

**IDENTIFIZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER
SUCCINSEMIALDEHYD-DEHYDROGENASE AUS
PARASITISCHEN UND NICHTPARASITISCHEN
ARTHROPODEN**

BORIS ROTHACKER

DISSERTATION
zur Erlangung
des Doktorgrades der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

*Identifizierung und Charakterisierung der
Succinsemialdehyd-Dehydrogenase aus
parasitischen und nichtparasitischen
Arthropoden*

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim**

Institut für Zoologie
Fachrichtung Parasitologie
und
Intervet Innovation GmbH
Schwabenheim

vorgelegt von
Boris Rothacker

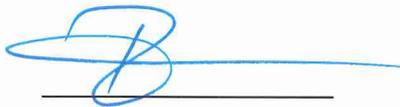
aus Mannheim
2008

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Heinz Breer
1. berichtende Person: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Ilg
2. berichtende Person: Prof. Dr. rer. nat. Ute Mackenstedt
Eingereicht am: 08.07.2008
Mündliche Prüfung am: 04.12.2008

Die vorliegende Arbeit wurde am 10.10.2008 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als "Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften" angenommen.

Hiermit versichere ich, Dipl.-Agrarbiologe Boris Rothacker, dass ich die Arbeit selbständig gefertigt, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Lampertheim, den 26.06.2008



Boris Rothacker

*Diese Arbeit ist meinem Opa
Karl Weber
gewidmet.*



† 16.04.2007

*Das ich immer so positiv durchs Leben
gehen werde, wie Du es bis zum Schluss
gegangen bist.*

Danksagung

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Ilg für die Themenstellung und die intensive Betreuung dieser Arbeit. Er hat durch seinen unglaublichen Wissensdrang, sein enormes Wissen, seine Menschlichkeit und seine Hilfsbereitschaft diese Arbeit und mich sehr geprägt.

Ich danke der Firma Intervet Innovation GmbH, die mir eine solche Arbeit ermöglicht hat.

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. Ute Mackenstedt, die mich über das Studium und die Diplomarbeit bis zur Doktorarbeit begleitet und betreut hat.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen langjährigen Kolleginnen Susanne Schmalz und Margaret Werr, die mich die ganze Arbeit über begleitet und sehr unterstützt haben.

Ein großes Dankeschön an meine ganzen Kolleginnen und Kollegen aus der Abteilung Profiling, die mich nicht nur mit Parasitenmaterial versorgt haben, sondern ohne die diese Zeit wohl nur halb so schön gewesen wäre.

Meiner Lebensgefährtin Alexa danke ich, dass sie mir in der Zeit der Doktorarbeit meinen Rücken frei gehalten und mich immer unterstützt hat.

Meinen Eltern gilt mein tiefster Dank, denn sie haben es mir jederzeit ermöglicht dieses große Ziel zu erreichen.

Zusammenfassung	VI
Summary	XI
1. Einleitung	1
1.1 Der γ -Aminobuttersäure-Abbau in parasitischen und nichtparasitischen Invertebraten: Ein vernachlässigtes Forschungsfeld.....	1
1.2 Die GABA-Rezeptoren und der GABA-Zyklus der Mammalier: Ein Überblick.....	2
1.2.1 GABA-Abbau in Mammaliern (I): Die GABA-Transaminase (GABA –T).....	7
1.2.2 GABA-Abbau in Mammaliern (II): Die Succinsemialdehyd-Dehydrogenase (SSAD).....	10
1.3 Der GABA-Synthese und –Abbau in Pflanzen, Hefen und Prokaryonten.....	14
1.4 Der GABA-Abbau in Invertebraten aus der Gruppe der Insekten, Akariden und Crustaceen.....	16
1.5 Aufgabenstellung.....	18
2. Abstracts	21
2.1 Functional characterization of a <i>Drosophila melanogaster</i> succinic semialdehyde dehydrogenase and a non specific aldehyde dehydrogenase.....	21
2.2 Molecular cloning, partial genomic structure and functional characterization of succinic semialdehyde dehydrogenase genes from the parasitic insects <i>Lucilia cuprina</i> and <i>Ctenocephalides felis</i>	22
2.3 Succinic semialdehyde dehydrogenase from the parasitic cattle tick <i>Rhipicephalus microplus</i> : gene identification, biochemical characterization and comparison with the mouse ortholog.....	23
2.4 Saturation transfer difference NMR studies on substrates and inhibitors of succinic semialdehyde dehydrogenase.....	23

3. Zitierte Literatur.....	24
Lebenslauf.....	40

Zusammenfassung

Die Behandlung und Kontrolle veterinärmedizinisch bedeutsamer Parasitosen beruht vor allem auf dem Einsatz von Chemotherapeutika. Bei der Therapie von Infektionen mit meist metazoischen und invertebraten Ektoparasiten dominieren hierbei Wirkstoffe, die neuronale Zielstrukturen adressieren (z. B. γ -Aminobuttersäure- [GABA-] gesteuerte Chloridkanäle). Bei der Erforschung dieser Zielstrukturen in Invertebraten wurde eine Reihe von Fortschritten erzielt, die die molekulare und physiologische Organisation der Targetproteine teilweise offen legen und Rückschlüsse auf die Wirkmechanismen der Antiparasitika erlauben. Die Synthese-, Abbau- und Transportwege der diese Targets adressierenden Neurotransmitter sind insbesondere in parasitischen, aber oft auch in nichtparasitischen Invertebraten (meist Modellorganismen) wenig untersucht oder sogar völlig unerforscht. Zu Beginn dieser Arbeit war die Untersuchung des GABA-Abbauweges ein besonders vernachlässigtes Feld. Dieser katabole Stoffwechselweg umfasst bei Mammaliern die beiden Enzyme GABA-Transaminase und Succinsemialdehyd-Dehydrogenase (SSADH). Während für das erste Enzym einige wenige Publikationen im Feld der Invertebraten zu finden waren, ergab eine Recherche für SSADH lediglich eine etwa 40 Jahre alte Studie im atlantischen Hummer.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die in Insektenmodellen weitgehend und in parasitischen Insekten und Akariden vollständig unerforschte SSADH molekularbiologisch und enzymologisch zu charakterisieren und somit den Grundstein für die Schliessung dieser Wissenslücke zu legen. Als Organismen der Wahl dienten das Bakterium *Escherichia (E.) coli* und das Säugetier *Mus musculus* (Maus) zu Referenzzwecken und für biophysikalische Untersuchungen des Enzyms, *Drosophila (D.) melanogaster* (Fruchtfliege) als Insekten-Modellorganismus, *Lucilia (L.) cuprina* (Schafs-Schmeissfliege) und *Ctenocephalides (C.) felis* (Katzenfloh) als wichtige Repräsentanten parasitischer Insekten, sowie *Rhipicephalus (R.) microplus* als veterinärmedizinisch bedeutsamster Vertreter der parasitischen Akariden. Für *D. melanogaster* lag zu

Beginn der Erstellung dieser Schrift durch „Expressed Sequence Tag“-Studien sowie durch die Entschlüsselung des Genoms ein Einzelgenkandidat vor, für den Homologiebetrachtungen die Vermutung nahe legten, dass es sich um das Fruchtfliegen-Genortholog für SSADH (DmSSADH) handeln könnte. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde dieser Genkandidat kloniert, und heterolog in *E. coli* als lösliches Produkt exprimiert. Zur vergleichenden Charakterisierung der enzymatischen Eigenschaften des SSADH-Expressionsprodukts wurde ein bisher ebenfalls nicht genauer charakterisierter Genkandidat für eine Acetaldehyd-Dehydrogenase (DmALDH) aus *D. melanogaster* kloniert und heterolog in *E. coli* als lösliches Protein exprimiert. Beide löslichen Expressionsprodukte zeigten die erwarteten enzymatischen Eigenschaften: eine NAD⁺-abhängige Succinsemialdehyd-oxidierende Aktivität für DmSSADH und eine NAD⁺-abhängige Acetaldehyd-oxidierende Aktivität für DmALDH. Ein genauer Vergleich der Substrateigenschaften von 30 aliphatischen und aromatischen Aldehyden und teilweise auch ihrer enzymkinetischen Parameter belegte die ausserordentlich stark ausgeprägte Spezifität von DmSSADH für das GABA-Abbauprodukt Succinsemialdehyd, während DmALDH sich weitaus weniger selektiv in seiner Substratazeptanz darstellte und daher als unspezifische Aldehyddehydrogenase eingeordnet wurde. Die Auswertung von SSADH-Homologiebetrachtungen sowie von chemischen Derivatisierungs-, Mutagenese- und Struktur-Daten anderer, entfernt homologer, unspezifischer Aldehyddehydrogenasen erlaubte den Vorschlag von Aminosäurepositionen in DmSSADH, die Kandidaten für die katalytischen Reste hätten sein können. Punktmutagenesestudien zeigten, dass zwei für die SSADH-Aktivität essentielle Aminosäuren Glutamat 277 und Cystein 311 sind, während die ebenfalls hochkonservierten oder in früheren Studien vorgeschlagenen Cystein 196, Cystein 243 und Cystein 502 ohne vollständigen Verlust der Enzymaktivität in Alanin und/oder Serin mutagenisierbar sind.

Im zweiten Teil der Arbeit erfolgte die Genidentifikation, Vollängen-Genklonierung sowie die funktionelle heterologe Expression jeweils eines Genvertreters von SSADH aus *L. cuprina* und *C. felis*. Die Bestimmung der

Aminosäuresequenzidentität sowie die Erstellung eines molekularen Stammbaums zeigte die Zugehörigkeit der neu identifizierten Gene zur SSADH-Subfamilie der Aldehyd-Dehydrogenase-Supergenfamilie. Enzymkinetische Studien und Aktivitätsuntersuchungen der *E. coli*-exprimierten *L. cuprina*- (LcSSADH) und *C. felis*- (CfSSADH) Enzyme mit verschiedenen Aldehydsubstraten und Cosubstraten zeigte, dass beide vor allem NAD⁺-abhängige SSADHs sind. Bioinformatische Analysen zeigten, dass beide Enzyme N-terminale mitochondriale Importsequenzen besitzen, die eine mitochondriale Matrixlokalisierung *in vivo* nahelegten. Interessanterweise war *E. coli*-exprimierte CfSSADH nur nach Abspaltung dieser Importsequenz enzymatisch aktiv. Der Versuch einer Aufklärung der genomischen Struktur der LcSSADH und CfSSADH-Gene durch PCR-Methoden und Southern-Blots zeigte überraschend zum Einen, dass das SSADH-Gen in beiden Organismen anders als in der Fruchtfliege, der Maus oder dem Menschen nicht als Einzelkopie vorliegt, und zum Anderen dass die Exon-Intron-Struktur von *D. melanogaster* (2 Exons, 1 Intron) nicht konserviert ist: In *L. cuprina* liegt SSADH in 2-3 Genkopien vor und das hier im Detail untersuchte LcSSADH-Gen zeigt 3 Exons und 2 Introns. *C. felis* hingegen scheint bis zu 8 SSADH-Gene in seinem Genom zu besitzen, während das hier genauer analysierte Gen kein Intron aufweist. Die Funktionen der multiplen Genkopien und die Gründe für die variable Exon-Intron-Strukturen in den SSADH-Genen der hier betrachteten verschiedenen Insektenspezies bleiben unklar. Durch Verwendung affinitätsgereinigter Antikörper wurde schliesslich in Immunblot-Experimenten gezeigt, dass SSADH in Imagines von *D. melanogaster*, *L. cuprina* und *C. felis* auch auf Proteinebene exprimiert ist.

Der dritte Teil der Arbeit hatte die Genidentifizierung sowie die biochemische Charakterisierung der SSADH aus der Zecke *R. microplus* zum Thema. Durch eine Kombination von PCRs mit degenerierten Primern, „rapid amplification of cDNA ends“ (RACE) PCR und Vollängen-PCR wurde ein Zecken-Ortholog der Mammalier- und Insekten-SSADH identifiziert und isoliert. Das hier untersuchte *R. microplus* SSADH-Gen zeigt gegenüber SSADH-Genen

phylogenetisch so unterschiedlicher Organismen wie *E. coli*, der Pflanze *Arabidopsis thaliana* (Acker-Schmalwand), Maus, Mensch, der Fruchtfliege oder des Katzenflohs in etwa gleiche Sequenzidentitäten (~ 50-55%). Southern-Blot-Analysen zeigten, dass das SSADH-Gen im *R. microplus*-Genom ebenfalls nicht als Einzelkopie vorliegt, sondern wahrscheinlich in 2-3 Genkopien vorhanden ist. Um die Zecken-SSADH mit dem Genprodukt eines Mammalier-Orthologen enzymologisch vergleichen zu können, wurde das SSADH-Gen aus der Maus isoliert und heterolog funktionell in *E. coli* exprimiert. Der Vergleich dieses Enzyms mit der ebenfalls heterolog funktionell exprimierten *R. microplus* SSADH ergab, dass beide Proteine potente NAD⁺-abhängige Succinsemialdehyd-oxidierende Aktivität besitzen und hierbei sehr ähnliche enzymkinetische Parameter aufweisen. Die detaillierte Betrachtung der kinetischen Parameter aliphatischer und aromatischer Aldehydsubstrate spricht für die Anwesenheit einer zur Aldehydbindungsstelle hinführenden, langen aber engen, hydrophoben Tasche in *R. microplus* SSADH, die an einer definierten Stelle eine negative Ladung zu akkomodieren vermag. Bei der genaueren vergleichenden Betrachtung der Aktivität gegenüber verschiedenen Aldehydsubstraten zeigten sich doch deutliche Unterschiede zwischen den Enzymen beider Spezies. Generell scheint Maus-SSADH spezifischer für Succinsemialdehyd zu sein als dies für *R. microplus* SSADH der Fall ist. Weiterhin ist das Mammalierenzym gegenüber den in dieser Studie identifizierten Inhibitoren p-Tolualdehyd und p-Methoxybenzaldehyd ebenso wie gegenüber Substratinhibition durch einen Überschuss Succinsemialdehyd weit weniger empfindlich als das Zeckenenzym. Es bleibt zu untersuchen, ob sich diese Unterschiede zwischen den beiden Enzymen für die Auffindung potenter und spezifischer Inhibitoren nutzen lassen. Ebenso muss noch die Frage beantwortet werden, ob SSADH, bzw. der GABA-Abbau allgemein eine valide akarizide Targetstruktur darstellt.

Im vierten Abschnitt des experimentellen Teils dieser Schrift wurden drei im Rahmen dieser Arbeit hergestellte SSADH-Enzympräparate in Sättigungstransfer-Differenz-Kernresonanzspektroskopie-(STD-NMR-)Experimente eingesetzt, um Fragen zur Aldehydsubstrat- und

Cosubstratbindung an SSADH zu beantworten. Die Frage ob SSADH das freie Aldehyd oder das in wässriger Lösung für Succinsemialdehyd in gleicher Konzentration vorliegende geminale Diol („gem-Diol“) als Substrat akzeptiert, wurde sowohl für das *E. coli*-Enzym als auch für *D. melanogaster* SSADH eindeutig zugunsten des Aldehyds beantwortet. Zusätzlich wurde diese exklusive Aldehyd-Spezifität auch für eine Reihe aromatischer Aldehyde (Benzaldehyd, 3-Nitrobenzaldehyd, 3-Carboxybenzaldehyd) und m-Tolualdehyd als Inhibitor belegt. Die STD-NMR-spektroskopische Untersuchung der Succinsemialdehyd-Interaktion mit der *D. melanogaster* SSADH Cysteine311Alanine-Mutante zeigte die Bindung sowohl der Aldehyd- als auch der gem-Diol-Form. Dieses Experiment deutet darauf hin, dass Cysteine311 für die Aldehyd-Selektivität des Enzyms ein entscheidender Aminosäurerest ist. Das STD-NMR-Epitopmapping der NAD⁺/NADP⁺-Bindung an *E. coli*-SSADH und an *D. melanogaster* SSADH legte in beiden Fällen die dominanten Protein-Interaktionen der Adenin- und Nikotinamidringe nahe, während die Ribose-Reste vermutlich weit weniger intensiv mit dem Enzym verbunden sind.

Summary

Metazoan and invertebrate ectoparasites belonging to the insecta or acari are a significant source of damage and nuisance to humans, companion animals and livestock. Control measures for these parasites rely largely on chemotherapeutics, predominantly drugs that target neuronal structures (such as γ -aminobutyric acid [GABA] gated chloride channels). With respect to the investigation of such neuronal target structures in insects or acarids, significant advances have been made in recent years. The physiology and the molecular organization of several target proteins have been elucidated, which allows conclusions on the molecular mode of action of several ectoparasiticides. By contrast the biosynthesis, transport mechanisms and degradation pathways of neurotransmitters addressing these neuronal targets in invertebrates are much less studied, or are completely unexplored, particularly in species with a parasitic life style. At the beginning of the studies described in this thesis, the biochemical pathway for the degradation of the neurotransmitter GABA was a particularly neglected research area. This catabolic pathway encompasses in mammals the two enzymes GABA transaminase and succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH). While for the former enzyme a small number of published reports from invertebrates could be identified, for SSADH only a single study in atlantic lobster dating back more than 40 years was identified in a comprehensive literature search.

The objective of the PhD project was the molecular and enzymological characterization of SSADH in parasitic and nonparasitic insects and acarids, organism groups where this enzyme was virtually unexplored. In this project, the list of investigated non-arthropod organisms included the bacterium *Escherichia (E.) coli* and the mammal *Mus musculus* (mouse). Their SSADH served as reference enzymes or were used for biophysical experiments. Amongst the arthropods, *Drosophila (D.) melanogaster* (fruit fly) was chosen as nonparasitic model insect. *Lucilia (L.) cuprina* (sheep blowfly) and *Ctenocephalides (C.) felis* (cat flea) were included as important parasitic insects, as was the acarid

Rhipicephalus (R.) microplus as the economically most important tick species. At the start of this thesis, expressed sequence tag studies and whole genome sequencing on *D. melanogaster* suggested the existence of a single copy gene candidate that, based on amino acid sequence homology, was considered to be a candidate for a SSADH ortholog in this species (DmSSADH).

In the first part of the study the *D. melanogaster* SSADH gene candidate was cloned and heterologously expressed in *E. coli* as a soluble protein. To compare the enzymological properties of this DmSSADH gene product, another so far uncharacterized *D. melanogaster* gene candidate for an acetaldehyde dehydrogenase (DmALDH) was cloned and expressed in *E. coli* as a soluble protein. Both expression products showed the expected enzymological properties: a NAD⁺-dependent succinic semialdehyde-oxidizing activity for DmSSADH and a NAD⁺-dependent acetaldehyde-oxidizing activity for Dm-ALDH. A detailed comparison of the substrate properties of 30 aliphatic and aromatic aldehydes, and in part also their enzyme kinetics parameters demonstrated the pronounced specificity of DmSSADH for the GABA degradation product succinic semialdehyde, while DmALDH exhibited much less discriminatory power and was categorized as a non-specific aldehyde dehydrogenase. Evaluation of amino acid homologies amongst different SSADH as well as consideration of literature data on chemical derivatizations, site-directed mutageneses and X-ray structures of distantly related non-specific aldehyde dehydrogenases suggested that a selection of amino acid residue positions in DmSSADH could be candidates for the catalytically active residues. Site-directed mutageneses on DmSSADH performed in this study demonstrated that two residues essential for catalysis are glutamate 277 and cysteine 311. By contrast, the residues cysteine 196, cysteine 243 and cysteine 502 that are also highly conserved or have been proposed as catalytic residues in earlier publications can be mutagenized to serine or alanine without complete loss of enzymatic activity.

The second part of the thesis encompassed the gene identification, full length gene cloning of SSADH in *L. cuprina* (LcSSADH) and *C. felis* (CfSSADH), as well as heterologous functional expression of one gene version, respectively.

Evaluation of the amino acid sequence identity to SSADH genes of other species as well as the construction of a molecular tree demonstrated that the newly identified genes, like DmSSADH, belong to the aldehyde dehydrogenase gene superfamily, and, more specifically, to the SSADH gene subfamily. Substrate/cosubstrate specificity determinations combined with enzyme kinetics studies showed that both enzymes are predominantly NAD⁺-dependent SSADHs. Bioinformatics analyses detected N-terminal mitochondrial import sequences in both *L. cuprina* and *C. felis* SSADH suggesting that these enzymes are localized *in vivo* in the mitochondrial matrix. Curiously, the *E. coli*-expressed *C. felis* SSADH was only enzymatically active after removal of the import sequence. The investigation of the genomic structure of the LcSSADH and CfSSADH genes revealed significant differences to the previously known gene organizations: firstly, different to the single copy SSADH gene situation in *E. coli*, *D. melanogaster*, *Mus musculus* and *Homo sapiens*, *L. cuprina* appears to possess 2-3 SSADH genes, while in *C. felis* up to 8 gene copies may be present. Secondly, compared to *D. melanogaster* (2 exons, 1 intron), the exon/intron structure of the SSADH genes in *L. cuprina* and *C. felis* is not conserved: the one SSADH genomic gene version investigated in detail in *L. cuprina* contained 3 exons and 2 introns, while the genomic gene version of *C. felis* analysed in this study was devoid of any introns. The reasons for the presence and the functions of multiple SSADH genes and of their distinct exon-intron structures in these parasitic insects remain elusive.

The central topic of the third part of this thesis was the gene identification and biochemical characterization of SSADH from the tick *R. microplus*. By a combination of degenerate primer RT-PCR, 'rapid amplification of cDNA ends' (RACE) PCR and full length gene PCR, a tick gene orthologous to insect and mammalian SSADH (RmSSADH) could be identified and isolated. Remarkably, the *R. microplus* SSADH gene investigated in detail in this study shows amino acid sequence identities to phylogenetically diverse organisms (*E. coli*, *Arabidopsis thaliana*, mouse, human, blow fly, cat flea) that suggest equidistance (50-55% identity). The results of Southern blot analyses of *R. microplus* DNA are

incompatible with a single copy situation and suggest the presence of 2-3 RmSSADH genes. To compare RmSSADH with a mammalian SSADH, the respective gene was isolated from mouse. Both the tick and the mouse SSADH genes were then heterologously expressed as soluble functional proteins in *E. coli*. The initial comparison showed that both proteins are potent NAD⁺-dependent succinic semialdehyde-oxidizing enzymes with very similar enzyme kinetics. A detailed evaluation of kinetic parameters of aliphatic and aromatic aldehyde pseudosubstrates in RmSSADH suggests the presence of a long, narrow and hydrophobic groove that also stabilizes a negative charge at a defined position, and that guides the substrate to the aldehyde binding and conversion site. A more detailed comparison of both enzymes suggests that in general, the mouse enzyme appears to be more specific for succinic semialdehyde than the tick enzyme. Furthermore, the mammalian enzyme is less sensitive to the newly identified inhibitors p-tolualdehyde and p-methoxyaldehyde and less prone to substrate inhibition by an excess of succinic semialdehyde compared to the tick enzyme. Whether these differences between mouse and *R. microplus* SSADH can be exploited for the identification of potent and tick-specific inhibitors remains to be determined. Also, the question whether SSADH or GABA degradation in general are valid acaricidal target structures has not yet been answered conclusively.

In the fourth section of the experimental part of this thesis, saturation transfer difference nuclear magnetic resonance spectroscopy (STD-NMR) experiments were performed on three of the above SSADH preparations, to answer questions on the aldehyde substrate and cosubstrate binding to these enzymes. Importantly, the long-standing question whether the free aldehyde of succinic semialdehyde or its hydrated *gem*-diol form (present in aqueous solution in equimolar amounts) is the binding substrates was answered conclusively in favour of the aldehyde form for both the *E. coli* and the *D. melanogaster* enzyme. In addition this exclusive aldehyde form specificity was confirmed for the pseudosubstrates benzaldehyde, 3-nitrobenzaldehyde and 3-carboxybenzaldehyde and the inhibitor 3-tolualdehyde. Most remarkably, STD-

NMR experimental investigation of the succinic semialdehyde interaction with the *D. melanogaster* SSADH cysteine311alanine mutant enzyme demonstrated binding of both the aldehyde and the *gem*-diol form. This experiment strongly suggests that cysteine311 is acting as an aldehyde *versus gem*-diol selectivity filter in the active site of the enzyme. Furthermore, STD-NMR epitope mapping of the NAD⁺/NADP⁺ binding to *E. coli* SSADH and *D. melanogaster* SSADH was performed. In both cases, the data suggested that the dominant protein-ligand interactions are *via* the adenine and the nicotinamide ring systems, while the ribose moieties interact much less intensely with the enzymes.

1. Einleitung

1.1 Der γ -Aminobuttersäure-Abbau in parasitischen und nichtparasitischen Invertebraten: Ein vernachlässigtes Forschungsfeld

Die Behandlung und Kontrolle von veterinärmedizinisch bedeutsamen Parasitosen beruht vor allem auf dem Einsatz von Chemotherapeutika. Bei der Therapie metazoischer Endo- und Ektoparasiten aus den Gruppen der Nematoden, Insekten und Akariden dominieren hierbei Wirkstoffe, die neuronale Zielstrukturen (Targets) adressieren. Prominente neuronale Targets sind beispielsweise die Glutamat-gesteuerten Chloridkanäle (Wirkstoffgruppen: Milbemycine und Avermectine), die γ -Aminobuttersäure-(GABA-) gesteuerten Chloridkanäle (Wirkstoffgruppen: Hexachlorcyclohexane, bicyclische Organohalogenide, Phenylpyrazole) und die Acetylcholinesterase aller drei oben genannten Gruppen, sowie die nikotinischen Acetylcholinrezeptoren der Nematoden und Insekten (Wirkstoffgruppen: Paraherquamide, Tetrahydropyrimidine, Imidazothiazoline, Neonikotinoide, Spinosyne). Die Erforschung dieser Zielstrukturen in Invertebraten ist zwar bei weitem nicht so fortgeschritten wie die Untersuchung der entsprechenden Enzyme und Rezeptoren der Mammalier, aber es wurden eine Reihe von Fortschritten erzielt, die die molekulare und physiologische Organisation der Targetproteine teilweise offen legen und Rückschlüsse auf die Wirkmechanismen der verschiedenen Antiparasitika erlauben (Bloomquist 1996; Köhler 2001; Raymond und Sattelle 2002; Woods und Williams 2007). Im Gegensatz hierzu stehen die Synthese-, Abbau- und Transportwege im Umfeld dieser Parasitentargets bisher nicht im Rampenlicht und sind bei den parasitären Invertebratenvertretern meist völlig unerforscht. Sogar bei nichtparasitären

Invertebraten-Modellorganismen wie *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Periplaneta americana* oder auch *Homarus americanus* bleiben die Untersuchungen vielfach beschränkt auf Genom- oder ‚Expressed sequence-tag‘-basierende Genvorhersagen oder vergleichsweise oberflächliche Betrachtungen enzymatischer Aktivitäten in Rohextrakten. Besonders vernachlässigt scheint der GABA-Abbauweg der Invertebraten zu sein, der bei Mammaliern die Enzyme GABA-Transaminase (GABA-T) und Succinsemialdehyd-Dehydrogenase (SSADH) umfasst. Zum erstgenannten Enzym ergab eine Literatursuche (bis 2007) nur ≤ 10 Verweise auf Untersuchungen in Invertebraten (Kravitz et al. 1965; Hall und Kravitz 1967a; Pandey und Singh 1985; Jeffery et al. 1988; Sloley und McKenna 1993), während für SSADH lediglich eine Studie in *Homarus americanus* publiziert wurde (Hall und Kravitz 1967b). Ein Ziel dieser Arbeit ist mit molekularbiologischen und enzymologischen Methoden dazu beizutragen, die offensichtliche Wissenslücke im GABA-Abbauweg der Invertebraten und besonders ihrer parasitischen Vertreter zu schließen.

1.2 Die GABA-Rezeptoren und der GABA-Zyklus der Mammalier: Ein Überblick

Die Zellen lebender Organismen weisen über ihre Plasmamembranen hinweg Konzentrationsunterschiede für verschiedene Ionen wie Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , oder Cl^- auf, die in ihrer Gesamtheit einen elektrochemischen Gradienten zwischen Intra- und Extrazellularraum bilden. Dieser Gradient wird unter hohem Energieaufwand durch spezifische Ionentransporter wie zum Beispiel die Na^+/K^+ -ATPase, sowie durch verschiedene selektive Ionenkanäle aufrechterhalten. Er bildet die energetische und mechanistische Grundlage für eine Vielzahl von essentiellen zellulären Prozessen, wie Substanzaufnahme und Sekretion oder auch Signalübertragung. Eine universelle Art der

Signalvermittlung in vielzelligen Organismen besteht im regulierten Ein- bzw. Ausstrom von Ionen durch spezifische Poren. Dieser kann, wie im Falle von spannungsgesteuerten Ionenkanälen Membranpotential-kontrolliert sein, oder wie im Falle von ligandengesteuerten Kanälen durch die Bindung einer spezifischen Substanz ausgelöst werden (Nelson und Cox 2001, Stryer et al. 2003). Zu den prominentesten Vertretern der ligandengesteuerten Ionenkanäle in Mammaliern zählen die nikotinischen Acetylcholinrezeptoren, die Serotoninrezeptoren Typ 3- (5-HT₃-) Rezeptoren, sowie verschiedene Glutamat-Rezeptoren, die alle depolarisierende exzitatorische kationenselektive Kanäle (Na⁺, K⁺, Ca²⁺) bilden. Aber auch Glycin-, oder γ-Aminobuttersäure- (GABA-) gesteuerte hyperpolarisierende inhibitorische Anionen-Kanäle, die Cl⁻ spezifisch sind zählen dazu (Ortells und Lunt 1995; Connolly und Wafford 2004). Im Zentralnervensystem (ZNS) der Vertebraten vermitteln GABA-gesteuerte Chlorid-Kanäle den grössten Teil der inhibitorischen synaptischen Reizweiterleitung und dominieren die Synapsen von 20-50% der Gehirnneuronen. Diese sogenannten ionotropen in Typ A und Typ C unterschiedenen GABA-Rezeptoren gehören zu den ligandengesteuerten Ionenkanälen (LGICs) und speziell zur Superfamilie der Cystein-Loop-Rezeptoren, deren Vertreter eine meist heteropentamere, manchmal auch homopentamere Struktur aus Untereinheiten mit jeweils 4 Transmembranhelices aufweisen (Bormann 2000; Abbildung 1-1).

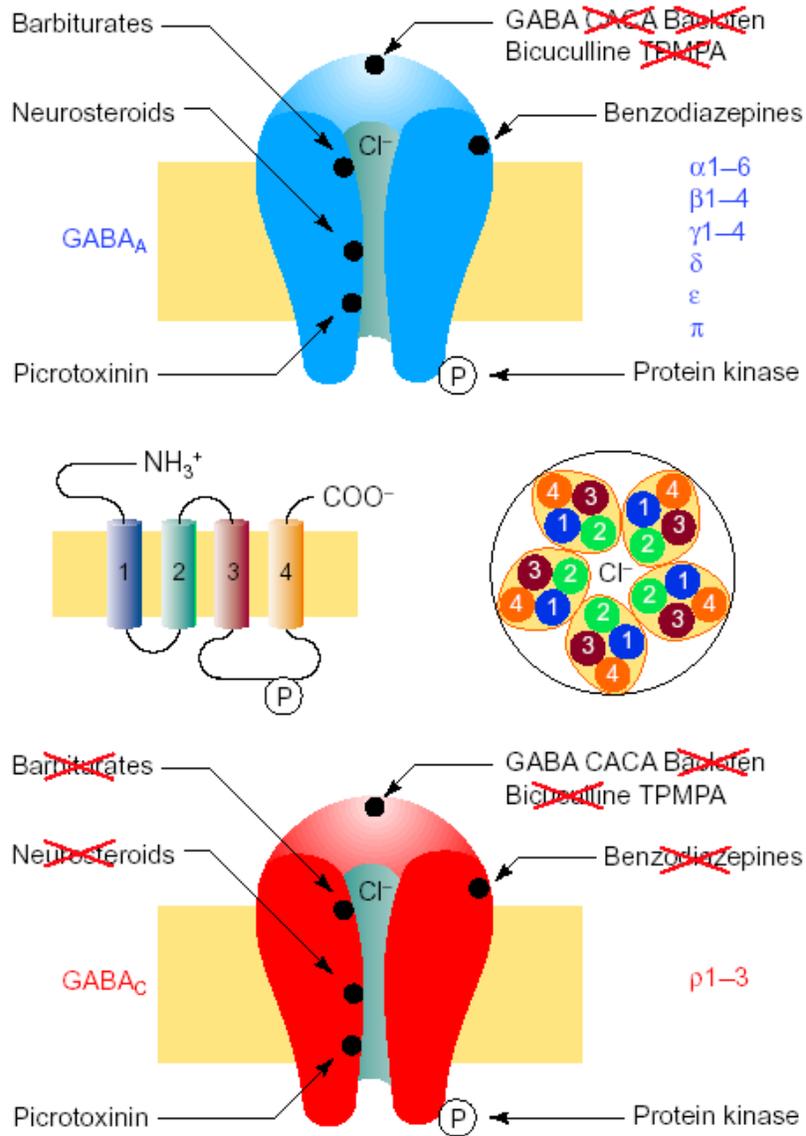


Abbildung 1-1 Darstellung der Funktion der beiden Liganden gesteuerten GABA-Rezeptoren (aus: Bormann 2000)

Neben den ionotropen GABA_A und GABA_C Rezeptoren existieren auch strukturell und funktionell unterschiedene sogenannte metabotrope GABA_B-Rezeptoren, die G-Protein-gekoppelte Rezeptoren darstellen. Von den verschiedenen GABA-Rezeptoren sind insbesondere die GABA-gesteuerten Chlorid-Kanäle des Typs A von großer pharmakologischer Bedeutung. Sie sind die Zielstrukturen von Krampfgiften wie dem Picrotoxinin, der therapeutisch wichtigen Tranquillantien aus der Benzodiazepinklasse, der Steroidhypnotika, sowie der narkotisch wirksamen Barbiturate. Weiterhin scheinen die ionotropen GABA-Rezeptoren als molekulare Targets an der Wirkung von Ethanol und verschiedener Anaesthetika beteiligt zu sein. Die Biosynthese von GABA erfolgt im Cytosol verschiedener Mammalier-Zelltypen, in besonders hohem Maße aber in GABAergen Neuronen, durch das Pyridoxalphosphat- (PALP-)abhängige Enzym Glutamatdecarboxylase (GAD). Das cytosolische GABA wird über einen spezifischen GABA/H⁺-Symporter in synaptischen Vesikeln gesammelt, die bei entsprechender Stimulierung der synaptischen Endknotten des Neurons mit der Plasmamembran fusionieren und ihren Inhalt in den synaptischen Spalt entlassen. Dort bindet GABA an den postsynaptischen und präsynaptischen Membranen vor allem an die ionotropen Rezeptoren vom Typ GABA_A und GABA_C sowie an die G-Protein-gekoppelte metabotrope Rezeptoren vom Typ GABA_B. Bei den ionotropen GABA-Rezeptoren führt die Bindung zur Öffnung einer Chlorid-Ionen-selektiven Pore und der folgende Einstrom von Cl⁻ hyperpolarisiert die postsynaptische Membran, während die GABA-vermittelte Aktivierung der metabotropen Rezeptoren über G-Protein-vermittelte Prozesse vor allem über die Öffnung von K⁺-Kanälen eine Ruhepotentialerhöhung bewirkt. Die GABA-Wirkung im synaptischen Spalt wird durch Wiederaufnahme mit Hilfe spezifischer in der Plasmamembran der umgebenden Zellen lokalisierter GABA/Na⁺-Symporter unterbrochen. Ein Teil des extrazellulären GABA gelangt direkt in das Cytoplasma der Präsynapse und kann über Vesikelaufnahme für die Signalübertragung direkt rezykliert werden, während ein anderer Teil von benachbarten Gliazellen ins Cytosol aufgenommen und dem sogenannten GABA-Zyklus zugeführt wird. Hierbei erfolgt zunächst die Aufnahme in die

Mitochondrien der Gliazellen und anschließend die Umsetzung mit dem PALP-abhängigen Enzym GABA-Transaminase (GABA-T) mit 2-Ketoglutarat als Transaminierungsakzeptor.

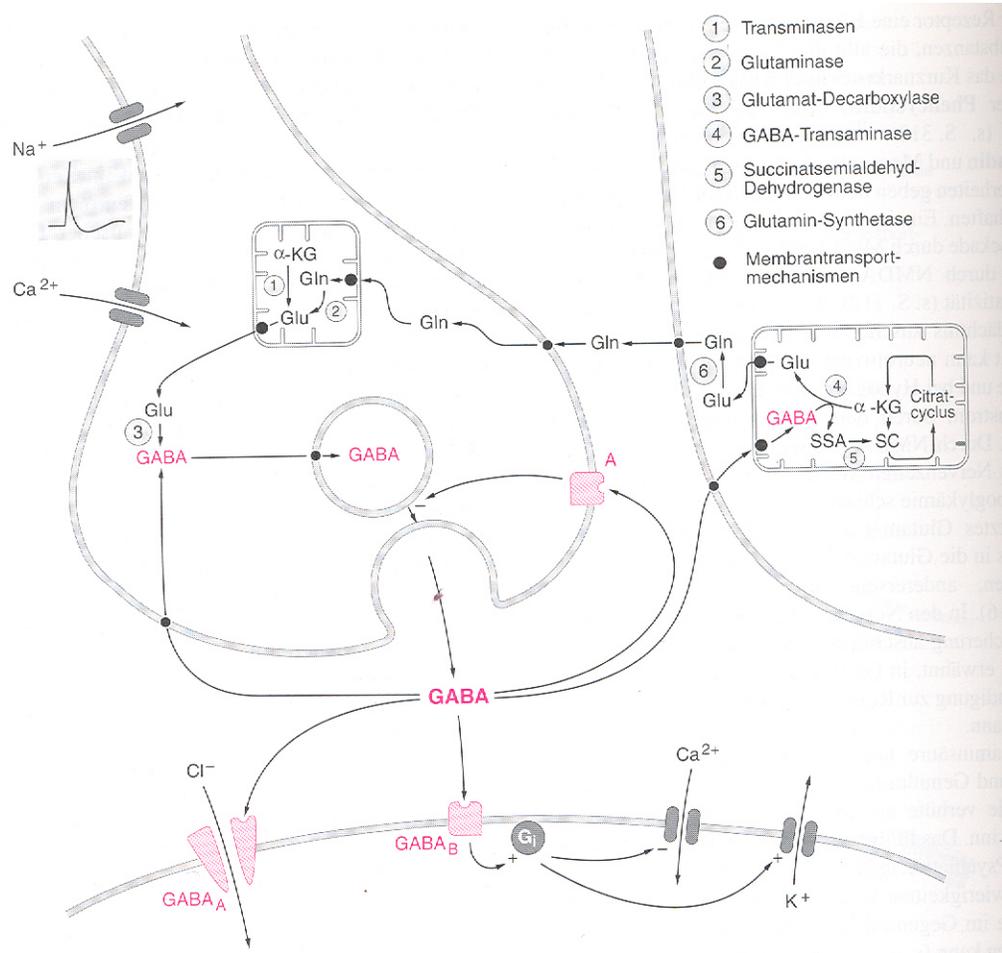


Abbildung 1-2 Der GABA-Zyklus (aus: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie; Forth, Henschler)

Als Reaktionsprodukte entstehen Glutamat und Succinsemialdehyd. Das Glutamat verlässt die Mitochondrien, wird amidiert zu Glutamin und in dieser Form an die benachbarten Neuronen weitergereicht. In den neuronalen Mitochondrien erfolgt die Glutaminase-vermittelte Deamidierung zu Glutamat, das nach Export ins Cytosol für die GABA-Synthese bereitgestellt wird. Das in der Gliazelle verbleibende Succinsemialdehyd wird durch ein zweites mitochondriales Enzym, die Succinsemialdehyd-Dehydrogenase (SSADH) unter

NAD⁺-Reduktion zu Succinat oxidiert und anschließend dem Citratzyklus zugeführt. Das Zusammenspiel von GABA-Synthese, Freisetzung, Wiederaufnahme, Metabolisierung und Synthesevorläuferbereitstellung nennt man den GABA-Zyklus (Abbildung 1-2). Die Bedeutung des GABA-Zyklus für die Zentralnervensystem-(ZNS-) Funktion wird bei der Betrachtung congenitaler Defekte wie dem GABA-T- (Medina-Kauwe et al. 1999) oder dem SSADH-Mangel (Gibson et al. 1983, Gupta et al. 2002, Gibson et al. 2003, Pearl et al. 2003) deutlich. Im ersten Fall stehen vor allem Epilepsie-ähnliche generalisierte Krampfanfälle und leukodystrophische Veränderungen im Vordergrund, während SSADH-Defizienz vor allem mit psychomotorischer Retardation und Sprachentwicklungsstörungen, sowie Hypotonie und Ataxia einhergeht. Für die zentrale Bedeutung des GABA-Zyklus im normalen und pathologischen ZNS-Geschehen spricht auch der Einsatz des irreversiblen GABA-T- Inhibitors Vigabatrin als Antiepileptikum und zur Therapie einer Reihe weiterer neurologischer Erkrankungen, die mit Krämpfen, Übererregung und Angstzuständen einhergehen (Sankar und Derdiarian 1998). In ähnlicher Weise zeigt der GABA/Na⁺-Symporter-Hemmstoff Tiagabin eine ausgeprägte krampflösende und anxiolytische Wirkung, und der therapeutische sedierende Effekt des Baldrianwirkstoffs Valproat wird von einigen Autoren unter anderem auf seine GABA-T- und SSADH-Hemmwirkung zurückgeführt. Daher ist nicht überraschend, dass der GABA-Zyklus als therapeutische Zielstruktur (Target) neuerdings wieder in den Vordergrund der humanmedizinischen Forschung gerückt ist (Yogeeswari et al. 2005).

1.2.1 GABA-Abbau in Mammaliern (I): Die GABA-Transaminase (GABA –T)

Schon kurz nach der Entdeckung von GABA im Mammaliergehirn vor etwa 60 Jahren (Roberts und Frankel 1950, Awapara et al.1950) wurde eine Enzymaktivität entdeckt, die diese Aminosäure mit 2-Ketoglutarat als

Reaktionspartner in einer Transaminierungsreaktion zu Glutamat und Succinsemialdehyd umsetzt, die GABA-Transaminase (GABA-T) (Bessman et al. 1953, Roberts et al. 1953). Die erste Isolierung des Enzyms wurde von Schousboe et al. (1973) beschrieben und in der Folgezeit wurden eine Vielzahl von Berichten über die Reinigung, Charakterisierung, Gewebs-, zelluläre und subzelluläre Lokalisierung, Enzymologie und Inhibitorsensitivität veröffentlicht (Salganicoff and DeRobertos 1963, 1965, Maitre et al. 1975, John and Fowler 1976, Lippert et al. 1977, White and Sato 1978, Churchich and Moses 1981, Soper and Manning 1982, Kim and Churchich 1983, Choi and Churchich 1985, 1986, Silverman et al. 1987, Jefferey et al. 1988, Andruszkiewicz and Silverman 1990, DeBiase et al. 1991, Hopkins et al. 1992). Diese Studien zeigten, dass die Mammalier-GABA-T ein lösliches Dimer aus zwei Untereinheiten ($M_r \sim 50$ kDa) bildet und intrazellulär weitgehend im mitochondrialen Matrixraum lokalisiert ist. Neben GABA vermag die Mammalier-GABA-T auch β -Alanin mit 2-Ketoglutarat unter Bildung von Malonsemialdehyd umzusetzen, während die proteinogenen α -Aminosäuren keine Substrate darstellen. Die Isolierung einer Mammalier-GABA-T cDNA-Sequenz basierend auf Peptidsequenzen des Schweinehirn-Enzyms wurde erstmals 1992 berichtet. Der Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz mit dem früher durch Peptidsequenzierung bestimmten N-Terminus zeigte die Abwesenheit von 27 Aminosäuren im reifen Protein, deren Sequenzcharakteristik eine Mitochondrienimport-Signalsequenz-Funktion nahe legt (Kwon et al. 1992). Die heterologe Expression des Schweine-GABA-T-Gens in *Escherichia (E.) coli* ergab ein lösliches und aktives Protein mit enzymkinetischen Eigenschaften, die dem natürlichen Enzym weitgehend entsprachen (Park et al. 1993, Churchich and Moses 1981). In der Folge wurden die cDNAs der entsprechenden Ratten- (Medina-Kauwe et al. 1994), Human- (Osei and Churchich 1995) und Rinderenzyme (Jeon et al. 2001) identifiziert und kloniert, wobei auf Aminosäuresequenzebene hohe Identitätswerte von 89%, 95,4% und 94% zur Schweine-GABA-T gefunden wurden. Genomuntersuchungen legen nahe, dass GABA-T in Mammaliern von einer einzigen Genkopie kodiert wird (Choi et al. 2001). Eine Reihe von

enzymologischen und immunchemischen Studien haben gezeigt, dass GABA-T-Aktivität in Mammaliern nicht auf das Gehirn beschränkt ist, sondern auch in peripheren Geweben wie Leber, Niere, Pankreas und Thrombozyten (Wu et al. 1978, White 1979, DeBiase et al. 1995, und darin enthaltene Literaturverweise). RNA-Dot-Blot-Analysen von Humangeweben stützen dieses Bild auch auf der mRNA-Expressionsebene (Jeon et al. 2000). Die Funktion des GABA-Zyklus in nicht-neuronalen Geweben ist noch nicht geklärt. Neben Signalübertragung werden auch metabolische Funktionen diskutiert. Ein Meilenstein in der GABA-T-Forschung der letzten Jahre war die Kristallisation und nachfolgende Aufklärung der Röntgenstruktur des Schweineleberenzym mit einer Auflösung von 3 Å, die die früher postulierte dimere Anordnung der Untereinheiten bestätigte (Storici et al. 1999). Dieser Arbeit ist inzwischen eine vergleichende Beschreibung der höher aufgelösten Kristallstrukturen von freiem, sowie mit den Inhibitoren Vigabatrin bzw. γ -Ethinyl-GABA komplexiertem Enzym gefolgt. Hierbei konnte die in früheren Arbeiten erarbeiteten Mechanismen und Strukturen der kovalenten Inhibitor-Addukte bestätigt werden. Eine große Überraschung war das Auffinden eines [2Fe-2S]-Clusters im Zentrum des Dimers nahe des PALP-Cofaktors (Storici et al. 2004a). Die Strukturinformation aus diesen Versuchen hat zum Design neuer Vigabatrin-Analoga beigetragen (Choi et al. 2002) und dient als Ausgangspunkt für die zielgerichtete Untersuchung und Entwicklung von innovativen GABA-T-Inhibitoren (Storici et al. 2004b).

1.2.2 GABA-Abbau in Mammaliern (II): Die Succinsemialdehyd-Dehydrogenase (SSADH)

Der 1953 entdeckte GABA-T-katalysierte Abbau von GABA ergibt neben Glutamat auch das potentiell chemisch reaktive Produkt Succinsemialdehyd (SSA). Während Glutamat in den weiteren Verlauf bekannter Stoffwechselwege eingeordnet werden konnte, blieb das weitere metabolische Schicksal von SSA einige Jahre unbekannt. Erst 1958 identifizierten Albers und Salvador ein Enzym im Mammaliergehirn, das die NAD^+ -abhängige Oxidation von SSA zu Succinat katalysiert, die Succinsemialdehyd-Dehydrogenase (SSADH). Dieser Studie schlossen sich partielle Reinigungen des Enzyms aus verschiedenen Mammalierspezies, weitere enzymkinetische Charakterisierungen, erste Untersuchungen zur Substratspezifität sowie Inhibitorstudien und enzymatische, histochemische und immunchemische Lokalisierung des Enzyms an (Albers und Koval 1961, Embree und Albers 1964, Pitts und Quick 1965, Pitts und Quick 1967, Miller und Pitts 1967, Kammeraat und Veldstra 1968, Sims et al. 1971, Sims et al. 1972, Maitre et al. 1976, Rivett und Tipton 1981, Manzocchi et al. 1986, Chambliss et al. 1995). Die Eigenschaften von SSADH aus verschiedenen Mammaliern liessen sich basierend auf diesen Studien wie folgt zusammenfassen: das Enzym besitzt einen sehr kleinen K_m -Wert für das Substrat SSA ($2,7 - 5,3 \mu\text{M}$) und zeigt schon ab $\sim 20\text{-}30 \mu\text{M}$ SSA Substrathemmung. Als Cosubstrat dient ausschließlich NAD^+ ($K_m \sim 100 \mu\text{M}$) während mit NADP^+ kaum Aktivität nachweisbar ist. Das pH-Optimum von SSADH wurde im Bereich zwischen 8,5 und 9,5 bestimmt. Die Mammalier-SSADH ist auch ausgeprägt SSA-spezifisch und setzt die meisten anderen Aldehyde wie z. B. Acetaldehyd und Benzaldehyd nur langsam oder nicht um. Das Enzym ist oxidationsempfindlich, wie die protektive Wirkung von 2-Mercaptoethanol belegt und wird durch verschiedene Thiol-modifizierende Reagenzien inaktiviert. Hierbei wirkt NAD^+ protektiv, was für die Lokalisation eines Cysteins in der aktiven Tasche spricht. Als besonders gute SSA-analoga

Inhibitoren wurden m- und p-Hydroxybenzaldehyd bestimmt. Während das Gehirn die höchsten Aktivitäten bezogen auf das Frischgewicht aufweist, finden sich auch in anderen Mammalierorganen wie Leber, Herz, Niere und Milz nachweisbare Enzymaktivitäten. Bei der Untersuchung der zellulären Lokalisation von SSADH zeigte sich, dass das Enzym gemeinsam mit GABA-T in der mitochondrialen Matrix stark angereichert ist, während für das GABA-Syntheseenzym GAD eine eindeutig cytosolische Lokalisierung festgestellt wurde (Salganicoff und DeRobertis 1963, 1965). In einer Reihe weiterer Studien wurde gezeigt, dass SSADH auch eine ausgeprägte Produkthemmung bezüglich NADH ($K_i \sim 60 \mu\text{M}$), nicht aber bezüglich Succinat aufweist (Blaner und Churchich 1979, 1980, Rivett and Tipton 1981). Die Bestimmung der molekularen Identität der SSADH über die vollständige Reinigung und enzymkinetische Charakterisierung zog sich über 10 Jahre hin und war von wissenschaftlichen Kontroversen begleitet. Der erste Bericht dieser Art wurde 1977 veröffentlicht (Cash et al. 1977), wobei sich beim isolierten Enzym der K_m für SSA ($100 \mu\text{M}$ versus $2,7 - 5,3 \mu\text{M}$), der Beginn der Substratinhibition durch SSA (1 mM versus $20-50 \mu\text{M}$) sowie die postulierte Quartärstruktur (Dimer versus Tetramer) deutlich von den Ergebnissen früherer und auch späterer Studien unterschied. Daher wurde die Identität dieses Enzyms in einer Arbeit von Ryzlak und Pietruzko (1988) in Frage gestellt. Diese Autoren vertraten die Meinung, dass es sich bei dem gereinigten Enzym von Cash et al. (1977) um eine Glutaminsäure- γ -semialdehyd-Dehydrogenase handelte, die im Labor des Seniorautors 1986 beschrieben wurde (Pietruzko und Forte-McRobbie 1986). Blaner und Churchich (1979,1980) veröffentlichten in zwei Arbeiten die Reinigung der SSADH aus Schweinehirn. Ihre Ergebnisse waren bezüglich des $K_m[\text{SSA}]$ ($11-15 \mu\text{M}$), Substratinhibition durch SSA (über $50 \mu\text{M}$) und der Quartärstruktur der SSADH (Tetramer aus 41 kDa -Untereinheiten) in besserer Übereinstimmung mit früheren und späteren Studien zu diesem Enzym. Vermutlich sind diese Autoren somit die ersten, die eine vollständige Reinigung beschrieben haben, obschon in einer späteren Arbeit von Ryzlak und Pietruzko (1988) in Anspruch genommen wurde, die bis dahin umfassendste Studie zur Mammalier-SSADH durchgeführt zu

haben. Anhand der Reinigung und Analyse des Humangehirn-Enzyms wurden alle bisher in anderen Mammalierspezies beschriebenen Befunde bestätigt und darüber hinaus die detaillierteste Untersuchung zur Substratspezifität mit 29 Aldehyden vorgelegt. Nur Glutarsemialdehyd, p-Nitrobenzaldehyd und Propionaldehyd zeigten im Vergleich zum spezifischen Substrat SSA eine deutliche Aktivität, während für Acetaldehyd, Butyraldehyd, Valeraldehyd und m-Nitrobenzaldehyd wenigstens die Substratwirkung demonstriert werden konnte. 21 weitere Aldehyde waren ohne Substrateigenschaften. Der Vorschlag einer heterotetrameren Struktur stand im Gegensatz zu früheren Befunden mit der SSADH aus Schweinehirn (Blaner and Churchich 1980) und wurde auch von späteren Untersuchungen nicht bestätigt (Chambliss und Gibson 1992). Ein entscheidender Schritt in der SSADH-Forschung war die Identifizierung und partielle Klonierung des SSADH-Gens aus Rattenhirn- und Humanleber-cDNA mit Hilfe N-terminaler und interner Sequenzen beider Proteine für die Ableitung degenerierter PCR-Primer. Obschon bei keinem der Klone ein Start-Codon identifiziert wurde, enthielten doch zwei der Ratten-cDNA-Partialsequenzen den N-terminus des reifen Proteins. Ihre in-frame-Fusion mit Glutathion-S-Transferase führte in *E. coli* nach Expression zu Fusionsproteinen mit deutlicher SSADH-Aktivität. Southern-Blot-Analysen mit Human-DNA belegten, dass SSADH von einer einzelnen Genkopie codiert wird. Northern-Blots von verschiedenen Ratten- und Humangeweben demonstrierten eine ausgeprägte mRNA-Expression in Gehirn, Leber und Herz in Übereinstimmung mit früheren enzymatischen und immunologischen SSADH-Expressionsdaten. Die Darstellung der Vollängen-cDNA aus Ratte und Mensch stieß allerdings auf unüberwindliche Schwierigkeiten, vermutlich aufgrund der extrem GC-reichen 5'-terminalen Genregion. Erst durch eine Mosaikklonierung mit humaner genomischer DNA als Quelle für die 5'-Region konnte das vollständige SSADH-Gen dargestellt werden (Trettel et al. 1996, Chambliss et al. 1998). Basierend auf dieser Sequenz gelang schließlich Kang et al. (2005) die Expression und Reinigung der reifen Form der Human-SSADH im großen Massstab als N-terminal hexa-Histidin-fusioniertes Protein. Die enzymkinetischen Eigenschaften

des rekombinanten Produkts (Kang et al. 2005) entsprachen weitgehend denen des native Enzyms (Chambliss and Gibson 1992, Murphy et al. 2003). Gibson und Mitarbeiter waren die ersten, die hereditären SSADH-Mangel mit einem relativ unspezifischen neuronalen Krankheitsbild in Verbindung brachten, das unter anderem durch γ -Hydroxybutyricacidurie gekennzeichnet ist. Hierbei erfolgt zum Einen vermutlich im metabolischen Rückstau vom SSA ausgehend eine Akkumulation von GABA, zum Anderen wird angestautes SSA durch Reduktion in γ -Hydroxybuttersäure, eine neurologisch stark aktive Substanz, umgewandelt. Beide neuroaktiven Substanzen scheinen zum Krankheitsbild beizutragen (Gibson et al. 1983). Die Klonierung des humanen SSADH-Gens erlaubte erstmals den direkten Nachweis möglicherweise zugrunde liegender Gendefekte: In zwei betroffenen Familien fanden sich unabhängige Punktmutationen an Exon-Intron-Grenzen festgestellt. Diese Mutationen führen zum Auslassen der betroffenen Exons im mRNA-Splicingvorgang und im einen Fall zu einer Rasterverschiebung und vorzeitigem Polypeptidkettenabbruch, im anderen Fall zu einer im Raster liegenden Deletion. In beiden Fällen wird keine aktive SSADH mehr gebildet. Die Herstellung und Analyse von Maus-Genknockoutmutanten war schließlich der endgültige Beweis des Zusammenhangs zwischen defektem SSADH-Gen und der neurologischen und biochemischen Symptomatik, wie sie sich in der γ -Hydroxybutyricacidurie manifestiert. (Hogema et al. 2001, Gupta et al. 2002).

1.3 Der GABA-Synthese und –Abbau in Pflanzen, Hefen und Prokaryonten

Das Vorkommen von GABA wurde in Pflanzen vor über 50 Jahren entdeckt (Stewart et al. 1949). Seine Synthese durch eine Ca^{2+} /Calmodulin-regulierte GAD wurde mit einer Reihe von Funktionen in Verbindung gebracht, die einen Alternativweg des Glutamatabbaus, die Kontrolle des cytosolischen pH's, die Balance zwischen N- und C-Katabolismus, die Abwehr von phytophagen Insekten, sowie die Konzentrationsbegrenzung reaktiver Sauerstoffintermediate umfassen (Bown und Shelp 1997, Shelp et al. 1999, Bouche et al. 2003). Neuerdings wurde GABA sogar mit Signaltransduktionsvorgängen in Pflanzen in Verbindung gebracht (Bouche et al. 2003, Bouche und Fromm 2004). Trotz der mittlerweile erkannten Bedeutung von GABA für die Physiologie der Pflanzen ist das erste Enzym des GABA-Abbauwegs, die GABA-T noch wenig untersucht. Breitkreuz und Shelp (1995) zeigten, dass dieses Enzym ebenso wie die SSADH auch bei Pflanzen ein mitochondriales Enzym ist und dass bemerkenswerter Weise neben α -Ketoglutarat auch Pyruvat als Transaminierungsakzeptor in der Reaktion mit GABA fungieren kann. Die SSADH von *Arabidopsis thaliana* wurde von Fromm und Bush (1999) isoliert, die codierende cDNA kloniert, exprimiert und nachfolgend enzymkinetische Untersuchungen, sowie Inhibitorstudien durchgeführt (Busch und Fromm 2000). Die spätere Generierung von Genknockout-Pflanzen zeigte die zentrale Bedeutung dieses Enzyms für die Abwehr von oxidativem Stress. Bei *Saccharomyces cerevisiae* wurde gezeigt, dass die GABA-Produktion durch eine Glutamatdecarboxylase für die Toleranz der Hefe gegenüber oxidativem Stress notwendig ist (Coleman et al. 2001). Darüber hinaus kann GABA von den Hefen als Stickstoffquelle genutzt werden. Die molekularen Eigenschaften der GABA-abbauenden Enzyme GABA-T und SSADH, die bisher nur als Gensequenzen vorliegen (Ramos et al. 1985, Andre und Janniaux 1990) waren bis vor kurzem aber noch weitgehend unklar. Erst Takahashi et al. (2004) untersuchten den biotechnologisch wichtigen GABA-

Abbaupfad der Sake-Brauerei in größerem Detail. Bei einer Reihe von Bakterien scheint die GABA-Synthese durch Glutamatdecarboxylase Säuretoleranz vermitteln (Richard und Foster 2004, Cotter et al. 2005). GABA-abbauende Enzyme der Bakterien scheinen vor allem katabole Funktionen bezüglich dieses endogen produzierten sowie auch exogen als Stickstoff- und Energiequelle zugänglichen GABAs zu spielen. So finden sich im bestuntersuchten Organismus *E. coli* die Gene der Enzyme GABA-T (*gabT*) und SSADH (*gabD*) zusammen mit denen eines GABA-Transporters (*gabP*) und eines vermuteten Repressorproteins (*gabC*) zum *gabDTPC*-Operon zusammengefasst, das der Stickstoffquellen-Regulation (Ntr) unterliegt (Metzer et al. 1979, Niegemann et al. 1993, Schneider et al. 2002). Die beiden Gene *gabT* und *gabD* wurden aus *E. coli* isoliert, sequenziert und überexprimiert (Bartsch et al. 1990). Die Studien mit den gereinigten Enzymen zeigten, dass *E. coli* GABA-T neben GABA auch das Herbizid Phosphinothricin als Substrat in Transaminierungsreaktionen akzeptiert (Schulz et al. 1990). Vor kurzem wurde die hochaufgelöste Kristallstruktur der *E. coli* GABA-T berichtet und es wurden systematische Mutagenesestudien durchgeführt. Hierbei wurde eine tetramere Struktur identifiziert und die aktiven Reste V₂₄₁, E₂₁₁ und I₅₀ identifiziert (Liu et al. 2004, 2005). Für die vom *gabD*-Gen abgeleitete *E. coli* SSADH wurde eine strikte NADP⁺-Abhängigkeit berichtet, die im Gegensatz zur eindeutigen NAD⁺-Präferenz des entsprechenden Mammalier-Enzyms steht. Weitergehende Mutagenese- und Kristallisationsstudien existieren zu diesem Enzym nicht. *GabD*-Orthologe, deren Expressionsprodukte ebenfalls starke NADP⁺-Präferenz aufwiesen, wurden z. T. gemeinsam mit *gabT*-Orthologen in verschiedenen Bakterien-Spezies identifiziert, wie z. B. *Pseudomonas* spp. (Nakamura 1960, Padmanabhan und Tchen 1969, Sanchez et al. 1988), *Klebsiella pneumoniae* (Sanchez et al. 1989), *Clostridium kluyveri* (Söhling und Gottschalk 1996), *Bradyrhizobium japonicum* (Green et al. 2000), *Rhizobium leguminosarum* (Prell et al. 2002) sowie in *Mycobacterium tuberculosis* (Tian et al. 2005). Für die drei letztgenannten Spezies wurde spekuliert, dass der GABA-Nebenweg (GABA shunt) im Citratzyklus eine Adaptation an mikroaerophile Umgebungsbedingungen

darstellt. Neben der NADP⁺-abhängigen SSADH wurden auch entsprechende Enzymaktivitäten in *E. coli* und Pseudomonas-Spezies identifiziert, die sowohl NADP⁺ als auch NAD⁺ als Cofaktoren akzeptieren. Ihre Funktion ist weitgehend unbekannt (Nakamura 1960, Callewaert et al. 1973, Roseblatt et al. 1973, Donnelly und Cooper 1981).

1.4 Der GABA-Abbau in Invertebraten aus der Gruppe der Insekten, Akariden und Crustaceen

Wie bei Vertebraten ist GABA, soweit bekannt, auch bei Invertebraten aus den Gruppen der Insekten, Akariden und Crustaceen der dominante inhibitorische Neurotransmitter. Von seinen Bindungsstrukturen in den angesprochenen Invertebratengruppen sind die ionotropen GABA-Rezeptoren bei weitem am besten untersucht, während metabotrope GABA-Rezeptoren wenig erforscht sind. GABA-Bindung an die ionotropen GABA-Rezeptoren führt bei ihnen zu einer raschen Öffnung eines Chloridkanals, die durch eine Reihe natürlicher und synthetischer Substanzen wie Picrotoxinin, Lindan, Dieldrin, Endosulfan und Fipronil verhindert wird. Die besondere landwirtschaftliche, veterinär- und humanmedizinische Bedeutung dieser und vieler ähnlicher Inhibitoren als Insektizide, Akarizide und anti-Crustaceenmittel führte zu einer Vielzahl von Studien, die die Eigenschaften insbesondere der Insekten-GABA-Rezeptoren untersuchte (Sattelle 1990, Rauh et al. 1990, Hosie et al. 1997, French-Constant et al. 1998, Chen et al. 2006). Dieser Fülle an Untersuchungen zur Ionenkanalrezeptorwirkung von GABA in den angesprochenen Invertebraten-Gruppen stehen bemerkenswert wenige Studien zum Abbau dieses so bedeutenden Neurotransmitters gegenüber. Die Untersuchungen über GABA-Transaminase (GABA-T) beschränken sich auf die Spezies Hummer (*Homarus americanus*), Küchenschabe (*Periplanata americana*) und Heuschrecke (*Schistocerca gregaria*). Die frühesten Studien beschrieben die GABA-T-Aktivitäten in exzitatorischen und inhibitorischen Axonen von Hummer, wobei

trotz 100 fachem Konzentrationsunterschieds des Substrats GABA (1 mM versus 100 mM) nur geringe Unterschiede in der Enzymaktivität gefunden wurden (Kravitz et al. 1965, Hall et al. 1970). Weiterhin wurde mit löslichem Extraktmaterial aus diesem Organismus eine Reihe von kinetischen Parametern, das pH-Optimum sowie die Salzabhängigkeit der GABA-Transaminase-Reaktion bestimmt (Hall und Kravitz 1967a). Spätere Arbeiten in der Küchenschabe untersuchten die Auswirkungen verschiedener GABA-Transaminase-Inhibitoren wie z.B. Mercaptopropionsäure, Isonicotinsäurehydrazid, Aminosäureester, Gabaculin und γ -Vinyl-GABA auf dissektierte Schabengehirne (Pandey und Singh 1985, Sloley und McKenna 1993), bzw. nach Injektion lebender Tiere (Gammon et al. 1986, 1987) auf GABA-Umsetzung und / oder Lebensfähigkeit. Die Untersuchungen an lebenden Schaben zeigten, dass bei Behandlung der Tiere mit dem irreversiblen GABA-T-Inhibitor Gabaculin die $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung aus coinjiziertem ^{14}C -GABA vollständig unterdrückt werden kann, aber die Tiere trotzdem überlebten. Während sich all diese Studien auf die Untersuchung von Extraktmaterial bzw. lebenden Organismen beschränkten, reinigten Jeffery et al. (1988) GABA-T aus Heuschreckenköpfen zur Homogenität auf und bestimmten Michaelis-Menten-Konstanten der Substrate GABA (0,79 mM) und 2-Ketoglutarat (0,27 mM) sowie die Wirkung einiger Inhibitoren. Weiterhin legten ihre Experimente nahe, dass die Heuschrecken-GABA-T ein mitochondriales Enzym ist. Lediglich eine spätere Arbeit befasste sich mit Invertebraten-GABA-T, aber diese beschränkte sich auf neurophysiologische Untersuchungen der Wirkungsweise von Inhibitoren auf Langustensynapsen. Auch auf Gen Ebene ist bisher keine Invertebraten-GABA-T näher charakterisiert. Im Rahmen von „Expressed Sequence Tag“- (EST-) Projekten wurde zwar eine cDNA identifiziert (z. B. Genbank No. AY113591, siehe auch Inlow und Restifo 2004), die auf Proteinsequenzebene beträchtliche Homologie zur Human- (50,5 % Identität) aufweist, jedoch ist bisher die Funktionalität des Genprodukts nicht experimentell belegt. Lediglich im Rahmen von Transkriptionsstudien wurde die Regulation der CG7433-cDNA im Zusammenhang mit der Steuerung des circadianen Rhythmus (Ueda et al. 2002), der geschlechtsspezifischen Rolle von Fettzellen im Kopf

(Fujii und Amrein 2002) sowie dem geruchsgesteuerten Verhalten (Anholt et al. 2003) untersucht. Das entsprechende Gen liegt im *D. melanogaster*-Genom (Adams et al. 2000) als Einzelkopie vor, und seine gesamte Struktur ist im Flybase-Report CG7433 zusammengefasst (<http://flybase.bio.indiana.edu>).

Im Falle der Succinsemialdehyd-Dehydrogenase (SSADH) gibt es nur eine publizierte Studie für Invertebraten: Hall und Kravitz (1967b) berichteten über die Anreicherung einer SSADH aus Hummergehirn durch Kombination von Fällungen und Säulenchromatographie. Das lösliche Enzym zeigte ein alkalisches pH-Optimum (8,5-9,0), einem K_m für SSA von 18-30 μM und für NAD^+ von 180 μM . NADP^+ diente auch als Substrat für das Hummerenzym, war aber in der Sättigung um den Faktor 3 weniger effizient. Für SSA wurde Substrathemmung ab 70 μM beobachtet und die Anwesenheit von Thiolen war für die SSADH-Aktivität essentiell. Auf der Genebene gibt es keinerlei Studien zur Invertebraten-SSADH. Ähnlich wie bei der GABA-T wurden bei *D. melanogaster* ESTs identifiziert (z. B. NM143151), deren abgeleitete Polypeptidsequenz eine deutliche Homologie zur Human- (51,1 % Identität) bzw., *E. coli*-SSADH (53,1 % Identität) aufweist. Über die Funktionalität des Produkts des im *D. melanogaster*-Genom als Einzelkopie vorliegenden Gens (Adams et al. 2000, Flybase CG4385) ist bisher nichts bekannt.

1.5 Aufgabenstellung

Die beiden Enzyme des Abbauweges des Neurotransmitters GABA, die GABA-Transaminase (GABA-T) und die Succinsemialdehyd-Dehydrogenase (SSADH), sind in Insektenmodellen weitgehend und in parasitischen Insekten sowie Akariden vollständig unerforscht. Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, das Wissen um das zweite Enzym dieses Abbauweges, der SSADH, in verschiedenen zum Teil parasitischen Arthropodenspezies zu erweitern bzw.

überhaupt erst zu generieren. Die Studien dieser Arbeit lassen sich in vier Teile untergliedern, die jeweils eine thematische Einheit bilden.

Im ersten Teil der Arbeit sollte der *Drosophila (D.) melanogaster* SSADH-Genortholog-Kandidat NM_143151 kloniert, heterolog in *Escherichia coli* exprimiert und mit einer ebenfalls aus *D. melanogaster* klonierten und heterolog exprimierten Acetaldehyd-Dehydrogenase bezüglich ihrer enzymatischen Eigenschaften verglichen werden. Insbesondere die Aldehydsubstratspezifitäten beider Enzyme sollten detailliert dargestellt werden. Ein weiteres Ziel des ersten Abschnitts dieser Schrift sollte die Untersuchung von Aminosäurepositionen der *D. melanogaster* SSADH sein, die, basierend auf Literaturdaten zu begrenzt homologen unspezifischen Aldehyd-Dehydrogenasen, an der Katalyse beteiligt sein könnten.

In einem zweiten Teil der Arbeit sollte aus den beiden veterinärmedizinisch bedeutendsten parasitischen Insekten, *Lucilia (L.) cuprina* (Schafs-Schmeißfliege) und *Ctenocephalides (C.) felis* (Katzenfloh), die Genorthologen der SSADH identifiziert werden. Beide Gene bzw. Genprodukte sollten dann individuell sowie im Vergleich miteinander genetisch und biochemisch untersucht und charakterisiert werden.

Die Genidentifizierung sowie die biochemische Charakterisierung der SSADH aus *Rhipicephalus (R.) microplus* (Afrikanische Rinderzecke), einem der wichtigsten Vertreter der veterinärparasitischen Akariden-Spezies, sollte im Mittelpunkt des dritten Teils dieser Schrift stehen. Hierbei sollte zusätzlich, im Rahmen einer vergleichenden enzymologischen Studie zwischen Akariden- und Säugerenzym, auch rekombinant exprimierte Maus-SSADH bereitgestellt und untersucht werden.

In Zusammenarbeit mit einer physikalisch-chemischen Arbeitsgruppe sollte im vierten Teil der Dissertation durch Sättigungstransfer-Differenz-Kernresonanzspektroskopie- (STD-NMR-) Experimente einige fundamentale Fragen zur Aldehydsubstrat- und Cosubstratbindung an SSADH von *D. melanogaster* und zum Teil auch vergleichend an SSADH von *Escherichia coli* untersucht werden.

Die Ergebnisse dieser vier Teile sind in vier separaten Manuskripten zusammengefasst und diskutiert, sowie bereits von Gutachtern („peer review“) positiv bewertet, zur Publikation empfohlen und in allen Fällen schon publiziert worden:

- 1) Boris Rothacker, Thomas Ilg (2008) Functional characterization of a *Drosophila melanogaster* succinic semialdehyde dehydrogenase and a non-specific aldehyde dehydrogenase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **38**, 354-366.
- 2) Boris Rothacker, Margaret Werr, Thomas Ilg (2008) Molecular cloning, partial genomic structure and functional characterization of succinic semialdehyde dehydrogenase genes from the parasitic insects *Lucilia cuprina* and *Ctenocephalides felis*. *Insect Molecular Biology* **17**, 279-291.
- 3) Boris Rothacker, Margaret Werr, Thomas Ilg (2008) Succinic semialdehyde dehydrogenase from the parasitic cattle tick *Rhipicephalus microplus*: gene identification, biochemical characterization and comparison with the mouse ortholog. *Molecular & Biochemical Parasitology* **161**, 32-34.
- 4) Martin Jäger, Boris Rothacker, Thomas Ilg (2008) Saturation transfer difference NMR studies on substrates and inhibitors of succinic semialdehyde dehydrogenases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **372**, 400-406.

Diese 4 Publikationen/Manuskripte bilden das Rückgrat dieser Dissertation. Die Abstracts der Publikationen werden im folgenden Teil der Schrift dargestellt.

2. Abstracts

2.1 Functional characterization of a *Drosophila melanogaster* succinic semialdehyde dehydrogenase and a non-specific aldehyde dehydrogenase

Insect Biochemistry and Molecular Biology **38**, 354-366

The probable *Drosophila melanogaster* (*Dm*) gene ortholog of mammalian succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH, NM_143151) that is involved in the degradation of the neurotransmitter GABA, and the putative *Dm* aldehyde dehydrogenase (Aldh, NM_135441) gene were cloned and expressed as an enzymatically active fusion-protein in *Escherichia coli*. The identities of the NM_143151 gene product as NAD⁺-dependent SSADH and the Aldh gene product as a non specific aldehyde dehydrogenase were established by substrate specificity studies. For *Dm* SSADH, the Michaelis constants for the specific substrates succinic semialdehyde and NAD⁺, was 4.7 and 90.9 μM , respectively. For *Dm* Aldh, the Michaelis constants of the probable substrate avetaldehyde was 0.9 μM while for the cosubstrate NAD⁺, a Michaelis constant of 62.7 μM was determined. Site directed-mutagenesis studies on *Dm* SSADH indicate that cystein 311 and glutamic acid 277 of this enzyme are candidates for the active site residues.

2.2 Molecular cloning, partial genomic structure and functional characterization of succinic semialdehyde dehydrogenase genes from the parasitic insects *Lucilia cuprina* and *Ctenocephalides felis*

Insect Molecular Biology **17**, 279-291

We report the identification, cDNA cloning and functional expression of succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH) from the parasitic insect *Lucilia cuprina* and *Ctenocephalides felis*. The SSADH is a component of the gamma-aminobutyric acid degradation pathway in mammals and is essential for development and function of the nervous system. The recombinant proteins possess potent NAD⁺-dependent SSADH activity. A copy of the genomic *Lucilia cuprina* SSADH gene contains two introns. The *Ctenocephalides felis* version of a genomic gene copy of SSADH is devoid of introns. In contrast to the single copy SSADH gene in *Drosophila melanogaster*, in *Lucilia cuprina* and *Ctenocephalides felis*, multiple SSADH gene copies are present in the genome.

2.3 Succinic semialdehyde dehydrogenase from the parasitic cattle tick *Rhipicephalus microplus*: gene identification, biochemical characterization and comparison with the mouse ortholog

Molecular & Biochemical Parasitology **161**, 32-34

The gamma-aminobutyric (GABA) acid degradation pathway that consists of the enzymes GABA transaminase and succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH) is essential for the development and functionality of the nervous system in mammals. Here we report the gene identification, cDNA cloning and

heterologous functional expression of a SSADH from the cattle tick *Rhipicephalus microplus* (*Rm*). In contrast to mammals and *Drosophila melanogaster*, which have one SSADH gene, *Rm* has several gene copies. The recombinant cattle tick protein has potent NAD⁺-dependent SSADH activity. Comparison of *Rm* SSADH enzyme kinetic properties as well as substrate and inhibitor specificities with those of a recombinant mammalian SSADH reveals overall similarities, but also subtle differences, that may be utilized for the design of specific inhibitors with acaricidal activity.

2.4 Saturation transfer difference NMR studies on substrates and inhibitors of succinic semialdehyde dehydrogenase

Biophysical Research Communications **372**, 400-406

Saturation transfer difference (STD) NMR experiments on *Escherichia coli* (*Ec*) and *Drosophila melanogaster* (*Dm*) succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH) suggest that only the aldehyde form of the specific substrate succinic semialdehyde (SSA) and of the inhibitor 3-tolualdehyde bind to these enzymes. STD experiments on SSADH and NAD⁺ / NADP⁺ indicate differential affinity in agreement with the respective cosubstrate properties. Saturation transfer to the ribose moieties is limited to the anomeric protons of *Ec* SSADH, suggesting that the NAD⁺ / NADP⁺ adenine and nicotinamide are important for the binding of the coenzyme.

3. Zitierte Literatur

Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A. et al. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**, 2185-95.

Albers, R.W., Salvador, R.A. (1958) Succinic semialdehyde oxidation by soluble dehydrogenase from brain. *Science* **128**, 359-60.

Albers, R.W., Koval, G.J. (1961) Succinic Semialdehyde Dehydrogenase: Purification and Properties of the enzyme from monkey brain. *Biochim. Biophys. Acta* **52**, 29-35.

Andre´B., and J.C. Jauniaux (1990) Nucleotide sequence of the yeast *UGA1* gene encoding GABA transaminase. *Nucleic Acids Res.* **18**, 3049.

Andruszkiewicz, R., Silverman, R.B. (1990) 4-Amino-3-alkylbutanoic Acids as Substrates for γ -Aminobutyric Acid Aminotransferase. *J. Biol. Chem.* **265**, 22288-22291.

Anholt, R.R.H., Ganguly, I., Mackay, T.F.C. (2003) *Scribble* Is Essential for olfactory behaviour in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **164**, 1447-1457.

Awapara, J., Landua, A.J., Fuerst, R., Seale, B. (1950) Free γ -Aminobutyric acid in brain. *J. Biol. Chem.*, 35-39.

Bartsch, K., von Johnn-Marteville A., Schulz, A. (1990) Molecular Analysis of two Genes of the *Escherichia coli* *gab* Cluster: Nucleotide Sequence of the Glutamate:Succinic Semialdehyde Transaminase Gene (*gabT*) and Characterization of the Succinic Semialdehyde Dihydrogenase Gene (*gabD*). *J. Bacteriol.* **172**, 7035-7042.

Bessman, S.P., Rossen, J., Layne, C.E., (1953) γ -Aminobutyric acid-glutamic acid transamination in brain. *J. Biol. Chem.*, 385-391.

Blaner, W.S. and Churchich, J. (1979) Succinic Semialdehyde Dehydrogenase. Reactivity of Lysyl Residues. *J. Biol. Chem.* **254**, 1794-1798.

Blaner, W.S. and Churchich, J.E. (1980) The Binding of NADH to Succinic Semialdehyde Dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **109**, 431-437.

Bloomquist, J.R. (1996) Ion channels as targets for insecticides. *Annu. Rev. Entomol.* **41**, 163-190.

Bormann, J. (2000) The 'ABC' of GABA receptors. *TiPS* **21**, 16-19.

Bouche, N., Lacombe, B., Fromm, H. (2003) GABA signalling: a conserved and ubiquitous mechanism. *Trends Cell Biol.* **13**, 607-610.

Bouche, N., Fromm, H. (2004) GABA in plants: just a metabolite ? *Trends Plant Sci.* **9** (3), 110-115.

Brown, A.W., Shelp, B.J. (1997) The Metabolism and Functions of γ -Aminobutyric Acid. *Plant Physiol.* **115**, 1-5.

Breitkreuz, K.E., Shelp, B.J. (1995) Subcellular Compartmentation of the 4-Aminobutyrate Shunt in Protoplasts from Developing Soybean Cotyledons. *Plant Physiol.* **108**, 99-103.

Busch, K., Piehler, J., Fromm, H. (2000) Plant Succinic Semialdehyde Dehydrogenase: Dissection of Nucleotide Binding by Surface Plasmon Resonance and Fluorescence Spectroscopy. *Biochemistry* **39**, 10110-10117.

-
- Callenwaert, D.M., Roseblatt, M.S., Suzuki, K., Tchen, T.T. (1973) Succinic Semialdehyde Dehydrogenase from a *Pseudomonas* Species. *J. Biol. Chem.* **248**, 6009-6013.
- Cash, C., Ciesielski, L., Maitre, M., Mandel, P. (1977) Purification and Properties of rat brain succinic semialdehyde dehydrogenase. *Biochimie.* **59**, 257-268.
- Chambliss, K.L. and Gibson, K.M. (1992) Succinic semialdehyde Dehydrogenase from mammalian brain: subunit analysis using polyclonal antiserum. *Int. J. Biochem.* **24**, 1493-1499.
- Chambliss, K.L., Caudle, D.L., Hinson, D.D., Moomaw,, C.R., Slaughter, C.A., Jakobs, C., Gibson, K.M. (1995) Molecular Cloning of the Mature NAD⁺-dependent Succinic Semialdehyde Dehydrogenase from Rat and Human. *J. Biol. Chem.* **270**, 461-467.
- Chambliss, K.L., Hinson, D.D., Trettel, F., Malaspina, P., Novelletto, A., Jakobs, C., Gibson, K.M. (1998) Two Exon-Skipping Mutations as the Molecular Basis of Succinic Semialdehyde Dehydrogenase Deficiency (4-Hydroxybutyric Aciduria). *Am. J. Hum. Genet.* **63**, 399-408.
- Chen, L., Durkin, K.A., Casida, J.E. (2006) Structural model for γ -aminobutyric acid receptor noncompetetive antagonist binding: Widely diverse structures fit he same site. *Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 5185-5190.
- Choi, S.Y. & Churchich, J.E. (1985) 4-Aminobutyrate aminotransferase reaction of sulfhydryl residues connected with catalytic activity. *J. Biol. Chem.* **260**, 993-997.
- Choi, S.Y., Churchich, J.E. (1986) Biosynthesis of 4-Aminobutyrate aminotransferase. *Eur. J. Biochem* **161** (2), 289-294.

Choi, S.Y., Jeon, S.g., Bahn, J.H., Jang, J.S., Jang, S.H., Lee, B.R., Lee, K.S., Park, J., Kang, T-C., Won, M.H., Kim, H.B., Kwon, O-S., Cho, S-W. (2001) Molecular Cloning and Functional Expression of Bovine Brain GABA Transaminase. *Mol. Cells* **12**, 91-96.

Choi, S., Silverman, R.B. (2002) Inactivation and inhibition of gamma-aminobutyric acid aminotransferase by conformationally restricted vigabatrin analogues. *J. Med. Chem.* **20**, 4531-4539.

Churchich, J.E., Moses, U. (1981) 4-Aminoutyrate Aminotransferase. The presence of non-equivalent binding sites. *J. Biol. Chem.* **256**, 1101-1104.

Coleman, S.T., Fang, T.K., Rovinsky, S.A., Turano, F.J., Moye-Rowley, W.S. (2001) Expression of a Glutamate Decarboxylase Homologue Is Required for Normal Oxidative Stress Tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **276**, 244-250.

Connolly, C.N., Wafford, K.A. (2004) The Cys-loop superfamily of ligand-gated ion channels: the impact of receptor structure on function. *Biochemical Society* **32** (3), 529-534.

Cotter, P.D., Ryan, S., Gahan, C.G., Hill, C. (2005) Presence of GAD1 glutamate decarboxylase in selected *Listeria monocytogenes* strains is associated with an ability to grow at low pH. *Appl. Environ. Microbiol.* **71** (6), 2832-2839.

De Biase, D., Barra, D., Bossa, F., Pucci, P., John, R.A. (1991) Chemistry of the Inactivation of 4-Aminobutyrate Aminotransferase by the Antiepileptic Drug Vigabatrin. *J. Biol. Chem.* **266**, 20056-20061.

De Biase, D., Barra, D., Simmaco, M., John, R.A., Bossa, F. (1995) Primary structure and tissue distribution of human 4-aminobutyrate aminotransferase. *Eur. J. Biochem.* **227** (1-2), 476-480.

Donnelly, M.I., Cooper, R.A. (1981) Two Succinic Semialdehyde Dehydrogenase Are Induced when *Escherichia coli* K-12 Is Grown on γ -Aminobutyrate. *J. Bacteriol.* **145**, 1425-1427.

Embree, L.J. and Albers, R.W. (1964) Succinic Semialdehyde Dehydrogenase from Human Brain. *Biochem. Pharmacol.* **13**, 1209-1217.

Forth, W., Henschler, D., Rummel, W. (2001) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Verlag Urban und Fischer, 8. Auflage.

Fromm, H., and Busch, B.K. (1999) Plant Succinic Semialdehyde Dehydrogenase. Cloning, Purification, Localization in Mitochondria, and Regulation by Adenine Nucleotides. *Plant Physiol.* **121**, 589-597.

Fujii, S., Amrein, H. (2002) Genes expressed in the *Drosophila* head reveal a role for fat cells in sex-specific physiology. *EMBO J.* **21**, 5353-5363.

Gammon, D.W., Gingrich, H.L., Sander, G., Vanderwerf, P.A., Manley, C.J. Crosby, G.A. (1986) The design and synthesis of GABAergic compounds as potential insecticides. *British crop protection conference*.

Gammon, D.W., Gingrich, H.L., Sander, G., Stewart, R.R., Vanderwerf, P.A. (1987) GABA transaminase and glutamic acid decarboxylase as targets for insecticides. *American Chem. Society*.

Gibson, K.M., Sweetman, L., Nyhan, W.L., Jakobs, C., Rating, D., Siemens, H.; Hanefeld, F. (1983) Succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency: an inborn error of gamma-aminobutyric acid metabolism. *Clin. Chim. Acta* **133**, 33-42.

Gibson, K.M., Gupta, M., Greven, R., Jansen, E.E.W., Jakobs, C., Hogema, B.M., Froestl, W., Snead, O.C., Bartels, H., Grompe, M. (2002) Therapeutic Intervention in Mice Deficient for Succinate Semialdehyde Dehydrogenase (γ -Hydroxybutyric Aciduria). *J. Pharm. Exp. Ther.* **302**, 180-187.

Gibson, K.M., Gupta, M., Pearl, P.L., Tuchman, M., Vezina, L.G., Snead III, C.O., Smit, L.M.E., Jakobs, C. (2003) Significant Behavioral Disturbances in Succinic Semialdehyde Dehydrogenase (SSADH) Deficiency (Gamma-Hydroxybutyric Aciduria). *Biol. Psych.* **54**, 763-768.

Gottschalk, G., Söhnling, B. (1996) Molecular Analysis of the Anaerobic Succinate Degradation Pathway in *Clostridium kluyveri*. *J. Bacteriol.* **178**, 871-880.

Green, L.S., Li, Y., Emerich, D.W., Bergersen, F.J., Day, D.A. (2000) Catabolism of α -Ketoglutarate by sucA Mutant of *Bradyrhizobium japonicum*: Evidence for an Alternative Tricarboxylic Acid Cycle. *J. Bacteriol.* **182**, 2838-2844.

Gupta, M., Greven, R., Jansen, E.E.W., Jakobs, C., Hogema, B.M., Froestl, W., Snead, O.C., Bartels, H., Grompe, M., Gibson, K.M. (2002) Therapeutic Intervention in Mice Deficient for Succinate Semialdehyde Dehydrogenase (γ -Hydroxybutyric Aciduria). *J. Pharm. Exp. Ther.* **302**, 180-187.

Hall, Z.W., Kravitz, E.A. (1967a) The metabolism of γ -aminobutyric acid (GABA) in the lobster nervous system-I. GABA-glutamate transaminase. *J. Neurochem.* **14**, 45-54.

Hall, Z.W., Kravitz, E.A. (1967b) The metabolism of γ -aminobutyric acid (GABA) in the lobster nervous system-II. Succinic semialdehyde dehydrogenase. *J. Neurochem.* **14**, 55-61.

Hall, Z.W., Bownds, M.D., Kravitz, E.A. (1970) The metabolism of gamma aminobutyric acid in the lobster nervous system. *J. Cell Biol.* **46**, 290-299.

Hogema, B.M., Gupta, M., Senephansiri, H., Burlingame, T.G., Taylor, M., Jakobs, C., Schutgens, R.B.H., Froestl, W., Snead, O.C., Diaz-Arrastia, R., Bottiglieri, T., Grompe, M. & Gibson, M. (2001) Pharmacologic rescue of lethal seizures in mice deficient in succinate semialdehyde dehydrogenase. *Nature Genetics* **29**, 212-216.

Hopkins, M.H., Bichler, K.A., Su, T., Chamberlain, C.L., Silverman, R.B. (1992) Inactivation of gamma-aminobutyric acid aminotransferase by various buffers. *J. Enzyme Inhib.* **6**, 195-199.

Hosie, A.M., Aronstein, K., Sattelle, D.B., Ffrench-Constant, R.H. (1997) Molecular biology of insect neuronal GABA receptors. *Trends Neurosci.* **20**, 578-583.

Inlow, J.K., Restifo, L.L. (2004) Molecular and comparative genetics of mental retardation. *Genetics* **166**, 835-881.

Jeffery, D., Rutherford, D.M., Weitzman, P.D.J., Lunt, J.J. (1988) Purification and partial characterization of 4-aminobutyrate:2-oxoglutarate aminotransferase from sheep brain and locust ganglia. *Biochem. J.* **249**, 795-799.

Jeon, S.G., Bahn, J.H., Jang, J.S., Park, J., Kwon, O.S., Cho, S.W., Choi, S.Y. (2000) Human brain GABA transaminase. *Eur. J. Biochem.* **267**, 5601-5607.

Jeon, S.G., Bahn, J.H., Jang, J.S., Jang, S.H., Lee, B.R., Lee, K.S., Park, S., Kang, T-C., Won, M.H., Kim, H.B., Kwon, O-S., Cho, S-W., Choi, S.Y. (2001) Molecular Cloning and Functional Expression of Bovine Brain GABA Transaminase. *Mol. Cells*. **12**, 91-96.

John, R.A., Fowler, L.J. (1976) Kinetic and Spectral Properties of Rabbit Brain 4-Aminobutyrate Aminotransferase. *Biochem. J.* **155**, 645-651.

Kammeraat, C., Veldstra, H. (1968) Characterization of succinate semialdehyde dehydrogenase from rat brain. *Biochim. Biophys. Acta* **151**, 1-10.

Kang, J.H., Park, Y.B., Huh, T.L., Lee, W.H., Choi, M.S., Kwon, O.S. (2005) High-level expression and characterization of the recombinant enzyme, and tissue distribution of human succinic semialdehyde dehydrogenase. *Prot. Expr. Purification*. **44**, 16-22.

Kim, D.S., Churchich, J.E. (1983) Catalytic and Structural Properties of Trypsin-treated 4-Aminobutyrate Aminotransferase. *J. Biol. Chem.* **258**, 11768-11773.

Köhler, P. (2001) The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *Int. J. Parasitol.* **31**(4), 336-345.

Kravitz, E.A., Molinoff, P.B., Hall, Z.W. (1965) A comparison of the enzymes and substrates of gamma-aminobutyric acid metabolism in lobster excitatory and inhibitory axons. *Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **54**, 778-782.

Kwon, O., Park, J., Churchich, J.E. (1992) Brain 4-Aminobutyrate Aminotransferase. *J. Biol. Chem.* **267**, 7215-7216.

Lippert, B., Jung, M.J., Metcalf, B.W. Böhlen, P., Schechter, P.J. (1977) gamma-Vinyl GABA (4-amino-hex-5-enoic acid), a new selective irreversible inhibitor of GABA-T: effects on brain GABA metabolism in mice. *J. Neurochem.* **29**(5), 797-802.

Liu, W., Peterson, P.E., Carter, R.J., Zhou, X., Langston, J.A., Fisher, A.J., Toney, M.D. (2004) Crystal Structures of Unbound and Aminooxyacetate-Bound *Escherichia coli* γ -Aminobutyrate Aminotransferase. *Biochemistry* **43**, 10896-10905.

Maitre, M., Ciesielski, L., Cash C. & Mandel, P. (1975) Purification and studies on some properties of the 4-aminobutyrate: 2-oxo-glutarate transaminase from rat brain. *Eur.J. Biochem.* **52**, 157-169.

Maitre, M., Ossola, L., Mandel, P. (1976) In vitro studies into the effect of inhibition of rat brain succinic semialdehyde dehydrogenase on GABA synthesis and degradation. *FEBS Letters* **72**, 53-57.

Manzocchi, A., Biondi, P., Secchi, C., Santaniello, E. (1986) Studies on Analogues of Succinic Semialdehyde as Substrates for Succinate Semialdehyde Dehydrogenase from Rat Brain. *J. Neurochem.* **46**, 1895-1898.

Medina-Kauwe, L.K., Tillakaratne, N.J.K., Wu, J-Y., Tobin, A.J. (1994) A Rat Brain cDNA Enzymatically Active GABA Transaminase and Provides a Molecular Probe for GABA-Catabolizing Cells. *J. Neurochem.* **62**, 1267-1275.

Medina-Kaunwe, L.K., Tobin, A.J., De Meirleir, L., Jaeken, J., Jakobs, C., Nyhan, W.L. and Gibson K.M. (1999) 4-Aminobutyrate aminotransferase (GABA-transaminase) deficiency. *J. Inher. Metab. Dis.* **22**, 414-427.

-
- Metzer, E., Levitz, R., Halpern, Y.S. (1979) Isolation and properties of Escherichia coli K-12 mutants impaired in the utilization of gamma-aminobutyrate. *J. Bacteriol.* **137** (3), 1111-1118.
- Miller, A.L., Pitts, F.N. Jr. (1967) Brain succinate semialdehyde dehydrogenase. 3. Activities in twenty-four regions of human brain. *J. Neurochem.* **14**(5), 579-584.
- Murphy, T.C., Amarnath, V., Gibson, K.M., Picklo, M.J Sr. (2003) Oxidation of 4-hydroxy-2-nonenal by succinic semialdehyde dehydrogenase (ALDH5A). *J. Neurochem.* **86** (2), 298-305.
- Nakamura, K. (1960) separation and properties of DPN and TPN-linked succinic semialdehyde dehydrogenase from Pseudomonas aeruginosa. *Biochim. Biophys. Acta* **45**, 554-60.
- Nelson, D., Cox, M. (2001) Lehninger Biochemie. 3. Auflage Springer Verlag.
- Niegemann, E., Schulz, A., Bartsch, K. (1993) Molecular organization of the Escherichia coli gab cluster: nucleotide sequence of structural genes gabD and gabP and expression of the GABA permease gene. *Arch. Microbiol.* **160**, 454-460.
- Ortell, M.O., Lunt, G.G. (1995) Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors. *Trends Neurosci.* **18**, 121-127.
- Osei, Y.D., Churchich, J.E. (1995) Screening and sequence determination of a cDNA encoding the human brain 4-aminobutyrate aminotransferase. *Gene* **155**, 185-187.
- Padmanabhan, R., Tchen, T.T. (1969) Nicotinamide Adenine Dinucleotide and Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Linked Succinic Semialdehyde Dehydrogenases in a Pseudomonas Species. *J. Bacteriol.* **100**, 398-402.

-
- Pandey, A., Singh, R. (1985) Response of the cockroach brain gamma-aminobutyric acid system to isonicotinic acid hydrazide and mercaptopropionic acid. *Biochem. Int.* **10**(2), 213-220.
- Park, J., Osei, Y.D., Churchich, J.E. (1993) Isolation and Characterization of Recombinant Mitochondrial 4-Aminobutyrate Aminotransferase. *J. Biol. Chem.* **268**, 7636-7639.
- Pietruszko, R., Forte-McRobbie, C.M. (1986) Purification and characterization of human liver "high Km" aldehyde dehydrogenase and its identification as glutamic gamma-semialdehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **261** (5), 2154-2163.
- Pitts, F.N. Jr., Quick, C. (1965) Brain succinate semialdehyde dehydrogenase. I. Assay and distribution. *J. Neurochem.* **12** (9), 893-900.
- Pitts, F.N. Jr., Quick, C. (1967) Brain succinate semialdehyde II. Changes in developing rat brain. *J. Neurochem.* **14**, 561-570.
- Prell, J., Boesten, B., Poole, P., Prierer, U.B. (2002) The *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* VF39 γ -aminobutyrate (GABA) aminotransferase gene (*gabT*) is induced by GABA and highly expressed in bacteroids. *Microbiology* **148**, 615-623.
- Ramos, F., el Guezzar, M., Grenson, M., Wiame, J.M. (1985) Mutations affecting the enzymes involved in the utilization of 4-aminobutyric acid as nitrogen source by the yeast *Saccharomyces cerevesiae*. *Eur. J. Biochem.* **149** (2), 401-404.
- Rauh, J.J., Lummis, S.C.R., Sattelle, D.B. (1990) Pharmacological and biochemical properties of insect GABA receptors. *Trends Pharm. Sci.* **11**, 325-329.

Raymond, V., Sattelle, D.B. (2002) Novel animal-health drug targets from ligand-gated chloride channels. *Net. Rev. Drug. Discov.* **1**(6), 427-436.

Richard, H., and Foster, J.W. (2004) *Escherichia coli* Glutamate- and arginine-dependent acid resistance systems increase internal pH and reverse transmembrane potential. *J. Bacteriol* **186**. 6032-6041.

Rivett, A.J., Tipton, K.F. (1981) Kinetic studies with rat-brain succinic-semialdehyde dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **117**, 187-193.

Rivett, A.J., Smith, I.L., Tipton, K.F. (1981) Purification of the high-K_m aldehyde reductase from rat brain and liver and from ox brain. *Biochem. J.* **197**, 473-481.

Roberts, E., Frankel, S. (1950) Glutamic acid decarboxylase in brain. *J. Biol. Chem.*, 789-795.

Roberts, E. and Frankel, S. (1950) γ -Aminobutyric acid in Brain: its formation from glutamic acid. *J. Biol. Chem.*, 55-63.

Roberts, E., Bregoff, H.M., (1953) Transamination of γ -Aminobutyric acid and β -Alanine in brain and liver. *J. Biol. Chem.*, 393-398.

Roseblatt, M.S., Callewaert, D.M., Tchen, T.T. (1973) Succinic Semialdehyde Dehydrogenase from a *Pseudomonas* Species II. Physical and immunochemical properties of the enzyme. *J. Biol. Chem.* **248**, 6014-6018.

Ryzlak, M.T., Pietruszko, R. (1988) Human brain "high K_m" aldehyde dehydrogenase: purification, characterization, and identification as NAD⁺-dependent succinyl semialdehyde dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* **266**, 386-396.

-
- Salganicoff, L., Roberts, E. (1963) Subcellular distribution of glutamic decarboxylase and gamma-aminobutyric alpha-ketoglutaric transaminase. *Life Sci.* **2**, 85-91.
- Salganicoff, L., De Robertis, E. (1965) Subcellular Distribution of the Enzymes of the Glutamic Acid, Glutamine and γ -Aminobutyric Acid Cycles in Rat Brain. *J. Neurochem.* **12**, 287-309.
- Sanchez, M., Alvarez, M.A., Balana, R., Garrido-Pertierra, A. (1988) Properties and functions of two succinic-semialdehyde dehydrogenase from *Pseudomonas putida*. *Biochim. Biophys. Acta* **953**, 249-257.
- Sanchez, M., Fernández, J., Martin, M., Gibello, A., Garrido-Pertierra, A., (1989) Purification and properties of two succinic semialdehyde dehydrogenases from *Klebsiella pneumoniae*. *Biochim. Biophys. Acta* **990**. 225-231.
- Sankar, R. and Derdiarian, AT. (1998) Vigabatrin. *CNS Drug Reviews* **4**, 260-274.
- Sattelle, D.B., Lummis, S.C., Buckingham, S.D., Rauh, J.J. (1990) Blocking actions of heptachlor at an insect central nervous system GABA receptor. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **240**, 97-106.
- Schneider, B.L., Ruback, S., Kiupakis, A.K., Kasbarian, H., Pybus, C., Reitzer, L. (2002) The *Escherichia coli* gabDTPC Operon: Specific γ -Aminobutyrate Catabolism and Nonspecific Induction. *J. Bacteriol.* **184**, 6976-6986.
- Schulz, A., Taggeselle, P., Tripier, D., Bartsch, K. (1990) Stereospecific Production of the Herbicide Phosphinothricin (Glufosinate) by Transamination: Isolation and Characterization of a Phosphinothricin-Specific Transaminase from *Escherichia coli*. *Appl. Env. Microbiol.* **56**, 1-6.

Schousboe, A., Wu, J.Y. & Robert, E. (1973) Purification and characterization of the 4-aminobutyrate-2-keto-glutarate transaminase from mouse brain.

Biochemistry **12**, 2868-2873.

Shelp, B.J., Breitzkreuz, K.E., Fischer, W.N., Schwacke, R., Rentsch, D. (1999) Identification and characterization of GABA, proline and quaternary ammonium compound transporters from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **450(3)**, 280-284.

Silverman, R.B., Invergot, B.J., Levy, M.A., Andrew, C.R. (1987) Substrate Stereospecificity and Active Site Topography of γ -Aminobutyric Acid Aminotransferase for β -Aryl- γ -aminobutyric Acid Analogues. *J. Biol. Chem.* **262**, 3192-3195.

Sims, K.L., Weitsen, H.A., Bloom, F.E. (1971) Histochemical localization of brain succinic semialdehyde dehydrogenase—a γ -aminobutyric acid degradative enzyme. *J. Histochem. Cytochem.* **19** (7), 405-415.

Sims, K.L., Weitsen, H.A., Bloom, F.E. (1972) GABA catabolism: localization of succinic semialdehyde dehydrogenase in brain motor and sensory nuclei. *Science* **175** (29), 1479-1480.

Sloley, B.D., McKeenna, K.F. (1993) 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), and gamma-vinyl-gamma-aminobutyric acid (gamma-vinyl-GABA) alter neurotransmitter concentrations in the nervous tissue of the goldfish (*Carassius auratus*) but not the cockroach (*Periplaneta Americana*). *Neurochem. Int.* **22(2)**, 197-203.

Soper, T.S., Manning, J.M. (1982) Inactivation of Pyridoxal Phosphate Enzymes by Gabaculine. *J. Biol. Chem.* **257**, 13930-13936.

Stewart, F.C., Thompson, J.F. and Dent, C.E. (1949) γ -butyric acid: a constituent of potato tubers. *Science* **110**, 439-440.

Storici, P., Capitani, G., De Biase, D., Moser, M., John, R.A., Jansonius, J.N. Schirmer, T. (1999) Crystal Structure of GABA-Aminotransferase, a Target of Antiepileptic Drug Therapy. *Biochemistry* **38**, 8628-8634.

Storici, P., De Biase, D., Bossa, F., Bruno, S., Mozzarelli, A., Peneff, C., Silverman, R.B., Schirmer, T. (2004) Structures of γ -Aminobutyric Acid (GABA) Aminotransferase, a Pyridoxal 5'-Phosphate, and [2Fe-2S] Cluster-containing Enzyme, Complexed with γ -Ethynyl-GABA and with the Antiepilepsy Drug Vigabatrin. *J. Biol. Chem.* **279**, 363-373.

Storici, P., Qiu, J., Schirmer, T., Silverman, R.B. (2004) Mechanistic crystallography. Mechanism of inactivation of gamma-aminobutyric acid aminotransferase by (1R,3S,4S)-3-amino-4-fluorocyclopentane-1-carboxylic acid as elucidated by crystallography. *Biochemistry* **43** (44), 14057-14063.

Stryer, L., Tymoczko, J.L., Berg, J.M. (2003) Biochemie. 5. Auflage Spektrum Verlag.

Takahashi, T., Furukawa, A., Hara, S., Mizoguchi, H. (2004) Isolation and Characterization of Sake Yeast Mutants Deficient in γ -Aminobutyric Acid Utilization in Sake Brewing. *J. Biosc. Bioeng.* **97**, 412-418.

Tian, J., Bryk, R., Itoh, M., Suematsu, M., Nathan, C. (2005) Variant tricarboxylic acid cycle in Mycobacterium tuberculosis: Identification of α -Ketoglutarate decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 10670-10675.

Trettel, F., Malaspina, P., Jodice, C., Novelletto, A., Slaughter, A.C., Caudle, L.D., Hinson, D.D., Chambliss, K.L., Ginson, K.M. (1996) Human Succinic

Semialdehyde Dehydrogenase. Molecular Cloning and Chromosomal Localization. *Enzym. Molec. Biol. C. Metabolism*, 253-260.

Ueda, H.R., Chen, W., Adachi, A., Wakamatsu, H., Hayashi, S., Takasugi, T., Nagano, M., Nakahama, K., Suzuki, Y., Sugano, S., Iino, M., Shigeyoshi, Y., Hoshimoto, S., (2002) A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature* **418**, 534-539.

White, H.E. & Sato, T.L. (1978) GABA transaminase of human brain and peripheral tissues: kinetics and molecular properties. *J. Neurochem.* **31**, 41-47.

White, H.L. (1979) 4-Aminobutyrate:2-oxoglutarate aminotransferase in blood platelets. *Science* **205**, 696-8.

Woods, D.J., Williams, T.M. (2007) The challenges of developing novel antiparasitic drugs. *Invert. Neurosci.* **7**(4), 245-250.

Wu, P.H., Hertz, L., Schousboe, A. (1978) Evidence for net uptake of GABA into mouse astrocytes in primary cultures – is sodium dependence and potassium independence. *Neurochem. Res.* **3** (3), 313-323.

Yogeeswari, P., Sriram, D., Thirumurugan, R., Raghavendran, J.V., Sudhan, K., Pavana, R.K., Stables, J. (2005) Discovery of N-(2,6-Dimethylphenyl)-Substituted Semicarbazones as Anticonvulsants: Hybrid Pharmacophore-Based Design. *J. Med. Chem* **48**, 6202-6211.

Lebenslauf

14.03.1978	geboren in Mannheim
1984-88	Grundschule
1988-97	Albertus Magnus Gymnasium, Viernheim
1997	Abitur
09/97 – 06/98	Grundwehrdienst
10/98 – 03/03	Studium der Agrarbiologie an der Universität Hohenheim
04/02 – 02/03	Diplomarbeit bei der Firma Intervet Innovation GmbH Thema: "Untersuchungen zur RNA-Interferenz der Genexpression bei Oesophagostomum dentatum"
04/03 – 2008	Doktorarbeit bei der Firma Intervet Innovation GmbH Thema: "Identifizierung und Charakterisierung der Succinsemialdehyd-Dehydrogenase aus parasitischen und nichtparasitischen Arthropoden"
01/06 – 03/08	Associate Scientist in Forschung und Entwicklung der Firma Intervet Innovation GmbH
04/08	Toxikologe bei der Firma Abbott GmbH & Co KG

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

ISBN 3-8359-5372-9

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de



9 1 7 8 3 8 3 5 1 9 5 3 7 2 7