

Aus dem Institut für Anatomie der Medizinischen Fakultät Charité –
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Arginase, Arginindecaboxylase, Agmatinase
– liefert die unterschiedliche Lokalisation dieser Enzyme Hinweise
auf die biologischen Funktionen im Gehirn der Ratte?

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Daniela Peters

aus Frankfurt am Main

Datum der Promotion: 27.02.2015

Inhalt

1	ZUSAMMENFASSUNG	4
1.1	ABSTRACT	6
2	EINLEITUNG	7
3	MATERIAL UND METHODEN	10
4	ERGEBNISSE	11
5	DISKUSSION	15
6	LITERATURVERZEICHNIS	18
7	CURRICULUM VITAE.....	22
8	PUBLIKATIONSLISTE.....	23
9	ANTEILSERKLÄRUNG AN DEN ERFOLGTEN PUBLIKATIONEN	24
10	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	25
11	DANKSAGUNG	26

Abkürzungsverzeichnis

ABC-Komplex	Avidin-biotinylperoxidase Komplex
ADC	Arginindecarboxylase
Agm	Agmatin
Arg1/Arg2	Arginase in den Isoformen 1 bzw. 2
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
-GST	Glutathion-S-Transferase-Transfusionsprotein
IgM	Immunglobulin der Klasse M
NMDA-Rezeptor	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
ODC	Ornithindecaboxylase
SpdS	Spermidinsynthase
VirP	Virtual pre-embedding

1 Zusammenfassung

Die Polyamine Spermidin und Spermin sind wichtige Regulatoren basaler Zellfunktionen, dienen aber darüber hinaus auch hochspezifischen Aufgaben im Säugergehirn. Für die Polyamine und deren Synthese- und Abbauenzyme findet sich in den verschiedenen Gehirnarealen eine unterschiedliche Verteilung. Auch zwischen Neuronen und Gliazellen ist die Verteilung verschieden. Die Synthese des Diamins Putrescin kann über zwei unterschiedliche Stoffwechselwege erfolgen. Beim „klassischen“ Weg wird Arginin zunächst durch Arginase unter Abspaltung von Harnstoff zu Ornithin hydrolysiert und dann in einem weiteren Schritt durch Ornithindecaboxylase zu Putrescin dekarboxyliert. Beim alternativen Weg wird zuerst Kohlendioxid durch Arginindecaboxylase und dann Harnstoff durch Agmatinase entfernt. Beide Stoffwechselwege könnten demselben Ziel dienen. Als Zwischenprodukt des alternativen Weges entsteht jedoch Agmatin, welches ein endogener Ligand für Imidazolinrezeptoren ist und als Neurotransmitter wirkt.

Um die Expressionsmuster der beiden Schlüsselenzyme Arginase und Arginindecaboxylase beurteilen und vergleichen zu können, wurden polyklonale, monospezifische Antikörper gegen Arginase-1 und Arginindecaboxylase hergestellt. Mittels dieser Werkzeuge wurde das Rattengehirn immunzytochemisch systematisch untersucht und die Expressionsmuster beider Enzyme in mehreren Gehirnarealen auf der regionalen, zellulären und subzellulären Ebene verglichen. Sowohl Arginase als auch Arginindecaboxylase Enzyme werden in weiten Teilen des Rattengehirns exprimiert. Beide Antikörper markierten im Cortex und Hippokampus Prinzipalneurone, putative Interneurone und Neuropil. In Bezug auf die subzelluläre Lokalisation beider Enzyme zeigte sich jedoch ein auffallender Unterschied in der Markierung der Neurone. Bei dem Antikörper gegen Arginindecaboxylase fand sich eine Verteilung des Immunsignals im gesamten Cytoplasma, die Immunreaktivität gegen Arginase war bevorzugt im Golgi-Apparat lokalisiert. Die Tatsache, dass die Verteilung von Arginase und Arginindecaboxylase in Bezug auf bestimmte Zellpopulationen große Übereinstimmungen zeigt, und dass für das Zwischenprodukt Agmatin eine Reihe von endogenen Funktionen bekannt sind, legt nahe, dass die Hauptfunktion des alternativen

ZUSAMMENFASSUNG

Stoffwechselweges die Synthese von Agmatin und nicht von Putrescin ist, während der klassische Weg Putrescin und Spermidin/Spermin in diesen Neuronen bereitstellt.

1.1 Abstract

Polyamines are important regulators of basal cellular functions but also subserve highly specific tasks in the mammalian brain. With this respect, polyamines and the synthesizing and degrading enzymes are clearly differentially distributed in neurons versus glial cells and also in different brain areas. The synthesis of the diamine putrescine may be achieved via two different pathways. In the “classical” pathway initially urea is removed from arginine by arginase. The resulting ornithine is then decarboxylated to putrescine by arginine decarboxylase. With the alternative pathway first carbon dioxide is removed by arginine decarboxylase and then urea by agmatinase. Both pathways may serve the same purpose. However the intermediate product of the alternative pathway, agmatine, is an endogenous ligand for imidazoline receptors and serves as a neurotransmitter.

In order to evaluate and compare the expression patterns of the two gate keeper enzymes arginase and arginine decarboxylase, a polyclonal, monospecific antibodies against arginase-1 and arginine decarboxylase were generated. These tools, were used to immunocytochemically screen the rat brain and compare the expression patterns of both enzymes in several brain areas on the regional, cellular and subcellular level. Arginase as well as arginine decarboxylase are constitutively and widely expressed in the rat brain. In the cerebral cortex and hippocampus, both antibodies labeled principal neurons, putative interneurons and neuropil. Labeling, however, was strikingly different in these neurons with respect to the subcellular localization of the enzymes. While with antibodies against arginine decarboxylase the immunosignal was distributed throughout the cytoplasm, arginase-like immunoreactivity was preferentially localized to Golgi stacks. Given the apparent congruence of arginase and arginine decarboxylase distribution with respect to certain cell populations, and the fact that several endogenous agmatine is known for several endogenous functions are known for agmatine, it seems likely that the synthesis of agmatine rather than putrescine may be the main purpose of the alternative pathway, while the classical pathway supplies putrescine and spermidine/spermine in these neurons.

2 Einleitung

Die Polyamine Spermidin, Spermin und im weiteren Sinne auch Putrescin sind organische Kationen und kommen in nahezu allen lebenden Organismen sowohl intrazellulär als auch extrazellulär vor¹. Polyamine sind essenziell für eine Vielzahl basaler sowie abgeleiteter Zellfunktionen, wie Zellwachstum, -differenzierung und -stabilität^{2,3}. Dagegen führt eine Dysregulation der Polyamine zur Auslösung der Apoptose⁴. Die unter physiologischen Bedingungen mehrfach positive Ladung der Polyamine ermöglicht Ladungs-Wechselwirkungen mit polyanionischen Makromolekülen, z.B. bei der Stabilisierung von DNA und RNA⁵. Weiterhin sind Polyamine direkt an der Modulation von Ionenkanälen und Rezeptoren, wie Kir-Kanäle^{6,7}, NMDA-Rezeptoren^{1,8} sowie einiger TRP-Kanäle⁹ beteiligt. Auch an pathologischen Prozessen ist das Polyaminsystem beteiligt. So liegen bei Tumoren mit hoher Zellteilungsrate Polyamine in erhöhten Konzentrationen vor^{3,10,11}. Für neurologisch/psychiatrische Erkrankungen wie Schlaganfall^{12,13}, Epilepsie^{14,15} Depression und Schizophrenie¹⁶⁻¹⁸ konnten Veränderungen im Polyaminstoffwechsel nachgewiesen werden.

Die Synthese der Polyamine in eukaryotischen Zellen erfolgt aus L-Arginin über das Zwischenprodukt Putrescin in einer Kette enzymatischer Reaktionen. Beim sogenannten „klassischen“ Stoffwechselweg entsteht unter Abspaltung von Harnstoff, katalysiert durch das Enzym Arginase (Arg), zunächst Ornithin. In einem weiteren Schritt wird Ornithin durch das Enzym Ornithindecaboxylase (ODC) zu Putrescin dekarboxyliert. Aus Putrescin kann dann durch die Enzyme Spermidinsynthase (SpdS) und Sperminsynthase Spermidin und Spermin aufgebaut werden.

Für Pflanzen und Bakterien ist spätestens seit den fünfziger Jahren ein weiterer „alternativer“ Stoffwechselweg für die Synthese von Putrescin aus L-Arginin bekannt^{19,20}. Hier findet zuerst die Dekarboxylierung zu Agmatin und dann die Abspaltung von Harnstoff statt, katalysiert durch die Enzyme Arginindecaboxylase (ADC) und Agmatinase (Agm). Bis vor einigen Jahren²¹ ging man davon aus, dass der alternative Stoffwechselweg im Säugergehirn nicht vorkommt^{22,23}. Auch in der neueren Literatur bleibt der ADC/Agmatin-Weg als möglicher Putrescinsyntheseweg unerwähnt^{11,24,25} (Abb1).

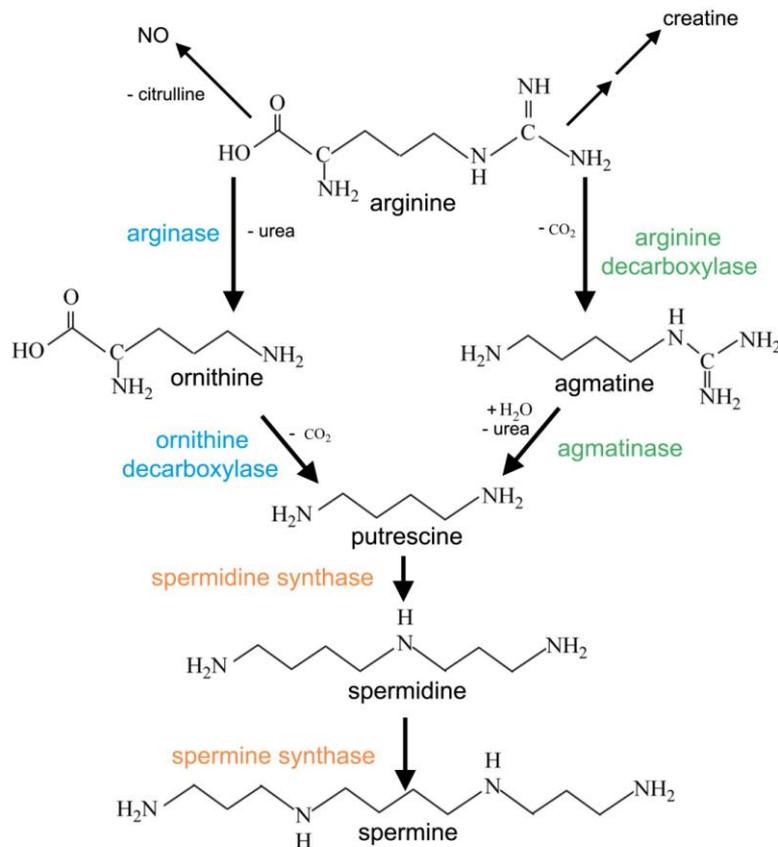


Abbildung 1: Polyaminsynthese aus Arginin

Die Aminosäure L-Arginin dient als Ausgangsstoff für die Synthese vieler Produkte. Die Polyamine Spermidin und Spermin können über Putrescin auf zwei verschiedenen Wegen enzymatisch aus L-Arginin entstehen. Beim „klassischen“ Syntheseweg katalysiert das Enzym Arginase als ersten Schritt unter Harnstoffabspaltung die Entstehung von Ornithin, eine Reaktion, die auch im Harnstoffzyklus vorkommt. Ornithin wird dann im zweiten Schritt durch Ornithindecarboxylase (ODC) unter Abspaltung von CO₂ umgesetzt. Beim „alternativen“ Syntheseweg wird zuerst durch Arginindecarboxylase (ADC) CO₂ abgespalten und dann im zweiten Schritt durch Agmatinase Harnstoff abgespalten und dabei Putrescin synthetisiert. Putrescin kann dann durch die Enzyme Spermidinsynthase und Sperminsynthase zu Spermidin und Spermin umgesetzt werden.

Da Agmatin als endogener Ligand von Imidazolinrezeptoren ^{21,26,27} gilt und unter anderem als möglicher Neurotransmitter/-modulator diskutiert wird ²⁸⁻³¹, ist das Interesse an Agmatin und den Synthese- bzw. Abbauenzymen in den letzten Jahren deutlich gestiegen. Bislang ist jedoch ungeklärt, ob Agmatin primär als Zwischenprodukt im Rahmen eines alternativen Stoffwechselweges der Polyaminbiosynthese dient, oder ob die Synthese von Agmatin die Hauptfunktion dieses Stoffwechselweges ist. Der Nachweis der am Agmatin-Stoffwechsel beteiligten Enzyme wurde bisher ausschließlich durch biochemische Methoden geführt. Durch diese Methoden ist zwar das Vorkommen in einem Gewebe nachweisbar, regionspezifische Anreicherungen, z.B. in kleineren Kerngebieten des Gehirns konnten durch die bisher angewandten Methoden aber nicht gezeigt werden. Insofern kann eine vergleichende Analyse der Expression der verschiedenen beteiligten Enzyme mittels Immunzytochemie wertvolle Informationen darüber liefern, von welchen Zellen einer oder beide Stoffwechselwege genutzt werden.

Zielstellung: Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Reinigung und Charakterisierung eines Antiserums gegen Arginindecarboxylase (ADC). Der gereinigte Antikörper sollte zur immunzytochemischen Charakterisierung des Expressionsmusters des Enzyms im Rattengehirn verwendet werden. In einem weiteren Schritt sollten dann unter Zuhilfenahme eines Antikörpers gegen Arginase (Arg1) und zweier in unserem Labor bereits vorhandener Antikörper gegen die nachgeschalteten Enzyme Agmatinase ³² und Spermidinsynthase ³³ die beiden Stoffwechselwege – Arg und SpdS für den klassischen und ADC u.nd Agm für den alternativen Weg – verglichen werden

3 Material und Methoden

Für die Versuche³⁴ der vorliegenden Arbeit wurden folgende Methoden angewandt: Zur Generierung monospezifischer polyklonaler Antikörper wurden Kaninchen mit Fusionsproteinen aus Glutathion-S-Transferase (GST) und einer für die Arginindecarboxylase bzw. Arginase der Ratte spezifischen Aminosäuresequenz immunisiert. Auf diese Weise wurden Rohseren gewonnen, die dann in mehreren Schritten aufgereinigt wurden. Im ersten Schritt wurde mittels Molekularsiebchromatographie potenziell interferierendes IgM entfernt. Um unerwünschte Kreuzreaktivitäten auszuschalten, wurden anschließend mit dem Fusionsanteil beladene Nitrozellulosemembranen mit dem Serum inkubiert³⁵. Derselbe Schritt wurde dann mit Nitrozellulosemembranen wiederholt, die mit potentiell kreuzreagierenden Proteinen aus derselben Familie beschichtet waren. Als dritter Schritt erfolgte die Affinitätsreinigung der Rohseren an mit Arg- bzw. ADC-6-His-markierten Thioredoxin-Fusionsprotein beladenen Nitrozellulosemembranen. Der sich anschließenden Elution und Dialyse folgte als letzter Schritt die Konzentrierung der Antikörper über eine Sulfat-Phosphat-Sepharosesäule.

Die immunologische Aktivität der Antikörper wurde mithilfe von indirektem und kompetitivem ELISA-Testverfahren verifiziert. Zur weiteren Charakterisierung dienten Western Blots mit Homogenaten von Gehirnen, Leber und Prostata der Ratte. Die anschließenden immunzytochemischen Versuche wurden an Gewebeschnitten von erwachsenen männlichen Wistar-Ratten durchgeführt. Zur Fixierung wurden die Tiere transkardial mit Paraformaldehyd, Glutaraldehyd und Pikrinsäure perfundiert. Die für diese Arbeit erhobenen Daten stammen aus Versuchen an 419 Frontalschnitten von insgesamt 29 Rattengehirnen. Dabei wurden frei flottierende Kryostatschnitte einem standardisierten Behandlungsschema unterzogen und mit dem Primäantikörper inkubiert. Nach Inkubation mit einem biotinylierten Zweitantikörper und ABC-Komplex erfolgte die Visualisierung durch eine anschließende Peroxidasereaktion. Für Lichtmikroskopie wurden die Schnitte auf Objektträger aufgezogen, für die Elektronenmikroskopie erfolgte eine Einbettung in Araldit.

4 Ergebnisse

Alle Enzyme des klassischen und des alternativen Stoffwechselweges gehören entweder der Arginase-Familie (Arg, Agm) oder der Orn/Lys/Arg-Decarboxylase-Klasse-II-Familie (ODC, ADC) an. Untereinander sind beide Gruppen strukturell verschieden, innerhalb einer Familie kommt es jedoch zu Sequenzhomologien unterschiedlicher Ausprägung. Die für die Immunisierung ausgewählte C-terminale Arg1-Sequenz zeigt eine Übereinstimmung von lediglich 18,5% mit Agm, sodass eine Kreuzreaktivität des Anti-Arginase-Antikörpers mit Agm nicht anzunehmen ist. Gegenüber der anderen Isoform Arginase 2 (Arg2) besteht eine Sequenzhomologie von 65%. Innerhalb der Gruppe der Decarboxylasen liegt die Übereinstimmung für ADC und ODC bei 50,2%. Für die Immunisierung konnte eine C-terminale ADC-Sequenz gefunden werden, die mit ODC lediglich zu 25,4% identisch ist.

Die Spezifität des Anti-ADC-Antikörpers wurde mittels ELISA und Western Blot Verfahren getestet. Mit steigender Proteinkonzentration zeigte sich im ELISA bei den ADC-Fusionsproteinen der zu erwartende charakteristische Abfall der spezifischen Aktivität des gereinigten Antikörpers. Weder der GST-Fusionsanteil noch das Arginase1-GST-Fusionsprotein beeinflussten die Bindungsfähigkeit des Antikörpers. Auch mit ODC bestand keine Kreuzreaktivität. Im Western Blot zeigten sich bei Leber und Prostata kräftige, beim Gehirn schwächere, aber deutliche Banden bei ca. 55kDa. Bei den zur Kontrolle an den bakteriell exprimierten Fusionsproteinen ADC-GST und ADC-His durchgeführten Blots lagen die entsprechenden Banden bei einem Molekulargewicht von 36,7 bzw. 30,7 kDa (siehe ³⁴ Abbildung 1). Western Blots an Lysaten von ODC-transfizierten Zellen zeigten keine Kreuzreaktivität des Anti-ADC-Antikörpers mit ODC. Auch im umgekehrten Versuch war mit einem kommerziellen Antikörper gegen ODC (Santa Cruz, sc-33539) an Blots von ADC-Fusionsproteinen keine Kreuzreaktivität zu verzeichnen (siehe ³⁴ Abbildung 2).

Der für den Anti-Arg1-Antikörper durchgeführte kompetitive ELISA zeigte ebenfalls einen Aktivitätsabfall bei steigender Arg1-Proteinkonzentration und keine Beeinflussung der Aktivität durch den GST-Fusionsanteil oder das Agm-Fusionsprotein. Im Western

Blot detektierte der Anti-Arg1-Antikörper die Fusionsproteine Arg1-GST und Arg1-His bei den erwarteten Molekulargewichten von 49,2 bzw. 43,2 kDa (siehe ³⁴ Abbildung 3). Aufgrund der durchgeführten Untersuchungen zur Spezifität konnte von einer Eignung des Anti-ADC- und des Anti-Arg1-Antikörpers für die Immunzytochemie ausgegangen werden. In der Folge untersuchten wir systematisch verschiedene Regionen des Rattengehirns immunzytochemisch auf die Expression von ADC und Arg1. Die Expressionsmuster dieser beiden Enzyme wurden dann mit denen von Agm und SpdS verglichen. Beide Antikörper, Anti-Arg und Anti-ADC, markierten sowohl Neuronen als auch Neuropil im gesamten Gehirn, jedoch mit wechselnder Intensität und unterschiedlichen intrazellulären Färbemustern.

Im cerebralen Cortex waren Neuronen in allen cortikalen Schichten gefärbt. Beim Anti-Arg1-Antikörper zeigte sich in der Mehrzahl der Neuronen ein zytosolisches Immunsignal mit deutlich punktiertem Muster. Der Anti-ADC-Antikörper wies hingegen ein eher diffuses zytosolisches Immunsignal auf. Während beim Anti-Arg1-Antikörper das umgebende Neuropil vergleichsweise stark gefärbt war, dominierte beim Anti-ADC-Antikörper die Färbung in Neuronen. Eine differenzierte Färbung des Neuropils konnte aber durch eine Erhöhung der Konzentration des Anti-ADC-Antikörpers erreicht werden. Im Unterschied dazu markierten der Anti-SpdS- und der Anti-Agm-Antikörper vor allem einzelne Populationen von Interneuronen, während in Prinzipalneuronen wie Pyramidenzellen das Immunsignal deutlich schwächer war (siehe ³⁴ Abbildung 4).

In der Hippokampusformation erstreckte sich die Markierung durch Anti-Arg- und Anti-ADC-Antikörper auf das Stratum pyramidale des Ammonshorns und das Stratum granulosum des Gyrus dentatus. Neben Prinzipalneuronen waren zahlreiche Interneurone gefärbt. Zusätzlich zu dem punktierten Markierungsmuster zeigten einige hippokampale Interneurone ein starkes aber diffuses Arg-Immunsignal. Beide Enzyme wurden auch in Oligodendrozyten exprimiert. Spds- und Agm-Immunreaktivität war auch im Hippokampus vorwiegend in Interneuronen und Neuropilarealen zu beobachten (siehe ³⁴ Abbildung 5).

Um herauszufinden, ob die sich unterscheidende intrazelluläre Markierung an einer Kreuzreaktivität der beiden Isoformen Arg1 und Arg2 liegen könnte, wurde der

affinitätsgereinigte Antikörper mit dem an eine Membran gebundenen möglicherweise kreuzreagierenden C-Terminus von Arg2 vorinkubiert. In Versuchen mit Überstand und Eluat an Hippokampusschnitten zeigte sich eine deutliche Trennung weniger Interneurone mit diffusem Immunsignal (Überstand, entspricht Arg1) von der Mehrheit der Zellen mit dem typischen gepunkteten Signalmuster (Eluat, entspricht Arg2) (siehe ³⁴ Abbildung 6).

Im cerebellären Cortex gab es auffallende Unterschiede zwischen den Expressionsmustern der Enzyme des klassischen und des alternativen Weges. Die Enzyme des alternativen Weges, ADC und Agm, fanden sich sehr prominent in den Zellkörpern und dendritischen Verzweigungen von Purkinjezellen, während Arg und SpdS in diesen Zellen nicht exprimiert wurden (siehe ³⁴ Abbildung 7). Bergmann Gliazellen wurden sowohl durch Anti-Arg als auch Anti-ADC markiert. Im Stratum granulosum wurden durch den Anti-SpdS-Antikörper große Moosfaserboutons ³⁶ und durch den Anti-Agm-Antikörper unipolare Brush-Zellen (siehe auch ³²) markiert.

Im basalen Vorderhirn markierten die Enzyme des alternativen Weges vor allem neuronale Zellkörper und zeigten eine relativ homogene Färbung im Neuropil. Besonders prominent erschien in der Färbung mit dem Anti-ADC-Antikörper eine Neuronengruppe in der Region der Calleja-Inseln. Die Antikörper gegen Arg und SpdS färbten mit stark variierendem Immunsignal primär Inseln von Neuropil im Nucleus accumbens und Striatum (siehe ³⁴ Abbildung 8).

Für Agmatinase ist eine starke Expression in den Nuclei vestibularis medialis und prepositus hypoglossi bekannt (siehe auch Abbildung 5, ³², die beide eine Bedeutung für die Koordination der Augenbewegungen haben. Auf dieser Hirnstammebene war das Expressionsmuster aller vier Enzyme bemerkenswert ähnlich. Allerdings markierte der Anti-SpdS-Antikörper im Gegensatz zu den drei anderen Antikörpern keine neuronalen Zellkörper (siehe ³⁴ Abbildung 9).

Durch die Methode des virtuellen pre-embedding (VirP) wird durch das Einbringen von Haptenen vor der Einbettung und einen Visualisierungsschritt nach der Einbettung eine Signalverstärkung in Form von Punktmustern erreicht (siehe auch ³⁷ Abbildung 1). Mit

dieser Methode wurden für die Antikörper gegen Arg und ADC zahlreiche Punktmuster im Neuropil des cerebralen Cortex und Hippokampus beobachtet. Einige dieser Punkte waren eindeutig assoziiert mit dendritischen Profilen; dies deutet entweder auf eine prä- oder postsynaptische Lokalisation des Antigens hin (siehe ³⁴ Abbildung 10). Durch elektronenmikroskopische Darstellung von DAB-basierter Immunoperoxidasereaktivität zeigte sich für ADC eine Lokalisation in Dendriten und dendritischen Dornen (Spines). Arg hingegen wurde in präsynaptischen Endigungen cortikaler Synapsen exprimiert. In neuronalen Zellkörpern war die ADC-Immunreaktion mit vesikulären und dem endoplasmatischen Reticulum ähnlichen Strukturen, die Arg-Immunreaktion dagegen deutlich in Golgi-Kompartimenten assoziiert (siehe ³⁴ Abbildung 10).

5 Diskussion

Für die Synthese von Putrescin, dem Ausgangssubstrat der Polyaminsynthese aus L-Arginin gibt es theoretisch zwei Stoffwechselwege: Den „klassischen“ Weg beginnend mit der Dekarboxylierung und der Entstehung von Ornithin und den „alternativen“ Weg, der über die Abspaltung von Harnstoff im ersten Schritt zu Agmatin führt. Die Bedeutung beider Synthesewege ist in verschiedenen Arbeiten, hauptsächlich basierend auf biochemischen Daten zu den Enzymen ADC und Arg, hinterfragt worden ^{24,38,39}. Demnach scheinen die beiden Isoformen der Arginase (Arg1 und Arg2) für die Aufrechterhaltung der Polyaminhomöostase in Arg1/Arg2 single und double Knock-out-Mäusen nicht notwendig zu sein ³⁹. Als Quelle für die aufrechterhaltenen Polyaminspiegel in Blut und Geweben wurde über die Nahrung zugeführtes Spermidin/Spermin und Agmatin diskutiert ^{39,40}. Allerdings starben die Arg-Knockouttiere im Alter von zwei Wochen an den Folgen des beeinträchtigten Harnstoffzyklus ^{39,41}. Aufgrund der Bluthirnschranke ist jedoch anzunehmen, dass für das Gehirn andere Bedingungen gelten. Spermidin und Spermin können die Bluthirnschranke nur ungenügend passieren ⁴². Agmatin hingegen kann einfach in den Liquor transportiert werden. Aufgrund der Möglichkeit, ins Blut aufgenommen zu werden und die Bluthirnschranke zu passieren, könnte Agmatin auch aus diversen Nahrungsquellen oder intestinalen Mikroorganismen stammen ^{25,40}. Allerdings konnte Agmatin in verschiedenen Untersuchungen nur in wenigen Nahrungsmitteln, wie in fermentierten Produkten und Frischfisch überhaupt nachgewiesen werden, und war ausschließlich in Sojabohnen in relevanter Konzentration vorhanden ^{25,43}. Darüber hinaus weisen Daten daraufhin, dass intravenös appliziertes Arginin die Bluthirnschranke passieren kann und als Vorläufer für die Agmatinsynthese dient ⁴⁴.

Die für diese Arbeit immunzytochemisch erhobenen Daten belegen eine Expression beider Arginaseisoformen Arg1 und Arg2 im Gehirn. Weiterhin wurden zwei Gruppen immunzytochemisch verschiedener hippokampaler Interneurone gezeigt, die sich in Bezug auf die zytosolische Verteilung von Arg1 und Arg2 unterscheiden. Für die in der Leber vorherrschende Isoform Arg1 ist eine zytosolische Lokalisation bekannt ⁴⁵. Dies deckt sich mit unserer Beobachtung, dass durch die als Arg1-spezifisch geltende Antikörperfraktion das Zytoplasma von Interneuronen immunzytochemisch markiert

wurde. Die zweite Isoform Arg2 gilt als mitochondrial lokalisiert und ist im gesamten Organismus, das Gehirn eingeschlossen, weit verteilt⁴⁶⁻⁴⁹. Die immunzytochemisch gewonnenen Erkenntnisse zur Expression von Arg2 in Hippokampus und Cerebellum stimmen mit bekannten durch In-situ-Hybridisierung erhobenen Daten überein, besonders auch in Bezug auf die fehlende Expression in cerebellären Purkinjezellen. Mit dem in dieser Arbeit verwendeten Antikörper wurde für Arg2 immunzytochemisch nur vereinzelt eine mitochondriale Lokalisation nachgewiesen. Vielmehr wurde überwiegend eine Assoziation mit dem Golgiapparat beobachtet. Dies mag einer begrenzten Eindringtiefe der Antikörper durch die Mitochondrienmembranen während der Voreinbettungs-Phase geschuldet sein. Mittels der hochsensitiven VirP-Methode zeigte sich eine vor allem in Präsynapsen lokalisierte breite, aber deutliche Verteilung von Arg im Neuropil. Diese präsynaptische Lokalisation spricht für eine Funktion der Polyaminsynthese innerhalb der synaptischen Übertragung.

Auch für ADC wurde eine vom Soma entfernte Immunreaktion im Neuropil beobachtet, allerdings mit postsynaptischer Lokalisation. In der Literatur wird ADC als Inhibitor von Antizym (einem Enzym, das ODC durch Komplexbildung hemmt) diskutiert⁵⁰. In dieser Funktion wäre ADC jedoch nicht in synaptischen Kompartimenten zu erwarten. Ferner sprechen die breite Expression von inaktiver monomerer ODC und regulatorischem Antizym I^{51,52}, z.B. in Purkinjezellen, gegen die Notwendigkeit einer breiten Verteilung eines weiteren Antizyminhibitors. Ausgehend von einer wichtigen Funktion von Agmatin als Neurotransmitter, dessen Regulation eine wesentliche Rolle im Rahmen von psychiatrischen Erkrankungen spielt^{17,18,26}, erscheint die lokale Expression sowohl eines Synthese- als auch eines abbauenden Enzyms in synaptischen Kompartimenten nicht nur begründet, sondern notwendig für die Aufrechterhaltung gehirnspezifischer Funktionen. Vor diesem Hintergrund deutet das von uns beobachtete Verteilungsmuster der Enzyme Arg/SpdS und ADC/Agm und die häufige Expression beider Enzymgruppen in denselben Neuronen darauf hin, dass der alternative Stoffwechsel in seiner Hauptfunktion nicht der Synthese von Putrescin, sondern der Synthese und dem Abbau von Agmatin dient.

Es ist davon auszugehen, dass weitere präzisere Einsichten in die physiologische Relevanz der Polyamine im Zusammenhang mit Gesundheit und Krankheit in Zukunft

DISKUSSION

neue Erkenntnisse in die bisher eher spekulative Diskussion über die zahlreichen Funktionen dieser organischen Polykationen im Zentralnervensystem bringen werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Williams, K. Interactions of polyamines with ion channels. *Biochem J* **325** (Pt 2), 289-297 (1997).
2. Eisenberg, T., *et al.* Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nat Cell Biol* **11**, 1305-1314 (2009).
3. Agostinelli, E., *et al.* Polyamines: fundamental characters in chemistry and biology. *Amino Acids* **38**, 393-403 (2010).
4. Seiler, N. & Raul, F. Polyamines and apoptosis. *J Cell Mol Med* **9**, 623-642 (2005).
5. Wallace, H.M., Fraser, A.V. & Hughes, A. A perspective of polyamine metabolism. *Biochem J* **376**, 1-14 (2003).
6. Ficker, E., Taglialatela, M., Wible, B.A., Henley, C.M. & Brown, A.M. Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier K⁺ channels. *Science* **266**, 1068-1072 (1994).
7. Lopatin, A.N., Makhina, E.N. & Nichols, C.G. Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature* **372**, 366-369 (1994).
8. Mott, D.D., Washburn, M.S., Zhang, S. & Dingledine, R.J. Subunit-dependent modulation of kainate receptors by extracellular protons and polyamines. *J Neurosci* **23**, 1179-1188 (2003).
9. Ahern, G.P., Wang, X. & Miyares, R.L. Polyamines are potent ligands for the capsaicin receptor TRPV1. *J Biol Chem* **281**, 8991-8995 (2006).
10. Agostinelli, E., *et al.* Polyamines: fundamental characters in chemistry and biology. *Amino Acids* **38**, 393-403.
11. Minois, N., Carmona-Gutierrez, D. & Madeo, F. Polyamines in aging and disease. *Aging (Albany NY)* **3**, 716-732 (2011).
12. Ferchmin, P.A., Perez, D. & Biello, M. Spermine is neuroprotective against anoxia and N-methyl-D-aspartate in hippocampal slices. *Brain Res* **859**, 273-279 (2000).
13. Koenig, H., Goldstone, A.D., Lu, C.Y. & Trout, J.J. Brain polyamines are controlled by N-methyl-D-aspartate receptors during ischemia and recirculation. *Stroke* **21**, III98-102 (1990).
14. Bell, M.R., Belarde, J.A., Johnson, H.F. & Aizenman, C.D. A neuroprotective role for polyamines in a *Xenopus* tadpole model of epilepsy. *Nat Neurosci* **14**, 505-512 (2011).
15. Laschet, J., *et al.* Heterogeneous distribution of polyamines in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* **35**, 161-172 (1999).

16. Chen, G.G., *et al.* Evidence of altered polyamine concentrations in cerebral cortex of suicide completers. *Neuropsychopharmacology* **35**, 1477-1484 (2010).
17. Fiori, L.M. & Turecki, G. Implication of the polyamine system in mental disorders. *J Psychiatry Neurosci* **33**, 102-110 (2008).
18. Bernstein, H.G., *et al.* Agmatinase, an inactivator of the putative endogenous antidepressant agmatine, is strongly upregulated in hippocampal interneurons of subjects with mood disorders. *Neuropharmacology* **62**, 237-246 (2012).
19. Morris, D.R. & Pardee, A.B. Multiple pathways of putrescine biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **241**, 3129-3135 (1966).
20. Sher, I.H. & Mallette, M.F. Purification and study of L-arginine decarboxylase from *Escherichia coli* B. *Arch Biochem* **53**, 370-380 (1954).
21. Li, G., *et al.* Agmatine: an endogenous clonidine-displacing substance in the brain. *Science* **263**, 966-969 (1994).
22. Tabor, C.W. & Tabor, H. Polyamines. *Annu Rev Biochem* **53**, 749-790 (1984).
23. Pegg, A.E. Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem J* **234**, 249-262 (1986).
24. Pegg, A.E. & Feith, D.J. Polyamines and neoplastic growth. *Biochem Soc Trans* **35**, 295-299 (2007).
25. Galgano, F., Caruso, M., Condelli, N. & Favati, F. Focused review: agmatine in fermented foods. *Front Microbiol* **3**, 199 (2012).
26. Halaris, A. & Plietz, J. Agmatine : metabolic pathway and spectrum of activity in brain. *CNS Drugs* **21**, 885-900 (2007).
27. Wu, N., Su, R.B. & Li, J. Agmatine and imidazoline receptors: their role in opioid analgesia, tolerance and dependence. *Cell Mol Neurobiol* **28**, 629-641 (2008).
28. Zhu, M.Y., Iyo, A., Piletz, J.E. & Regunathan, S. Expression of human arginine decarboxylase, the biosynthetic enzyme for agmatine. *Biochim Biophys Acta* **1670**, 156-164 (2004).
29. Iyo, A.H., Zhu, M.Y., Ordway, G.A. & Regunathan, S. Expression of arginine decarboxylase in brain regions and neuronal cells. *J Neurochem* **96**, 1042-1050 (2006).
30. Reis, D.J. & Regunathan, S. Is agmatine a novel neurotransmitter in brain? *Trends Pharmacol Sci* **21**, 187-193 (2000).
31. Otake, K., *et al.* Regional localization of agmatine in the rat brain: an immunocytochemical study. *Brain Res* **787**, 1-14 (1998).

32. Bernstein, H.G., *et al.* The agmatine-degrading enzyme agmatinase: a key to agmatine signaling in rat and human brain? *Amino Acids* **40**, 453-465 (2011).
33. Krauss, M., *et al.* Spermidine synthase is prominently expressed in the striatal patch compartment and in putative interneurons of the matrix compartment. *J Neurochem* **97**, 174-189 (2006).
34. Peters, D., *et al.* Arginase and Arginine Decarboxylase – Where Do the Putative Gate Keepers of Polyamine Synthesis Reside in Rat Brain? *PLoS ONE* **8**, e66735 (2013).
35. Veh, R.W., *et al.* Immunohistochemical localization of five members of the Kv1 channel subunits: contrasting subcellular locations and neuron-specific co-localizations in rat brain. *Eur J Neurosci* **7**, 2189-2205 (1995).
36. Krauss, M., *et al.* Cellular and subcellular rat brain spermidine synthase expression patterns suggest region-specific roles for polyamines, including cerebellar pre-synaptic function. *J Neurochem* **103**, 679-693 (2007).
37. Madai, V.I., *et al.* Synaptic localisation of agmatinase in rat cerebral cortex revealed by virtual pre-embedding. *Amino Acids* (2011).
38. Coleman, C.S., Hu, G. & Pegg, A.E. Putrescine biosynthesis in mammalian tissues. *Biochem J* **379**, 849-855 (2004).
39. Deignan, J.L., *et al.* Polyamine homeostasis in arginase knockout mice. *Am J Physiol Cell Physiol* **293**, C1296-1301 (2007).
40. Pegg, A.E. Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB Life* **61**, 880-894 (2009).
41. Cederbaum, S.D., *et al.* Arginases I and II: do their functions overlap? *Mol Genet Metab* **81 Suppl 1**, S38-44 (2004).
42. Shin, W.W., Fong, W.F., Pang, S.F. & Wong, P.C. Limited blood-brain barrier transport of polyamines. *J Neurochem* **44**, 1056-1059 (1985).
43. Okamoto, A., Sugi, E., Koizumi, Y., Yanagida, F. & Udaka, S. Polyamine content of ordinary foodstuffs and various fermented foods. *Biosci Biotechnol Biochem* **61**, 1582-1584 (1997).
44. Piletz, J.E., May, P.J., Wang, G. & Zhu, H. Agmatine crosses the blood-brain barrier. *Ann N Y Acad Sci* **1009**, 64-74 (2003).
45. Carvajal, N. & Cederbaum, S.D. Kinetics of inhibition of rat liver and kidney arginases by proline and branched-chain amino acids. *Biochim Biophys Acta* **870**, 181-184 (1986).
46. Vockley, J.G., *et al.* Cloning and characterization of the human type II arginase gene. *Genomics* **38**, 118-123 (1996).

47. Morris, S.M., Jr., Bhamidipati, D. & Kepka-Lenhart, D. Human type II arginase: sequence analysis and tissue-specific expression. *Gene* **193**, 157-161 (1997).
48. Braissant, O., Gotoh, T., Loup, M., Mori, M. & Bachmann, C. L-arginine uptake, the citrulline-NO cycle and arginase II in the rat brain: an in situ hybridization study. *Brain Res Mol Brain Res* **70**, 231-241 (1999).
49. Yu, H., *et al.* Expression of arginase isozymes in mouse brain. *J Neurosci Res* **66**, 406-422 (2001).
50. Lopez-Contreras, A.J., Lopez-Garcia, C., Jimenez-Cervantes, C., Cremades, A. & Penafiel, R. Mouse ornithine decarboxylase-like gene encodes an antizyme inhibitor devoid of ornithine and arginine decarboxylating activity. *J Biol Chem* **281**, 30896-30906 (2006).
51. Kilpelainen, P., Rybnikova, E., Hietala, O. & Peltto-Huikko, M. Expression of ODC and its regulatory protein antizyme in the adult rat brain. *J Neurosci Res* **62**, 675-685 (2000).
52. Laitinen, P.H., Hietala, O.A., Pulkka, A.E. & Pajunen, A.E. Purification of mouse brain ornithine decarboxylase reveals its presence as an inactive complex with antizyme. *Biochem J* **236**, 613-616 (1986).

7 Curriculum vitae

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

8 Publikationsliste

Publikation 1:

Bernstein, H. G., Derst, C., Stich, C., Pruss, H., **Peters, D.**, Krauss, M., Bogerts, B., Veh, R. W., Laube, G. „The agmatine-degrading enzyme agmatinase: a key to agmatine signaling in rat and human brain?“. Amino Acids. 2011, 40 (2): 453-465

Impactfaktor: 3,914

Publikation 2: Madai, V. I., Poller, W. C., **Peters, D.**, Berger, J., Paliege, K., Bernard, R., Veh, R. W., Laube, G. „Synaptic localisation of agmatinase in rat cerebral cortex revealed by virtual pre-embedding“ Amino Acids. 2012

Impactfaktor: 3,914

Publikation 3: **Peters, D.**, Berger, J., Langnaese, K., Derst, C., Madai, V.I., Krauss, M., Fischer, K-D., Veh, R.W., Laube, G. „Arginase and Arginine Decarboxylase – Where Do the Putative Gate Keepers of Polyamine Synthesis Reside in Rat Brain?“ PLoS ONE 2013 8 (6) e66735

Impactfactor: 4,09

9 Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Daniela Peters hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

„The agmatine-degrading enzyme agmatinase: a key to agmatine signaling in rat and human brain?“

Prozent: 30%

Beitrag im Einzelnen:

- Erhebung von experimentellen Daten zum Anti-Agmatinase-Antikörper

Publikation 2:

„Synaptic localisation of agmatinase in rat cerebral cortex revealed by virtual pre-embedding“

Prozent: 20%

Beitrag im Einzelnen:

- Erhebung von experimentellen Daten zum Anti-Agmatinase-Antikörper
- kritische Beiträge zur fachlichen Diskussion

Publikation 3:

„Arginase and Arginine Decarboxylase – Where Do the Putative Gate Keepers of Polyamine Synthesis Reside in Rat Brain?“

Prozent: 50%

Beitrag im Einzelnen:

- Charakterisierung des Anti-Arginindecarboxylase-Antikörpers
- Erhebung sämtlicher experimenteller Daten zum Anti-Arginindecarboxylase-Antikörper
- Erstellen aller Abbildungen
- Verfassen des Textes in Teilen

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

10 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Daniela Peters, geborene Schriever, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Arginase, Arginindecarboxylase, Agmatinase – liefert die unterschiedliche Lokalisation dieser Enzyme Hinweise auf die biologischen Funktionen im Gehirn der Ratte?“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der unten stehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

11 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Rüdiger W. danke ich sehr für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Möglichkeit an seinem Institut zu lernen und zu forschen. Besonders für die dichte, kompetente und hilfreiche Betreuung in der Endphase der Arbeit bin ich sehr dankbar.

Die Anregung für diese Arbeit und das Thema verdanke ich Herrn Dr. Gregor Laube, der mich kompetent und geduldig in die neuroanatomische Forschung eingeführt und meine Arbeit begleitet hat. Ich habe in dieser Zeit viel gelernt und die gemeinsame Arbeit hat mir viel Freude gemacht.

Dr. Kristina Langnäse, Institut für Biochemie und Zellbiologie, Otto-von-Guericke Universität Magdeburg danke ich sehr herzlich für die unkomplizierte und freundschaftliche Unterstützung und Zusammenarbeit im Rahmen der letzten Veröffentlichung.

Bei Berit Soehl-Kielczinski, Semanur Ünsal und Petra Loge möchte ich mich für die ganz praktische Unterstützung im Laboralltag bedanken. Neben der hilfreichen und lehrreichen Einführung in die zahlreichen Methoden der Forschung war es eine wunderbare gemeinsame Zeit.

Auch Dr. Christian Derst, Annett Kaphan, Dr. Torsten Weiß und allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, sei an dieser Stelle noch einmal ausdrücklich für die herzliche Aufnahme und die Unterstützung gedankt.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei meiner Familie bedanken, ohne deren Unterstützung, Wohlwollen und Verzicht ich diese Arbeit nicht hätte durchführen können.

Bernstein, H. G., Derst, C., Stich, C., Pruss, H., **Peters, D.**, Krauss, M., Bogerts, B., Veh, R. W., Laube, G. „The agmatine-degrading enzyme agmatinase: a key to agmatine signaling in rat and human brain?“. *Amino Acids*. 2011, 40 (2): 453-465

<http://dx.doi.org/10.1007/s00726-010-0657-5>

Madai, V. I., Poller, W. C., **Peters, D.**, Berger, J., Paliege, K., Bernard, R., Veh, R. W., Laube, G. „Synaptic localisation of agmatinase in rat cerebral cortex revealed by virtual pre-embedding“ Amino Acids. 2012

<http://dx.doi.org/10.1007/s00726-011-1195-5>

Peters, D., Berger, J., Langnaese, K., Derst, C., Madai, V.I., Krauss, M., Fischer, K-D., Veh, R.W., Laube, G. „Arginase and Arginine Decarboxylase – Where Do the Putative Gate Keepers of Polyamine Synthesis Reside in Rat Brain?“ PLoS ONE 2013 8 (6) e66735

<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0066735>