetase and carbamoyl-phosphate synthetase I in vertebrate liver. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1988; 85: 160-164. DOI:10.1073/pnas.85.1.160
 48. Moorman AF, Vermeulen JL, Charles R, Lamers WH. Localization of ammonia-metabolizing enzymes in human liver: ontogenesis of heterogeneity. **Hepatology** 1989; 9: 367-372. DOI:10.1002/hep.1840090305
 49. Gaunitz F, Deichsel D, Heise K, Werth M, Anderegg U, Gebhardt R. An intronic silencer element is responsible for specific zonal expression of glutamine synthetase in the rat liver. **Hepatology** 2005; 41: 1225-1232. DOI:10.1002/hep.20710
 50. Häussinger D, Sies H. Hepatic Glutamine Metabolism under the Influence of the Portal Ammonia Concentration in the Perfused Rat Liver. **European Journal of Biochemistry** 1979; 101: 179-184. DOI:10.1111/j.1432-1033.1979.tb04230.x
 51. Watford M. Glutamine and Glutamate Metabolism across the Liver Sinusoid. **The Journal of Nutrition** 2000; 130: 983S-987S. DOI:10.1093/jn/130.4.983S
 52. Watford M, Chellaraj V, Ismat A, Brown P, Raman P. Hepatic glutamine metabolism. **Nutrition** 2002; 18: 301-303. DOI:10.1016/S0899-9007(02)00739-6

53. Häussinger D, Gerok W, Sies H. Regulation of flux through glutaminase and glutamine synthetase in isolated perfused rat liver. **Biochim Biophys Acta** 1983; 755: 272-278. DOI:10.1016/0304-4165(83)90214-3
54. Häussinger D, Gerok W, Sies H. Hepatic role in pH regulation: role of the intercellular glutamine cycle. **Trends in Biochemical Sciences** 1984; 9: 300-302. DOI:10.1016/0968-0004(84)90294-9
55. Watford M, Smith EM. Distribution of hepatic glutaminase activity and mRNA in perivenous and periportal rat hepatocytes. **Biochem J** 1990; 267: 265-267. DOI:10.1042/bj2670265
56. Frieg B, Görg B, Gohlke H, Häussinger D. Glutamine synthetase as a central element in hepatic glutamine and ammonia metabolism: novel aspects. **Biol Chem** 2021; 402: 1063-1072. DOI:10.1515/hsz-2021-0166
57. Bennett J, Gilkes C, Klassen K, Kerr M, Khan A. Two Siblings With Valproate-Related Hyperammonemia and Novel Mutations in Glutamine Synthetase (GLUL) Treated With Carglumic Acid. **Child Neurol Open** 2020; 7: 2329048x20967880. DOI:10.1177/2329048x20967880
58. Kaiser S, Gerok W, Häussinger D. Ammonia and glutamine metabolism in human liver slices: new aspects on the pathogenesis of hyperammonaemia in chronic liver disease. **Eur J Clin Invest** 1988; 18: 535-542. DOI:10.1111/j.1365-2362.1988.tb01053.x
59. Listrom CD, Morizono H, Rajagopal BS, McCann MT, Tuchman M, Allewell NM. Expression, purification, and characterization of recombinant human glutamine synthetase. **Biochem J** 1997; 328: 159-163. DOI:10.1042/bj3280159
60. Häussinger D, Gerok W. Hepatocyte heterogeneity in glutamate uptake by isolated perfused rat liver. **Eur J Biochem** 1983; 136: 421-425. DOI:10.1111/j.1432-1033.1983.tb07759.x
61. Häussinger D, Stoll B, Stehle T, Gerok W. Hepatocyte heterogeneity in glutamate metabolism and bidirectional transport in perfused rat liver. **Eur J Biochem** 1989; 185: 189-195. DOI:10.1111/j.1432-1033.1989.tb15101.x
62. Soboll S, Elbers R, Scholz R, Heldt HW. Subcellular distribution of di- and tricarboxylates and pH gradients in perfused rat liver. **Hoppe Seylers Z Physiol Chem** 1980; 361: 69-76. DOI:10.1515/bchm2.1980.361.1.69
63. Häussinger D. Hepatic glutamine transport and metabolism. **Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol** 1998; 72: 43-86. DOI:10.1002/9780470123188.ch3
64. Qvartrkhava N, Lang PA, Görg B, Pozdeev VI, Ortiz MP, Lang KS, Bidmon HJ, Lang E, Leibrock CB, Herebian D, Bode JG, Lang F, Häussinger D. Hyperammonemia in gene-targeted mice lacking functional hepatic glutamine synthetase. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2015; 112: 5521-5526. DOI:10.1073/pnas.1423968112
65. Häussinger D, Gerok W. Hepatocyte heterogeneity in ammonia metabolism: impairment of glutamine synthesis in CCl₄ induced liver cell necrosis with no effect

- on urea synthesis. **Chem Biol Interact** 1984; 48: 191-194. DOI:10.1016/0009-2797(84)90120-0
66. Häussinger D, Schliess F. Glutamine metabolism and signaling in the liver. **Front Biosci** 2007; 12: 371-391. DOI:10.2741/2070
67. Häussinger D. Organization of hepatic nitrogen metabolism and its relation to acid-base homeostasis. **Klinische Wochenschrift** 1990; 68: 1096-1101. DOI:10.1007/BF01798059
68. Atkinson DE, Bourke E. Metabolic aspects of the regulation of systemic pH. **Am J Physiol** 1987; 252: F947-956. DOI:10.1152/ajprenal.1987.252.6.F947
69. Atkinson DE, Camien MN. The role of urea synthesis in the removal of metabolic bicarbonate and the regulation of blood pH. **Curr Top Cell Regul** 1982; 21: 261-302. DOI:10.1016/b978-0-12-152821-8.50014-1
70. Atkinson DE, Bourke E. The role of ureagenesis in pH homeostasis. **Trends in Biochemical Sciences** 1984; 9: 297-300. DOI:10.1016/0968-0004(84)90293-7
71. Bean ES, Atkinson DE. Regulation of the rate of urea synthesis in liver by extracellular pH. A major factor in pH homeostasis in mammals. **J Biol Chem** 1984; 259: 1552-1559.
72. Häberle J, Görg B, Toutain A, Rutsch F, Benoist JF, Gelot A, Suc AL, Koch HG, Schliess F, Häussinger D. Inborn error of amino acid synthesis: human glutamine synthetase deficiency. **J Inherit Metab Dis** 2006; 29: 352-358. DOI:10.1007/s10545-006-0256-5
73. Albrecht J. Ammonia Toxicity in the Central Nervous Systems. In: Lajtha A, Oja SS, Schousboe A, Saransaari P, editors. Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Amino Acids and Peptides in the Nervous System. New York, NY: Springer US; 2007. p. 261-276.
74. Adlimoghaddam A, Sabbir MG, Albensi BC. Ammonia as a Potential Neurotoxic Factor in Alzheimer's Disease. **Front Mol Neurosci** 2016; 9: 57. DOI:10.3389/fnmol.2016.00057
75. Norenberg MD. Distribution of glutamine synthetase in the rat central nervous system. **J Histochem Cytochem** 1979; 27: 756-762. DOI:10.1177/27.3.39099
76. Liaw SH, Kuo I, Eisenberg D. Discovery of the ammonium substrate site on glutamine synthetase, a third cation binding site. **Protein Sci** 1995; 4: 2358-2365. DOI:10.1002/pro.5560041114
77. Campolo N, Mastrogiovanni M, Mariotti M, Issoglio FM, Estrin D, Häggglund P, Grune T, Davies MJ, Bartesaghi S, Radi R. Multiple oxidative post-translational modifications of human glutamine synthetase mediate peroxynitrite-dependent enzyme inactivation and aggregation. **J Biol Chem** 2023; 299: 102941. DOI:10.1016/j.jbc.2023.102941

78. Todd AC, Hardingham GE. The Regulation of Astrocytic Glutamate Transporters in Health and Neurodegenerative Diseases. **Int J Mol Sci** 2020; 21: 24. DOI:10.3390/ijms21249607
79. Castegna A, Menga A. Glutamine Synthetase: Localization Dictates Outcome. **Genes (Basel)** 2018; 9: 108. DOI:10.3390/genes9020108
80. Zhou Y, Eid T, Hassel B, Danbolt NC. Novel aspects of glutamine synthetase in ammonia homeostasis. **Neurochem Int** 2020; 140: 104809. DOI:10.1016/j.neuint.2020.104809
81. Castell DO, Moore EW. Ammonia absorption from the human colon. The role of nonionic diffusion. **Gastroenterology** 1971; 60: 33-42. DOI:10.1016/S0016-5085(71)80004-5
82. Kelly T, Kafitz KW, Roderigo C, Rose CR. Ammonium-evoked alterations in intracellular sodium and pH reduce glial glutamate transport activity. **Glia** 2009; 57: 921-934. DOI:10.1002/glia.20817
83. Häberle J, Shahbeck N, Ibrahim K, Schmitt B, Scheer I, O'Gorman R, Chaudhry FA, Ben-Omran T. Glutamine supplementation in a child with inherited GS deficiency improves the clinical status and partially corrects the peripheral and central amino acid imbalance. **Orphanet J Rare Dis** 2012; 7: 48. DOI:10.1186/1750-1172-7-48
84. Görg B, Bidmon HJ, Häussinger D. Gene expression profiling in the cerebral cortex of patients with cirrhosis with and without hepatic encephalopathy. **Hepatology** 2013; 57: 2436-2447. DOI:10.1002/hep.26265
85. Brusilow SW, Koehler RC, Traystman RJ, Cooper AJ. Astrocyte glutamine synthetase: importance in hyperammonemic syndromes and potential target for therapy. **Neurotherapeutics** 2010; 7: 452-470. DOI:10.1016/j.nurt.2010.05.015
86. Jayakumar AR, Norenberg MD. Glutamine Synthetase: Role in Neurological Disorders. **Adv Neurobiol** 2016; 13: 327-350. DOI:10.1007/978-3-319-45096-4_13
87. Derouiche A, Ohm TG. Glutamine synthetase immunoreactivity in the human hippocampus is lamina-specific. **Neuroscience Letters** 1994; 165: 179-182. DOI:10.1016/0304-3940(94)90739-0
88. Robinson SR. Neuronal expression of glutamine synthetase in Alzheimer's disease indicates a profound impairment of metabolic interactions with astrocytes. **Neurochem Int** 2000; 36: 471-482. DOI:10.1016/s0197-0186(99)00150-3
89. Matias I, Diniz LP, Araujo APB, Damico IV, de Moura P, Cabral-Miranda F, Diniz F, Parmeggiani B, de Mello Coelho V, Leite REP, Suemoto CK, Ferreira GC, Kubrusly RCC, Gomes FCA. Age-Associated Upregulation of Glutamate Transporters and Glutamine Synthetase in Senescent Astrocytes In Vitro and in the Mouse and Human Hippocampus. **ASN Neuro** 2023; 15: 17590914231157974. DOI:10.1177/17590914231157974
90. Görg B, Qvartskhava N, Bidmon HJ, Palomero-Gallagher N, Kircheis G, Zilles K, Häussinger D. Oxidative stress markers in the brain of patients with cirrhosis and hepatic encephalopathy. **Hepatology** 2010; 52: 256-265. DOI:10.1002/hep.23656

91. Bidmon HJ, Görg B, Palomero-Gallagher N, Schleicher A, Häussinger D, Speckmann EJ, Zilles K. Glutamine synthetase becomes nitrated and its activity is reduced during repetitive seizure activity in the pentylentetrazole model of epilepsy. **Epilepsia** 2008; 49: 1733-1748. DOI:10.1111/j.1528-1167.2008.01642.x
92. Häussinger D, Görg B, Reinehr R, Schliess F. Protein tyrosine nitration in hyperammonemia and hepatic encephalopathy. **Metab Brain Dis** 2005; 20: 285-294. DOI:10.1007/s11011-005-7908-2
93. Eid T, Thomas MJ, Spencer DD, Rundén-Pran E, Lai JC, Malthankar GV, Kim JH, Danbolt NC, Ottersen OP, de Lanerolle NC. Loss of glutamine synthetase in the human epileptogenic hippocampus: possible mechanism for raised extracellular glutamate in mesial temporal lobe epilepsy. **Lancet** 2004; 363: 28-37. DOI:10.1016/s0140-6736(03)15166-5
94. Petroff OA, Errante LD, Rothman DL, Kim JH, Spencer DD. Glutamate-glutamine cycling in the epileptic human hippocampus. **Epilepsia** 2002; 43: 703-710. DOI:10.1046/j.1528-1157.2002.38901.x
95. Häussinger D, Laubenberger J, vom Dahl S, Ernst T, Bayer S, Langer M, Gerok W, Hennig J. Proton magnetic resonance spectroscopy studies on human brain myoinositol in hypoosmolarity and hepatic encephalopathy. **Gastroenterology** 1994; 107: 1475-1480. DOI:10.1016/0016-5085(94)90552-5
96. Häussinger D, Dhiman RK, Felipo V, Görg B, Jalan R, Kircheis G, Merli M, Montagnese S, Romero-Gomez M, Schnitzler A, Taylor-Robinson SD, Vilstrup H. Hepatic encephalopathy. **Nat Rev Dis Primers** 2022; 8: 43. DOI:10.1038/s41572-022-00366-6
97. Butterworth RF. Effects of hyperammonaemia on brain function. **Journal of Inherited Metabolic Disease** 1998; 21: 6-20. DOI:10.1023/A:1005393104494
98. Spodenkiewicz M, Diez-Fernandez C, Rufenacht V, Gemperle-Britschgi C, Häberle J. Minireview on Glutamine Synthetase Deficiency, an Ultra-Rare Inborn Error of Amino Acid Biosynthesis. **Biology (Basel)** 2016; 5: 40. DOI:10.3390/biology5040040
99. Gropman AL, Batshaw ML. Cognitive outcome in urea cycle disorders. **Mol Genet Metab** 2004; 81 Suppl 1: S58-62. DOI:10.1016/j.ymgme.2003.11.016
100. Solbu TT, Boulland JL, Zahid W, Lyamouri Bredahl MK, Amiry-Moghaddam M, Storm-Mathisen J, Roberg BA, Chaudhry FA. Induction and targeting of the glutamine transporter SN1 to the basolateral membranes of cortical kidney tubule cells during chronic metabolic acidosis suggest a role in pH regulation. **J Am Soc Nephrol** 2005; 16: 869-877. DOI:10.1681/ASN.2004060433
101. Tannen RL. Ammonia and Acid-Base Homeostasis. **Medical Clinics of North America** 1983; 67: 781-798. DOI:10.1016/S0025-7125(16)31177-4
102. Curthoys NP. Role of Mitochondrial Glutaminase in Rat Renal Glutamine Metabolism. **The Journal of Nutrition** 2001; 131: 2491S-2495S. DOI:10.1093/jn/131.9.2491S

103. Pitts RF. The Role of Ammonia Production and Excretion in Regulation of Acid-Base Balance. **New England Journal of Medicine** 1971; 284: 32-38. DOI:doi:10.1056/NEJM197101072840110
104. Ruderman NB, Berger M. The Formation of Glutamine and Alanine in Skeletal Muscle. **Journal of Biological Chemistry** 1974; 249: 5500-5506. DOI:10.1016/S0021-9258(20)79756-5
105. Welbourne TC. Hepatic glutaminase flux regulation of glutamine homeostasis. Studies in vivo. **Biol Chem Hoppe Seyler** 1986; 367: 301-305. DOI:10.1515/bchm3.1986.367.1.301
106. Addae S, Lotspeich W. Relation between glutamine utilization and production in metabolic acidosis. **American Journal of Physiology-Legacy Content** 1968; 215: 269-277. DOI:10.1152/ajplegacy.1968.215.2.269
107. Lee HW, Osis G, Handlogten ME, Lamers WH, Chaudhry FA, Verlander JW, Weiner ID. Proximal tubule-specific glutamine synthetase deletion alters basal and acidosis-stimulated ammonia metabolism. **Am J Physiol Renal Physiol** 2016; 310: F1229-1242. DOI:10.1152/ajprenal.00547.2015
108. He Y, Hakvoort T, Koehler S, Vermeulen J, de Waart R, Theije C, Have G, Eijk H, Kunne C, Labruyère W, Houten S, Sokolović M, Ruijter J, Deutz N, Lamers W. Glutamine Synthetase in Muscle Is Required for Glutamine Production during Fasting and Extrahepatic Ammonia Detoxification. **The Journal of biological chemistry** 2010; 285: 9516-9524. DOI:10.1074/jbc.M109.092429
109. Kieler M, Hofmann M, Schabbauer G. More than just protein building blocks: how amino acids and related metabolic pathways fuel macrophage polarization. **Febs j** 2021; 288: 3694-3714. DOI:10.1111/febs.15715
110. Zhao JS, Shi S, Qu HY, Keckesova Z, Cao ZJ, Yang LX, Yu X, Feng L, Shi Z, Krakowiak J, Mao RY, Shen YT, Fan YM, Fu TM, Ye C, Xu D, Gao X, You J, Li W, Liang T, Lu Z, Feng YX. Glutamine synthetase licenses APC/C-mediated mitotic progression to drive cell growth. **Nat Metab** 2022; 4: 239-253. DOI:10.1038/s42255-021-00524-2
111. Owji AP, Yu K, Kittredge A, Wang J, Zhang Y, Yang T. Bestrophin-2 and glutamine synthetase form a complex for glutamate release. **Nature** 2022; 611: 180-187. DOI:10.1038/s41586-022-05373-x
112. Tecson MCB, Geluz C, Cruz Y, Greene ER. Glutamine Synthetase: Diverse Regulation and Functions of an Ancient Enzyme. **Biochemistry** 2025; 64: 547-554. DOI:10.1021/acs.biochem.4c00763
113. Häberle J, Görg B, Rutsch F, Schmidt E, Toutain A, Benoist JF, Gelot A, Suc AL, Höhne W, Schliess F, Häussinger D, Koch HG. Congenital glutamine deficiency with glutamine synthetase mutations. **N Engl J Med** 2005; 353: 1926-1933. DOI:10.1056/NEJMoa050456
114. Battaglia FC. Glutamine and glutamate exchange between the fetal liver and the placenta. **J Nutr** 2000; 130: 974s-977s. DOI:10.1093/jn/130.4.974S

115. Self JT, Spencer TE, Johnson GA, Hu J, Bazer FW, Wu G. Glutamine synthesis in the developing porcine placenta. **Biol Reprod** 2004; 70: 1444-1451. DOI:10.1095/biolreprod.103.025486
116. He Y, Hakvoort TB, Vermeulen JL, Lamers WH, Van Roon MA. Glutamine synthetase is essential in early mouse embryogenesis. **Dev Dyn** 2007; 236: 1865-1875. DOI:10.1002/dvdy.21185
117. He Y, Hakvoort TB, Vermeulen JL, Labruyère WT, De Waart DR, Van Der Hel WS, Ruijter JM, Uylings HB, Lamers WH. Glutamine synthetase deficiency in murine astrocytes results in neonatal death. **Glia** 2010; 58: 741-754. DOI:10.1002/glia.20960
118. Caggese C, Barsanti P, Viggiano L, Bozzetti MP, Caizzi R. Genetic, molecular and developmental analysis of the glutamine synthetase isozymes of *Drosophila melanogaster*. **Genetica** 1994; 94: 275-281. DOI:10.1007/bf01443441
119. Vermeulen T, Görg B, Vogl T, Wolf M, Varga G, Toutain A, Paul R, Schliess F, Häussinger D, Häberle J. Glutamine synthetase is essential for proliferation of fetal skin fibroblasts. **Arch Biochem Biophys** 2008; 478: 96-102. DOI:10.1016/j.abb.2008.07.009
120. Roifman M, Niles KM, MacNeil L, Blaser S, Noor A, Godoy R, van Miegheem T, Ryan G, Seaward G, Sondheimer N, Mercimek-Andrews S, Schulze A, Hewson S, Ovadia A, Chitayat D, Morgen EK, Hojilla C, Kolomietz E, Watkins N, Häberle J, Shannon P. Homozygous GLUL deletion is embryonically viable and leads to glutamine synthetase deficiency. **Clin Genet** 2020; 98: 613-619. DOI:10.1111/cge.13844
121. Häberle J, Shahbeck N, Ibrahim K, Hoffmann GF, Ben-Omran T. Natural course of glutamine synthetase deficiency in a 3 year old patient. **Mol Genet Metab** 2011; 103: 89-91. DOI:10.1016/j.ymgme.2011.02.001
122. Battaglia FC, Regnault TR. Placental transport and metabolism of amino acids. **Placenta** 2001; 22: 145-161. DOI:10.1053/plac.2000.0612
123. Mackenzie B, Erickson JD. Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family. **Pflugers Arch** 2004; 447: 784-795. DOI:10.1007/s00424-003-1117-9
124. Harding BN, Leonard JV, Erdohazi M. Ornithine carbamoyl transferase deficiency: a neuropathological study. **Eur J Pediatr** 1984; 141: 215-220. DOI:10.1007/bf00572763
125. Braissant O, McLin VA, Cudalbu C. Ammonia toxicity to the brain. **J Inherit Metab Dis** 2013; 36: 595-612. DOI:10.1007/s10545-012-9546-2
126. Maurizi MR, Pinkofsky HB, Ginsburg A. ADP, chloride ion, and metal ion binding to bovine brain glutamine synthetase. **Biochemistry** 1987; 26: 5023-5031. DOI:10.1021/bi00390a021
127. Wu C. Glutamine synthetase. Purification and characterization of the enzyme from sheep spleen. **Can J Biochem** 1977; 55: 332-339. DOI:10.1139/o77-046

128. Meister A. The Specificity of Glutamine Synthetase and Its Relationship to Substrate Conformation at the Active Site. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* 1968; p. 183-218.
129. Liaw SH, Eisenberg D. Structural model for the reaction mechanism of glutamine synthetase, based on five crystal structures of enzyme-substrate complexes. **Biochemistry** 1994; 33: 675-681. DOI:10.1021/bi00169a007
130. Eads CD, Villafranca JJ. Interaction among substrates, inhibitors and Mn²⁺ bound to glutamine synthetase as studied by NMR relaxation rate measurements. **Arch Biochem Biophys** 1987; 252: 382-387. DOI:10.1016/0003-9861(87)90044-0
131. Moreira C, Ramos MJ, Fernandes PA. Clarifying the Catalytic Mechanism of Human Glutamine Synthetase: A QM/MM Study. **J Phys Chem B** 2017; 121: 6313-6320. DOI:10.1021/acs.jpcc.7b02543
132. Liaw SH, Villafranca JJ, Eisenberg D. A model for oxidative modification of glutamine synthetase, based on crystal structures of mutant H269N and the oxidized enzyme. **Biochemistry** 1993; 32: 7999-8003. DOI:10.1021/bi00082a022
133. Hunt JB, Ginsburg A. Mn²⁺ and substrate interactions with glutamine synthetase from *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry** 1980; 255: 590-594. DOI:10.1016/S0021-9258(19)86216-6
134. Krishnaswamy PR, Pamiljans V, Meister A. Studies on the Mechanism of Glutamine Synthesis: Evidence for the Formation of Enzyme-bound Activated Glutamic Acid. **Journal of Biological Chemistry** 1962; 237: 2932-2940. DOI:10.1016/S0021-9258(18)60252-2
135. Colanduoni J, Nissan R, Villafranca JJ. Studies of the mechanism of glutamine synthetase utilizing pH-dependent behavior in catalysis and binding. **J Biol Chem** 1987; 262: 3037-3043.
136. Gill HS, Eisenberg D. The crystal structure of phosphinothricin in the active site of glutamine synthetase illuminates the mechanism of enzymatic inhibition. **Biochemistry** 2001; 40: 1903-1912. DOI:10.1021/bi002438h
137. Webb JT, Brown GW. Some properties and occurrence of glutamine synthetase in fish. **Comp Biochem Physiol B** 1976; 54: 171-175. DOI:10.1016/0305-0491(76)90077-8
138. Wellner VP, Meister A. Binding of adenosine triphosphate and adenosine diphosphate by glutamine synthetase. **Biochemistry** 1966; 5: 872-879. DOI:10.1021/bi00867a010
139. Minet R, Villie F, Marcollet M, Meynial-Denis D, Cynober L. Measurement of glutamine synthetase activity in rat muscle by a colorimetric assay. **Clin Chim Acta** 1997; 268: 121-132. DOI:10.1016/S0009-8981(97)00173-3
140. Shapiro BM, Stadtman ER. Glutamine synthetase (*Escherichia coli*). *Methods in Enzymology*. 17: Academic Press; 1970. p. 910-922.
141. Liaw SH, Pan C, Eisenberg D. Feedback inhibition of fully unadenylylated glutamine synthetase from *Salmonella typhimurium* by glycine, alanine, and serine. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1993; 90: 4996-5000. DOI:10.1073/pnas.90.11.4996

142. Purich DL. Advances in the enzymology of glutamine synthesis. **Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol** 1998; 72: 9-42. DOI:10.1002/9780470123188.ch2
143. Görg B, Bidmon HJ, Keitel V, Foster N, Goerlich R, Schliess F, Häussinger D. Inflammatory cytokines induce protein tyrosine nitration in rat astrocytes. **Arch Biochem Biophys** 2006; 449: 104-114. DOI:10.1016/j.abb.2006.02.012
144. Görg B, Qvartskhava N, Voss P, Grune T, Häussinger D, Schliess F. Reversible inhibition of mammalian glutamine synthetase by tyrosine nitration. **FEBS Lett** 2007; 581: 84-90. DOI:10.1016/j.febslet.2006.11.081
145. Spickett CM, Pitt AR. Protein oxidation: role in signalling and detection by mass spectrometry. **Amino Acids** 2012; 42: 5-21. DOI:10.1007/s00726-010-0585-4
146. Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. **Free Radic Biol Med** 2002; 32: 790-796. DOI:10.1016/s0891-5849(02)00765-7
147. Frieg B, Görg B, Qvartskhava N, Jeitner T, Homeyer N, Häussinger D, Gohlke H. Mechanism of Fully Reversible, pH-Sensitive Inhibition of Human Glutamine Synthetase by Tyrosine Nitration. **J Chem Theory Comput** 2020; 16: 4694-4705. DOI:10.1021/acs.jctc.0c00249
148. Görg B, Wettstein M, Metzger S, Schliess F, Häussinger D. Lipopolysaccharide-induced tyrosine nitration and inactivation of hepatic glutamine synthetase in the rat. **Hepatology** 2005; 41: 1065-1073. DOI:10.1002/hep.20662
149. Schliess F, Görg B, Fischer R, Desjardins P, Bidmon HJ, Herrmann A, Butterworth RF, Zilles K, Häussinger D. Ammonia induces MK-801-sensitive nitration and phosphorylation of protein tyrosine residues in rat astrocytes. **FASEB J** 2002; 16: 739-741. DOI:10.1096/fj.01-0862fje
150. Häussinger D. The role of cellular hydration in the regulation of cell function. **Biochem J** 1996; 313: 697-710. DOI:10.1042/bj3130697
151. Görg B, Qvartskhava N, Keitel V, Bidmon HJ, Selbach O, Schliess F, Häussinger D. Ammonia induces RNA oxidation in cultured astrocytes and brain in vivo. **Hepatology** 2008; 48: 567-579. DOI:10.1002/hep.22345
152. Saitoh F, Araki T. Proteasomal Degradation of Glutamine Synthetase Regulates Schwann Cell Differentiation. **The Journal of Neuroscience** 2010; 30: 1204. DOI:10.1523/JNEUROSCI.3591-09.2010
153. Jeitner TM, Battaile K, Cooper AJL. Critical Evaluation of the Changes in Glutamine Synthetase Activity in Models of Cerebral Stroke. **Neurochemical Research** 2015; 40: 2544-2556. DOI:10.1007/s11064-015-1667-1
154. Rotoli BM, Uggeri J, Dall'Asta V, Visigalli R, Barilli A, Gatti R, Orlandini G, Gazzola GC, Bussolati O. Inhibition of glutamine synthetase triggers apoptosis in asparaginase-resistant cells. **Cell Physiol Biochem** 2005; 15: 281-292. DOI:10.1159/000087238
155. Häussinger D, Sies H. Effect of phenylephrine on glutamate and glutamine metabolism in isolated perfused rat liver. **Biochem J** 1984; 221: 651-658. DOI:10.1042/bj2210651

156. Shapiro BM. Regulation of glutamine synthetase by enzyme catalyzed structural modification. **Angew Chem Int Ed Engl** 1970; 9: 670-678. DOI:10.1002/anie.197006701
157. Gill HS, Pfluegl GMU, Eisenberg D. Multicopy Crystallographic Refinement of a Relaxed Glutamine Synthetase from Mycobacterium tuberculosis Highlights Flexible Loops in the Enzymatic Mechanism and Its Regulation. **Biochemistry** 2002; 41: 9863-9872. DOI:10.1021/bi020254s
158. Berlicki L, Kafarski P. Computer-aided analysis of the interactions of glutamine synthetase with its inhibitors. **Bioorg Med Chem** 2006; 14: 4578-4585. DOI:10.1016/j.bmc.2006.02.022
159. Ronzio RA, Meister A. Phosphorylation of methionine sulfoximine by glutamine synthetase. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1968; 59: 164-170. DOI:10.1073/pnas.59.1.164
160. Rowe WB, Ronzio RA, Meister A. Inhibition of glutamine synthetase by methionine sulfoximine. Studies On Methionine sulfoximine phosphate. **Biochemistry** 1969; 8: 2674-2680. DOI:10.1021/bi00834a065
161. Ronzio RA, Rowe WB, Meister A. Mechanism of inhibition of glutamine synthetase by methionine sulfoximine. **Biochemistry** 1969; 8: 1066-1075. DOI:10.1021/bi00831a038
162. Berlicki L. Inhibitors of glutamine synthetase and their potential application in medicine. **Mini Rev Med Chem** 2008; 8: 869-878. DOI:10.2174/138955708785132800
163. Ünal Ö, Ceylaner S, Akın R. A Very Rare Etiology of Hypotonia and Seizures: Congenital Glutamine Synthetase Deficiency. **Neuropediatrics** 2019; 50: 51-53. DOI:10.1055/s-0038-1675637
164. Hu L, Ibrahim K, Stucki M, Frapolli M, Shahbeck N, Chaudhry FA, Görg B, Häussinger D, Penberthy WT, Ben-Omran T, Häberle J. Secondary NAD⁺ deficiency in the inherited defect of glutamine synthetase. **J Inherit Metab Dis** 2015; 38: 1075-1083. DOI:10.1007/s10545-015-9846-4
165. Watford M. Glutamine metabolism and function in relation to proline synthesis and the safety of glutamine and proline supplementation. **J Nutr** 2008; 138: 2003s-2007s. DOI:10.1093/jn/138.10.2003S
166. Li Z, Lazaridis T. Water at biomolecular binding interfaces. **Phys Chem Chem Phys** 2007; 9: 573-581. DOI:10.1039/b612449f
167. Frieg B, Häussinger D, Gohlke H. Towards Restoring Catalytic Activity of Glutamine Synthetase With a Clinically Relevant Mutation. **NIC Symposium** 2016; 48: pp. 97.
168. Saiki R, Gelfand D, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn G, Mullis K, Erlich H. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science** 1988; 239: 487-491. DOI:10.1126/science.239.4839.487
169. Cherbas L, Willingham A, Zhang D, Yang L, Zou Y, Eads BD, Carlson JW, Landolin JM, Kapranov P, Dumais J, Samsonova A, Choi JH, Roberts J, Davis CA, Tang H,

- van Baren MJ, Ghosh S, Dobin A, Bell K, Lin W, Langton L, Duff MO, Tenney AE, Zaleski C, Brent MR, Hoskins RA, Kaufman TC, Andrews J, Graveley BR, Perrimon N, Celniker SE, Gingeras TR, Cherbas P. The transcriptional diversity of 25 *Drosophila* cell lines. **Genome Res** 2011; 21: 301-314. DOI:10.1101/gr.112961.110
170. Cherbas L, Cherbas P. Transformation of *Drosophila* cell lines: an alternative approach to exogenous protein expression. **Methods Mol Biol** 2007; 388: 317-340. DOI:10.1007/978-1-59745-457-5_16
171. Santos MG, Jorge SA, Brillet K, Pereira CA. Improving heterologous protein expression in transfected *Drosophila* S2 cells as assessed by EGFP expression. **Cytotechnology** 2007; 54: 15-24. DOI:10.1007/s10616-007-9060-9
172. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** 1976; 72: 248-254. DOI:10.1006/abio.1976.9999
173. Norenberg MD, Itzhak Y, Bender AS. The peripheral benzodiazepine receptor and neurosteroids in hepatic encephalopathy. **Adv Exp Med Biol** 1997; 420: 95-111. DOI:10.1007/978-1-4615-5945-0_7
174. Brusilow SW, Horwich AL. Urea Cycle Enzymes. In: Valle DL, Antonarakis S, Ballabio A, Beaudet AL, Mitchell GA, editors. The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2019.
175. Michalak A, Butterworth RF. Ornithine transcarbamylase deficiency: pathogenesis of the cerebral disorder and new prospects for therapy. **Metab Brain Dis** 1997; 12: 171-182. DOI:10.1007/BF02674610
176. Msall M, Batshaw ML, Suss R, Brusilow SW, Mellits ED. Neurologic outcome in children with inborn errors of urea synthesis. Outcome of urea-cycle enzymopathies. **N Engl J Med** 1984; 310: 1500-1505. DOI:10.1056/nejm198406073102304
177. Enns GM. Neurologic Damage and Neurocognitive Dysfunction in Urea Cycle Disorders. **Seminars in Pediatric Neurology** 2008; 15: 132-139. DOI:10.1016/j.spen.2008.05.007
178. Dolman CL, Clasen RA, Dorovini-Zis K. Severe cerebral damage in ornithine transcarbamylase deficiency. **Clin Neuropathol** 1988; 7: 10-15.
179. Filloux F, Townsend JJ, Leonard C. Ornithine transcarbamylase deficiency: Neuropathologic changes acquired in utero. **The Journal of Pediatrics** 1986; 108: 942-945. DOI:10.1016/S0022-3476(86)80935-0
180. Norenberg MD, Rao KVR, Jayakumar AR. Mechanisms of Ammonia-Induced Astrocyte Swelling. **Metabolic Brain Disease** 2005; 20: 303-318. DOI:10.1007/s11011-005-7911-7
181. Norenberg MD, Bender AS. Astrocyte swelling in liver failure: role of glutamine and benzodiazepines. **Acta Neurochir Suppl (Wien)** 1994; 60: 24-27. DOI:10.1007/978-3-7091-9334-1_6

182. Butterworth RF. Pathophysiology of Hepatic Encephalopathy: A New Look at Ammonia. **Metabolic Brain Disease** 2002; 17: 221-227. DOI:10.1023/A:1021989230535
183. Ribas GS, Lopes FF, Deon M, Vargas CR. Hyperammonemia in Inherited Metabolic Diseases. **Cell Mol Neurobiol** 2022; 42: 2593-2610. DOI:10.1007/s10571-021-01156-6
184. Rangroo Thrane V, Thrane AS, Wang F, Cotrina ML, Smith NA, Chen M, Xu Q, Kang N, Fujita T, Nagelhus EA, Nedergaard M. Ammonia triggers neuronal disinhibition and seizures by impairing astrocyte potassium buffering. **Nat Med** 2013; 19: 1643-1648. DOI:10.1038/nm.3400
185. Kosenko E, Venediktova N, Kaminsky Y, Montoliu C, Felipe V. Sources of oxygen radicals in brain in acute ammonia intoxication in vivo. **Brain Res** 2003; 981: 193-200. DOI:10.1016/s0006-8993(03)03035-x
186. Rama Rao KV, Norenberg MD. Brain energy metabolism and mitochondrial dysfunction in acute and chronic hepatic encephalopathy. **Neurochem Int** 2012; 60: 697-706. DOI:10.1016/j.neuint.2011.09.007
187. Kanamori K, Ross BD, Chung JC, Kuo EL. Severity of hyperammonemic encephalopathy correlates with brain ammonia level and saturation of glutamine synthetase in vivo. **J Neurochem** 1996; 67: 1584-1594. DOI:10.1046/j.1471-4159.1996.67041584.x
188. Cherbas P, Cherbas L, Lee SS, Nakanishi K. 26-[125I]iodoponasterone A is a potent ecdysone and a sensitive radioligand for ecdysone receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1988; 85: 2096-2100. DOI:10.1073/pnas.85.7.2096
189. Echalier G, Ohanessian A. Isolation, in tissue culture, of *Drosophila melanogaster* cell lines. **C R Acad Hebd Seances Acad Sci D** 1969; 268: 1771-1773.
190. Caizzi R, Bozzetti MP, Caggese C, Ritossa F. Homologous nuclear genes encode cytoplasmic and mitochondrial glutamine synthetase in *Drosophila melanogaster*. **J Mol Biol** 1990; 212: 17-26. DOI:10.1016/0022-2836(90)90301-2
191. dos Santos Moreira CD, Ramos MJRN, Fernandes PMAA. Glutamine synthetase structure-catalysis relationship—Recent advances and applications. **WIREs Computational Molecular Science** 2019; 9: e1399. DOI:10.1002/wcms.1399
192. Issoglio FM, Campolo N, Zeida A, Grune T, Radi R, Estrin DA, Bartesaghi S. Exploring the Catalytic Mechanism of Human Glutamine Synthetase by Computer Simulations. **Biochemistry** 2016; 55: 5907-5916. DOI:10.1021/acs.biochem.6b00822
193. Moreira C, Ramos MJ, Fernandes PA. Reaction Mechanism of *Mycobacterium Tuberculosis* Glutamine Synthetase Using Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Calculations. **Chemistry** 2016; 22: 9218-9225. DOI:10.1002/chem.201600305
194. Allison RD, Todhunter JA, Purich DL. Steady state and equilibrium exchange kinetic studies of the sheep brain glutamine synthetase reaction. **J Biol Chem** 1977; 252: 6046-6051.

195. Boyer PD, Mills RC, Fromm HJ. Hypotheses for and some kinetic studies with glutamine synthetase and acetate thiokinase. **Arch Biochem Biophys** 1959; 81: 249-263. DOI:10.1016/0003-9861(59)90194-8
196. Chondrogianni N, Petropoulos I, Grimm S, Georgila K, Catalgol B, Friguet B, Grune T, Gonos ES. Protein damage, repair and proteolysis. **Mol Aspects Med** 2014; 35: 1-71. DOI:10.1016/j.mam.2012.09.001
197. Labow BI, Souba WW, Abcouwer SF. Mechanisms governing the expression of the enzymes of glutamine metabolism, glutaminase and glutamine synthetase. **J Nutr** 2001; 131: 2467S-2474S. DOI:10.1093/jn/131.9.2467S
198. Seiler N, Reid J, Knödgen B. A sensitive method for the assay of glutamine synthetase. **Neurochem Res** 1990; 15: 301-305. DOI:10.1007/bf00968676

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den Menschen danken, ohne deren tatkräftige Unterstützung der erfolgreiche Abschluss meiner Promotion nicht gelungen wäre.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Häussinger für seine kontinuierliche Unterstützung und die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie durchführen zu können. Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. med. Philipp Lang für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein aufrichtiger Dank gilt meinem Betreuer, Herrn Dr. Boris Görg, für seine ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung, seine stetige Unterstützung sowie seine wertvollen Anregungen und Hilfestellungen, sowohl während der experimentellen Arbeiten als auch bei der Anfertigung und Korrektur dieser Dissertation.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Mathias Beller und Frau Petra Kolkhof vom Institut für Mathematische Modellierung biologischer Systeme der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf für die Bereitstellung der von mir verwendeten Zellkultur.

Mein Dank gilt zudem Herrn Prof. Dr. Holger Gohlke und Herrn Dr. Benedikt Frieg vom Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf für die vorausgegangenen Berechnungen und Modellierungen, die die Grundlage dieser Arbeit bilden.

Für ihre wertvolle Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und den täglichen Laborarbeiten danke ich Frau Dr. Ayse Karababa und Herrn Thorsten Janssen. Die stets angenehme Zusammenarbeit, ihre Hilfsbereitschaft und ihr offenes Ohr haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Auch allen weiteren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Hepatologie danke ich herzlich für die hervorragende Arbeitsatmosphäre, die vielen Hilfestellungen und die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Mein herzlicher Dank gilt meinen Eltern und meiner Familie für ihre langjährige, geduldige und bedingungslose Unterstützung und dafür, dass sie immer an mich geglaubt haben.

Für ihre Freundschaft, Unterstützung, Aufmunterung und eine Studienzeit an die ich immer gerne zurückdenke danke ich Debbie, Verena, Merle, Anke, Leonie und Linda. Meinen Mitbewohnerinnen Marlene und Franzi danke ich für ihre Geduld mit meinem Chaos, die kulinarische Versorgung und die aufmunternden Worte, insbesondere in herausfordernden Phasen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Freundin und *forever travel buddy* Franzi, die mich in jeder Lebenslage begleitet, unterstützt und aufgefangen hat, meine Eigenheiten stets mit Geduld ertragen und den Laptop als weiteren Mitreisenden akzeptiert hat. Ich bin sehr dankbar, dass es dich gibt.

Abschließend möchte ich allen weiteren Personen danken, die mich in den vergangenen Jahren während dieses Projekts und auf meinem persönlichen Weg begleitet und unterstützt haben. Ohne euch hätte ich viele Herausforderungen nicht gemeistert und diese Dissertation nicht zu Ende gebracht.

Vielen Dank!