

Aus dem Arbeitsbereich Molekularbiologie  
der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin  
des Zentrums für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin  
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf  
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. T. Braulke

Identifizierung von 3-Hydroxyglutarsäure-Transportern und Analyse  
pathologischer Nierenveränderungen am Mausmodell der Glutarazidurie Typ 1

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

vorgelegt von

**Franziska Stellmer**

aus Hamburg

beim Fachbereich Medizin

der Universität Hamburg

**Hamburg 2007**

**Angenommen vom Fachbereich Medizin**

**der Universität Hamburg am: 01. 07. 2008**

**Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs**

**Medizin der Universität Hamburg**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Th. Braulke**

**Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: PD Dr. M. Kemper**

**Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. A. Erbersdobler**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>6</b>
<b>1.1 Glutarazidurie Typ 1</b> .....	<b>6</b>
<b>1.2 Die Gcdh-defiziente Maus</b> .....	<b>9</b>
<b>1.3 Transport von 3-OHGA und GA über Membranen</b> .....	<b>10</b>
1.3.1 Transportsysteme der Niere .....	10
1.3.1.1 Der Organische Kationen Transporter Typ 2 .....	11
1.3.1.2 Der Natrium-abhängige Dicarboxylat Transporter Typ 3.....	12
<b>2 Zielsetzung</b> .....	<b>14</b>
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>15</b>
<b>3.1 Material</b> .....	<b>15</b>
3.1.1 Chemikalien und Reagenzien .....	15
3.1.2 Radioaktive Substanzen .....	16
3.1.3 Enzyme und Nukleotide .....	16
3.1.4 Proteine und Proteinstandards .....	16
3.1.5 DNA-Standards .....	17
3.1.6 Kits.....	17
3.1.7 Zellkulturlösungen .....	17
3.1.8 Puffer, Medien und Lösungen .....	17
3.1.9 Antikörper .....	17
3.1.9.1 primäre Antikörper .....	17
3.1.9.2 sekundäre Antikörper .....	18
3.1.10 Verbrauchsmaterialien .....	18
3.1.11 Geräte .....	18
<b>3.2 Mauslinien und Tierversuchsanträge</b> .....	<b>20</b>
<b>3.3 Methoden</b> .....	<b>20</b>
3.3.1 Molekularbiologische Methoden .....	20
3.3.1.1 Isolierung genomischer DNA .....	20
3.3.1.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA.....	21
3.3.1.3 Polymerasekettenreaktion .....	21
3.3.1.4 Auftrennung von DNA im Agarosegel.....	21
3.3.1.5 RNA-Isolierung aus Gewebe und Zellen.....	22
3.3.1.6 DNA-Microarray.....	23
3.3.1.7 Realtime-PCR.....	23
3.3.2 Biochemische Methoden.....	24
3.3.2.1 Isolierung von Membranproteinen aus Geweben.....	24
3.3.2.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen .....	25
3.3.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	25
3.3.2.4 Westernblot.....	25
3.3.2.5 Immunfluoreszenz-Mikroskopie.....	26
3.3.2.6 Immunhistochemie.....	26
3.3.2.7 Kreatinin-Bestimmung im Mausurin.....	27
3.3.2.8 Silberfärbung von SDS-PAGE-Gelen.....	27
3.3.2.9 Zymographie.....	27
3.3.3 Tierexperimentelle Arbeiten.....	28

3.3.3.1 Organentnahme und Aufarbeiten für die Mikroskopie .....	28
3.3.3.2 [ <sup>14</sup> C]TEA-Verteilungsassay.....	28
3.3.3.3 Untersuchungen im metabolischen Käfig .....	29
3.3.3.4 Hochproteindiät .....	29
3.3.4 Zellbiologische Methoden .....	30
3.3.4.1 Primärkultur von Nierenrindenzellen.....	30
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>31</b>
<b>4.1 Veränderungen in der Nierenmorphologie <i>Gcdh</i>-defizienter Mäuse .....</b>	<b>31</b>
4.1.1 Makroskopische Nierenhypertrophie .....	31
4.1.2 Histologische Untersuchungen .....	32
4.1.3 Volumenzunahme des Extrazellulärraums .....	33
4.1.4 Erhöhter Gehalt extrazellulärer Matrixproteine.....	34
<b>4.2 Renale Genexpression bei <i>Gcdh</i>-Defizienz.....</b>	<b>35</b>
4.2.1 DNA-Microarray-Analysen .....	36
4.2.2 Blutdruckregulation und Wasserhomöostase .....	39
4.2.3 Expression der Ornithin-Decarboxylase.....	41
4.2.4 Expression und Funktion spezifischer Transporter bei <i>Gcdh</i> -Defizienz.	41
4.2.4.1 Organische Kationen Transporter Typ 2.....	41
4.2.4.2 Natrium-abhängige Dicarboxylat Transporter .....	46
<b>4.3 Untersuchung der Nierenfunktion .....</b>	<b>48</b>
4.3.1 Untersuchungen im metabolischen Käfig.....	49
4.3.2 Gesteigerte Azidität des Urins.....	50
4.3.3 Untersuchung harnpflichtiger Substanzen .....	50
4.3.4 Hypoproteinurie bei <i>Gcdh</i> -Defizienz .....	51
<b>4.4 Reaktionen von Maus und Niere auf metabolischen Stress.....</b>	<b>52</b>
4.4.1 Histologische Untersuchung des Nierenparenchyms .....	53
4.4.2 Analyse des Trink- und Fressverhaltens .....	54
4.4.3 Exkretion harnpflichtiger Substanzen in der Krise .....	57
4.4.4 Progressive Hypoproteinurie unter Hochproteindiät.....	59
<b>5 Diskussion.....</b>	<b>61</b>
<b>5.1 Pathologische Veränderungen der Nieren .....</b>	<b>61</b>
5.1.1 Morphologische Veränderungen.....	62
5.1.2 Funktionelle Veränderungen .....	65
5.1.2.1 Störung der Wasserhomöostase.....	65
5.1.2.2 Störung der Elektrolytausscheidung .....	66
5.1.2.3 Störung der Proteinausscheidung.....	68
<b>5.2 Blutdruckregulation bei <i>Gcdh</i>-Defizienz .....</b>	<b>69</b>
<b>5.3 Transportmechanismen für 3-OHGA und GA.....</b>	<b>71</b>
5.3.1 Bedeutung des Organische Kationen Transporters Typ 2 (OCT2).....	72
5.3.2 Bedeutung des Natrium-abhängigen Dicarboxylat Transporters Typ 3 (NaDC3).....	75
<b>5.4 Ausblick .....</b>	<b>79</b>
<b>6 Zusammenfassung.....</b>	<b>80</b>
<b>7 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>81</b>
<b>8 Anhang.....</b>	<b>90</b>

<b>8.1 Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>90</b>
<b>8.2 Primer und Schmelztemperaturen.....</b>	<b>92</b>
<b>8.3 Bereits vorgestellte Ergebnisse .....</b>	<b>93</b>
<b>8.4 Lebenslauf.....</b>	<b>94</b>
<b>8.5 Erklärung .....</b>	<b>95</b>
<b><i>Dank</i>.....</b>	<b>96</b>

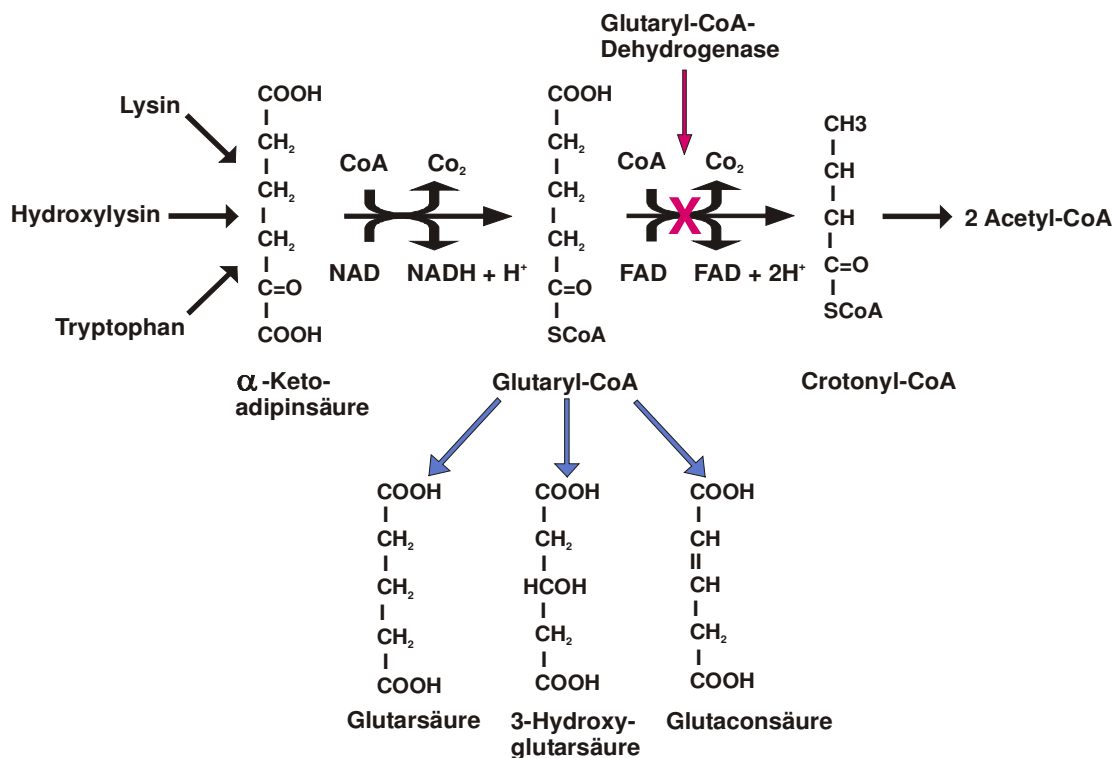
# 1 Einleitung

## 1.1 Glutarazidurie Typ 1

Die Glutarazidurie Typ 1 (synonym: GA-1; Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Defizienz; MIM 231670) ist eine hereditäre Erkrankung, bei der sich im Rahmen metabolischer Krisen schwere motorische Behinderungen ausbilden können. Die 1975 erstmals von S.I. Goodman beschriebene Erkrankung tritt mit einer geschätzten Inzidenz von 1:100.000 Neugeborenen auf (Goodman et al. 1975, Lindner et al. 2004). In genetisch homogenen Populationen wie der Amish Community (Pennsylvania, USA) ist sie mit einer Inzidenz von 1:400 häufiger (Morton et al. 1991).

Der Glutarazidurie Typ 1 liegen autosomal rezessiv vererbte Mutationen im Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Gen (*GCDH*), das sich auf Chromosom 19p13.2 befindet, zugrunde (Greenberg et al. 1994, Goodman et al. 1998). Bisher wurden über 150 verschiedene Mutationen des *GCDH*-Gens beschrieben (Goodman et al. 1998, Busquets et al. 2000). Die Glutaryl-CoA-Dehydrogenase (*GCDH*) ist ein homotetrameres Flavoprotein der mitochondrialen Matrix, das im Abbauweg der Aminosäuren Lysin, Hydroxylysin und Tryptophan die oxidative Decarboxylierung und Dehydrogenierung von Glutaryl-CoA zu Crotonyl-CoA katalysiert (Westover et al. 2001, Liesert et al. 1999). Mutationen im *GCDH*-Gen führen zu reduzierter oder aufgehobener Aktivität des Enzyms, so dass bei Patienten über alternative Abbauege aus Glutaryl-CoA die Metaboliten Glutarsäure (GA), 3-Hydroxyglutarsäure (3-OHGA) und Glutaconsäure entstehen (Liesert et al. 1999) (Abb. 1). Diese organischen Säuren akkumulieren in Körperflüssigkeiten und Geweben der betroffenen Patienten, werden aber auch renal ausgeschieden (Liesert et al. 1999). Sie zeichnen sich durch eine neurotoxische Wirkung, insbesondere auf Neuronen des Corpus striatum, sowie durch schädigende Einflüsse auf die Integrität von Blutgefäßen aus (Strauss et al. 2003, Mühlhausen et al. 2004, 2006). Über welche Wege die Metaboliten transportiert werden und welche Mechanismen den Zellschädigungen zugrunde liegen, ist weitgehend ungeklärt. Aufgrund der Strukturähnlichkeit von 3-OHGA und dem Neurotransmitter Glutamat werden NMDA-Rezeptor-abhängige exzitotoxische Mechanismen bezüglich der Neurotoxizität diskutiert. Es konnten aber auch

NMDA-Rezeptor-unabhängige Effekte gefunden werden (Ullrich et al. 1999, Kölker et al. 2004).

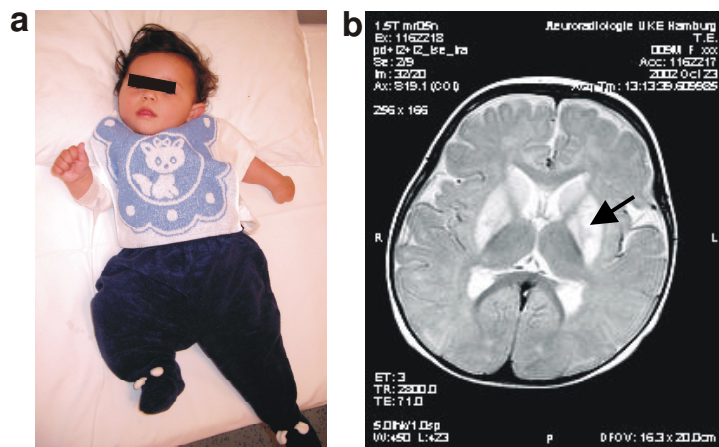


**Abb.1: Gestörter Stoffwechselweg bei der Glutarazidurie Typ 1**

Die Glutaryl-CoA-Dehydrogenase katalysiert im Abbauweg der Aminosäuren Lysin, Hydroxylysin und Tryptophan die Decarboxylierung und Dehydrogenierung von Glutaryl-CoA zu Crotonyl-CoA. Fehlt das Enzym, so reichert sich Glutaryl-CoA an und wird über noch nicht vollständig geklärte alternative Stoffwechselwege zu Glutarsäure, 3-Hydroxyglutarsäure und Glutaconsäure abgebaut.

Klinisch auffällig werden einige Kinder mit *GCDH*-Defizienz bereits im Säuglings- und frühen Kleinkindesalter durch eine progrediente Makrozephalie und seltener durch diskrete neurologische Symptome wie muskuläre Hypotonie und Irritabilität (Hoffmann et al. 1996). Ohne präventive Behandlungsstrategie (s.u.) entwickeln etwa 75 Prozent der Patienten, meist im Rahmen von fieberhaften Infektionen oder Routineimpfungen, eine akute Enzephalopathie mit irreversibler striataler Destruktion und konsekutiver dyston-dyskinetischer Bewegungsstörung (Brismar & Ozand 1995, Hoffmann et al. 1994, 1996, Bjugstad et al. 2000) (Abb. 2 a). Diese Krise tritt mit einem Manifestationsgipfel zwischen dem 6. und 12. Lebensmonat auf. Nach dem 18. Lebensmonat wurde ein solches Ereignis selten beobachtet. Jungen haben ein leicht erhöhtes Risiko eine akute Enzephalopathie zu entwickeln und sind vom Ausmaß der motorischen Behinderung durchschnittlich etwas schwerer betroffen als Mädchen (Strauss et al. 2003).

Die Diagnostik der GA-1 erfolgte bislang durch selektives Screening klinisch auffälliger Kinder bezüglich der organischen Säuren GA und 3-OHGA im Urin mit nachfolgender Sicherung der Diagnose durch Enzymatik an Fibroblasten und molekulargenetische Untersuchungen. Über das seit 2005 flächendeckend in Deutschland durchgeführte erweiterte Neugeborenen-Screening ist es neuerdings möglich, betroffene Patienten bereits vor dem Auftreten von Symptomen zu erkennen. Dem GA-1-Screening zugrunde liegt die Detektion von Acylcarnitinen im Blut mittels Tandem-Massenspektrometrie (Meyburg et al. 2001). Bei der Magnetresonanztomographie (MRT) fällt schon bei 80 Prozent der betroffenen Säuglinge ein hypoplastischer fronto-temporaler Cortex auf. Die Liquorräume sind diffus erweitert, seltener werden subdurale Hämatomate gefunden. Während der akuten Enzephalopathie zeigt sich im Tomogramm eine ödematöse Schwellung der Basalganglien, im weiteren Verlauf ist dann ein narbiger Umbau mit Atrophie nachweisbar (Abb. 2 b) (Forstner et al. 2004).



**Abb 2: Klinik der GA-1**

Die betroffenen Kinder zeigen nach der akuten Enzephalopathie eine dyston-dyskinetische Bewegungsstörung mit Chorea und Athetose (a). In der Magnetresonanztomographie fallen kurz nach der enzephalopathischen Krise ödematöse Veränderungen des Corpus striatum auf (Pfeil) (b). (Eine Zustimmung seitens der Eltern und der Neuroradiologie zur Verwendung der Bilder liegt freundlicherweise vor.)

Da eine kausale Therapie derzeit nicht möglich ist, zielen die Behandlungsstrategien auf die Prävention neurometabolischer Krisen ab. Die Basistherapie ist eine proteinarme Diät bei gleichzeitiger Gabe spezieller Lysin- und Tryptophan-freier Aminosäure-Mischungen, um die Konzentration der Substrate der GCDH möglichst gering zu halten. Zusätzlich erhalten die Patienten L-Carnitin, um den Mangel des biogenen Amins auszugleichen und die Ausscheidungsrate der cytotoxischen Säuren über Carnitinbindung zu erhöhen. Bei fieberhaften Erkrankungen stehen eine hochkalorische Ernährung und eine schnelle antipyretische Therapie im Vordergrund, um katabole Stoffwechsellagen zu verhindern (Mühlhausen et al. 2004, Kölker et al. 2006). In der metabolischen



Krise müssen die Patienten intensivmedizinisch unter Kontrolle des Hirndrucks, der Hydrierung, der Oxygenierung und der Energiezufuhr und mit zusätzlicher medikamentöser Neuroprotektion versorgt werden (Strauss et al. 2003).

Unter präventiver Therapie erreichen etwa 90 Prozent der Kinder das zweite Lebensjahr ohne eine enzephalopathische Krise zu entwickeln (Kölker et al. 2006). Im weiteren Verlauf fallen sie lediglich durch mildere Symptome, wie etwa eine schnellere Ermüdbarkeit, auf oder bleiben gänzlich symptomfrei. Bei den Kindern, die eine dystone Bewegungsstörung erworben haben, bestimmen, abhängig von der Schwere der Behinderung, sekundäre Komplikationen die Prognose (Strauss et al. 2003).

## 1.2 Die *Gcdh*-defiziente Maus

Als Modell für die Glutarazidurie Typ 1 generierten Dr. S. Goodman und Kollegen (Denver, USA) eine Maus, die durch Deletion der ersten sieben Exone des *Gcdh*-Gens im homozygoten Zustand keine *Gcdh*-Aktivität zeigt. Bei *Gcdh*-defizienten Mäusen findet sich eine Akkumulation der Metaboliten 3-OHGA und GA im Gehirn, Blut und Urin. Die *Gcdh*-defizienten Tiere weisen keine äußerlichen Auffälligkeiten auf, es findet sich aber eine Hypertrophie der Nieren und im Gehirn eine isolierte Spongiose des frontalen Cortex. Bei gleichem biochemischen Phänotyp unterscheidet sich der klinische Phänotyp der Mäuse radikal von dem menschlicher Patienten. Die Mäuse entwickeln unter konventioneller Tierpflege keine akute Enzephalopathie. Auch durch Stress, z.B. erzeugt durch Injektion von Lipopolysacchariden zur Imitation einer Infektion, ließ sich eine solche Krise bislang nicht provozieren. Die *Gcdh*-defizienten Mäuse weisen in neurologisch-motorischen Tests, wie dem *Rotarod*-Test oder dem auditorischen *Startle-response*-Test, lediglich milde Defizite auf (Koeller et al. 2002).

Vor kurzem wurde beschrieben, dass es durch Fütterung einer hochgradig proteinreichen Diät möglich ist, bei jungen *Gcdh*-defizienten Mäusen eine neurometabolische Krise zu induzieren (Zinnanti et al. 2006). Die Tiere werden zunächst hypotherm und hypoaktiv, zeigen dann Bewegungsstörungen, die wie eine Dystonie imponieren und versterben nach wenigen Tagen. Pathologisch finden sich ausgedehnte Einblutungen im Gehirn sowie ein ausgeprägter Neuronenverlust mit konsekutiver Gliose des Cortex und des Striatums.

## 1.3 Transport von 3-OHGA und GA über Membranen

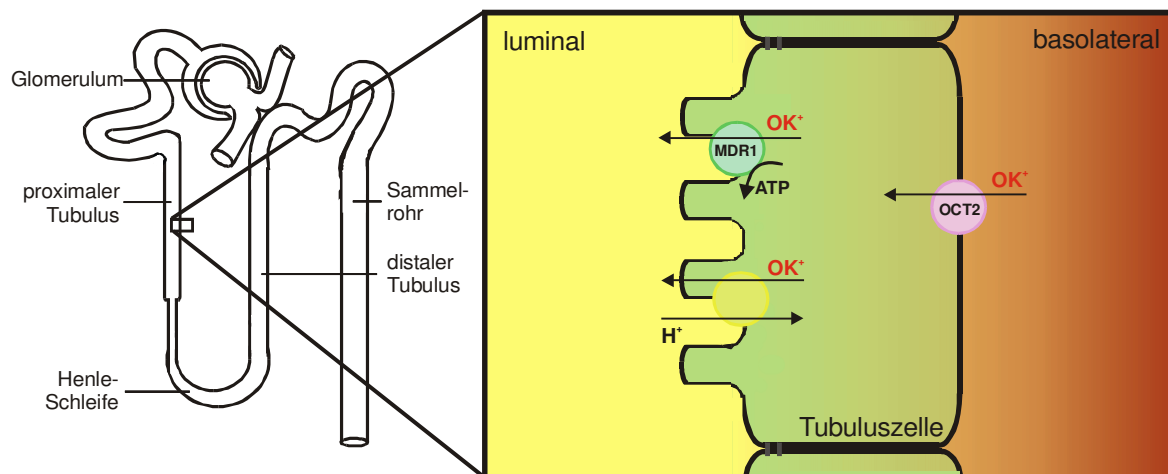
Da es sich bei 3-OHGA und GA um geladene Dicarboxylat-Verbindungen handelt, ist ihre Translokation über Membranen nur mit Hilfe spezifischer Transporter möglich, zu denen bisher keine veröffentlichten experimentellen Daten vorliegen. Es ist sehr wahrscheinlich, dass verschiedene Transportsysteme für die unterschiedlichen Membranen existieren, über die 3-OHGA und GA transloziert werden. Nach dem bislang bekannten Metabolismus der beiden Dicarboxylate ist ein Transport über die innere und äußere Mitochondrienmembran, über die Plasmamembran von Hepatozyten und Neuronen, über vaskuläre Endothelzellbarrieren und über die funktionell unterschiedliche basolaterale und apikale Membran renaler Tubuluszellen erforderlich.

### 1.3.1 Transportsysteme der Niere

Die Niere erfüllt neben ihren Aufgaben in den Bereichen der Volumen- und Elektrolythomöostase, der Blutdruckregulation und der Hormonsynthese die wichtige Funktion, wasserlösliche Stoffwechselprodukte und Pharmaka kontrolliert auszuscheiden. Hierfür stehen eine Anzahl von Transportern zur Verfügung, die mit unterschiedlicher Spezifität Konzentrations- oder ATP-abhängig das Substrat basolateral oder apikal über die Tubuluszellmembran transportieren. Den Transfer unterschiedlicher kleiner Verbindungen vermitteln Proteine, die einer Familie von Transportern der *solute carrier* (SLC)-Serie angehören. Derzeit umfasst die SLC-Serie 44 Familien mit insgesamt etwa 300 Transportproteinen, die durch passiven Transport, Ionen-abhängigen Transport oder als Austauscher spezifische Substrate durch Membranen translozieren. Dazu gehören unter anderem Transporter für organische Kationen und Anionen (SLC22- und SLC21-Familie), für Dicarboxylate (SLC13-Familie) und Monocarboxylate (SLC16-Familie), für Harnstoff (SLC14-Familie), für Glucose (SLC2- und SLC5-Familie), für zahlreiche Metallionen, Aminosäuren und Fettsäuren sowie Transporter der mitochondrialen Matrix (SLC25-Familie) (Hedinger et al. 2004).

### 1.3.1.1 Der Organische Kationen Transporter Typ 2

Der Organische Kationen Transporter Typ 2 (OCT2, *SLC22a2*) ist ein etwa 62 kDa schweres Protein mit 12 Transmembrandomänen, das die erleichterte Diffusion von Monoaminen und kationischen Xenobiotika, aber auch von einigen Anionen ermöglicht (Gründemann et al. 1999, Hayer-Zillgen et al. 2002) (Tab. 1). OCT2 wird ubiquitär exprimiert, findet sich aber vorwiegend in der Niere sowie in geringerer Menge in Leber, Darm und Neuronen (Koepsell et al. 1998, 2003). In der Niere ist der Transporter basolateral im S2- und S3-Segment des proximalen Tubulus lokalisiert, sodass ihm eine wichtige Funktion in der regulierbaren Clearance von organischen Kationen aus dem Blut zukommt (Karbach et al. 1999) (Abb. 3). Auch in anderen Organen ist OCT2 in polarisierten Zellen basolateral lokalisiert und vermittelt primär einen Influx der Ionen. Bei intrazellulärer Kationenakkumulation kann es aber auch zum OCT2-vermittelten Efflux kommen (Koepsell et al. 1998). Die Transportaktivität von OCT2 ist vom extrazellulären pH-Wert abhängig. Sie sinkt bei zunehmender Azidität (Kakehi et al. 2002). An Ratten konnte gezeigt werden, dass die Expression von OCT2 besonders bei männlichen Tieren mit dem Alter zunimmt. Werden die erwachsenen Tiere gonadektomiert, so gleicht sich die Expression des OCT2 derjenigen der weiblichen Tiere an (Slitt et al. 2002).



**Abb. 3: Proximal-tubuläre OCT2-vermittelte Sekretion organischer Kationen**

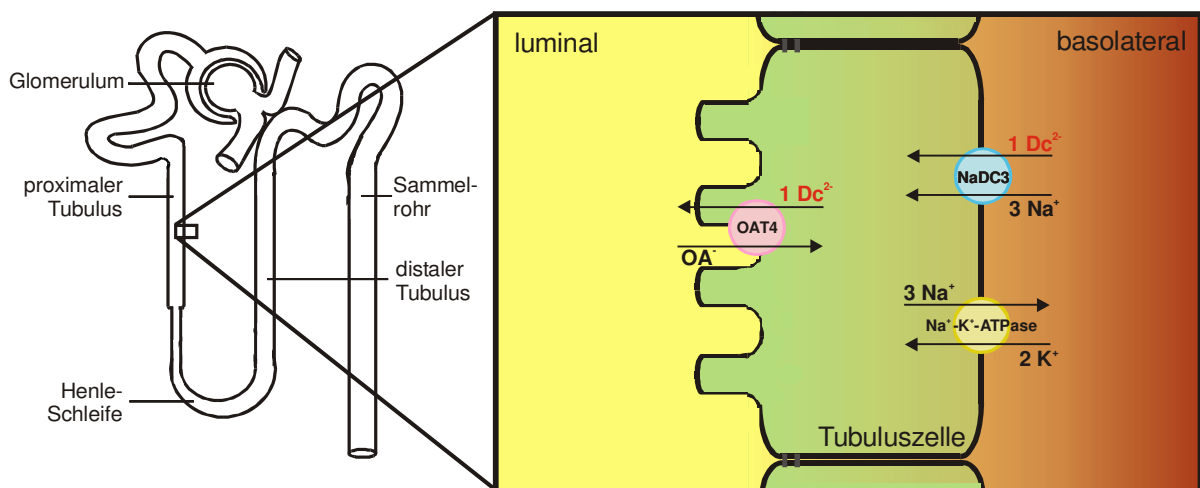
Der proximale Tubulus schließt sich dem Glomerulum an (s. Nephron links im Bild). Somit erfolgt die Sekretion von organischen Kationen ( $OK^+$ ) über OCT2 bereits früh. OCT2 ist basolateral in der proximalen Tubuluszelle lokalisiert. Während der Einstrom aus dem blutseitigen Interstitium in die Zelle passiv erfolgt, ist luminal ein primär aktiver, ATP-abhängiger Transport (z.B. Multi Drug Resistance Protein 1 = MDR1) oder ein Protonen-abhängiger Transport für die Abgabe in den Primärurin notwendig.

**Tab. 1: Lokalisation, Substrate und Inhibitoren des OCT2**

Lokalisationen	Substrate	Modellsubstrate	Inhibitoren
Niere	Dopamin	TEA	Phenoxybenzamin
Harnblase	Adrenalin	MPP	SKF550
Leber	Noradrenalin		Disprocynium24
Darm	Cholin		
Gehirn	Serotonin		
Thymus	Histamin		
Plazenta	Cisplatin		
	Amantadin		
	Biguanide		
	Cimetidin		

### 1.3.1.2 Der Natrium-abhängige Dicarboxylat Transporter Typ 3

Der Natrium-abhängige Dicarboxylat Transporter Typ 3 (NaDC3, *SLC13a3*) ist ein 66 kDa schweres Transmembranprotein, das vorwiegend in der Niere exprimiert wird (Abb. 4), aber auch in Leber, Pankreas und Gehirn nachgewiesen werden konnte. Er befördert pH-Wert-abhängig im Kotransport mit Natrium-Ionen vorrangig Intermediate des Zitratzyklus in die Zelle hinein (Markovich et al. 2004, Huang et al. 2000) (Tab. 2). Die Expression von NaDC3 steigt mit zunehmendem Alter an (Wang et al. 2003).



**Abb. 4: Proximal-tubuläre NaDC3-vermittelte Sekretion von Dicarboxylaten**

NaDC3 ist in der basolateralen Membran proximaler Nierentubuluszellen lokalisiert. Im Kotransport mit drei Natriumionen transloziert er ein Dicarboxylat Ion ( $Dc^{2-}$ ) in die Zelle hinein. Dieser Transport ist sekundär aktiv, da Natrium über die  $Na^+K^+$ -ATPase wieder aus der Zelle hinaus gepumpt werden muss. Auf der luminalen Seite sorgt unter anderem der Organische Anionen Transporter Typ 4 (OAT4) im Austausch gegen organische Anionen für die Sekretion der Dicarboxylate in den Primärurin.

**Tab. 2: Lokalisation, Substrate und Inhibitoren des NaDC3**

<i>Lokalisationen</i>	<i>Substrate</i>	<i>Modellsubstrate</i>	<i>Inhibitoren</i>
Niere	Succinat	Glutarsäure	Lithium
Leber	Citrat		
Pankreas	$\alpha$ -Ketoglutarat		
Gehirn			
Plazenta			

---

## 2 Zielsetzung

Die Glutarazidurie Typ 1 ist eine angeborene Stoffwechselstörung, bei der es aufgrund eines Defekts der Glutaryl-CoA-Dehydrogenase (GCDH) zu Störungen im Abbau der Aminosäuren Lysin, Hydroxylysin und Tryptophan und nachfolgend zur Akkumulation der Metaboliten 3-Hydroxyglutarsäure (3-OHGA) und Glutarsäure (GA) kommt. Ein Großteil der betroffenen Kinder erleidet im Rahmen kataboler Stoffwechsellagen während einer vulnerablen Phase zwischen dem 6. und 18. Lebensmonat eine akute Enzephalopathie mit Destruktion des Striatums und konsekutiv irreversibler dyston-dyskinetischer Bewegungsstörung. Bislang lag bei Untersuchungen zur Glutarazidurie Typ 1 der Schwerpunkt auf neuronalen und vaskulären Mechanismen, die zur Auslösung solcher Krisen beitragen. Während der Charakterisierung *Gcdh*-defizienter Mäuse, als Modell der Glutarazidurie Typ 1, stellte sich heraus, dass die Nieren ebenfalls betroffen sind. Sie weisen eine Hypertrophie auf, deren Ursache unbekannt ist.

Ziel der Arbeit war es, die molekularen Ursachen der morphologischen und funktionellen Veränderungen an den Nieren *Gcdh*-defizienter Mäuse näher zu beschreiben. Zunächst sollte geklärt werden, welches histologische Korrelat der Nierenhypertrophie zugrunde liegt. Mittels DNA-Microarray- und Protein-Analytik sollte untersucht werden, wie die Niere auf transkriptioneller und translationaler Ebene auf die pathologische Stoffwechsellage während verschiedener Entwicklungsstufen der Maus reagiert. Ausgewählte Parameter sollten anschließend, auch unter Bedingung einer induzierten metabolischen Krise bei der *Gcdh*-defizienten Maus, näher charakterisiert werden. Der Schwerpunkt der Untersuchung sollte dabei auf der Identifizierung potentieller Transportproteine für 3-OHGA und GA liegen. Zuletzt sollte geklärt werden, inwiefern die Nierenfunktion *Gcdh*-defizienter Mäuse unter basalen Bedingungen sowie in der metabolischen Krise beeinträchtigt ist.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien entsprachen dem Reinheitsgrad pro analysi. Die nicht angegebenen Reagenzien wurden entweder von Merck, GIBCO/BRL, Pierce, Sigma, Amersham Pharmacia oder BioRad bezogen.

Acrylamid 30% / Bisacrylamid 0,8%	Roth, Karlsruhe
Agarose	GIBCO/BRL, Eggenstein
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München
Bromphenolblau	BioRad, München
Caesiumchlorid (CsCl <sub>2</sub> )	Paesel + Lorei, Duisburg
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dithiotreitol (DTT)	Serva, Heidelberg
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure- Dinatriumsalz (EDTA)	Merck, Darmstadt
ECL-Reagenz (Super Signal)	Pierce Rockford, IL, USA
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Fluorescent Mounting Medium	Dako, USA
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Giensa Färbelösung	Sigma, Deisenhofen
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glutarsäure	Sigma, Deisenhofen
Guanidin Isothiocyanat	Gibco BRL, USA
3-Hydroxyglutarsäure	Synthetisiert und zur Verfügung gestellt von Prof. J. Thiem, Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma, Deisenhofen
Ketanest S	Pfizer, USA
N-Lauroylsarcosine	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
May-Grünwald-Lösung	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Natriumacetat (NaAc)	Merck, Darmstadt

Natriumcarbonat	J.T. Baker, Holland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat	Sigma, Deisenhofen
Para-Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Sigma, Deisenhofen
Pikrinsäure	Sigma, Deisenhofen
Rompun 2%	Bayer, Leverkusen
Saccharose	Merck, Darmstadt
Serva blue G	Serva, Heidelberg
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
Solvable Tissue Solubilizer	Perkin Elmer, USA
Tetraethylammonium Chlorid	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Trizma base	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Serva, Heidelberg
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt

### 3.1.2 Radioaktive Substanzen

<sup>14</sup> C-Tetraethylammonium Bromid	Perkin Elmer, Boston
---	----------------------

### 3.1.3 Enzyme und Nukleotide

Collagenase CLS II	Biochrom, Berlin
DNase, RQ1	Promega
dNTP-Set, ultrapure	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Oligo d(T) <sub>16</sub> -Primer	Roche Diagnostics, Mannheim
PCR-Primer	MWG-Biotech AG, Ebersberg
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Random Hexamers	Roche Diagnostics, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

### 3.1.4 Proteine und Proteinstandards

Casein, aus Kuhmilch	Sigma, Deisenhofen
Collagen I, aus Kalbshaut	Sigma, Deisenhofen
Gelatine, aus Kalbshaut	Sigma, Deisenhofen
Kreatinin	Hitado, Möhnesee
Rainbow™-coloured Protein-Standard	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg



### 3.1.5 DNA-Standards

DNA-Ladder, 100 Bp GIBCO/BRL, Eggenstein

### 3.1.6 Kits

LightCycler-FastStart DNA Master SYBR-Green I Roche Diagnostics, Mannheim  
 Superscript III Reverse Transkriptase Invitrogen, USA

### 3.1.7 Zellkulturlösungen

Fötale Kälberserum (FKS) GIBCO/BRL, Eggenstein  
 Optimem-I GIBCO/BRL, Eggenstein  
 PBS für Zellkultur GIBCO/BRL, Eggenstein  
 Penicillin/Streptomycin/Neomycin Sigma, Deisenhofen

### 3.1.8 Puffer, Medien und Lösungen

Die verwendeten Puffer und Lösungen wurden gemäß den Instruktionen der „Current Protocols in Molecular Biology“ (2000), Harvard Medical School angesetzt.

### 3.1.9 Antikörper

#### 3.1.9.1 primäre Antikörper

Antigen	Spezies	Referenz/Firma	Verdünnung		
			WB	IF	IH
OCT2 Ratte	K	Alpha Diagnostic, San Antonio, TX	1 :1.000	1 :200	-
NaDC3 Maus	K	Alpha Diagnostic, San Antonio, TX	-	-	1:50
Collagen I human	Z	Santa Cruz, Santa Cruz, CA	1:500	-	-
Fibronektin human	K	Sigma, Deisenhofen	1:1.000	-	-
β-Aktin human	Z	Santa Cruz, Santa Cruz, CA	1:250	-	-

Z: Ziege, K: Kaninchen, WB: Westernblot, IF: Immunfluoreszenz, IH: Immunhistochemie

### 3.1.9.2 sekundäre Antikörper

Kaninchen-anti-Ziege-IgG, HRP-gekoppelt; 1:10.000 im WB	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Kaninchen-IgG, HRP-gekoppelt, 1: 10.000 im WB	Dianova, Hamburg
Schaf-anti-Kaninchen-IgG, Cy3 Konjugat, 1:400 in der IF	Sigma, Deisenhofen

### 3.1.10 Verbrauchsmaterialien

Gewebekulturschalen, 60x15 cm	Sarstedt, USA
Immersionsöl 518 C	Zeiss, Oberkochen
Light-Cycler Capillaries (20µl)	Roche Diagnostics, Mannheim
Linspapier MN 10 B	Zeiss, Oberkochen
Nitrocellulose Blotting Membran 0,2 µm	BioRad, München
Objektträger und Deckgläser	Menzel Gläser
Röntgenfilme, XAR-5	Kodak, Stuttgart
Spritzenvorsatzfilter, 0,45µm	Qualilab, Bruchsal
TC-Plate, 24 well	Greiner, Frickenhausen
Whatman GB002-Papier	Schleicher & Schüll, Daßel
Zentrifugenröhrchen 2.2 PA	Hitachi, USA

### 3.1.11 Geräte

Analysenwaagen Typ AC 100	Mettler Waagen, Giessen
Analysenwaagen Typ BP 2100S	Sartorius, Göttingen
Beta-Counter LS 3801	Beckman, USA
Blot-System, Transphor Typ SE 600	Hoefer Scientific Instruments, USA
Eismaschine AF 10	Scotsman
Elektrophoresekammern für Agarosegele	BioRad, München
Elektrophoresekammern für Polyacrylamidgele	Hoefer Scientific Instruments, USA
Filmentwicklungsmaschine Modell Gevamic 60	Agfa-Gevaert, Leverkusen
Gefrierschrank -80 °C	New Brunswick, Edison
Geltrockner, Modell Gel Air Dryer	BioRad Herkules, USA
Heizblock Modell Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Homogenisator Typ Tissue Tearer, Model 985-370	Dremel, USA
Inkubationsschüttler Modell G25	New Brunswick Sc., Edison
Injektionsblock für Mäuse	Eigenbau, Werkstatt des Zentrums für Biochemie der Universität Göttingen
Magnetrührer Ika-Combimag Ret	Janke & Kunkel, Staufen
Metabolischer Käfig für Mäuse Typ 3600M021	Tecniplast, Italien

Mikroskope:

Phasenkontrastmikroskop, Zeiss, Oberkochen  
Modell ID 03

Fluoreszenzmikroskop, Axiovert 100 Zeiss, Oberkochen

Zusatzausstattung für das Axiovert 100: DP 50-Kamera Olympus, Hamburg

Software: Analysis Soft Imaging System

Mikrowellenherd

Bosch

Netzgerät Standard Power Pack P25

Biometra, Göttingen

pH-Meter Knick 647

Schütt, Göttingen

PCR-Thermocycler:

LightCycler Instrument

Roche Diagnostics, Mannheim

Mastercycler, Gradient

Eppendorf, Hamburg

Perfusionspumpe P1

Pharmacia Biotech, USA

Photometer

Photometer, Modell RS 232 C

Eppendorf, Hamburg

Photometer Ultraspec 1100 pro

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Pipetten für Volumina im µl-Bereich

Eppendorf, Hamburg

Sterilbank HS 12

Heraeus, Osterode

Tissue Tearer

Dremel, USA

Ultraschall-Desintegrator Sonifier W-450

Branson Ultrasonic SA, Carouge-Geneve, USA

UV-Transilluminator

Raytest, Straubenhardt

Vakuum Konzentrator

Vacuubrand, Wertheim

Modell Speed Vac SPD 111V

Vortex-Genie

Bender & Hobein AG, Zürich

Wasserbad Typ HOR 7225

Köttermann, Häningsen

Zentrifugen:

Minifuge GL

Heraeus, Osterode

Eppendorf Kühlzentrifuge, Modell 5417

Eppendorf, Hamburg

Eppendorf Tischzentrifuge 5415 D

Eppendorf, Hamburg

Ultrazentrifuge Sorvall Discovery M120

Kendro Laboratory Products, Newtown, Connecticut USA

Rotoren für die Minifuge:

F-45-30-11

Heraeus, Osterode

F-45-24-11

Heraeus, Osterode

Rotoren für die Ultrazentrifugen:

S 100 AT4, S55S,

Kendro Laboratory Products, Newtown, Connecticut USA

## 3.2 Mauslinien und Tierversuchsanträge

Heterozygote Tiere der Mauslinien GAc57Bl6 und GA129SVJ wurden freundlicherweise von Dr. S.I. Goodman (Denver, USA) bereitgestellt. Beide Linien weisen den gleichen Defekt im *Gcdh*-Gen auf. Durch Kreuzung von Heterozygoten jeweils einer Linie erhält man die für die Versuche verwendeten GAexp-Tiere („Hybrid-vigour“-Kreuzungsverfahren).

Alle Tierversuche wurden nach Prüfung und Genehmigung durch die Tierschutzkommission des Amts für Gesundheit und Verbraucherschutz, Abteilung für Veterinärwesen der Freien und Hansestadt Hamburg durchgeführt (Genehmigung Nr. 26/05 vom 11.04.2005 und Zusatzgenehmigung zu Nr. 26/05 vom 02.06.2006).

## 3.3 Methoden

### 3.3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.3.1.1 Isolierung genomischer DNA

Lysispuffer	100mM	Tris/HCl pH 7,4
	5mM	EDTA
	200mM	NaCl
SDS-Lösung	10%	SDS
Proteinase K-Lösung	20 mg/ml	in Lysispuffer
Solubilizer	100mM	Tris/HCl pH 7,4
	5mM	EDTA

Genomische DNA wurde für die Genotypisierung aus den Schwanzspitzen und für die Untersuchung der Nierenhypertrophie aus den gesamten Nieren der Mäuse isoliert. Dazu wurden die Gewebe über Nacht in 1 ml Lysispuffer, 20 µl SDS-Lösung und 80 µl Proteinase K-Lösung unter Schütteln bei 56 °C inkubiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4 °C wurde dem Überstand 500 µl Isopropanol zugegeben. Nach mehrmaligem Invertieren erfolgte eine 5-minütige Zentrifugation. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet getrocknet. Die

getrocknete DNA wurde anschließend mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen und erneut bei 37 °C getrocknet. Das DNA-Pellet wurde in 100 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und 30 min bei 37 °C gelöst.

### 3.3.1.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die photometrische Messung der DNA-Konzentration erfolgte bei 260 nm in einer UV-Küvette gegen TE-Puffer bzw. Aqua bidest. Eine OD<sub>260</sub> von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 31 µg/ml Oligonukleotiden.

### 3.3.1.3 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein Methode, um definierte DNA-Fragmente mit Hilfe der thermostabilen DNA-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermophilus aquaticus* (*Taq*) zu amplifizieren (Saiki et al. 1988).

Als Template wurde DNA verwendet, die mittels Präparation aus Schwanzspitzen gewonnen wurde. Das dNTP-Set wurde auf eine Endkonzentration von 2,5mM je Nukleotid verdünnt. Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte in einem Thermocycler in 30 Zyklen, bestehend aus Denaturierung bei 94 °C für 15 sec, Annealing bei 63 °C für 1 min und Extension bei 72 °C für 1 min (Primersequenzen siehe Tabelle 8.2 im Anhang).

DNA-Template	Primer 3´ und 5´ (10 pmol/µl)	dNTP (2,5mM je Nukleotid)	10 x PCR-Puffer	<i>Taq</i> - Polymerase (5 U/µl)	H <sub>2</sub> O
50 ng	je 1 µl	1 µl	5 µl	0,5 µl	ad 50 µl

Bei jeder PCR wurden zwei Kontrollen mitgeführt. Es wurde jeweils eine Probe ohne DNA-Template und eine ohne Oligonukleotid-Primer angesetzt.

### 3.3.1.4 Auftrennung von DNA im Agarosegel

TAE-Puffer	40mM	Tris base
	20mM	Essigsäure
	2mM	EDTA

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe wurden 1-2%ige (w/v) Agarosegele verwendet. Die erforderliche Agarosemenge wurde in Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) im Mikrowellenherd aufgekocht und nach dem Abkühlen auf ca. 55 °C mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 0,5 µg/ml). Die Proben wurden mit DNA-Ladepuffer (0,05% Bromphenolblau; 45% TAE-Puffer; 55% Glycerin) versehen und aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 3-4 V/cm durchgeführt. Durch das in die DNA eingelagerte Ethidiumbromid wurden die DNA-Fragmente unter UV-Licht als Bande sichtbar. Zur Dokumentation wurde das Agarosegel auf dem UV-Transilluminator mit einem Fotosystem aufgenommen und ein Ausdruck des Bildes erstellt.

### 3.3.1.5 RNA-Isolierung aus Gewebe und Zellen

Guanidin-Lsg.	5M	Guanidine-Thiocyanat
	50mM	Tris/HCl, pH 7,5
	10mM	EDTA
Sarkosyl-Lsg.	20% (w/v)	Sarkosyl
Caesiumchlorid-Lsg.	5,7M	Caesiumchlorid
		in 100mM EDTA, pH 8,0
Resuspensionspuffer	5mM	EDTA
	0,5% (w/v)	Sarkosyl
	5%	β-Mercaptoethanol

Für die Isolierung von RNA aus Gewebe wurde dieses zunächst mit dem Skalpell zerkleinert. Nach Zugabe von 950 µl Guanidin-Lösung und 50 µl β-Mercaptoethanol wurde das Gewebe durch mehrmaliges Aufziehen durch eine Spritze mit 20G-Nadel homogenisiert und anschließend 10 min bei 12.000 x g und 12 °C zentrifugiert. (Bei RNA-Isolierung aus kultivierten Zellen wurden diese in der Guanidin-Lösung abgeschabt und anschließend identisch wie oben fortgefahren). Der Überstand wurde mit 100 µl Sarkosyllösung versetzt und 2 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurden 500 µl Caesiumchloridlösung mit dem Überstand überschichtet und 20 h bei 113.000 x g und 22 °C im Swing-out-Rotor S55S zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in 400 µl Resuspensionspuffer aufgenommen und 1 min bei 56 °C inkubiert. Durch sequenzielles Mischen mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)

wurde die RNA aufgereinigt und anschließend aus der oberen Phase durch Zugabe von Natrium-Acetat ad 0,3M sowie 2,5 Vol. Ethanol bei -80 °C für 30 min präzipitiert. Die RNA wurde durch Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4 °C für 30 min pelletiert. Das Pellet wurde anschließend bei Raumtemperatur getrocknet, in 50 µl A. dest. aufgenommen und anschließend einer DNase-Behandlung nach den Instruktionen des Herstellers (Promega) unterzogen. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurde die RNA wiederholt durch Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt (s.o.).

### 3.3.1.6 DNA-Microarray

RNA aus Nieren von *Gcdh*-defizienten und Wildtyp-Mäusen der Altersstufen 42 und 100 Tage wurde zur Microarray-Analyse in das UKE-eigene Servicelabor (Institut für Klinische Chemie, Dr. T. Streichert) gegeben. Die Analyse erfolgte unter Verwendung des Affimetrix-Systems. Es wurde der Gen-Chip Mouse Expression Set 430 verwendet.

### 3.3.1.7 Realtime-PCR

Für die Realtime-PCR wurde zunächst RNA mit Hilfe von Reverser Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben. Die RT ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die einzelsträngige RNA als Template für die Synthese eines komplementären DNA-Stranges benutzt. Zunächst wurde 1 µg RNA mit unspezifischen Primern für 10 min bei 70 °C im Thermocycler inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt.

RNA	Random-Hexamers (50µM)	Oligo d(T) <sub>16</sub> -Primer (50µM)	H <sub>2</sub> O
1 µg	1 µl	1 µl	ad 20 µl

Nach Zugabe von DTT, einem Nukleotid-Mix und Reverser Transkriptase erfolgte die Transkription ebenfalls im Thermocycler für 1 h bei 42 °C.

5x First strand buffer	0,1M DTT	dNTP (10mM je Nukleotid)	Superscript III Reverse Transkriptase (200 U/µl)
5 µl	3 µl	6 µl	1 µl

Bei der anschließenden Realtime-PCR interkaliert der fluoreszierende Farbstoff SYBR-Green mit jedem neu amplifizierten DNA-Strang. So kann im Light Cycler die Menge der DNA durch Messung der Fluoreszenz nach jedem Zyklus in Echtzeit und nicht als Endpunktquantifizierung wie bei der herkömmlichen semiquantitativen PCR gemessen werden. Für die PCR wurde die cDNA mit  $MgCl_2$ , den spezifischen Primern (Primersequenzen siehe Anhang 8.2) und der Polymerase versetzt und der Ansatz in Glaskapillaren der Firma Roche pipettiert.

cDNA- Template	25mM $MgCl_2$	Primer forward (10 pmol/ $\mu$ l)	Primer reverse (10 pmol/ $\mu$ l)	SYBR- Green- Polymerase (10x)	ad $H_2O$
1,5 $\mu$ l	8,7 $\mu$ l	0,75 $\mu$ l	0,75 $\mu$ l	1,5 $\mu$ l	15 $\mu$ l

Die PCR erfolgte im Light Cycler. Auf die initiale Aktivierung der Polymerase bei 95 °C für 10 min folgten 35 Zyklen, bestehend aus der Denaturierung bei 95 °C für 1 sec, dem Annealing (primerspezifische Temperatur siehe Anhang 8.2) für 10 sec und der Extension bei 72 °C für 20 sec. Im Anschluss wurde zur Kontrolle der Annealing-Eigenschaften der Primer eine Schmelzkurve nach Standardprotokollen erstellt. Die Messungen erfolgten in Doppelbestimmung, zur Kontrolle wurde eine Probe ohne cDNA mitgeführt.

Die Auswertung erfolgte nach der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode zur relativen Quantifizierung unter Verwendung von *Gapdh* als Housekeeping-Gen.

### 3.3.2 Biochemische Methoden

#### 3.3.2.1 Isolierung von Membranproteinen aus Geweben

Um Membranproteine im Westernblot nachweisen zu können, ist es oftmals nötig, diese zunächst mittels spezieller Verfahren aus der Membranverankerung zu lösen. Das Gewebe (0,2 mg Feuchtgewicht / ml Puffer) wurde in Homogenisierungspuffer (50mM Tris, 150mM NaCl und 2mM EDTA, pH 7,4) durch mehrmaliges Aufziehen durch eine Spritze mit 20G-Nadel homogenisiert und der postnukleäre Überstand (PNS) als Gesamthomogenat nach Zentrifugation bei 1.000 x g und 4 °C für 5 min abgenommen. Der PNS wurde anschließend bei



100.000 x g und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Das Pellet, das alle Membranbestandteile der Zelle enthält, wurde in 0,2% Triton X-100-haltigem Homogenisierungspuffer mittels Vortex-Gerät resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Das Lösen der integralen Proteine wurde durch Ultraschall-Sonifikation ergänzt. Nach erneuter Ultrazentrifugation (s.o.) wurde der Überstand mit den enthaltenen Membranproteinen abgenommen.

### 3.3.2.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen wurden in Doppelbestimmungen nach der Methode von Bradford, 1976, gemessen.

### 3.3.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Anodenpuffer	25mM	Tris/HCl, pH 8,6
	192mM	Glycin
Kathodenpuffer	25mM	Tris/HCl, pH 8,6
	192mM	Glycin
	0,1% (w/v)	SDS

Proteine wurden nach ihrer Größe durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in modifizierter Form nach Laemmli, 1970, in einem diskontinuierlichen Puffersystem getrennt. Die Acrylamid-Konzentration der Trenngele variierte in Abhängigkeit von dem darzustellenden Protein zwischen 8% und 15%. Die Auftrennung erfolgte bei Raumtemperatur und 55 mA/Gel für ca. 3h.

### 3.3.2.4 Westernblot

Transferpuffer	25mM	Tris
	192mM	Glycin
	20%	Methanol

Nach Auftrennung von Proteingemischen durch SDS-PAGE wurden die Proteine in einer Elektroblo-Apparatur für 90 min bei 900 mA auf eine

Nitrocellulosemembran elektrotransferriert (Towbin et al. 1979). Danach wurden nicht besetzte Stellen auf der Nitrocellulosemembran durch Inkubation mit Blockpuffer (10mM PBS, 5% Milchpulver, 0,05% Tween-20) für 2 h bei Raumtemperatur abgesättigt. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte über Nacht bei 4 °C in Blockpuffer. Danach wurde die Nitrocellulosemembran 3 x 5 min mit Waschpuffer (10mM PBS, 0,05% Tween-20) gewaschen und für 1 h bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Detektion der gebundenen Antikörper durch ECL („enhanced chemiluminescence“) und Belichtung eines Röntgenfilms.

### 3.3.2.5 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie lassen sich an kultivierten Zellen spezifische Proteine in ihrer Lokalisation nachweisen. Die Zellen wurden auf Ø 10 mm Deckgläsern in 24-Well TC-Platten ausgesät und bei Subkonfluenz zunächst drei mal mit 10mM PBS gewaschen, mit 4% (w/v) Paraformaldehyd (Pfa) für 15 min bei Raumtemperatur fixiert und danach erneut gewaschen (s.o.). Bei Bedarf wurden dann die Zellen mit 1% Triton X-100 in 10mM PBS für 1 h bei Raumtemperatur permeabilisiert und anschließend mit 2% Fötalem Kälberserum (FKS) in 10mM PBS für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Deckgläser wurden aus den Wells genommen und zunächst mit dem Primärantikörper für 2 h bei Raumtemperatur und nach abermaligem Waschen (s.o.) mit dem Fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper unter Lichtschutz für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläser mit Mounting Medium auf einem Objektträger eingebettet. Nach 12 Stunden konnten die gebundenen Antikörper im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht und mittels der Software „Analysis“ Bilder erstellt werden.

### 3.3.2.6 Immunhistochemie

Alle immunhistochemischen Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Neuropathologie des UKE unter Leitung von Herrn Prof. Glatzel durchgeführt.

### 3.3.2.7 Kreatinin-Bestimmung im Mäusurin

Die Bestimmung von Kreatinin im Urin erfolgte nach der Methode von Jaffé (Seaton et al. 1984).

### 3.3.2.8 Silberfärbung von SDS-PAGE-Gelen

Mit der Silberfärbung nach Blum (1987) lassen sich mittels SDS-PAGE aufgetrennte Proteine unspezifisch, aber sehr sensitiv, im Gel anfärben. Nach der Elektrophorese (siehe 3.3.2.3) wurde das Gel für 1 h in Fixierlösung (40% Ethanol, 10% Essigsäure) inkubiert und anschließend drei mal für 20 min in 30% Ethanol gewaschen. Es folgte eine Inkubation des Gels in 0,02% (w/v) Natriumthiosulfatlösung für 1 min. Nach kurzem Waschen mit Aqua bidest wurde das Gel unter Lichtschutz für 20 min gefärbt (0,2% (w/v) Silbernitrat, 0,009% Formaldehyd). Nach abermaligem kurzen Waschen erfolgte die Entwicklung (3% (w/v) Natriumcarbonat, 0,018% Formaldehyd). Sobald die gewünschte Farbintensität erreicht war, wurde die Reaktion durch Inkubation mit 1% (w/v) Glycin für 10 min gestoppt.

### 3.3.2.9 Zymographie

Die Zymographie dient dem Nachweis von Proteasen, die durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch enzymatischen Abbau im Gel einpolymerisierter Substrate der Protease sichtbar gemacht werden. Die Protease-haltigen Proben wurden mit 3x Z-Puffer (250mM Tris, 10% (w/v) SDS, 4% (w/v) Saccharose, pH 6,8) für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend im Gelatine-haltigen SDS-PAGE-Gel (0,5 mg / ml Gel) elektrophoretisch aufgetrennt. Um SDS zu entfernen wurde das Gel in 2,5% Triton X-100 für 30 min bei Raumtemperatur gewaschen und über Nacht bei 37 °C inkubiert (50mM Tris, 200mM NaCl, 5mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5). Die im Gel noch enthaltenen intakten Proteinsubstrate wurden durch jeweils einstündiges Färben (30% Methanol, 5% Essigsäure, 0,25% (w/v) Coomassie Blau) und Entfärben (30% Methanol, 5% Essigsäure) bei Raumtemperatur sichtbar gemacht. Die Proteasen imponieren indirekt als ungefärbte Banden.

### 3.3.3 Tierexperimentelle Arbeiten

#### 3.3.3.1 Organentnahme und Aufarbeiten für die Mikroskopie

Für die Entnahme von Organen zur Gewinnung von RNA und Protein wurden die Mäuse im Alter von 21, 42, 100 oder 200 Tagen über eine tiefe CO<sub>2</sub>-Narkose auf Trockeneis in einem geschlossenen Gefäß betäubt. Anschließend wurde der Thorax eröffnet und Blut mittels Herzpunktion gewonnen, worunter die Maus verstirbt. Die gewünschten Organe wurden sofort herauspräpariert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80 °C gelagert.

Für histologische und immunhistochemische Untersuchungen wurden die Mäuse zunächst mit 1,2 mg Ketanest, 0,16 mg Rompun / mg Körpergewicht narkotisiert und dann unter standardisierten Bedingungen für 5 min mit 3,75 ml 10mM PBS + Heparin (0,5 IE/ml) über die linke Herzkammer perfundiert. Die Organe wurden entnommen und zur Anfertigung von Kryoschnitten in Hanks-Medium in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für Paraffinschnitte mit nachfolgender Hämotoxylin-Eosin-Färbung oder Immunhistochemie wurden die Organe in 4% (w/v) Formalin und für die Elektronenmikroskopie in Glutaraldehyd fixiert. Die Organe wurden zur histologischen und immunhistochemischen Untersuchung an Herrn Prof. Helmchen, Institut für Pathologie des UKE, an Herrn Prof. Glatzel, Institut für Neuropathologie des UKE und Frau Prof. Lüllmann-Rauch, Institut für Pathologie der Universität Kiel gegeben.

#### 3.3.3.2 [<sup>14</sup>C]TEA-Verteilungsassay

Zur Untersuchung der Rolle von Organische Kationen Transportern im lebenden Organismus dient der Verteilungsassay mit dem spezifischen Substrat Tetraethylammonium (TEA). Hierfür wurde der Maus 100 µl einer 3,63mM [<sup>14</sup>C]TEA-Lösung in 0,9% NaCl (spezifische Aktivität: 2,75 mCi/mmol) in die Schwanzvene injiziert. Nach 20 min wurde die Maus getötet und die Organe sowie Blut mittels Herzpunktion und Urin mittels Blasenpunktion entnommen. Die Organe wurden gewogen, in Tissue-Solubilizer bei 56 °C über Nacht gelöst und anschließend zur Vermeidung von Quench-Effekten mit 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei 50 °C entfärbt. Die Messung der in den Organen enthaltenen Radioaktivität erfolgte im β-Counter.

### 3.3.3.3 Untersuchungen im metabolischen Käfig

Der metabolische Einzelkäfig für Mäuse erlaubt es, die Trink- und Futtermenge zu messen, einen nahezu verlustfreien 24 h-Sammelurin zu gewinnen und die Faeces vom Urin getrennt zu sammeln. Die Mäuse wurden für zwei Tage an den Käfig gewöhnt, Messungen erfolgten ab dem dritten Tag. Wasser und Futter stand *ad libitum* zur Verfügung. Zur Wahrung des Tag-Nacht-Rhythmus wurde auf entsprechende Lichtverhältnisse mit 12 h Licht und 12 h Dunkelheit geachtet.

### 3.3.3.4 Hochproteindiät

Durch Gabe einer Hochproteindiät lässt sich bei *Gcdh*-defizienten Mäusen eine akute Enzephalopathie induzieren (Zinnanti et al. 2006). Die Mäuse wurden im metabolischen Käfig gehalten (siehe 3.3.3.3) und erhielten als Futter eine Mischung aus 51% Casein und 49% Standard-Tiernahrung (Gesamtproteingehalt: 62%). Es wurden die Trink-, Futter-, Urin- und Kotmenge gemessen und die Exkremate zur weiteren Untersuchung gesammelt. Die Entwicklung der enzephalopathischen Krise wurde mittels eines Scores überwacht (Tab. 3). Bei einem Score von etwa 22 Punkten wurden die Tiere getötet (siehe 3.3.3.1).

**Tab. 3: Neurologisch-motorischer Score zur Überwachung *Gcdh*-defizienter Mäuse unter Hochproteindiät**

	keine	leicht	schwer
Gekrümmte Haltung	0	1	2
Hypothermie	0	2	3
Tägliche Gewichtsabnahme	0	2 <sup>1)</sup>	3 <sup>2)</sup>
struppiges Fell	0	1	1
Trinkverweigerung	0	2 <sup>3)</sup>	3 <sup>4)</sup>
Nahrungsverweigerung	0	1 <sup>5)</sup>	2 <sup>6)</sup>
Defizite im Stab-Test <sup>7)</sup>	0	1	2
Schnappatmung	0	2	4
Myoklonien	0	3	4
Lähmungen	0	3	4

<sup>1)</sup> Gewichtsabnahme < 1 g/d; <sup>2)</sup> Gewichtsabnahme > 1 g/d; <sup>3)</sup> Trinkmenge < 4 ml/d; <sup>4)</sup> Trinkmenge < 3 ml/d; <sup>5)</sup> Futtermenge < 2 g/d; <sup>6)</sup> Futtermenge < 1 g/d; <sup>7)</sup> Beim Stab-Test wird die Maus auf einen schmalen, sich drehenden Stab gesetzt. Er misst die motorische Koordinationsfähigkeit.

### 3.3.4 Zellbiologische Methoden

#### 3.3.4.1 Primärkultur von Nierenrindenzellen

Die primäre Kultivierung von Nierenrindenzellen erfolgte aus Nieren 40 Tage alter Mäuse. Die Nieren wurden sofort nach dem Töten der Tiere entnommen, kurz in 10mM PBS gespült und bis zur Weiterverarbeitung in Optimem I, wie alle im folgenden verwandten Medien versetzt mit jeweils 20 IE/ml Penicillin, 20 µg/ml Streptomycin und 40 µg/ml Neomycin, auf Eis gehalten. Mit einem Skalpell wurde die Nierenkapsel entfernt, die Rinde vom Mark getrennt und die Rinde zerkleinert. Das Rindengewebe wurde durch Inkubation in 0,1%iger (w/v) Collagenase II in Optimem I bei 37 °C und wiederholter Resuspension mit sukzessiv schmalere Pasteurpipetten verdaut. Nach Zentrifugation bei 600 x g und 4 °C für 7 min wurde das Zellpellet in Optimem I, versetzt mit 10% FKS, resuspendiert. Die Zellen wurden durch ein 200 µm wire-mesh filtriert und abermals zentrifugiert (s.o.). Nach Resuspension dieses Zellpellets in Optimem I, versetzt mit 5% FKS, wurden die Zellen ( $3 \times 10^4$  Zellen /  $\text{cm}^2$ ) in Collagen I-beschichteten Zellkulturschalen ausgesät. Primäre Nierenrindenzellen teilen sich nur mäßig und lassen sich nicht durch Trypsinieren und Ausdünnen über mehrere Passagen in Kultur halten. Eingefrorene Zellen sind nach dem Auftauen nicht mehr vital.

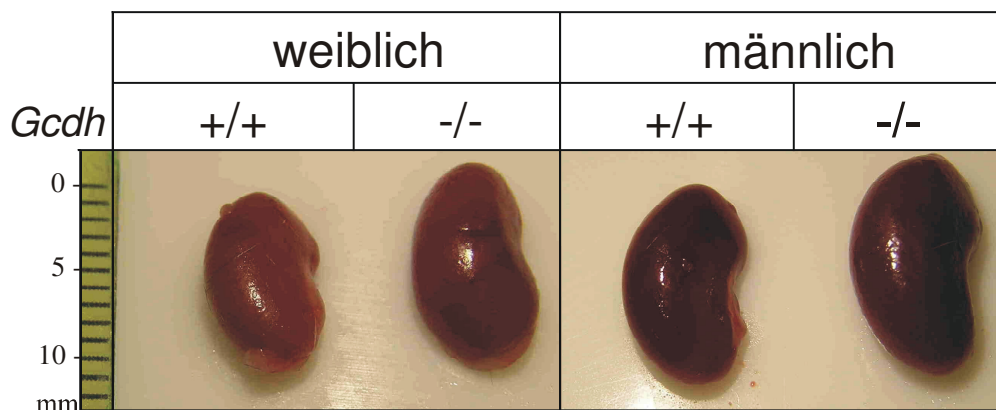
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Veränderungen in der Nierenmorphologie *Gcdh*-defizienter Mäuse

Bei der Obduktion *Gcdh*-defizienter Mäuse fallen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren deutlich vergrößerte Nieren auf. Es sollte untersucht werden, welche morphologischen Veränderungen dieser makroskopischen Nierenhypertrophie zu Grunde liegen.

#### 4.1.1 Makroskopische Nierenhypertrophie

Bereits makroskopisch fällt auf, dass die Nieren der *Gcdh*-defizienten Mäuse vergrößert sind (Abb. 5).

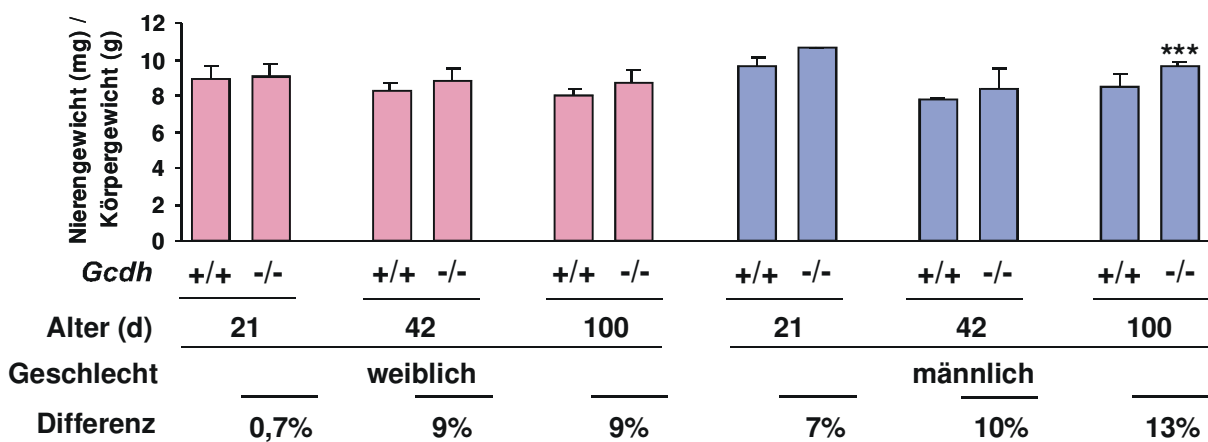


**Abb. 5: Nierenhypertrophie bei *Gcdh*-defizienten Mäusen**

Die Nieren 100 Tage alter Mäuse mit *Gcdh*-Defizienz (-/-) sind im Vergleich zu denen der Wildtyp-Tiere (+/+) deutlich sichtbar vergrößert. Diese Volumenzunahme scheint bei den Männchen stärker ausgeprägt zu sein.

Durch Auswiegen der Nieren gleich nach der Entnahme und Bezug dieses Feuchtgewichts auf das Körpergewicht der Maus, sollte die Vergrößerung des Organs verifiziert werden. Das Körpergewicht von *Gcdh*-defizienten und Wildtyp-Mäuse unterscheidet sich nicht. Die Nieren der *Gcdh*-defizienten Tiere sind schwerer als die ihrer gesunden Artgenossen. Dieser Gewichtsunterschied nimmt mit dem Alter der Mäuse progredient zu und ist bei Männchen deutlicher ausgeprägt als bei Weibchen (Abb. 6). So ist im Alter von 21 Tagen das relative

Nierengewicht der *Gcdh*-defizienten Männchen um 7 Prozent und im Alter von 42 Tagen um 10 Prozent größer als das der gleichgeschlechtlichen Wildtyp-Kontrollen. Die 100 Tage alten männlichen *Gcdh*-defizienten Mäuse zeigen eine hochsignifikante Erhöhung des relativen Nierengewichts um 13 Prozent in Bezug auf das der entsprechenden Wildtyp-Tiere. Bei weiblichen *Gcdh*-defizienten Mäusen ist im Alter von 21 Tagen noch kein Unterschied im relativen Nierengewicht festzustellen, das aber im Alter von 42 und 100 Tagen etwa 9 Prozent über dem der entsprechenden Wildtyp-Tiere liegt.



**Abb. 6: Differenzen im Nierengewicht *Gcdh*-defizienter und Wildtyp-Mäuse**

In der graphischen Darstellung wurde das Nierengewicht auf das Körpergewicht der Maus bezogen. Das relative Nierengewicht *Gcdh*-defizienter Mäuse (-/-) ist größer als das der Wildtyp-Mäuse (+/+) gleichen Alters und Geschlechts. Diese Gewichts-differenz ist mit zunehmendem Alter stärker ausgeprägt und erreicht bei Männchen ein größeres Ausmaß als bei Weibchen. Die Angaben sind Mittelwerte  $\pm$ SD (n $\approx$ 8), \*\*\* = p < 0,0005.

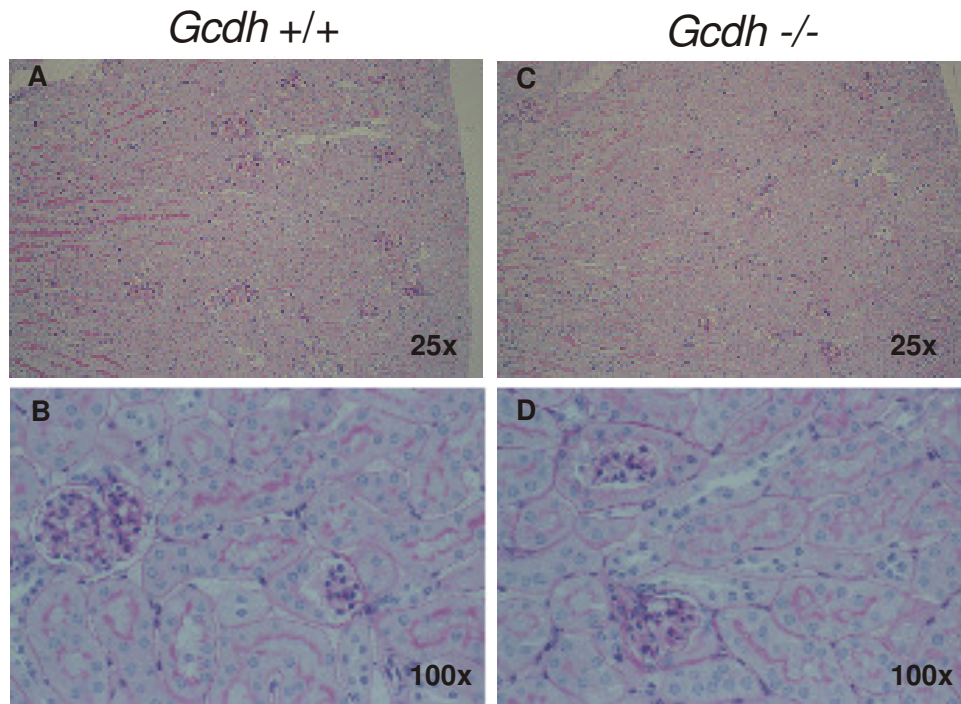
#### 4.1.2 Histologische Untersuchungen

Es wurden Paraffinschnitte von in Formalin fixierten Nieren 100 Tage alter männlicher *Gcdh*-defizienter Mäuse und den entsprechenden Kontroll-Tieren angefertigt und Hämatoxylin-Eosin gefärbt, um zu untersuchen, ob ein morphologisches Korrelat der makroskopischen Nierenhypertrophie zu Grunde liegt.

In den histologischen Analysen konnten keine für die *Gcdh*-defizienten Tiere spezifischen Auffälligkeiten gefunden werden. Die Glomerula zeigen lichtmikroskopisch keine Defekte, sind in ihrer Anzahl unauffällig und normotroph. Auch die Tubuli weisen keine Defekte auf. Die Tubuluszellen sind ebenfalls



normotroph. Es finden sich keine Anzeichen für Extravasationen oder andere pathologische Befunde des Extrazellulärraums oder der Gefäße (Abb. 7).



**Abb. 7: Histologie der Nieren**

In der Übersichtsvergrößerung finden sich am Nierenparenchym der männlichen *Gcdh*-defizienten Mäuse (-/-) (C) im Vergleich mit den Wildtyp-Tieren (+/+) (A) keine pathologischen Befunde. Bei stärkerer Vergrößerung erweisen sich sowohl Glomerula und Tubuli als auch der Extrazellulärraum als unauffällig (D, B). (Prof. Helmchen, Hamburg; Prof. Lüllmann-Rauch, Kiel)

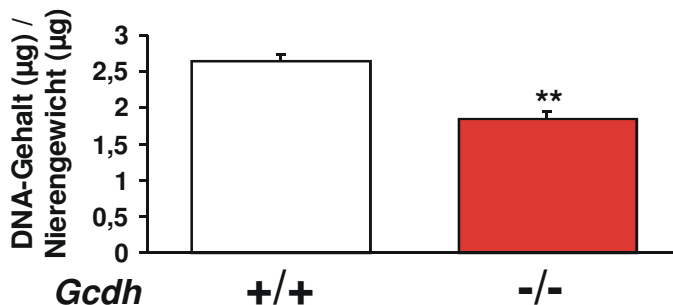
### 4.1.3 Volumenzunahme des Extrazellulärraums

Durch die Nierenhistologie konnte eine Zellhypertrophie ausgeschlossen werden, Rückschlüsse auf eine potentielle Vermehrung der Zellzahl ließen sich nicht ziehen. Aufgrund der Entwässerung des Präparats im Rahmen der Aufarbeitung des Gewebes für die Mikroskopie entstehen Bedingungen, die eine Beurteilung des Extrazellulärraums nur eingeschränkt zulassen.

Zur Klärung, ob der Nierenvergrößerung eine Zellhyperplasie oder eine Volumenzunahme der extrazellulären Matrix zu Grunde liegt, wurde aus der Niere die gesamte DNA isoliert, photometrisch quantifiziert und anschließend auf das Nierengewicht bezogen. Bei einer Hyperplasie wäre bei den *Gcdh*-defizienten Mäusen ein erhöhter DNA-Gehalt der Nieren im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen zu erwarten. Eine Zellhypertrophie oder eine Vermehrung der extrazellulären Matrix würde mit einem geringeren DNA-Gehalt einhergehen. Die

Untersuchungen erfolgten an jeweils vier Nieren von *Gcdh*-defizienten und Wildtyp-Mäusen der Altersstufen 21 Tage, 42 Tage und 100 Tage.

Bei den *Gcdh*-defizienten Tieren zeigt sich eine Abnahme des DNA-Gehalts bezogen auf das Nierengewicht, die mit zunehmendem Alter der Tiere und bei männlichem Geschlecht ausgeprägter ist. So weisen 100 Tage alte Männchen nur 70 Prozent des DNA-Gehalts pro Nierengewicht ihrer genotypisch gesunden Artgenossen auf (Abb. 8). Da eine Zellhypertrophie bereits in der Histologie ausgeschlossen werden konnte, macht dies eine Volumenzunahme des Extrazellulärraums wahrscheinlich.



**Abb. 8: Verminderter DNA-Gehalt pro Nierengewicht**

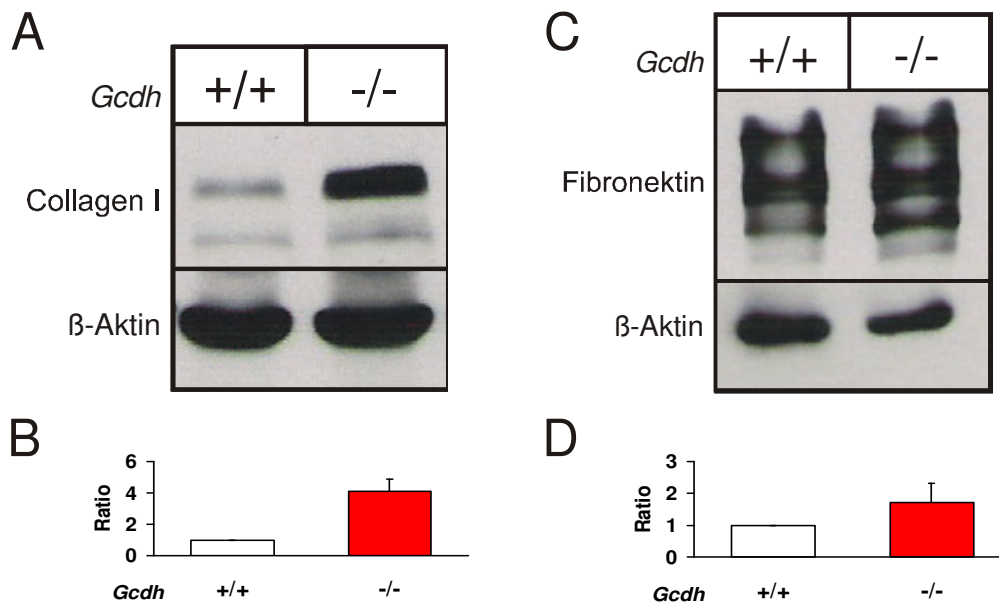
Im Alter von 100 Tagen ist bei *Gcdh*-defizienten Männchen (-/-) der DNA-Gehalt der Niere bezogen auf das Gesamtgewicht des Organs signifikant um etwa 30% im Vergleich zu der Wildtyp-Kontrolle (+/+) verringert. Die Angaben sind Mittelwerte  $\pm$ SD (n=4), \*\* =  $p < 0,005$ .

#### 4.1.4 Erhöhter Gehalt extrazellulärer Matrixproteine

Einer Volumenzunahme der extrazellulären Matrix liegt häufig ein erhöhter Gehalt an Matrixproteinen mit konsekutiv vermehrter Wassereinlagerung zu Grunde. Collagen I ist ein aus drei ca. 130 kD schweren Helices aufgebautes Protein, das als Hauptbestandteil der Fasern des Bindegewebes neben Faszien und Organkapseln auch das Stroma aller Gewebe organisiert. Fibronektin hat als dimeres Glycoprotein von 440 kD die Funktion, das Collagen der extrazellulären Matrix mit den Zellen zu vernetzen und so die Integrität des Gewebes sicherzustellen. Ob die Konzentrationen dieser Proteine bei der Nierenhypertrophie *Gcdh*-defizienter Mäuse verändert sind, sollte mittels Westernblot-Analysen untersucht werden. Hierzu wurde Gesamthomogenat aus Nieren 100 Tage alter Männchen untersucht.

Die Analysen zeigen, dass die Nieren *Gcdh*-defizienter Mäuse im Vergleich zu denen der Wildtyp-Tiere wesentlich reicher an Matrixproteinen sind. Die densitometrische Auswertung der Blots ergab, dass in den Nieren der *Gcdh*-

defizienten Tiere im Verhältnis zu denen der Wildtyp-Kontrollen etwa das Vierfache an Collagen I eingelagert wird und dass der Gehalt an Fibronektin um das 1,7-fache erhöht ist (Abb. 9). Als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung des Gels mit äquivalenten Proteinmengen wurde  $\beta$ -Aktin (42 kD) auf der gleichen Blotmembran detektiert und mit in die densitometrische Auswertung einbezogen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine pathologische Anhäufung bindegewebiger Fasern mit der Hypertrophie der Nieren *Gcdh*-defizienter Mäuse assoziiert ist. Durch welchen Stimulus diese fibröse Reaktion induziert wird, ist bislang unbekannt.



**Abb. 9: Erhöhter Gehalt extrazellulärer Matrixproteine**

Im Westernblot zeigt sich ein erhöhter Gehalt der Proteine Collagen I (A) und Fibronektin (C) in den Nieren *Gcdh*-defizienter Mäuse im Vergleich zu denen der Wildtyp-Tiere. Die densitometrische Quantifizierung ergibt eine relative Zunahme von Collagen I um den Faktor 4 (B) und von Fibronektin um den Faktor 1,7 (D). Die Angaben sind Mittelwerte  $\pm$ SD (n=2).

## 4.2 Renale Genexpression bei *Gcdh*-Defizienz

Die Untersuchungen zu Veränderungen in der Nierenmorphologie bei der *Gcdh*-defizienten Maus lassen vermuten, dass bei der Glutarazidurie Typ 1 neben spongiösen Veränderungen im Hirn und vaskulären Schädigungen auch die Nieren in den pathologischen Prozess einbezogen sind. Zur näheren Klärung, welche Rolle die Niere als wichtiges Stoffwechsel- und Ausscheidungsorgan im

veränderten Metabolismus der *Gcdh*-Defizienz spielt, wurden DNA-Microarray-Analysen durchgeführt. Durch Quantifizierung der Menge spezifischer mRNAs über den Weg der reversen Transkription zu cDNA und anschließender Hybridisierung auf einem Gen-Chip, lassen sich, bei Bezug eines kranken Tieres auf ein Kontroll-Tier, Aussagen über die Genexpression unter pathologischen Bedingungen treffen. Von diesen Analysen wurden außerdem Aussagen über verändert regulierte Transportergenexpressionen erwartet, die mögliche Hinweise auf bisher nicht bekannte Transportproteine geben, die am Transfer von 3-OHGA und GA über Membranen der Nierentubuluszellen beteiligt sind.

### 4.2.1 DNA-Microarray-Analysen

Für die DNA-Microarray-Analysen wurde mRNA aus Nieren jeweils eines 42 Tage und eines 100 Tage alten Paares männlicher *Gcdh*-defizienter und gleichgeschlechtlicher Kontroll-Mäuse eingesetzt.

Unter 15.000 Genen fanden sich bei der jüngeren *Gcdh*-defizienten Maus etwa 275 Gene herauf- und 600 Gene herunterreguliert. Bei dem älteren Tier wurden 300 Gene erhöht und 200 Gene erniedrigt gefunden. Bei der Auswertung der DNA-Microarray-Analysen wurde ein Schwerpunkt auf die Genexpressionsveränderungen der Niere der 42 Tage alten *Gcdh*-defizienten Maus gelegt, da in dieser Alterstufe die Nierenhypertrophie noch nicht vollständig ausgeprägt ist und somit Aufschlüsse über assoziierte Prozesse hier eher zu erwarten sind als bei dem 100 Tage alten Tier. Ausgehend von dem Datensatz der 42 Tage alten Tiere wurden die in ihrer Regulation veränderten Gene nach ihren Funktionen in die Gruppen Metabolismus, Transporter und Kanäle, Rezeptoren, Zytoskelett, Signaltransduktion, Zellzyklus und Transkription, Chaperone und Expressed sequence tags eingeteilt (Tab. 4). Als Grenzwert wurde eine 1,4-fache Herauf- bzw. Herunterregulation für Transportergene der *Slc*-Serie und eine Zweifache für alle übrigen Gene gesetzt. Neben den gelisteten Daten der Altersstufe 42 Tage ist bei gleichzeitiger Alteration der Genexpression bei der 100 Tage alten Maus dies entsprechend gekennzeichnet.

## Ergebnisse

**Tab. 4: Veränderungen der renalen Genexpression bei *Gcdh*-Defizienz**

Expression herauf- bzw. herunterregulierter Gene bei der 42 Tage alten *Gcdh*-defizienten Maus in Relation zum Wildtyp-Tier.

Funktion	Nr.	Gen Symbol	Gen Name	Relative Expression (-/-) / (+/+)
Metabolismus	1	Cyp24a1	Cytochrom P450, 24a1	7,0 ↑
	2	Gpc1	Glypican 1	4,0 ↑ 2,6 ↑
	3	Odc1	Ornithin-Decarboxylase	2,8 ↑
	4	Mogat2	Monoacylglycerol O-Acyltransferase 2	2,6 ↑
	5	Dhrs8	Dehydrogenase/Reduktase (SDR Familie) 8	2,6 ↑
	6	Pla2g2d	Phospholipase A2, Gruppe IID	2,5 ↑
	7	Aacs	Acetoacetyl-CoA Synthetase	2,5 ↑ 2,3 ↑
	8	Pck1	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase 1, zytosolisch	2,3 ↑
	9	Upp2	Uridin-Phosphorylase 2	2,3 ↑
	10	Ugt2b5	UDP-glucuronosyltransferase 2b5	2,3 ↑ 16 ↑
	11	Car4	Carboanhydrase 4	2,1 ↑
	12	Sah	SA Ratte Hypertension-assoziiertes Protein	2,1 ↑
	13	Tmlhe	Trimethyllysin-Hydroxylase, epsilon	2,1 ↑
	14	Ace	Angiotensin converting enzyme (ACE)	2,1 ↑
	15	Alas1	Aminolävulinsäure-Synthetase 1	1,9 ↑ 2,6 ↑
	16	Atp11a	ATPase, Klasse VI, Typ 11A	1,9 ↑
	17	Ren1	Renin 1	1,9 ↑
	18	Hebp1	Häm-bindendes Protein 1	2,0 ↓
	19	Acaa2	Acetyl-Coenzyme A Acyltransferase 2	2,0 ↓
	20	Agt	Angiotensinogen	2,0 ↓
	21	Mgst1	Mikrosomale Glutathion S-Transferase 1	2,5 ↓
	22	Cte1	zytosolische Acyl-CoA Thioesterase 1	2,5 ↓
	23	Scd2	Stearoyl-Coenzyme A Desaturase 2	2,5 ↓
	24	Sc4mol	Sterol-C4-methyl Oxidase-ähnlich	2,5 ↓
	25	Arg2	Arginase type II	2,5 ↓
	26	Folh1	Folat Hydrolase	2,5 ↓
	27	Psat1	Phosphoserin-Aminotransferase 1	2,5 ↓
	28	Rdh11	Retinol Dehydrogenase 11	3,4 ↓
	29	Phgdh	3-phosphoglycerat Dehydrogenase	3,4 ↓
	30	Star	steroidabhängig akut reguliertes Protein	4,0 ↓
	31	Dhcr7	7-dehydrocholesterol Reduktase	4,5 ↓
	32	Serpina1b	Serin-Proteinase-Inhibitor A, Mitglied 1b	5,0 ↓
	33	Lzp-s	P Lysozyme	7,7 ↓
	34	Hsd3b1	Hydroxysteroid-Dehydrogenase 1, d5,3β	13 ↓
	35	Hmgcs2	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A Synthase 2	25 ↓
	36	Gcdh	Glutaryl-Coenzyme A Dehydrogenase	100 ↓
	37	Serpina1a	Serin-Proteinase-Inhibitor A, Mitglied 1a	500 ↓
Transporter und Kanäle	38	Slc25a25	Mitochondrialer Transporter 25	4,0 ↑
	39	Slc21a1	Organische Anionen Transporter 1a1	4,0 ↑
	40	Ttpa	Tocopherol (alpha) Transfer Protein	2,8 ↑
	41	Slc41a2	Magnesium Transporter 2	2,6 ↑
	42	Slc7a11	Kationische Aminosäuren Transporter,y+ Syst., 11	2,6 ↑
	43	Slc22a7	Organische Anionen Transporter 7	1,7 ↑
	44	Slc16a4	Monocarboxylsäure Transporter 4	1,7 ↑
	45	Slc21a13	Organische Anionen Transporter 1a6	1,7 ↑
	46	Slc13a3	Natrium-abhängiger Dicarboxylat Transporter 3	1,7 ↑
	47	Slc12a6	Kationen/Chlorid Kotransporter 6	1,6 ↑ 1,6 ↑
	48	Slc7a13	Kationische Aminosäuren Transporter,y+ Syst., 13	1,6 ↑
	49	Slc13a2	Natrium-abhängiger Dicarboxylat Transporter 1	1,6 ↑
	50	Slc39a14	Zink Transporter 14	1,5 ↑ 1,4 ↑
	51	Slc22a19	Organische Anionen Transporter 19	1,5 ↑
	52	Slc5a8	Natrium/Glucose Kotransporter 8	1,4 ↑
	53	Slc22a2	Organische Kationen Transporter 2	1,4 ↑
	54	Slc17a3	Vesikulärer Glutamat Transporter3	1,4 ↑
	55	Slc4a2	Bicarbonat Transporter 2	1,4 ↓
	56	Slc5a2	Natrium/Glucose Kotransporter 2	1,4 ↓
	57	Slc1a1	Glutamat Transporter 1	1,4 ↓

## Ergebnisse

	58	Slc26a4	Multifunktionaler Anionen Austauscher 4	1,6 ↓
	59	Slc4a1	Bicarbonat Transporter 1	1,6 ↓
	60	Slc16a7	Monocarboxylsäure Transporter 7	1,6 ↓
	61	Slc29a3	Nucleosid Transporter 3	1,6 ↓ 1,4 ↓
	62	Slc16a1	Monocarboxylsäure Transporter 1	1,8 ↓
	63	Slc7a8	Kationische Aminosäuren Transporter, y+ Syst., 8	1,9 ↓
	64	Slc2a1	Facilitated glucose transporter 1	1,9 ↓
	65	<b>Aqp2</b>	<b>Aquaporin 2</b>	<b>2,1 ↓</b>
	66	Slc14a2	Harnstoff Transporter 2	2,3 ↓ 1,6 ↓
	67	<b>Aqp4</b>	<b>Aquaporin 4</b>	<b>5,0 ↓</b>
	68	Clic3	Intrazellulärer Chlorid Kanal 3	6,3 ↓
Rezeptoren	69	<b>Avpr2</b>	<b>Arginin-Vasopressin Rezeptor 2</b>	<b>1,5 ↓</b>
	70	Igfbp1	Insulin-like growth factor binding protein 1	2,1 ↓
	71	Fabp7	Fettsäure bindendes Protein 7	2,6 ↓
	72	Mup1 / 2	Major urinary protein 1 / major urinary protein 2	7,7 ↓
	73	Abcb1b	ATP-binding cassette, B (MDR/TAP), 1B	14 ↓
Zytoskelett	74	Cml5	Camello-like5	3,2 ↑
	75	Cd36	CD36 Antigen	2,8 ↑
	76	Myo5a	Myosin Va	2,1 ↑
	77	Cml3	Camello-like 3	1,9 ↑
	78	Eva1	Epitheliales V-like Antigen 1	2,1 ↓
	79	Ceacam2	CEA-related cell adhesion molecule 2	2,3 ↓ 1,6 ↓
	80	Itgb6	Integrin beta 6	2,4 ↓
	81	Camk2d	Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II d	6,3 ↓
	82	Lamb2	Laminin, beta 2	6,7 ↓
	83	Spon1	Spondin 1	8,3 ↓
Signaltrans- duktion	84	Frzb	Frizzled-related protein	2,1 ↑
	85	Rgl1	Ral guaninenucleotide dissociation stimulator-like 1	2,0 ↑
	86	Rtkn	Rhotekin	2,0 ↑
Zellzyklus und Transkription	87	Ankrd6	Ankyrin repeat domain 6	8,6 ↑
	88	Cidea	Cell death-inducing DNA fragmentation factor, a, A	3,3 ↑
	89	Socs2	Suppressor of cytokine signaling 2	2,3 ↑ 5,3 ↑
	90	Dsip1	Delta sleep inducing peptide	2,3 ↑
	91	Polk	Polymerase kappa	2,3 ↑
	92	Idb1	DNA-bindungs-Inhibitor 1	1,9 ↑
	93	Hdac11	Histon Deacetylase 11	2,3 ↓
	94	Anapc4	Anaphase promoting complex subunit 4	2,4 ↓
	95	Mdk	Midkin	3,0 ↓ 1,8 ↓
	96	Cdkn1c	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (P57)	10 ↓
Chaperone	97	Dnaja4	DnaJ (Hsp40) Homolog, A 4	3,5 ↑ 2,5 ↑
	98	Dnajb1	DnaJ (Hsp40) Homolog, B 1	2,8 ↑ 2,6 ↑
	99	Hspa1b	Hitzeschockprotein 1B	2,5 ↑ 2,6 ↑
	100	Hspa1a	Hitzeschockprotein 1A	2,1 ↑ 4,0 ↑
	101	Dnaja1	DnaJ (Hsp40) Homolog, A 1	1,9 ↑
	102	Dnajb4	DnaJ (Hsp40) Homolog, B 4	1,9 ↑
	103	Hsp105	Hitzeschockprotein 105	1,9 ↑
Expressed sequence tags	104	C730048C13Rik	RIKEN cDNA C730048C13 gene	2,0 ↑
	105	Rlf	rearranged L-myc fusion sequence	2,0 ↑
	106	1300002F13Rik	RIKEN cDNA 1300002F13 gene	2,0 ↑
	107	D6Ertd253e	DNA segment, Chr 6, ERATO Doi 253, expressed	1,9 ↑
	108	LOC224833	hypothetical protein BC006605, expressed	2,1 ↓
	109	Dock9	dedicator of cytokinesis 9	2,3 ↓
	110	AI114950	expressed sequence AI114950	3,4 ↓
	111	AI788959	expressed sequence AI788959	20 ↓

Eine vermehrte Genexpression ist mit „↑“ gekennzeichnet, eine verminderte mit „↓“. Gene, deren Expressionsveränderung durch Realtime-PCR verifiziert wurde, sind in **rot** aufgezeigt. Gene, deren Expression auch im Array der 100 Tage alten Maus verändert ist, sind in **grün** mit dem entsprechenden Wert gekennzeichnet.

In der **Metabolismus**-Rubrik fällt zunächst eine Gruppe von Genen auf, deren Genprodukte an der Blutdruckregulation beteiligt sind. So werden das Hypertonus-assoziierte SA-Protein der Ratte sowie Angiotensin Converting Enzyme (ACE) und Renin, die beide an der Biosynthese des Vasokonstriktors Angiotensin II beteiligt sind, verstärkt exprimiert (Tab. 4; Nr. 14, 17). Dessen Vorstufe Angiotensinogen ist dagegen herunterreguliert (Tab. 4; Nr. 20). Desweiteren sind in dieser Rubrik Gene zu finden, deren Genprodukte in Synthese und Abbau von Häm involviert sind. Dazu gehören die UDP-Glucuronosyltransferase 2b5, die Aminolävulinsäure-Synthase 1 und das Häm-bindende Protein (Tab. 4; Nr. 10, 15, 18). Die Ornithin-Decarboxylase, ein Schlüsselenzym der Polyamin-Biosynthese, der eine Beteiligung an der Pathogenese der diabetischen Nierenhypertrophie zugesprochen wird (Deng et al. 2003), ist ebenfalls heraufreguliert (Tab. 4; Nr. 3). Überaus gering exprimiert werden dagegen die mRNAs der Serin-Protease-Inhibitoren Serpina1a und Serpina1b sowie erwartungsgemäß die mRNA der Gcdh (Tab. 4; Nr. 32, 37, 36).

Innerhalb der **Transporter**-Rubrik findet sich eine Reihe verstärkt exprimierter Gene, deren Proteine potentielle Kandidaten für den Transport von 3-OHGA und GA über Zellmembranen sind. Dazu gehören die Natrium-abhängigen Dicarboxylat Transporter NaDC1 und NaDC3, die Organische Anionen Transporter OATP1, OATP1a6 und OAT2 sowie der Organische Kationen Transporter OCT2 (Tab. 4; Nr. 49, 46, 39, 45, 43, 53). Unter den Transportern sind die Wasserkanäle Aquaporin 2 und Aquaporin 4 sowie der Harnstofftransporter Typ 2 herunterreguliert (Tab. 4; Nr. 65, 67, 66).

Unter den übrigen Genen fallen das Zelladhäsionsprotein Ceacam2, das vermindert exprimiert wird, sowie eine Anzahl molekularer Chaperone auf, deren vermehrte Expression auch bei der 100 Tage alten Maus gefunden wurde (Tab. 4; Nr. 79, 97-100).

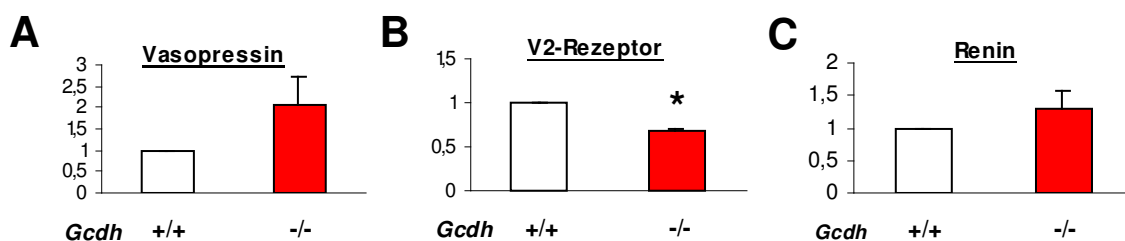
### 4.2.2 Blutdruckregulation und Wasserhomöostase

In einer DNA-Microarray-Analyse zur Genexpression im Hirnstamm einer 42 Tage alten *Gcdh*-defizienten Maus wurde eine um das 14-fache erhöhte Expression der Vasopressin-mRNA gefunden (Dissertation Nicola Ott, 2005). Vasopressin ist ein im Hypothalamus gebildetes Peptidhormon, das bei zunehmender



Plasmaosmolalität durch die Neurohypophyse freigesetzt wird und über  $V_1$ -Rezeptoren der Gefäßmuskulatur vasokonstriktorisch wirkt. Am Sammelrohr der Niere bewirkt es über  $V_2$ -Rezeptoren einen cAMP-vermittelten luminalen Einbau der Wasserkanäle Aquaporin 2 und damit eine gesteigerte Wasserrückresorption und konsekutiv eine Erhöhung des Blutdrucks. Dazu passt die renal erhöhte Expression der Effektoren Renin und ACE, die an der Prozessierung von Angiotensinogen zu Angiotensin II, einem Hormon, das stark vasokonstriktorisch wirkt und die Ausschüttung von Aldosteron stimuliert, beteiligt sind.

Ob diese Gene der Blutdruckregulation und Wasserhomöostase tatsächlich in ihrer Expression bei der *Gcdh*-defizienten Maus verändert sind, sollte mittels Realtime-PCR überprüft werden. Es wurden drei männliche Paare, jeweils bestehend aus einer *Gcdh*-defizienten- und einer Wildtyp-Maus der Altersstufe 42 Tage, untersucht. Durch die PCR konnte die im Array gefundene gesteigerte Expression des Vasopressins bestätigt werden. Es fand sich allerdings lediglich eine zweifache Heraufregulation des Gens im Hirnstamm der *Gcdh*-defizienten Maus (Abb. 10 A). Die Expression des  $V_2$ -Rezeptors, über den Vasopressin seine Wirkung an der Niere entfaltet, ist sowohl im Array als auch in der Realtime-PCR signifikant um das 1,5-fache erniedrigt (Tab. 4; Nr. 69, Abb. 10 B). Eine verminderte Expression der Wasserkanäle Aquaporin 2 und Aquaporin 4 konnte nicht bestätigt werden. Für die Menge der Renin-mRNA in der Niere der *Gcdh*-defizienten Maus wurde mittels Realtime-PCR eine Erhöhung um das 1,6-fache bestimmt (Abb. 10 C).



**Abb. 10: Relative Veränderung der Genexpression blutdruckregulierender Effektoren**

Die y-Achse gibt die relative Expression des betreffenden Gens der *Gcdh*-defizienten Maus (-/-) in Bezug auf das Wildtyp-Tier (+/+) an. Es findet sich doppelt so viel Vasopressin-mRNA im Hirnstamm (A). Die Expression des  $V_2$ -Rezeptors in der Niere ist um 30% erniedrigt (B). Renin ist in der Niere um den Faktor 1,6 heraufreguliert (C). Die Angaben sind Mittelwerte  $\pm$ SD (n=3), \* = p < 0,05.

Das zweite proteolytische Enzym der Angiotensin II-Synthese, ACE, unterliegt in seiner Expression großen Schwankungen, sodass die PCR-Analysen hier keine



Aussagen über Regulationsveränderungen bei der *Gcdh*-defizienten Maus zulassen. Angiotensinogen, die Vorstufe des Angiotensin II, erwies sich in der PCR, im Gegensatz zu der erniedrigten Expression im Array (Tab. 4; Nr. 20), als nicht verändert.

### 4.2.3 Expression der Ornithin-Decarboxylase

Im DNA-Microarray imponiert unter anderem eine gesteigerte Expression des Gens der Ornithin-Decarboxylase (ODC) bei der *Gcdh*-defizienten Maus (Tab. 4; Nr. 3). Es ist beschrieben, dass eine Erhöhung dieses Enzyms in der Niere an der Pathogenese der diabetischen Nierenhypertrophie beteiligt ist (Deng et al. 2003). Mittels Realtime-PCR-Analysen wurde die Expression der ODC in Nieren von 21, 42 und 100 Tage alten Mäusen quantifiziert. Eine Heraufregulation dieses Gens konnte für keine der untersuchten Altersstufen bestätigt werden.

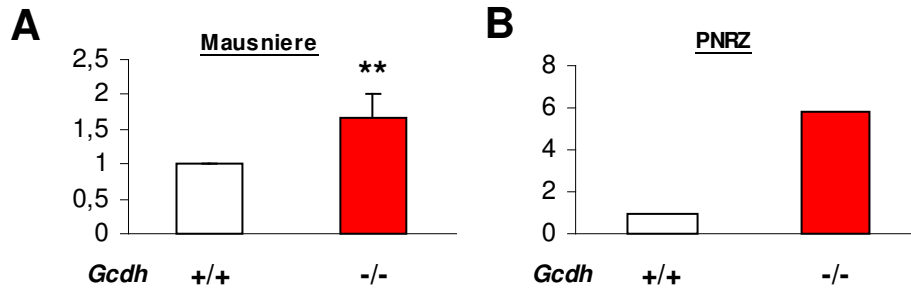
### 4.2.4 Expression und Funktion spezifischer Transporter bei *Gcdh*-Defizienz

Ausgehend von der im DNA-Microarray gefundenen erhöhten Expression des Organische Kationen Transporters Typ 2 (OCT2, *Slc22a2*) und des Natrium-abhängigen Dicarboxylat Transporters Typ 1 und Typ 3 (NaDC1, *Slc13a2*; NaDC3, *Slc13a3*) in den Nieren *Gcdh*-defizienter Mäuse, wurde die Expression und die Funktion dieser Transporter näher untersucht.

#### 4.2.4.1 Organische Kationen Transporter Typ 2

Der Organische Kationen Transporter Typ 2 (OCT2) gilt auf Grund seiner breiten Substratakzeptanz, die neben organischen Kationen auch Anionen mit einschließt, und wegen seiner Verbreitung im Organismus, die zwar ubiquitär ist, aber vorrangig Niere, Leber, Darm und Neurone betrifft, als potentieller Transporter für den GA-1-spezifischen Metaboliten 3-OHGA sowie für GA.

Im DNA-Microarray der 42 Tage alten *Gcdh*-defizienten Maus ist OCT2 in der Niere um den Faktor 1,4 heraufreguliert (Tab. 4; Nr. 53). Diese erhöhte Genexpression konnte mittels Realtime-PCR bestätigt werden. Hier fand sich eine Heraufregulation um den Faktor 1,7 (Abb. 11 A).

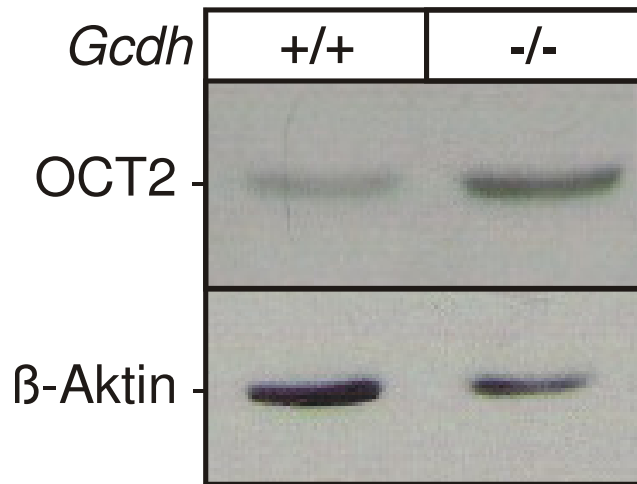


**Abb. 11: Gesteigerte renale Genexpression von OCT2 *in vivo* und *in vitro***

Die y-Achse gibt die relative Expression von OCT2 bei *Gcdh*-Defizienz (-/-) in Bezug auf die entsprechenden Kontrollen (+/+) an. In der Niere ist der Transporter um den Faktor 1,7 heraufreguliert (A). In kultivierten Nierenzellen wurde eine 6-fache Erhöhung der Expression von OCT2 nachgewiesen (B). Die Angaben sind Mittelwerte  $\pm$ SD (A: n=5, B: n=1), \*\* =  $p < 0,005$ .

Zur Klärung, ob diese vermehrte Expression einer übergeordneten, beispielsweise hormonellen, Steuerung unterliegt oder ob sie durch das para- und intrazelluläre Milieu bedingt ist, sollte die OCT2-mRNA-Menge *in vitro* quantifiziert werden. In einem Pilotexperiment wurden aus Nieren von *Gcdh*-defizienten und Kontrollmäusen Rindenzellen isoliert und kultiviert. Aus den primären Nierenrindenzellen (PNRZ) wurde RNA isoliert und diese für die Realtime-PCR eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass die Zellen mit Defizienz des *Gcdh*-Gens etwa sechsfach mehr OCT2-mRNA exprimieren als die Kontrollzellen (Abb. 11 B). Zur Validierung des Ergebnisses ist eine höhere Zahl an Experimenten erforderlich.

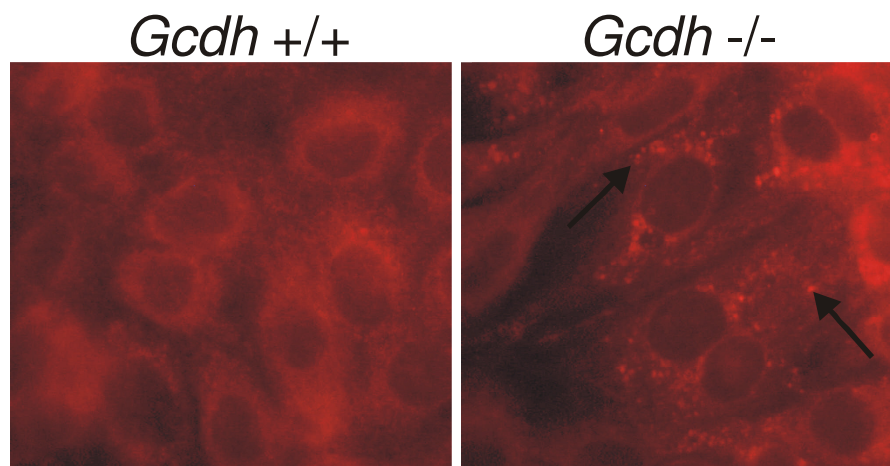
Nachdem die vermehrte Expression von OCT2 auf mRNA-Ebene bestätigt werden konnte, sollte durch proteinbiochemische Analysen untersucht werden, ob diese Expressionssteigerung tatsächlich in einer erhöhten Anzahl der Transporter resultiert. Für die hierzu verwendeten Westernblot-Analysen wurden aus den Nieren Membranfraktionen isoliert, die extrahierten Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und der Transporter durch OCT2-spezifische Antikörper detektiert. Die Analysen wurden an zwei 100 Tage alten männlichen Paaren, bestehend aus *Gcdh*-defizienter und Wildtyp-Maus, durchgeführt. Die Konzentration von OCT2 bei 42 Tage alten Tieren war zu gering, als dass sie im Westernblot detektiert werden konnte. Die Analysen zeigten, dass OCT2 bei 100 Tage alten *Gcdh*-defizienten Mäusen in der Niere erhöht ist (Abb. 12). Die densitometrische Auswertung der OCT2-Bande in Bezug auf den  $\beta$ -Aktin-Gehalt ergab eine Erhöhung des Transporters in der Niere des *Gcdh*-defizienten Tieres um den Faktor 3,8.



**Abb. 12: Vermehrter Nachweis von OCT2 im Westernblot**

Die linke Spur zeigt die Menge an OCT2 in der Niere der Wildtyp-Maus (+/+), die rechte die des *Gcdh*-defizienten Tiers (-/-). Bezogen auf die Menge an β-Aktin ergibt die densitometrische Auswertung eine 3,8-fache Erhöhung des Transporters.

Die Expression und zelluläre Lokalisation des OCT2 wurde anschließend durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie in kultivierten PNRZ untersucht. Während die Zellen aus Wildtyp-Tieren lediglich eine diffuse Fluoreszenz zeigen, finden sich bei den Zellen mit *Gcdh*-Defizienz zahlreiche OCT2-positive vesikuläre intrazelluläre Strukturen (Abb. 13). Eine Lokalisation des OCT2 an der Plasmamembran konnte unter diesen Bedingungen nicht nachgewiesen werden, da der verwendete Antikörper intrazelluläre, cytoplasmatische Peptidsequenzen erkennt.

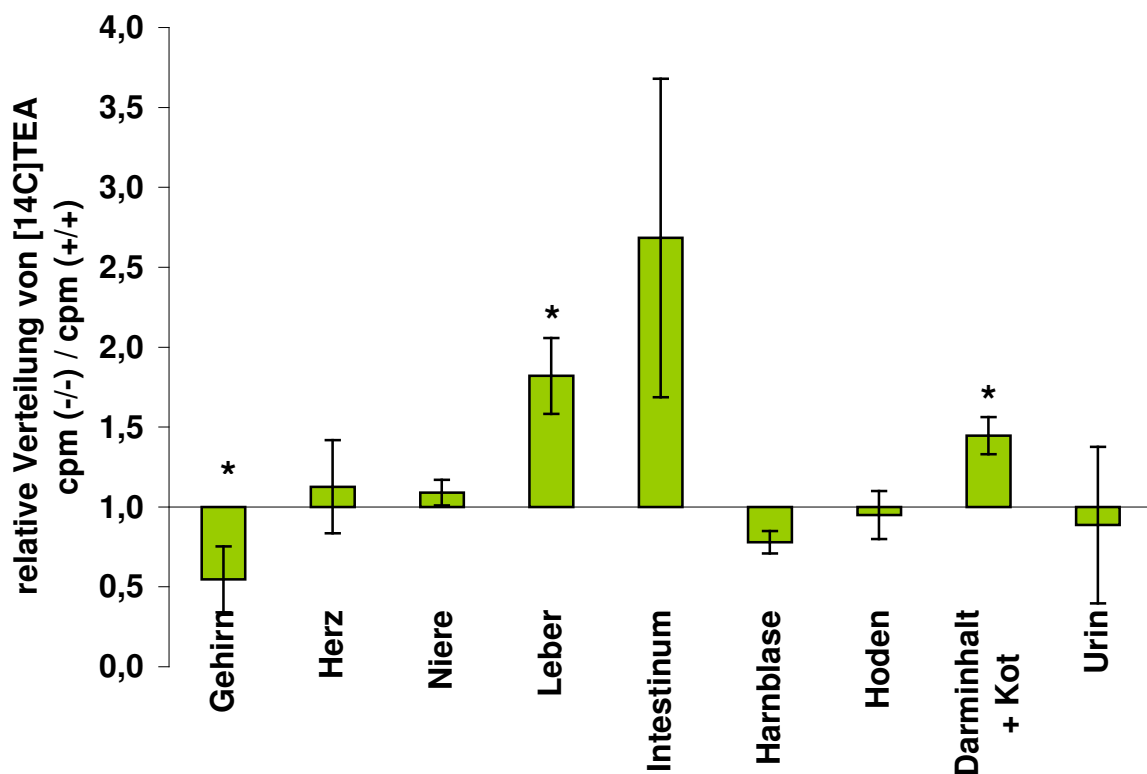


**Abb. 13: Immunfluoreszenz-mikroskopischer Nachweis von OCT2 in primären Nierenrindenzellen**

Nierenrindenzellen wurden aus *Gcdh*-defizienten (-/-) und Wildtyp- (+/+) Mäusen isoliert und für fünf Tage auf Deckgläschen kultiviert. Nach Fixierung und Permeabilisierung in Triton X-100 wurden die Zellen mit anti-OCT2 Antikörper (1:200) und mit Texas-rot markiertem sekundärem Antikörper (1:400) inkubiert. Die Pfeile weisen auf OCT2-positive intrazelluläre Granula der PNRZ mit *Gcdh*-Defizienz hin.

Durch eine funktionelle *in vivo* Untersuchung des OCT2 sollte festgestellt werden, welche Relevanz die vermehrte Expression des Transporters in der Niere *Gcdh*-

defizienter Mäuse hat und ob eine veränderte Expression des OCT2 auch andere Organe betrifft. Hierfür wurde ein [<sup>14</sup>C]TEA-Verteilungsassay an drei Paaren 70 Tage alter, männlicher Mäuse durchgeführt. Den Mäusen wurde das radioaktiv markierte Modell-Kation [<sup>14</sup>C]TEA i.v. injiziert. Nach 20 Minuten wurden die Tiere getötet und die Verteilung des radioaktiven Tracers in verschiedenen Organen und Exkrementen durch Messung der Radioaktivität bestimmt. In Organen, in denen die OCT2-Expression gesteigert ist und der Transport des Substrats aus dem Extrazellulärraum in die Zelle erfolgt, ist bei *Gcdh*-defizienten Tieren eine erhöhte Menge an Radioaktivität zu erwarten. Bei Organen mit verminderter Anzahl oder Aktivität von OCT2-Transportern oder bei einem zellauswärts gerichteten Fluss der Kationen, ist von einer geringeren Menge an Radioaktivität auszugehen. Die Versuche zeigten eine signifikant erhöhte Konzentration von [<sup>14</sup>C]TEA in der Leber und im Intestinaltrakt *Gcdh*-defizienter Mäuse (Abb. 14). Passend dazu konnten im Darminhalt und im Kot ebenfalls erhöhte Mengen an [<sup>14</sup>C]TEA nachgewiesen werden. Signifikant erniedrigt ist die aufgenommene Menge des OCT2-Substrats [<sup>14</sup>C]TEA im Gehirn *Gcdh*-defizienter Tiere.

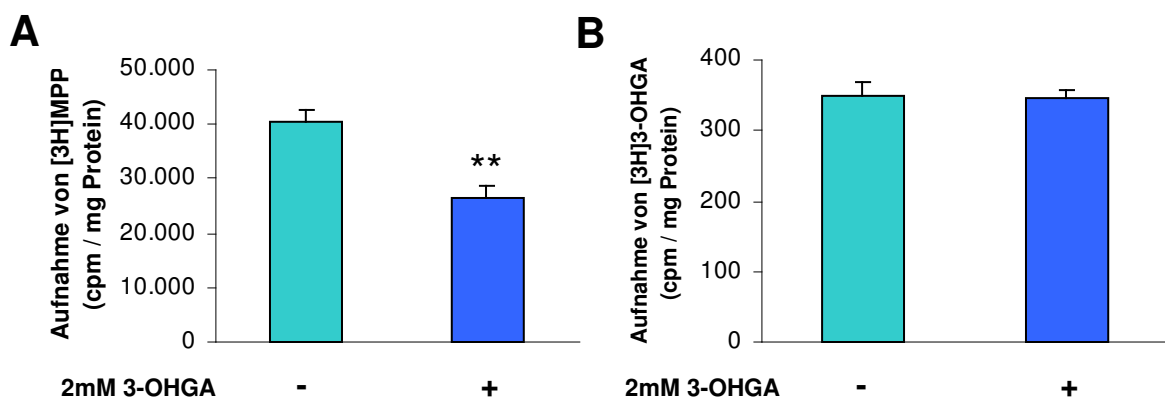


**Abb. 14: *In vivo* Verteilung von [<sup>14</sup>C]TEA in Organen und Exkrementen**

Männlichen *Gcdh*-defizienten und Kontroll-Mäusen (70 Tage alt) wurde [<sup>14</sup>C]TEA (1μCi) i.v. injiziert. Nach 20 min wurden die Tiere getötet, die Organe entnommen, Darminhalt, Kot und Urin gesammelt und die enthaltene Radioaktivität bestimmt. Die relative Verteilung der Radioaktivität in Organen und Exkrementen *Gcdh*-defizienter Tiere in Bezug zu der in Kontroll-Tieren ist dargestellt. Die Angaben sind Mittelwerte ±SD (n=3), \* = p < 0,05.

In den Nieren *Gcdh*-defizienter Tiere war die Menge gemessener [<sup>14</sup>C]-Radioaktivität nahezu gleich derer der Nieren von Wildtyp-Tieren. Auch die Ausscheidung des [<sup>14</sup>C]-Kations im Urin differiert nicht von derjenigen der Wildtyp-Tiere. In der entleerten Harnblase der *Gcdh*-defizienten Mäuse finden sich leicht erniedrigte Mengen an [<sup>14</sup>C]TEA. Unverändert ist dagegen die Einlagerung von [<sup>14</sup>C]TEA in Herz und Hoden.

Zur Untersuchung, ob 3-OHGA mit OCT2 interagiert, wurden in Kooperation mit Herrn Prof. H. Koepsell (Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Würzburg) *in vitro*-Experimente nach Standardprotokollen durchgeführt (Lips et al. 2005). In stabil hOCT2 exprimierenden CHO-Zellen wurde zunächst der Transport des Tritium-markierten Modellkations 1-Methyl-4-Phenylpyridinium ([<sup>3</sup>H]MPP) in An- und Abwesenheit von 3-OHGA gemessen. In Anwesenheit von 2mM 3-OHGA fand sich eine signifikant um 30 Prozent verringerte OCT2-vermittelte Aufnahme von [<sup>3</sup>H]MPP (Abb. 15 A). In einem zweiten experimentellen Ansatz wurde die Aufnahme von Tritium-markierter 3-OHGA in hOCT2 überexprimierende CHO-Zellen gemessen. Dieses Experiment erlaubt Aussagen darüber, ob 3-OHGA OCT2-abhängig transportiert wird. Es konnte keine relevante Aufnahme von [<sup>3</sup>H]3-OHGA in OCT2-überexprimierende CHO-Zellen festgestellt werden (Abb. 15 B). Da ein molarer Überschuss an nicht radioaktiv markierter 3-OHGA die zellassoziierte Menge an [<sup>3</sup>H]3-OHGA nicht beeinflusst, handelt es sich um unspezifisch aufgenommenes Material. Die Daten zeigen, dass OCT2 zwar 3-OHGA nicht direkt transportiert, aber in seiner Transportaktivität, z.B. für den Liganden MPP, durch das organische Anion gehemmt wird.



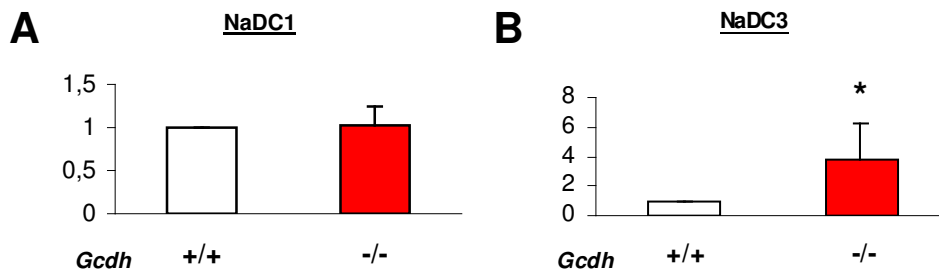
**Abb. 15: Interaktionen des organischen Anions 3-OHGA mit OCT2 *in vitro***

A, OCT2-überexprimierende CHO-Zellen wurden in Ab- (-) und Anwesenheit (+) von 2mM 3-OHGA für 1 sec mit 0.2µM [<sup>3</sup>H]MPP inkubiert. Die internalisierte Radioaktivität wurde gemessen und in Relation zur Proteinmenge der Zellen gesetzt. B, Unter gleichen Bedingungen wurde die Aufnahme von 0.2µM [<sup>3</sup>H]3-OHGA in OCT2-überexprimierende CHO-Zellen untersucht. Die Angaben sind Mittelwerte ±SD (n=3), \*\* = p < 0,005.

#### 4.2.4.2 Natrium-abhängige Dicarboxylat Transporter

Die Natrium-abhängigen Dicarboxylat Transporter NaDC1 und NaDC3 gelten wie OCT2 als potentielle Kandidaten für den Transport von 3-OHGA über die Zellmembran. Für GA konnte bereits nachgewiesen werden, dass NaDC3 ihren Transfer vermittelt (Burckhardt et al. 2005). In-situ-Hybridisierungen zeigten, dass beide Transporter vorrangig in Niere, Leber, Darm und Hirn exprimiert werden (Markovich et al. 2004). Die Substratspezifität für Dicarboxylate macht die Transporter NaDC1 und NaDC3 für die Translokierung der Dicarboxylate 3-OHGA und GA über Membranen interessant.

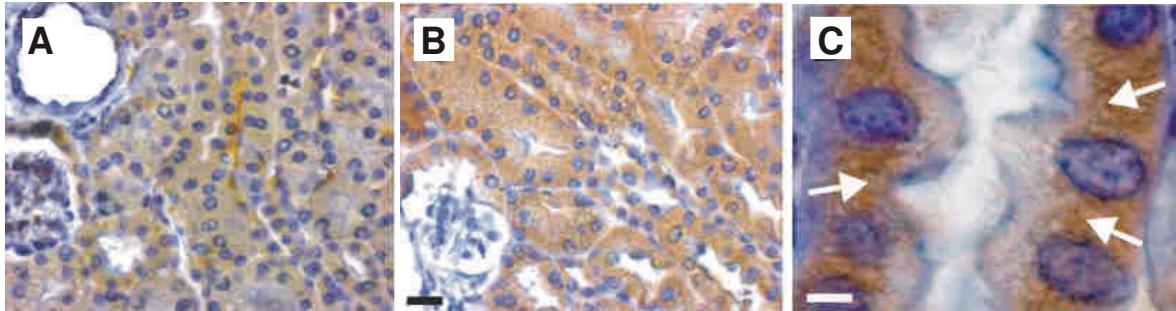
Im DNA-Microarray fand sich in der Niere der *Gcdh*-defizienten Maus eine Erhöhung der Genexpression von NaDC1 um den Faktor 1,6 und von NaDC3 um den Faktor 1,7 (Tab. 4; Nr. 49, 46). In der nachfolgenden Verifizierung mittels Realtime-PCR konnte eine erhöhte Konzentration von NaDC1-mRNA nicht bestätigt werden (Abb. 16 A). Dagegen konnte für NaDC3 in der PCR eine signifikante Erhöhung der Genexpression um das 3,8-fache ermittelt werden (Abb. 16 B).



**Abb. 16: Quantifizierung der mRNA-Konzentration der Dicarboxylat Transporter NaDC1 und NaDC3 in der Niere *Gcdh*-defizienter Mäuse**

Die y-Achse gibt die relative Expression von NaDC1 (A) und NaDC3 (B) bei männlichen 42 Tage alten *Gcdh*-defizienten Tieren (-/-) in Bezug auf entsprechende Wildtyp-Tiere (+/+) an. Die Angaben sind Mittelwerte  $\pm$ SD (n=3), \* =  $p < 0,05$ .

Da der Natrium-abhängige Dicarboxylat Transporter NaDC1 keine quantitativen Alterationen auf mRNA-Ebene zeigt, beschränkten sich proteinbiochemische Analysen auf den NaDC3. Der käuflich erworbene NaDC3-spezifische Antikörper zeigt im Westernblot keine Reaktion mit seinem 66 kDa schweren Target-Protein. In immunhistochemischen Untersuchungen an Paraffinschnitten Formalin-fixierter Nieren 42 Tage alter Mäuse konnte NaDC3 spezifisch an den Einfaltungen der basolateralen Tubulusmembran nachgewiesen werden (Abb. 17).



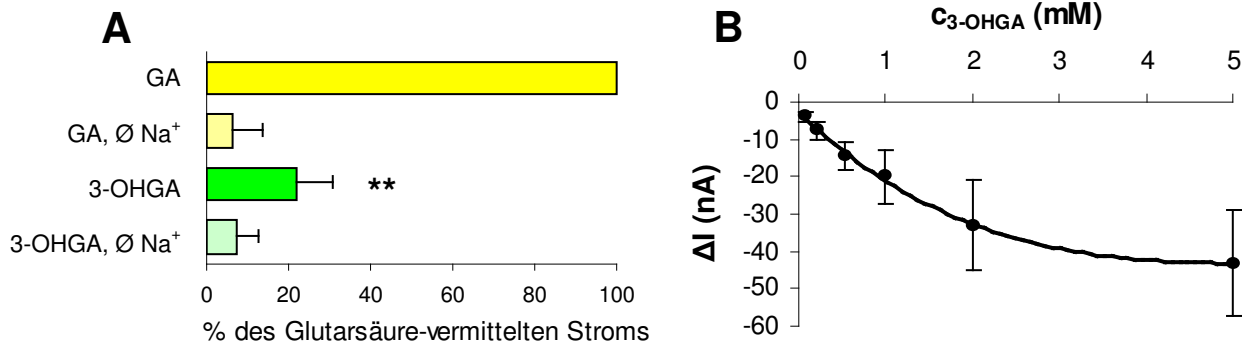
**Abb. 17: Immunhistochemischer Nachweis von NaDC3 in der Niere**

In Abwesenheit des NaDC3-spezifischen Primärantikörpers lässt sich an Nieren 42 Tage alter *Gcdh*-defizienter Mäuse keine Färbung erwirken (A). In Anwesenheit des Antikörpers zeigt sich eine deutliche Lokalisation von NaDC3 in den Einfaltungen der basolateralen Tubulusmembran als braune Anfärbung (Pfeile) (B,C). Der Balken entspricht 20 $\mu$ m (B) bzw. 5 $\mu$ m (C). (Prof. Glatzel, Hamburg)

Die Sensitivität der Färbung ist allerdings zu gering, als dass sich Aussagen über quantitative Unterschiede zwischen Wildtyp- und *Gcdh*-defizienten Mäusen treffen ließen.

In Kooperation mit Frau Dr. B. Burckhardt (Institut für Physiologie und Pathophysiologie, Universität Göttingen) wurden in funktionellen *in vitro*-Studien Interaktionen zwischen 3-OHGA und NaDC3 unter Standardbedingungen untersucht (Burckhardt et al. 2005). An hNaDC3-transfizierten Oozyten wurde mittels Zwei-Elektroden-Spannungs-Klemmtechnik der NaDC3-vermittelte Transport des Substrats GA und des potentiellen Substrats 3-OHGA über durch Natrium-Kotransport ausgelöste Potentialänderungen indirekt gemessen. Ausgehend von einem Potential von -60 mV wurde der Einwärtsstrom unter jeweils 1mM GA und unter 1mM 3-OHGA registriert. Während GA einen Einwärtsstrom von -80 nA induziert, ist der Strom unter 3-OHGA mit -13 nA um knapp 80 Prozent geringer (Abb. 18 A). Beide Ströme lassen sich durch Austausch des für NaDC3-vermittelten Transport essentiellen Natriums gegen N-methyl-D-Glucamin signifikant hemmen. Die Kinetik des NaDC3-abhängigen Transports von 3-OHGA wurde durch Messung des Einwärtsstroms unter zunehmenden Konzentrationen des Dicarboxylats untersucht. Eine Sättigung des Transports trat bei einer  $K_m$  von 0,954mM auf (Abb. 18 B). Die Daten zeigen, dass NaDC3 in der Lage ist, 3-OHGA direkt in Natrium-abhängiger Weise über Membranen zu transportieren.





**Abb. 18: NaDC3-vermittelter Transport von 3-OHGA**

An hNaDC3-exprimierenden Oozyten wurde die Sättigung des Transports bei einer Substratkonzentration von 1mM in An- und Abwesenheit von Natrium gemessen. Dargestellt sind der 3-OHGA induzierte Sättigungsstrom und die Kontrollströme im natriumfreien Medium (Ø Na<sup>+</sup>) als Prozente des GA-vermittelten Sättigungsstroms (A). Die Konzentrationsabhängigkeit des 3-OHGA-evozierten Stroms wurde sowohl mit auf- als auch mit absteigenden Konzentration des Dicarboxylats an hNaDC3-exprimierenden Oozyten untersucht (B). Die Angaben sind Mittelwerte ±SD (A: n=8, B: n=5). \*\* = p < 0,005.

### 4.3 Untersuchung der Nierenfunktion

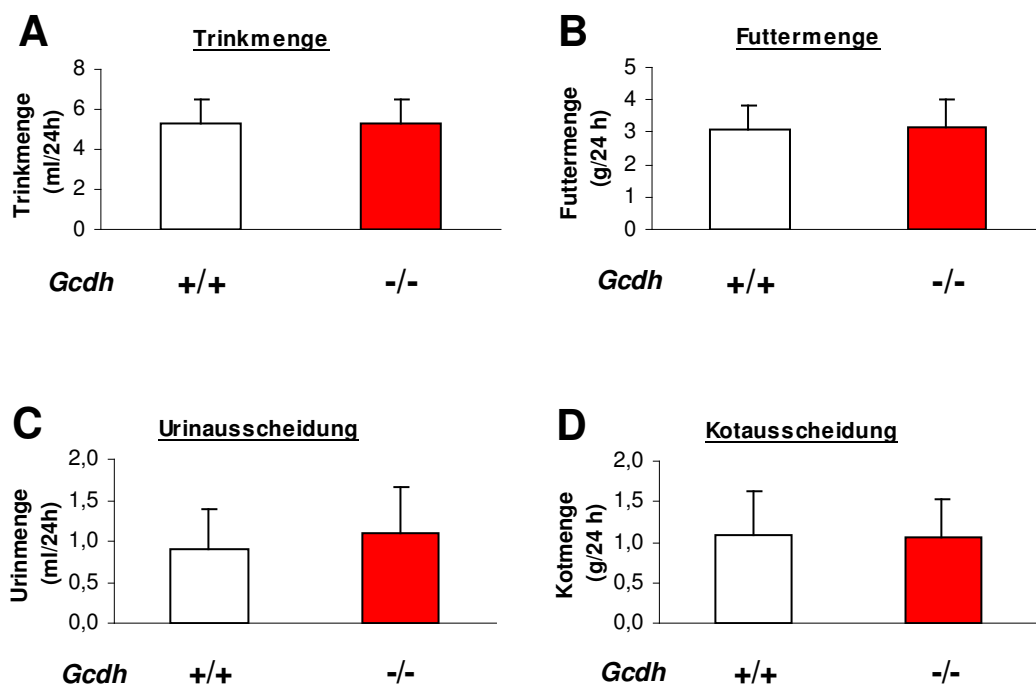
Aufgrund der veränderten Nierenmorphologie und Unterschieden in der renalen Expression einiger nierenphysiologisch relevanter Gene bei *Gcdh*-defizienten Mäusen sollten Nierenfunktionsparameter überprüft werden. Zur funktionellen Untersuchung wurde die Wasseraufnahme und -abgabe gemessen und der Urin auf die Konzentration bestimmter harnpflichtiger Substanzen und den Säuregehalt hin überprüft. Zum Ausschluss einer Proteinurie, die häufig konsekutiv bei Nierenerkrankungen auftritt, wurde die Proteinkonzentration im Urin der Tiere bestimmt. Von Blutdruckmessungen, die wegen der Heraufregulation einiger Hypertonie-assoziiierter Gene interessant wären, wurde aufgrund der messtechnischen Unsicherheit der manometrischen Messung und der Invasivität der intraarteriellen Messung Abstand genommen. Die Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate über Messung des Kreatinins in Blut und Urin, eine zur Einschätzung der Nierenfunktion klassische Untersuchung, ist bei der Maus aufgrund von speziesspezifischen Chromogenen des Blutes mit herkömmlich gebräuchlichen Verfahren nicht möglich.



### 4.3.1 Untersuchungen im metabolischen Käfig

Zur Untersuchung der Wasserhomöostase *Gcdh*-defizienter Mäuse wurden Studien im metabolischen Käfig durchgeführt. Der metabolische Käfig erlaubt neben der Messung der Trink- und Urinmenge über 24 Stunden auch eine Bestimmung der Futter- und Kotmenge, sodass das Fressverhalten mitgetestet werden konnte. Die Messungen erfolgten an sechs Wildtyp-Mäusen und 12 *Gcdh*-defizienten Tieren weiblichen Geschlechts der Altersstufe 42 Tage an zwei aufeinander folgenden Tagen.

Unter Standarddiät konnten keine Unterschiede im Trink- oder Fressverhalten und entsprechend in der Ausscheidung von Urin und Kot zwischen *Gcdh*-defizienten und Wildtyp-Mäusen festgestellt werden (Abb. 19). In beiden Gruppen diesen Alters trinken die Tiere etwa 5 ml Wasser und scheiden 1 ml Urin in 24 h aus. Der Durchschnittswert der Futtermenge liegt bei *Gcdh*-defizienten wie bei Wildtyp-Mäusen bei etwa 3 g pro Tag, die Kotmenge beträgt ca. 1 g pro Tag.

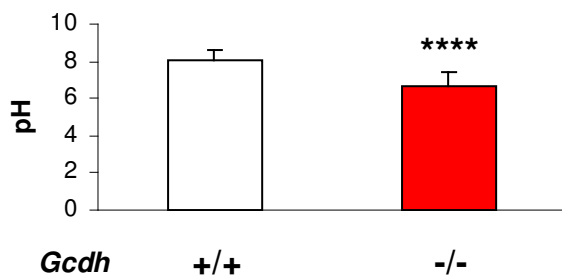


**Abb. 19: Trink- und Fressverhalten sowie Ausscheidung bei *Gcdh*-defizienten Tieren**

Weibliche *Gcdh*-defiziente (-/-) und Kontroll-Mäuse (+/+) wurden einzeln in metabolischen Käfigen unter Standardbedingungen gehalten. Nach 48-stündiger Eingewöhnungsphase wurde die tägliche Trink- (A), und Futtermenge (B) sowie die ausgeschiedene Urin- (C) und Kotmenge (D) bestimmt. Die Angaben sind Mittelwerte  $\pm$ SD.

### 4.3.2 Gesteigerte Azidität des Urins

Zur Erfassung des Säurestatus des Urins wurden Messungen des pH-Wertes mittels Indikatorpapier durchgeführt. Da die Werte der einzelnen Altersgruppen kaum differieren, wurden sie zusammengefasst. Der Urin *Gcdh*-defizienter Mäuse ist mit einem pH-Wert von 6,5 hochsignifikant saurer als der von Kontroll-Mäusen mit einem Wert von 8 (Abb. 20).



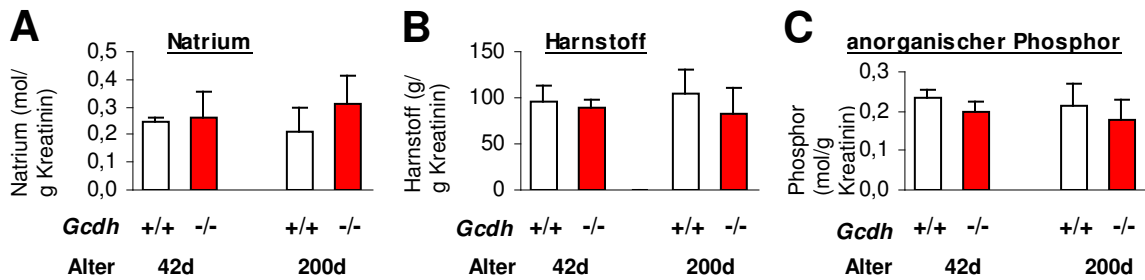
**Abb. 20: Gesteigerte Azidität des Urins *Gcdh*-defizienter Mäuse**

Spontanurin wurde von *Gcdh*-defizienten (-/-) und Wildtyp-Mäusen (+/+) gewonnen und der pH bestimmt. Die Angaben sind Mittelwerte  $\pm$ SD (n=10), \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ .

### 4.3.3 Untersuchung harnpflichtiger Substanzen

Um die Nierenfunktion *Gcdh*-defizienter Mäuse bezüglich der Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen zu prüfen, wurde 24-Stunden-Sammelurin im Routinelabor des UKE auf die Konzentration von Elektrolyten, Kreatinin und Harnstoff hin untersucht. Die Proben stammten von jeweils drei Paaren, bestehend aus *Gcdh*-defizienter und Wildtyp-Maus der Altersstufen 42 und 200 Tage. Um Fehler auszuschließen, die auf einer unterschiedlichen Konzentrierung der verglichenen Urine beruhen, wurde die Konzentration der jeweiligen Substanz auf die des Kreatinins bezogen.

Die Messungen ergaben leichte, nicht signifikante Unterschiede. Die 200 Tage alten *Gcdh*-defizienten Tiere scheiden mit 0,31 mol/g Kreatinin etwas mehr Natrium aus als die entsprechenden Wildtyp-Mäuse mit 0,21 mol/g Kreatinin (Abb. 21 A). Die Ausscheidung von Harnstoff und anorganischem Phosphor ist bei beiden Altersstufen leicht vermindert (Abb. 21 B und C). Die Konzentration von Kalium, Chlorid, Kalzium und Magnesium ist bei den *Gcdh*-defizienten Mäusen unverändert.

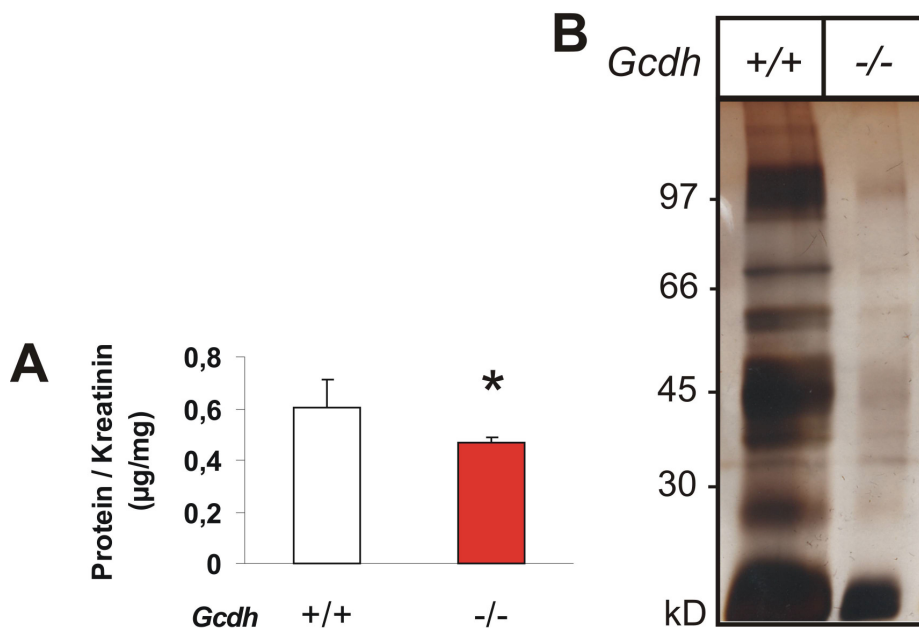


**Abb. 21: Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen bei der *Gcdh*-defizienten Maus**

Urin von 42 und 200 Tage alten *Gcdh*-defizienten (-/-) und Wildtyp-Tieren (+/+) wurde über 24 Stunden gesammelt und die Konzentration von Natrium (A), Harnstoff (B) und anorganischem Phosphor (C) bestimmt. Die Konzentration der jeweilig betrachteten Substanz wurde zur Normalisierung auf die Kreatininkonzentration bezogen. Die Angaben sind Mittelwerte  $\pm$ SD (n=3).

#### 4.3.4 Hypoproteinurie bei *Gcdh*-Defizienz

Da viele Erkrankungen der Niere, vor allem bei Schädigung des glomerulären Filterapparates, mit einem vermehrten Verlust von Proteinen über den Urin einhergehen, wurde bei den Mäusen die renale Proteinausscheidung gemessen. Untersucht wurde der Spontanurin von jeweils fünf 100 Tage alten *Gcdh*-defizienten und Wildtyp-Tieren. Um Fehler durch unterschiedlich konzentrierten Urin auszuschließen, wurde die Proteinkonzentration auf die Kreatininkonzentration bezogen. Die Messungen ergaben eine um 25 Prozent erniedrigte Proteinausscheidung der *Gcdh*-defizienten Mäuse (Abb. 22 A).



**Abb. 22: Hypoproteinurie bei der *Gcdh*-defizienten Maus**

Sowohl bei der photometrischen Proteinbestimmung (A) als auch in der Silberfärbung (B) findet sich bei den *Gcdh*-defizienten Mäusen eine signifikant erniedrigte renale Proteinausscheidung. A: Die Angaben sind Mittelwerte  $\pm$ SD (n=5), \* = p < 0,05

Um diese Hypoproteinurie näher zu charakterisieren, wurden Urinproben elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Dafür wurden jeweils drei Urine von 100 Tage alten männlichen *Gcdh*-defizienten und Wildtyp-Mäusen äquivalenten Kreatiningehalts verglichen. Sowohl bei *Gcdh*-defizienten wie auch bei Wildtyp-Tieren finden sich im Urin Proteine der Molekulargewichte 100 kDa, 70 kDa, 60 kDa, 45 kDa, 33 kDa und 25 kDa sowie sehr leichte Peptide (Abb. 22 B). Bei gleichem Bandenmuster der ausgeschiedenen Proteine ist die Menge des angefärbten Proteins bei der *Gcdh*-defizienten Maus wesentlich geringer. Silberfärbungen von Urinproben 21 Tage alter Tiere zeigen keine verminderte Proteinausscheidung bei *Gcdh*-Defizienz.

### 4.4 Reaktionen von Maus und Niere auf metabolischen Stress

Während Patienten mit Mutation im *GCDH*-Gen im Rahmen kataboler Stoffwechsellagen, wie etwa Infektionen, enzephalopathische Krisen erleiden, ist es bei *Gcdh*-defizienten Mäusen weder durch Imitation einer bakteriellen Infektion mittels Lipopolysaccharid-Injektion noch durch Simulation einer akuten viralen Infektion durch Gabe von poly-Inosin/Cytosin und Interferon  $\alpha$  gelungen, eine katabole Krise zu induzieren (Koeller et al. 2002). Kürzlich gelang es jedoch, durch Gabe eine Hochproteindiät (62% Proteinanteil vs 20% im Standardfutter) bei jungen Tieren eine neuro-metabolische Krise zu induzieren (Zinnanti et al. 2006).

Die folgenden Experimente wurden unter Hochproteindiät an 42 Tage und an 200 Tage alten Mäusen im metabolischen Käfig durchgeführt. Die Tiere erhielten zunächst für zwei Tage das gewohnte Futter und konnten sich an den Käfig adaptieren, dann erst erfolgte die Fütterung der Hochproteindiät. Als Kontrollen wurden jeweils ein Wildtyp-Tier, das ebenfalls proteinreiches Futter erhielt, und ein *Gcdh*-defizientes Tier, das weiterhin Standard-Futter bekam, mitgeführt.

Die 42 Tage alten *Gcdh*-defizienten Mäuse zeigen am dritten Tag der Hochproteindiät zunächst einen Abfall der Körpertemperatur und einen Verlust an motorischer Aktivität. Diese Symptome verstärken sich am vierten Tag. Am fünften Tag der Diät kommen Myoklonien, Lähmungen, insbesondere der vorderen Extremität, und schließlich eine Schnappatmung hinzu. In diesem Stadium wurden die Tiere getötet. Bei den als Kontrollen eingesetzten Tieren traten keine dieser

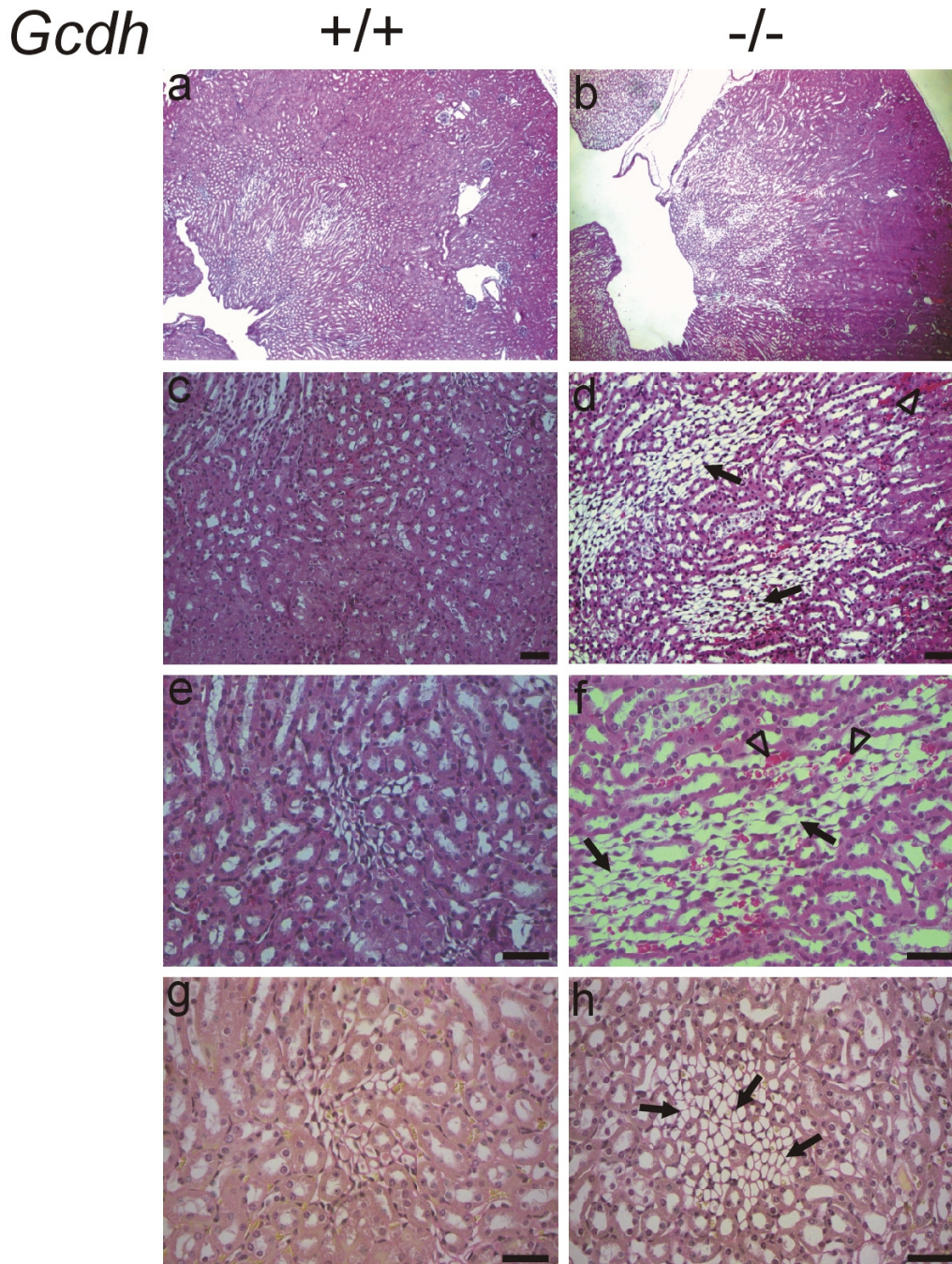
Symptome auf. Von drei untersuchten 200 Tage alten *Gcdh*-defizienten Tieren zeigten keine unter hochgradig proteinreicher Diät Einschränkungen ihrer Vitalität. Sie entwickelten keine neuro-metabolische Krise. Die Versuche wurden am 11. Tag der Diät abgebrochen. Auffallend waren bisweilen aggressive Verhaltensstörungen der alten *Gcdh*-defizienten Mäuse, die aber nicht weiter untersucht wurden.

### 4.4.1 Histologische Untersuchung des Nierenparenchyms

Die Nieren *Gcdh*-defizienter Mäuse zeigen bereits unter basalen Bedingungen eine proteinbiochemisch nachweisbare Zunahme bindegewebiger Fasern mit Hypertrophie des Organs (siehe 4.1). Zur Klärung, ob die Nieren unter metabolischem Stress weiteren strukturellen Schädigungen unterliegen, wurden die Organe histologisch untersucht. Für die Analysen wurden die Nieren 42 Tage alter Tiere am fünften Tag der Diät entnommen. Als Kontrollen dienten Nieren von Wildtyp-Mäusen gleichen Alters, die ebenfalls Hochproteindiät gefüttert bekamen. Für die lichtmikroskopische Untersuchung wurden Paraffinschnitte der Nieren angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin-Lösung (HE) sowie nach van-Gieson gefärbt.

Die Nieren der *Gcdh*-defizienten, enzephalopathischen Mäuse weisen multiple, in der HE-Färbung lediglich gering angefärbte Areale auf, deren Tubuli einen massiven Zelluntergang zeigen (Abb. 23 d, f). Diese Areale finden sich vorrangig in der Außenzone des Nierenmarks. Auch in der van-Gieson-Färbung stellt sich die Atrophie der Tubuli deutlich dar, ein erhöhter Gehalt collagener Fasern lässt sich dagegen auch in dieser, diesbezüglich spezifischen, Färbung bei den *Gcdh*-defizienten Tieren nicht nachweisen (Abb. 23 g,h). Eine weitere Auffälligkeit stellen Ansammlungen von Erythrozyten im Nierengewebe der *Gcdh*-defizienten Mäuse dar, die nicht eindeutig als intravasale Rückstände bei mangelnder Perfusion klassifiziert werden können (Abb. 23, d, f).





**Abb. 23: Histologische Untersuchung der Nieren *Gcdh*-defizienter Mäuse nach diätetisch induziertem metabolischem Stress**

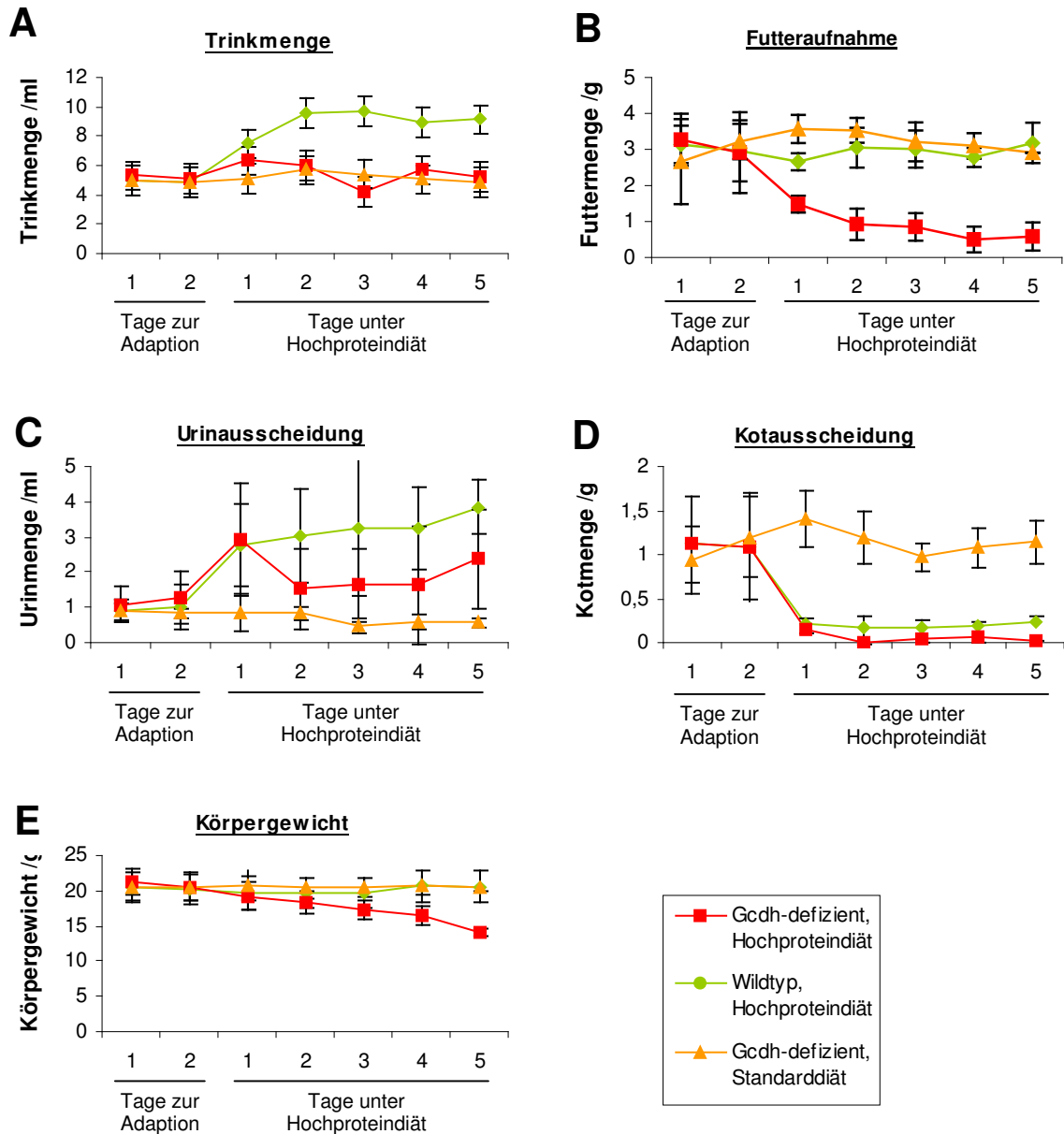
Nach fünftägiger Fütterung einer Hochproteindiät wurden *Gcdh*-defiziente (-/-) und Kontroll-Mäuse (+/+) getötet und die Nieren entnommen. Von den Nieren wurden Paraffinschnitte angefertigt und Hämatoxylin-Eosin (a-f) bzw. nach van-Gieson (g-h) gefärbt. Die gefüllten Pfeile weisen auf die im Text beschriebenen atrophischen Tubuli, die Dreieckspfeile auf die Erythrozytenansammlungen hin. Die Balken entsprechen jeweils 50µm. (Prof. Glatzel, Hamburg)

#### 4.4.2 Analyse des Trink- und Fressverhaltens

Die Mäuse wurden während der Fütterung der Hochproteindiät in metabolischen Käfigen gehalten, um Trink- und Fressverhalten sowie Urin- und KOTAusscheidung untersuchen zu können. Als zusätzlicher Parameter des metabolischen Status

wurden die Tiere täglich gewogen. Zunächst wurden fünf Triplets 42 Tage alter Tiere untersucht. Jedes Triplet bestand aus einer *Gcdh*-defizienten und einer Wildtyp-Maus unter Hochproteindiät sowie einer *Gcdh*-defizienten Maus unter Standarddiät.

Während sich die Parameter der *Gcdh*-defizienten Mäuse in den ersten beiden Tagen ohne Hochproteindiät nicht von denen der Kontrolltiere unterscheiden, treten nach Induktion der Krise deutliche Veränderungen auf. Während die Wildtyp-Mäuse unter proteinreicher Ernährung ab dem zweiten Tag der Diät mit knapp 10 ml Wasser pro Tag etwa das Doppelte der gewöhnlichen Trinkmenge zu sich nehmen, ändern die *Gcdh*-defizienten Tiere unter Hochproteindiät ihr Trinkverhalten nicht (Abb. 24 A). Sie trinken genauso wie ihre Kontrollen unter Standarddiät konstant etwa 5 ml Flüssigkeit pro Tag. Die *Gcdh*-defizienten Tiere erniedrigen unter Hochproteindiät bereits ab dem ersten Tag ihre Nahrungsaufnahme und fressen am vierten und fünften Tag der Diät kaum noch (Abb. 24 B). Währenddessen ändern die Mäuse der beiden Kontrollgruppen ihr Fressverhalten nicht. Die Urinausscheidung variiert in den beiden Gruppen mit proteinreicher Diät stark (Abb. 24 C). Die Wildtyp-Tiere scheiden entsprechend der erhöhten Trinkmenge ab dem ersten Tag der Diät etwa das Dreifache der gewöhnlichen Urinmenge von 1 ml aus. Die *Gcdh*-defizienten Tiere erhöhen unter Hochproteindiät ihre Urinausscheidung bei konstanter Trinkmenge nach einem kurzen starken Anstieg am ersten Tag der Diät im weiteren Verlauf auf knapp das Doppelte. Ohne Hochproteindiät treten keine Veränderungen der Urinproduktion bei den *Gcdh*-defizienten Mäusen auf. Sowohl bei *Gcdh*-defizienten wie bei Wildtyp-Mäusen kommt es unter Hochproteindiät ab dem ersten Tag zu einer konstanten massiven Verringerung der Kotalausscheidung auf etwa 0,1 g pro Tag (Abb. 24 D). Dagegen scheiden die *Gcdh*-defizienten Tiere, die Standarddiät erhalten, während der Testperiode weiterhin 1 g Kot aus. Unter Hochproteindiät verlieren die *Gcdh*-defizienten Mäuse kontinuierlich an Gewicht, bis sie am fünften Tag der Diät nur noch 2/3 ihres Ausgangsgewichtes aufbringen (Abb. 24 E). Bei den Kontrolltieren treten keine größeren Schwankungen des Körpergewichts auf. In einer weiteren Versuchsreihe bekamen drei Paare, jeweils bestehend aus einer 200 Tage alten männlichen *Gcdh*-defizienten Maus und einem entsprechenden Wildtyp-Tier, die Hochproteindiät gefüttert. Auch bei den alten Tieren zeigen sich *Gcdh*-Defizienz-spezifische Veränderungen, diese sind aber milder ausgeprägt als



**Abb. 24: Metabolischer Status *Gcdh*-defizienter Mäuse unter Hochproteindiät**

Zwei weibliche 42 Tage alte *Gcdh*-defiziente Mäuse und ein entsprechendes Wildtyp-Tier wurden parallel in drei metabolischen Einzelkäfigen gehalten und zunächst für zwei Tage an die Käfigbedingungen adaptiert. Danach wurde eine *Gcdh*-defiziente Maus (rot) und ein Wildtyp-Tier (grün) auf Hochproteindiät umgestellt. Die zweite *Gcdh*-defiziente Maus (orange) erhielt weiterhin Standarddiät. Das Trink- und Fressverhalten, die ausgeschiedene Urin- und Kotmenge sowie das Körpergewicht der Tiere wurden täglich ermittelt. Die Angaben sind Mittelwerte  $\pm$ SD (n=5).

bei ihren jüngeren Artgenossen. Die alten *Gcdh*-defizienten Tiere fressen an den ersten vier Tagen der Diät etwas weniger als die Kontrolltiere und scheiden auch entsprechend weniger Kot aus. Die Nahrungsaufnahme gleicht sich aber im Verlauf der Diät derer der Wildtyp-Tiere an. Wasseraufnahme wie Urinausscheidung steigen unter Hochproteindiät bei den alten *Gcdh*-defizienten wie Wildtyp-Tieren gleichermaßen um das Doppelte bzw. das Vierfache an. Die



200 Tage alten *Gcdh*-defizienten Mäuse verlieren bei Fütterung mit proteinreicher Diät ab dem ersten Tag kontinuierlich an Gewicht. Sie wiegen am 11. Tag der Diät nur noch 75 Prozent ihres Ausgangsgewichts. Der Gewichtsverlust der Wildtyp-Kontrollen betrug im gleichen Zeitraum nur etwa 10 Prozent.

Zuletzt wurde in einem Pilotversuch getestet, ob sich durch Gabe hochgradig proteinreicher Diät auch bei für das *Gcdh*-Gen heterozygoten Mäusen Veränderungen der metabolischen Parameter nachweisen lassen. Das 42 Tage alte heterozygote Tier zeigte unter Hochproteindiät ein ähnliches Trink-, Fress- und Ausscheidungsverhalten wie die oben beschriebenen Wildtyp-Tiere. Mit Gabe der Diät stieg die Trink- und Urinmenge an, bei gleichbleibender Nahrungszufuhr war die Kotalausscheidung eher gering und das Körpergewicht über die 11 Tage des Versuchs konstant. Eine neurometabolische Krise trat nicht auf.

### 4.4.3 Exkretion harnpflichtiger Substanzen in der Krise

Es sollte untersucht werden, ob sich die Exkretionsleistung der Nieren bei der *Gcdh*-defizienten Maus unter Hochproteindiät ändert. Dafür wurden Urinproben von jeweils drei *Gcdh*-defizienten und Wildtyp-Mäusen der Altersstufen 42 und 200 Tage jeweils vor Gabe der Hochproteindiät und am letzten Tag der Diät (Tag 5 bzw. Tag 11) auf harnpflichtige Substanzen, wie Elektrolyte und Harnstoff, hin analysiert. Die Messwerte wurden jeweils auf Kreatinin bezogen, um Fehler durch unterschiedlich konzentrierten Urin zu vermeiden.

Beide Altersstufen unterscheiden sich bezüglich der Tendenz der Konzentrationsänderung der untersuchten Substanzen im Urin kaum. Allerdings weisen die jüngeren Tiere häufig eine stärkere Reaktion auf die Hochproteindiät auf. Während bei den 42 Tage alten Wildtyp-Tieren nach Fütterung einer Hochproteindiät keine Änderung der renalen Natriumausscheidung auftritt, weist der Urin entsprechender *Gcdh*-defizienter Tiere eine um etwa 60 Prozent verringerte Natriumkonzentration auf (Tab. 5). Bei jungen *Gcdh*-defizienten wie bei Wildtyp-Mäusen sinkt die Konzentration der Elektrolyte Kalium, Chlorid und Magnesium im Urin unter proteinreicher Diät stark ab. Dieser Effekt ist bei den *Gcdh*-defizienten Tieren mit einer etwa 70-prozentigen Reduktion der Kalium- und Chloridkonzentration ausgeprägter.

## Ergebnisse

**Tab. 5: Konzentration harnpflichtiger Substanzen im Urin *Gcdh*-defizienter, enzephalopathischer Mäuse**

Parameter	<i>Gcdh</i>	Wert	±SD
<b>Natrium</b> (mol / g Kreatinin)	+/+ vor Diät	0,25	0,01
	+/+ nach Diät	0,29	0,01
	-/- vor Diät	0,36	0
	-/- nach Diät	0,16	0,06
<b>Kalium</b> (mol / g Kreatinin)	+/+ vor Diät	0,89	0,21
	+/+ nach Diät	0,47	0,02
	-/- vor Diät	0,87	0,1
	-/- nach Diät	0,25	0,01
<b>Calcium</b> (mmol / g Kreatinin)	+/+ vor Diät	7	2
	+/+ nach Diät	13	0
	-/- vor Diät	9	3
	-/- nach Diät	55	31
<b>Magnesium</b> (mmol / g Kreatinin)	+/+ vor Diät	84	24
	+/+ nach Diät	33	12
	-/- vor Diät	58	9
	-/- nach Diät	32	4
<b>Chlorid</b> (mol / g Kreatinin)	+/+ vor Diät	0,45	0,11
	+/+ nach Diät	0,32	0,03
	-/- vor Diät	0,45	0,01
	-/- nach Diät	0,17	0,01
<b>anorganischer Phosphor</b> (mol / g Kreatinin)	+/+ vor Diät	0,23	0,02
	+/+ nach Diät	0,19	0,02
	-/- vor Diät	0,2	0,03
	-/- nach Diät	0,19	0,02
<b>Harnstoff</b> (g / g Kreatinin)	+/+ vor Diät	95	19,3
	+/+ nach Diät	487	67,8
	-/- vor Diät	89	10,3
	-/- nach Diät	96	26,9

Gelistet sind die Konzentrationen der Substanzen im 24h-Sammelurin bezogen auf Kreatinin, jeweils für Wildtyp-Mäuse (+/+) und *Gcdh*-defiziente Mäuse (-/-) der Altersstufe 42 Tage vor und nach Diät. (n=3).

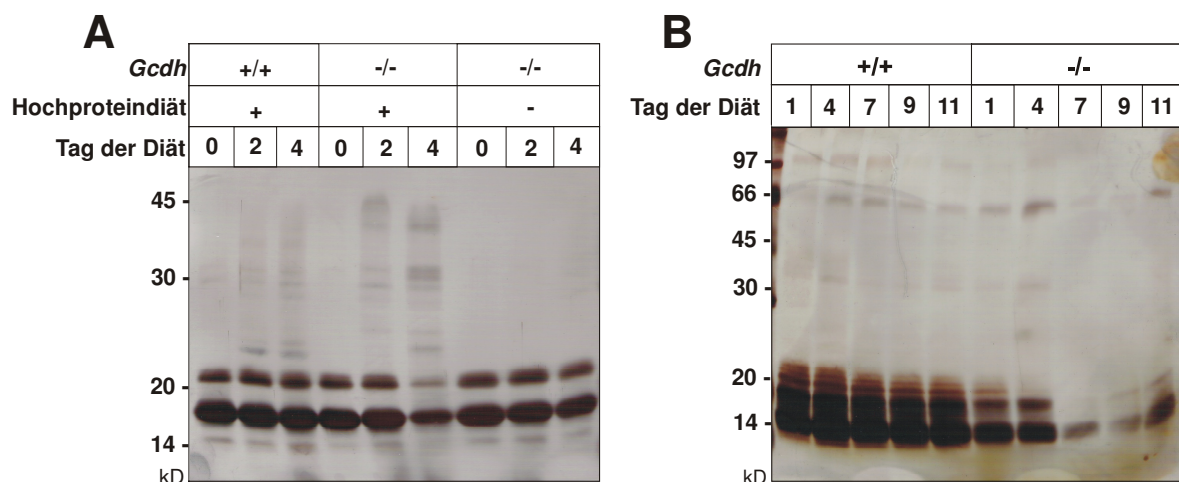
Bei 42 Tage alten Wildtyp-Mäusen kommt es durch Fütterung einer Hochproteindiät zu einer fünffach erhöhten Harnstoffkonzentration des Urins. Die Exkretion von Harnstoff ändert sich dagegen bei gleichaltrigen *Gcdh*-defizienten Tieren unter Diät nicht. Während sich die Calciumkonzentration des Urins bei den jungen Wildtyp-Mäusen nach Hochproteindiät verdoppelt, reagieren die *Gcdh*-defizienten Tiere auf metabolischen Stress mit einer sechsfach gesteigerten Exkretion des Elektrolyts. Die Ausscheidung von anorganischem Phosphor ist in beiden Gruppen unverändert.

Während sich die Ausscheidung der Elektrolyte Natrium, Kalium, Calcium, Magnesium und Chlorid unter Hochproteindiät bei 200 Tage alten Mäusen im Vergleich zu den 42 Tage alten Tieren gleichsinnig, aber in geringerem Ausmaß ändert, kommt es in dieser Alterstufe auch bei den *Gcdh*-defizienten Mäusen nach Hochproteindiät zu einer erhöhten Harnstoffkonzentration im Urin. Desweiteren steigt sowohl bei alten Wildtyp- als auch *Gcdh*-defizienten Tieren die Konzentration von anorganischem Phosphor im Urin durch Fütterung der Diät um etwa das Doppelte an.

#### 4.4.4 Progressive Hypoproteinurie unter Hochproteindiät

Bereits unter basalen Bedingungen zeigen die *Gcdh*-defizienten Mäuse der Alterstufe 100 Tage im Vergleich zu Wildtyp-Tieren eine verminderte Proteinausscheidung über den Urin. Ob diese Hypoproteinurie auch unter proteinreicher Diät bestehen bleibt, sollte mittels Silberfärbung von im SDS-PAGE-Gel aufgetrennten Urinproteinen, normalisiert durch gleichen Kreatinin-Gehalt, untersucht werden.

Bei 42 Tage alten *Gcdh*-defizienten, enzephalopathischen Mäusen findet sich am vierten Tag der Diät eine deutliche Reduktion der Proteinausscheidung, während bei den als Kontrolle eingesetzten Wildtyp-Tieren und den *Gcdh*-defizienten Tieren ohne Hochproteindiät keine Veränderungen eintreten (Abb. 25 A).

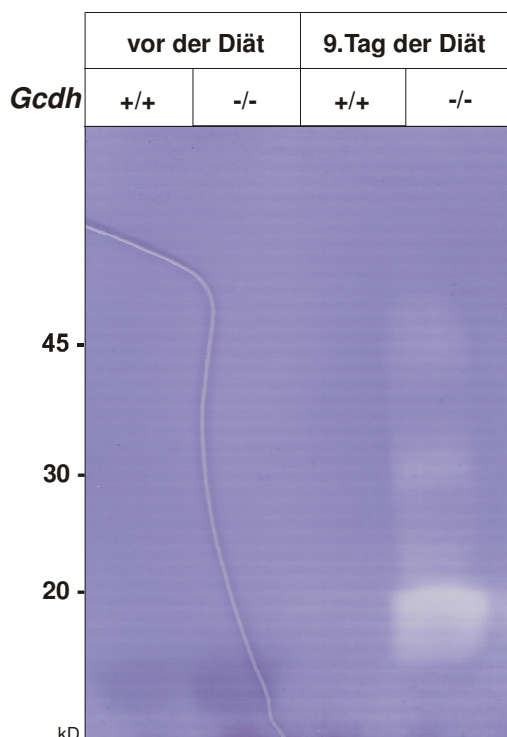


**Abb. 25: progressive Abnahme der renalen Proteinausscheidung unter Hochproteindiät**  
 Die 42 Tage alten *Gcdh*-defizienten Mäuse scheiden am vierten Tag der Hochproteindiät deutlich weniger Protein mit dem Urin aus als vor Beginn der Diät (A). Bei den Kontroll-Tieren ändert sich die Proteinausscheidung nicht. Bei den 200 Tage alten *Gcdh*-defizienten Tieren ist ein mit zunehmender Dauer der Diät abnehmender Proteingehalt des Urins sichtbar (B).

Zweihundert Tage alte *Gcdh*-defiziente Mäuse weisen einen bereits basal erniedrigten Proteingehalt des Urins auf (Abb. 25 B). Obwohl die Mäuse nicht durch Hochproteindiät in eine metabolische Krise zu bringen sind (siehe 4.4), nimmt der Proteingehalt des Urins bereits ab dem vierten bis siebten Tag der Diät deutlich und progressiv ab. Bei alten Wildtyp-Mäusen ändert sich die Proteinausscheidung wiederum nicht.

Zur Klärung, ob die Hypoproteinurie der *Gcdh*-defizienten Mäuse auf eine erhöhte Proteaseaktivität zurückzuführen ist, wurden zunächst Urinproben, die von 200 Tage alten *Gcdh*-defizienten und Wildtyp-Mäusen vor und am 9. Tag der Hochproteindiät gesammelt wurden, auf Anwesenheit von Matrixmetalloproteasen durch Gelatine-Zymographie getestet. Während einer Inkubationszeit von 12 Stunden können vorhandene Matrixmetalloproteasen die Gelatine zersetzen und die freigesetzten Aminosäuren diffundieren aus dem Gel. Noch im Gel verbleibende Gelatine ist dann durch Coomassie-blau anfärbbar, während Stellen mit erhöhter Matrixmetalloproteaseaktivität als weiße Banden imponieren.

Es zeigte sich eine deutliche Matrixmetalloproteaseaktivität im Urin der *Gcdh*-defizienten Maus am letzten Tag der Hochproteindiät (Abb. 26). Nachgewiesen werden konnten Proteasen der Molekulargewichte 18 kDa, 30 kDa und 45 kDa. Vor der Diät sowie bei beiden Urinproben des Wildtyp-Tieres ist zymographisch keine Proteaseaktivität nachweisbar.



**Abb. 26: Zymographie von Urinproben *Gcdh*-defizienter Mäuse vor und nach Hochproteindiät**  
 Urin wurde für 24 h von jeweils einer 200 Tage alten *Gcdh*-defizienten (-/-) und einer Wildtyp-Maus (+/+) vor und am 9. Tag der Diät gesammelt. Zur Normalisierung wurden Urinproben mit einem Kreatiningehalt von jeweils 0,2 µg aufgetragen. In der Gelatine-Zymographie zeigt sich eine erhöhte Matrixmetalloproteaseaktivität im Urin der *Gcdh*-defizienten Maus am 9. Tag der Hochproteindiät. Beim Wildtyp-Tier ist diese gesteigerte Aktivität nicht nachweisbar.

## 5 Diskussion

In der folgenden Diskussion der Resultate soll zunächst auf die anatomischen und funktionellen Veränderungen der Nieren *Gcdh*-defizienter Mäuse eingegangen werden. Nach kurzen Überlegungen zur alterierten Blutdruckregulation dieser Tiere folgt dann eine ausführliche Besprechung der Bedeutung der Transporter OCT2 und NaDC3 als neu identifizierte Interaktionspartner von 3-OHGA.

### 5.1 Pathologische Veränderungen der Nieren

Bei *Gcdh*-defizienten Mäusen wurden im Rahmen dieser Arbeit morphologische und funktionelle Veränderungen der Nieren analysiert, die bereits unter basalen Bedingungen und insbesondere nach Induktion einer enzephalopathischen Krise auftreten. So weisen die *Gcdh*-defizienten Tiere eine Nierenhypertrophie, Veränderungen der renalen Elektrolytausscheidung, des Wasserhaushalts und der Blutdruckregulation, eine Hypoproteinurie sowie Alterationen in der Expression renaler Transporter auf. Dagegen sind renale Begleiterscheinungen bei Patienten mit GA-1 äußerst selten beobachtet worden. Demgegenüber stehen einige Organoazidurien mit GA-1-ähnlichem Pathomechanismus, wie die Glutarazidurie Typ 2 und die Methyl-Malonazidurie, die regelhaft mit Nierenerkrankungen einhergehen.

In einem Fallbericht von 1997 beschreiben Pöge et al. das Auftreten eines nephrotischen Syndroms bei einem 12 Wochen alten GA-1-Patienten, bei dem es bereits im Alter von drei Wochen zu ersten klinischen Zeichen einer akuten Enzephalopathie kam und der im Alter von 22 Wochen im terminalen Nierenversagen verstarb. Klinisch fielen bei dem Jungen Ödeme, eine massive Proteinurie sowie ultrasonographisch vergrößerte Nieren auf. Histologisch konnten glomeruläre Schädigungen bei intaktem Tubulussystem nachgewiesen werden. Durch Serumanalysen gelang der Ausschluss zahlreicher Autoimmunnephritiden sowie eines hepato-renalen Syndroms. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass das nephrotische Syndrom des Jungen wahrscheinlich direkt mit seiner Grunderkrankung, der GA-1, in Verbindung steht und empfehlen, an die Möglichkeit nephrologischer Komplikationen zu denken, obwohl sie bei dieser Form der Organoazidurie selten sind.

Bei der unter anderem ebenfalls durch extrapyramidale Bewegungsstörungen gekennzeichneten Glutarazidurie Typ 2, der ein Enzymdefekt des Elektronentransportierenden Flavoproteins oder dessen Oxoreduktase mit nachfolgender Akkumulation der Metaboliten GA, 2-OHGA, Ethylmalonsäure und Hippursäure zugrunde liegt (Gordon 2006), treten bei Ausbruch der Erkrankung in der Neonatalzeit häufig hypertrophe Veränderungen der Nieren, zum Teil mit zystischen Dysplasien, auf (el-Essa et al. 2000, Loehr et al. 1990).

Eine weitere Organoazidurie mit primär neurologischen Symptomen ist die Methylmalonazidurie, deren Enzymdefekt den Abbau verzweigtkettiger Aminosäuren betrifft (Hörster 2004). Ähnlich wie bei der Glutarazidurie Typ 1, gelingt es seit einiger Zeit durch einen präsymptomatischen Therapiebeginn akute neurologische Krisen zu verhindern und somit die Lebenserwartung deutlich zu erhöhen. Als Langzeitkomplikation trat bei der Mehrzahl der Patienten ein chronisches Nierenversagen auf (Hörster 2004). Histologische Untersuchungen der Nieren zeigten eine tubulointerstitielle Nephritis mit interstitieller Fibrose und tubulärer Atrophie (Deodato et al. 2006).

### 5.1.1 Morphologische Veränderungen

Die Nieren der *Gcdh*-defizienten Mäuse weisen im Vergleich zu denen der Wildtyp-Tiere ein signifikant erhöhtes Gewicht auf (Koeller et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Grad der Nierenhypertrophie mit dem Alter progredient zunimmt und bei den männlichen Tieren im Vergleich zu den weiblichen deutlich ausgeprägter ist (Abb. 6). Als Ursache der Nierenvergrößerung konnte durch histologische und DNA-quantifizierende Methoden sowohl eine Zellhypertrophie als auch eine Zellhyperplasie ausgeschlossen werden (Abb. 7, 8). Obgleich histologisch unter basalen Bedingungen bei 100 Tage alten *Gcdh*-defizienten Mäusen keine Zeichen einer Nierenfibrose zu erkennen sind, lässt sich mittels Westernblot-Analysen ein deutlich erhöhter Gehalt der extrazellulären Matrixproteine Collagen I und Fibronectin nachweisen (Abb. 9). Nach Induktion einer enzephalopathischen Krise weisen die Nieren der *Gcdh*-defizienten Tiere histologisch umgrenzte Areale atrophischer Tubuli auf (Abb. 23). Damit ähneln die strukturellen Schädigungen der Nieren *Gcdh*-defizienter Mäuse den pathomorphologischen Veränderungen,

die bei der Glutarazidurie Typ 2 und der Methyl-Malonazidurie beschrieben werden.

Die Fibrose ist die gewöhnliche Spätmanifestation einer ganzen Reihe chronischer Nierenerkrankungen und führt häufig zu einem terminalen Nierenversagen, das Dialysepflichtigkeit oder die Erfordernis einer Nierentransplantation nach sich zieht (Liu 2006). Der pathophysiologische Prozess, der zum fibrotischen Umbau der Niere führt, lässt sich in vier Phasen einteilen (Eddy 2000). Durch chronische Schädigungen der tubulointerstitiellen Zellen, etwa durch massive Proteinurie, Energiemangelzustände, direkte Tubulusverletzungen, z.B. durch Komplementfaktoren, oder chronische Hypoxie (Nangaku et al. 2004), kommt es zur Aktivierung dieser Zellen und in der Folge zur Abgabe proinflammatorischer Faktoren. Daraufhin folgt die Freisetzung einer Anzahl fibrogener Faktoren, darunter TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ), Angiotensin II und Endothelin. Unter diesen Effektoren ist das Renin-Angiotensin-System (RAS) von tragender Bedeutung (Okada et al. 2002). Verschiedene Zellen, unter ihnen Tubulusepithelzellen, Fibroblasten und mesenchymale Stammzellen, werden so zur verstärkten Produktion von Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM), wie Collagen I, III und IV sowie Fibronectin und Proteoglykanen, stimuliert (Strutz et al. 2006). Gleichzeitig entsteht ein Ungleichgewicht zwischen matrixsynthetisierenden und matrixabbauenden Enzymen, das den Prozess der Fibrose unterstützt. Zuletzt kommt es zur Zerstörung renaler Strukturen mit Verdrängung von Tubuli und Kapillaren und Verlust von Nephronen. Histopathologische Befunde der Nierenfibrose können eine Glomerulosklerose, eine tubulointerstitielle Fibrose mit Tubulusatrophie, Entzündungsinfiltrate sowie ein Verlust an Kapillaren und Podozyten sein (Liu 2006).

Der ursächliche Auslöser der fibrösen und tubuloatrophischen Veränderungen ist im Falle der *Gcdh*-defizienten Maus unbekannt. Er könnte auf einer Schädigung tubulointerstitieller Zellen bei intrazellulärem Energiemangel beruhen. *In vitro*-Versuche konnten zeigen, dass Glutaryl-CoA einen  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex hemmt (Sauer et al. 2005). Als Folge werden eine Inhibition des Zitratzyklus und der mitochondrialen Fettsäureoxidation als ein kausaler Faktor der neuronalen Degeneration bei GA-1 diskutiert. Aufgrund der hohen Transportaktivität zeigen Tubulusepithelzellen nur eine geringe Toleranz gegenüber Energiemangelzuständen. Somit wäre es nicht verwunderlich, wenn

sich der Gendefekt der *Gcdh*-defizienten Mäuse unter basalen Bedingungen auch und vor allem an den Nieren manifestiert und im Verlauf der Enzephalopathie zu deutlichen renalen Strukturveränderungen führt. Die im DNA-Microarray gefundene Heraufregulation von Renin und ACE (Tab. 4; Nr. 17, 14) könnte neben einer reaktiven Blutdrucksteigerung auch als Aktivierung des tubulointerstitiellen RAS zur fibrogenen Stimulation ECM-produzierender Zellen gedeutet werden. Um dies zu klären, wären immunhistochemische Analysen zum Nachweis einer tubulointerstitiellen Lokalisation dieser Enzyme erforderlich.

Auch bei der Pathogenese der ECM-Proliferation der *Gcdh*-defizienten Maus ist das Vorherrschen einer gestörten Homöostase der ECM im Sinne eines unzureichenden Abbaus bei gesteigerter Synthese denkbar. Im DNA-Microarray der Niere eines 42 Tage alten *Gcdh*-defizienten Tieres war die mRNA-Menge des alpha-1-Antitrypsins (*Serpina1*) massiv vermindert (Tab. 4; Nr. 32, 37). Alpha-1-Antitrypsin ist ein Inhibitor der Proteasen Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin und Elastase. Plasmin wiederum spielt eine wichtige Rolle bei der Fibrinolyse und aktiviert außerdem Matrixmetalloproteasen. Eine zentrale Funktion dieser Gruppe von Proteasen ist der Abbau extrazellulärer Matrix (Löffler & Petrides 1998). Die Inaktivierung von Matrixmetalloproteasen katalysieren die TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases). Bei vielen progressiven Nierenerkrankungen findet sich eine vermehrte Expression dieser Inhibitoren, insbesondere des TIMP-1 (Eddy 2000). Das Fehlen des alpha-1-Antitrypsins kann somit als kompensatorischer Mechanismus gedeutet werden, durch vermehrte Proteolyse bindegewebiger Fasern einer Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung Fibrose entgegen zu wirken. Im Einklang mit diesem Modell steht ein erhöhter Gehalt an Matrixmetalloproteasen, der im Urin *Gcdh*-defizienter enzephalopathischer Mäuse nachgewiesen werden konnte (Abb. 26). Ob diese aus dem Niereninterstitium stammen und dort tatsächlich an der Gegensteuerung der Fibrose beteiligt waren, konnte bislang nicht geklärt werden. Ein zymographischer Nachweis der Proteasen im Gewebe ist aufgrund zu niedriger Konzentrationen nicht möglich, so dass photometrische Aktivitätsmessungen indiziert scheinen. Desweiteren sollte geklärt werden, ob es im Rahmen des bindegewebigen Umbaus der Nieren *Gcdh*-defizienter Mäuse ebenfalls zu einer verstärkten Aktivität der pro-fibrotischen TIMPs kommt.



## 5.1.2 Funktionelle Veränderungen

Neben pathologischen Veränderungen der Nierenmorphologie sind bei *Gcdh*-defizienten Mäusen, insbesondere nach Induktion einer enzephalopathischen Krise, auch Abweichungen in der Nierenfunktion zu finden. Die enzephalopathische Krise lässt sich bei jungen Tieren (42 Tage) durch Fütterung einer Hochproteindiät auslösen. Dabei weisen die *Gcdh*-defizienten Mäuse zunächst eine Hypothermie und Hypoaktivität sowie eine verminderte Nahrungsaufnahme auf, später kommt es zu Myoklonien und Lähmungen als Korrelat der akuten Enzephalopathie. In der Regel versterben die Tiere am fünften Tag der Diät nach einer Phase insuffizienter Schnappatmung. Experimentell wurden die Tiere in dieser Phase getötet.

### 5.1.2.1 Störung der Wasserhomöostase

Zur Untersuchung der Wasserhomöostase durchgeführte Analysen im metabolischen Käfig ergaben unter basalen Bedingungen keine Unterschiede zwischen *Gcdh*-defizienten und Wildtyp-Mäusen bezüglich der Wasseraufnahme und der Urinausscheidung (Abb. 19). Jedoch reagieren die 42 Tage alten *Gcdh*-defizienten Tiere bei Fütterung einer Hochproteindiät zur Induktion einer neuro-metabolischen Krise mit deutlich gesteigerter Urinausscheidung bei nahezu unveränderter Trinkmenge (Abb. 24). Vergleichbare Wildtyp-Kontrollen scheiden unter Diät ebenfalls mehr Urin aus, sie erhöhen aber im Gegensatz zu den *Gcdh*-defizienten Tieren entsprechend die Wasseraufnahme. Bei *Gcdh*-defizienten Mäusen im Alter von 200 Tagen lässt sich durch proteinreiche Nahrung keine akute Enzephalopathie mehr auslösen. Diese Tiere reagieren auf die Diät genauso wie Wildtyp-Mäuse mit einer Erhöhung von sowohl Wasseraufnahme als auch Urinausscheidung.

Da alle Mäuse, unabhängig von Genotyp und Alter, auf Fütterung einer Hochproteindiät mit einer erhöhten Urinausscheidung antworten, ist anzunehmen, dass diese Reaktion eine physiologische Anpassung an den Proteinexzess darstellt. Bei erhöhter Proteinzufuhr kommt es durch konsekutiv gesteigerten Aminosäureabbau zum vermehrten Anfallen des cerebrotoxischen Moleküls Ammoniak. Zur Entgiftung wird dieses in der Leber mit Bicarbonat zu Harnstoff umgewandelt. Harnstoff ist renal ausscheidbar, wobei die Ausscheidungsrate bei

erhöhter Diurese steigt (Klinke & Silbernagl, 2001). An Nerzen konnte gezeigt werden, dass unter Fütterung einer Hochproteindiät das Urinvolumen zunimmt (Tauson et al. 2001). In diesem Kontext scheint es sinnvoll, zur Erhöhung der Diurese die Trinkmenge zu steigern, wie es die Wildtyp-Tiere aller Alterstufen und die alten *Gcdh*-defizienten Tiere unter Hochproteindiät tun. Bei den jungen *Gcdh*-defizienten Mäusen bleibt diese Reaktion von Beginn der Diät an aus, so dass eine durch die Enzephalopathie bedingte relative Trinkschwäche als Erklärung wahrscheinlich nicht genügt. Warum eine Anpassung der Wasseraufnahme an den erhöhten renalen Verlust nicht gelingt, ist bislang unklar. Zum besseren Verständnis dieser Prozesse wären im Verlauf der Diät Blutanalysen bezüglich der Konzentration der Volumen-regulierenden Hormone Vasopressin und Aldosteron sowie des eng mit diesen Steuerungsprozessen verknüpften Elektrolyts Natrium notwendig.

### 5.1.2.2 Störung der Elektrolytausscheidung

Häufig gehen Änderungen der Wasserhomöostase auch mit Verschiebungen des Elektrolythaushalts einher. Aus diesem Grund wurde die Konzentration der Elektrolyte Natrium, Kalium, Chlorid, Magnesium und Calcium im Urin der *Gcdh*-defizienten Mäuse und ihrer Kontrollen vor und nach Hochproteindiät in Relation zur Kreatinin-Konzentration bestimmt. Als deutlichste Veränderungen fanden sich eine isoliert bei den *Gcdh*-defizienten Tieren auftretende Diät-induzierte Reduktion der Natrium-Urinkonzentration um die Hälfte sowie eine massiv erhöhte Calcium-Ausscheidung (Tab. 5).

Eine reduzierte Natriumausscheidung beruht entweder primär auf einer Hyponatriämie verschiedenster Ursachen, wie Natriumverlusten bei Gastroenteritiden, Pankreatitis oder nephrotischem Syndrom, auf einer vermehrten tubulären, Aldosteron-vermittelten Natriumrückresorption oder auf massiven Wasserverlusten bei Nephropathien, polyurischem Nierenversagen oder Diabetes insipidus, die sich der Steuerung durch Vasopressin entziehen (Renz-Polster, Krautzig & Braun, 2004). Da die enzephalopathischen *Gcdh*-defizienten Mäuse einen, gemessen an der Wasseraufnahme, inadäquat hohen renalen Wasserverlust zeigen und unter Hochproteindiät stark angestiegenen Konzentrationen der cytotoxischen Metabolite 3-OHGA und GA ausgesetzt sind, ist ein toxisch bedingtes polyurisches Nierenversagen denkbar. Die erhöhte

Calcium-Ausscheidung ließe sich damit allerdings nicht erklären. Ob bei den *Gcdh*-defizienten Mäusen im Verlauf der Entwicklung einer akuten Enzephalopathie tatsächlich auch ein Nierenversagen eintritt, wie es etwa für den Fall des GA-1-Jungen mit nephrotischem Syndrom oder die chronische Nephropathie bei der Methyl-Malonazidurie beschrieben ist (s. 5.1, Hörster 2004, Pöge et al. 1997), müsste durch Bestimmung der Blutkonzentration der Retentionsparameter Kreatinin und Harnstoff nachgewiesen werden. Dies ist außerdem indiziert, da es auszuschließen gilt, dass durch Urämiegifte induzierte Komplikationen des Nierenversagens, wie Myokloni und Enzephalopathie, die durch *Gcdh*-Defizienz-spezifische Noxen ausgelöste metabolische Enzephalopathie imitieren. Das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) als schwere primär renale und sekundär cerebrale Erkrankung konnte allerdings anhand der Analyse von Blutaussstrichen bei *Gcdh*-defizienten, enzephalopathischen Mäusen ausgeschlossen werden.

Eine weitere mögliche Erklärung für die erniedrigte Natriumausscheidung der *Gcdh*-defizienten enzephalopathischen Mäuse bietet die im DNA-Microarray gefundene und mittels Realtime-PCR verifizierte vermehrte Expression einiger Komponenten des RAS (Tab. 4; Nr. 14, 17). Das in der Folge vermehrt ausgeschüttete Aldosteron würde dann eine verstärkte tubuläre Natriumrückresorption und konsekutiv einen Wasserentzug aus dem Primärurin vermitteln (Klinke & Silbernagl, 2001). Einer solchen Konzentrierung des Urins steht allerdings die erhöhte Urinmenge und die gleichzeitig erniedrigte Kaliumausscheidung dieser Tiere entgegen.

In der Arbeitsgruppe durchgeführte Studien zum Verteilungsmuster von injizierter radioaktiv markierter 3-OHGA zeigten eine bei jungen *Gcdh*-defizienten Mäusen im Vergleich mit Wildtyp-Tieren deutlich vermehrte Ausscheidung der organischen Säure über den Darm. Unter der Annahme, dass der Sekretionsmechanismus im Kotransport mit Natrium, etwa NaDC3-vermittelt, erfolgt (s. 5.3.2), ist auch ein erhöhter intestinaler Natriumverlust als Ursache der reduzierten renalen Natriumausscheidung der *Gcdh*-defizienten enzephalopathischen Mäuse denkbar. Als weitere Ursachen des ungewöhnlichen Musters der Elektrolytausscheidung der *Gcdh*-defizienten enzephalopathischen Mäuse kommen auch in dieser Stoffwechsellage verstärkte erforderliche, bislang unbekannte, Transportprozesse in Betracht, die einen Kotransport von Elektrolyten bedingen und das

Gleichgewicht dieser stören können. Auch bei einem in der Stoffwechselambulanz des UKE betreuten Mädchen mit GA-1 fielen im Urinlabor ähnliche Elektrolytmuster auf. So war die Ausscheidung von Natrium um das sechsfache vermindert, die von Kalium, Calcium und Phosphat dagegen nur leicht reduziert (Dr. C. Mühlhausen, persönliche Mitteilung). Dies macht für die veränderte Elektrolytausscheidung Ursachen, die in direktem Zusammenhang mit dem Metabolismus oder Transport der in der Krise um 90 Prozent ansteigenden *Gcdh*-Defizienz-spezifischen Metabolite (Zinnanti 2006), wie 3-OHGA und GA, stehen eher wahrscheinlich, als solche die isoliert auf der Proteinbelastung der *Gcdh*-defizienten Mäuse unter Diät beruhen.

### 5.1.2.3 Störung der Proteinausscheidung

Eine weitere Auffälligkeit der renalen Exkretionsleistung ist die bereits basal bei den *Gcdh*-defizienten Mäusen in Erscheinung tretende Hypoproteinurie (Abb. 22), die sich im Verlauf der Fütterung proteinreicher Diät progredient verstärkt (Abb. 25). Während die Hyperproteinurie ein klassisches Symptom einer ganzen Reihe von Nephropathien, wie etwa der diabetischen Nephropathie, ist und hier auch als prädiktiver Parameter eingesetzt wird (Morgensen 2003), ist eine Hypoproteinurie sehr selten. Das Auftreten einer Hypoproteinurie findet sich etwa als Begleiterscheinung des hämorrhagischen Dengue-Fiebers aufgrund einer durch vaskuläre Leckagen bedingten Proteinverarmung des Blutes (Balasubramanian et al. 2006). Dieser Ursache liegt auch die Hypoproteinurie zu Grunde, die bei einem Behandlungsversuch einer bei der Maus experimentell induzierten Graft-vs-Host-Reaktion (GVDH) mit dem Immunotoxin anti-Thy1.2-RTA als Nebenwirkung beobachtet wurde (Vallera et al. 1991). Ebenfalls toxisch ausgelöst ist die Hypoproteinurie von Ratten, deren Nahrung mit Mykotoxinen belastet ist (Kazanas et al. 1984). Auch bei der Glutarazidurie Typ 1 nehmen toxisch bedingte vaskuläre Schädigungen eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Erkrankung ein. So konnte gezeigt werden, dass die Integrität der Blutgefäße der Chorioallantoismembranen von Hühnereiern durch Inkubation mit 3-OHGA herabgesetzt wird (Mühlhausen et al. 2006). In der Arbeitsgruppe durchgeführte Studien an *Gcdh*-defizienten Mäusen, die für vier Tage eine Hochproteindiät gefüttert bekamen, ergaben neben Extravasationen der meningealen Gefäße des Gehirns auch in Einzelfällen beobachtete Einblutungen in Darm und Harnblase. In

diesem Kontext scheint eine Hypoproteinurie-relevante Hypoproteinämie aufgrund 3-OHGA induzierter Gefäß-Leckagen möglich. Zur Bestätigung dieser Hypothese wäre eine Bestimmung der Proteinkonzentration im Plasma sinnvoll.

Eine andere Erklärung für die Hypoproteinurie bietet der zymographisch nachgewiesene erhöhte Gehalt an Matrixmetalloproteasen im Urin *Gcdh*-defizienter enzephalopathischer Mäuse (Abb. 26). Die Funktion dieser erhöhten Proteaseaktivität könnte primär als Gegensteuerung der vermehrten extrazellulären Einlagerung von Collagen in der Niere angesehen werden (s. 5.1.1). Gelangen die Proteasen dann sekundär in den Urin, so ist bei erhaltener Aktivität ein Abbau dort befindlicher Proteine mit konsekutiver Hypoproteinurie denkbar. Weiterhin ist eine erhöhte proteolytische Aktivität saurer Hydrolasen im Urin *Gcdh*-defizienter Mäuse bei gesteigerter Azidität des Urins und erhöhtem tubulärem Zelluntergang möglich. Bestimmungen der enzymatischen Aktivität der  $\beta$ -Hexosaminidase als Marker lysosomaler Enzyme konnten diese Theorie allerdings nicht stützen. Ebenfalls in der Arbeitsgruppe durchgeführte Aktivitätsmessungen spezifischer Proteasen mit Aktivitätsoptimum im sauren Milieu, wie Cathepsin D und Cathepsin L, konnten keine gesteigerte Aktivität im Urin *Gcdh*-defizienter Mäuse nachweisen.

Sowohl die morphologischen Befunde als auch insbesondere die exkretorischen Auffälligkeiten der Nieren *Gcdh*-defizienter Mäuse lassen sich aufgrund ihrer häufigen Atypie bislang nur schwer klassischen Modellen renaler Pathologien zuordnen. Auch besteht eine massive Diskrepanz zwischen der stark renal betonten Ausprägung der *Gcdh*-Defizienz bei der Maus und der in der Regel rein cerebralen Symptomatik bei betroffenen Patienten. Als Begründung kommt vor allem der Spezies-Unterschied in Frage. Es soll aber auch darauf hingewiesen werden, dass die Anzahl jener Patienten die das frühe bis mittlere Erwachsenenalter und damit das Erwartungsalter für degenerative Nierenerkrankungen erreichen bislang gering ist.

## 5.2 Blutdruckregulation bei *Gcdh*-Defizienz

Klinische Beobachtungen lassen bei Kindern mit Glutarazidurie Typ 1 oftmals Auffälligkeiten in den Bereichen Flüssigkeitszufuhr und Temperaturregulation erkennen. Die Kinder möchten nur wenig trinken und schwitzen leicht.

Veröffentlichte Daten existieren hierzu aber bislang nicht. Auch liegen keine klinischen Studien vor, die Blutdruckmessungen bei GA-1-Patienten erwähnen.

In DNA-Microarray-Analysen von Gehirn und Niere *Gcdh*-defizienter Mäuse fielen veränderte Expressionen einiger Blutdruck-relevanter Gene auf (Tab. 4; Nr. 14, 17, 20). Durch Verifizierung mittels Realtime-PCR konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Menge des im Hypothalamus gebildeten, antidiuretischen Peptidhormons Vasopressin im Gehirn um das Doppelte erhöht ist (Abb. 10 A). Der Rezeptor des Vasopressins im Erfolgsorgan Niere, der V<sub>2</sub>-Rezeptor, ist hingegen um den Faktor 1,5 herunterreguliert (Abb. 10 B). Der vasokonstriktorische Effektor Renin findet sich in der Niere um das 1,6-fache erhöht (Abb. 10 C).

Neben dem eher längerfristig wirkenden Renin sowie dem Peptidhormon Vasopressin sind Katecholamine eine wichtige Stellgröße, insbesondere für die kurzfristige Steigerung des Blutdrucks. Eine mögliche Ursache für die Heraufregulation der pro-hyperton wirkenden Effektoren Vasopressin und Renin könnte in dem renalen und intestinalen Verlust von über OCT2 transportierten Katecholaminen, wie Adrenalin und Noradrenalin, aufgrund einer erhöhten Expression des Kationentransporters begründet sein. Ein derartiger Ausgleich eines Katecholaminmangels ist bislang nicht beschrieben. Bekannt ist aber, dass ein Fehlen von Adrenalin und Noradrenalin beim Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase-Defekt zu einer schweren Hypotonie führt (Senard et al. 2006) und dass in der Intensivmedizin Katecholamine durch Gabe von Vasopressin eingespart werden können (Treschan et al. 2006).

Eine weitere Erklärung für eine Steigerung des Blutdrucks auf Ebene der Genexpression bieten die morphologischen Veränderungen der Niere im Sinne einer latenten Fibrose mit tubulärer Atrophie. Neben der Nierenarterienstenose und der generalisierten Arteriosklerose weisen auch viele degenerative Nierenerkrankungen, wie etwa die IgA-Nephropathie, im Verlauf aufgrund einer Widerstandserhöhung einen renalen Hypertonus auf (Ikee et al. 2006).

Das Peptidhormon Vasopressin ist neben der Regulation der Wasserausscheidung auch an der Entstehung des Durstempfindens und an der Temperaturregulation im Sinne einer Senkung der Körpertemperatur beteiligt (Antunes-Rodrigues et al. 2004, Steiner et al. 1998). Diese zusätzlichen Effekte des Vasopressins stehen im Einklang mit der oben erwähnten klinisch auffälligen

Neigung zum Schwitzen von GA-1-Patienten. Währenddessen wäre bei erhöhtem Vasopressinspiegel eher ein gesteigertes als ein reduziertes Durstempfinden zu erwarten.

Die Herunterregulation des  $V_2$ -Rezeptors in der Niere lässt sich am ehesten als Reaktion auf eine dauerhaft erhöhte Vasopressin-Konzentration des Blutes erklären. Ein sogenannter „Vasopressin-escape“ ist bereits in vielen Studien beschrieben worden. So reagieren etwa Ratten auf experimentell erhöhte Vasopressinspiegel des Blutes durch Gabe des Analogons dDAVP mit einer verminderten Expression des  $V_2$ -Rezeptors in der Niere (Saito et al. 2001).

Zur abschließenden Klärung der Ursachen und Effekte der Blutdruckregulation bei der *Gcdh*-defizienten Maus bedarf es direkter invasiver Messungen des Blutdrucks, Bestimmungen der Blutkonzentrationen von Vasopressin, ACE, Renin und Angiotensin II, z.B. mittels Radio-Immunoassay (RIA), sowie Messungen der Katecholamin-Konzentrationen im Urin. Eine Messung der genannten renalen vasoaktiven Substanzen im Blut ist nicht zuletzt indiziert, um eine isoliert renal lokalisierte Aktivierung des RAS im Sinne eines fibrogenen Stimulus auszuschließen.

### 5.3 Transportmechanismen für 3-OHGA und GA

Bei Mutation oder Defizienz der Glutaryl-CoA-Dehydrogenase kommt es aufgrund alternativer Abbauege des Substrats Glutaryl-CoA, sowohl bei betroffenen Patienten als auch bei *Gcdh*-defizienten Mäusen, über nicht identifizierte Enzymreaktionen zur Synthese und Akkumulation der organischen Säuren 3-OHGA und GA (Liesert et al. 1999, Koeller et al. 2002). Die beiden Metabolite lassen sich im Blut und Liquor nachweisen. Sie zeigen eine Anreicherung im Gehirn und werden renal ausgeschieden (Koeller et al 2002, Strauss et al. 2003). Während zur Wirkung von 3-OHGA und GA auf Neuronen und Gefäße bereits erste Modelle existieren (Kölker et al. 2004, Mühlhausen et al. 2006), sind Mechanismen und beteiligte Transporter für den Membrantransfer beider Säuren bislang nicht untersucht worden. Aufgrund der subzellulären Lokalisation der Synthese und der Verteilung dieser polaren Substanzen im Organismus müssen spezifische Transporter für die Ausschleusung von 3-OHGA und GA über die innere und äußere Mitochondrienmembran und für den Transfer über die

Plasmamembran von Hepatozyten und Neuronen, über verschiedene Gefäßendothelien, insbesondere die der Blut-Hirn-Schranke, sowie über die basolaterale und apikale Nierentubuluszellmembran postuliert werden. Zur Identifizierung von Transportproteinen, die an der renalen Exkretion der organischen Säuren 3-OHGA und GA beteiligt sein könnten, wurde mittels DNA-Microarray-Analysen nach erhöhten Transportergenexpressionen in den Nieren *Gcdh*-defizienter Mäuse gesucht (Tab. 4). Diesem Ansatz liegt der Gedanke zugrunde, dass möglicherweise Rückkopplungsmechanismen zwischen erhöhten Konzentrationen von 3-OHGA und GA und der Expression spezifischer Transporter existieren. Die Expression potentieller Kandidaten sollte dann durch Realtime-PCR-Analysen verifiziert werden. Während in der Arbeitsgruppe durchgeführte Studien eine erhöhte mRNA-Menge der Organische Anionen transportierenden Polypeptide Typ 1a1 (*Slc21a1*) und 1a6 (*Slc21a13*) nicht bestätigen konnten, zeigte sich für den Organische Anionen Transporter Typ 2 (*Slc22a7*), den Organische Kationen Transporter Typ 2 (OCT2, *Slc22a2*) sowie den Natriumabhängigen Dicarboxylat Transporter Typ 3 (NaDC3, *Slc13a3*) eine signifikant erhöhte Genexpression in der Niere 42 Tage alter *Gcdh*-defizienter Mäuse (Stellmer et al. 2007).

### 5.3.1 Bedeutung des Organische Kationen Transporters Typ 2 (OCT2)

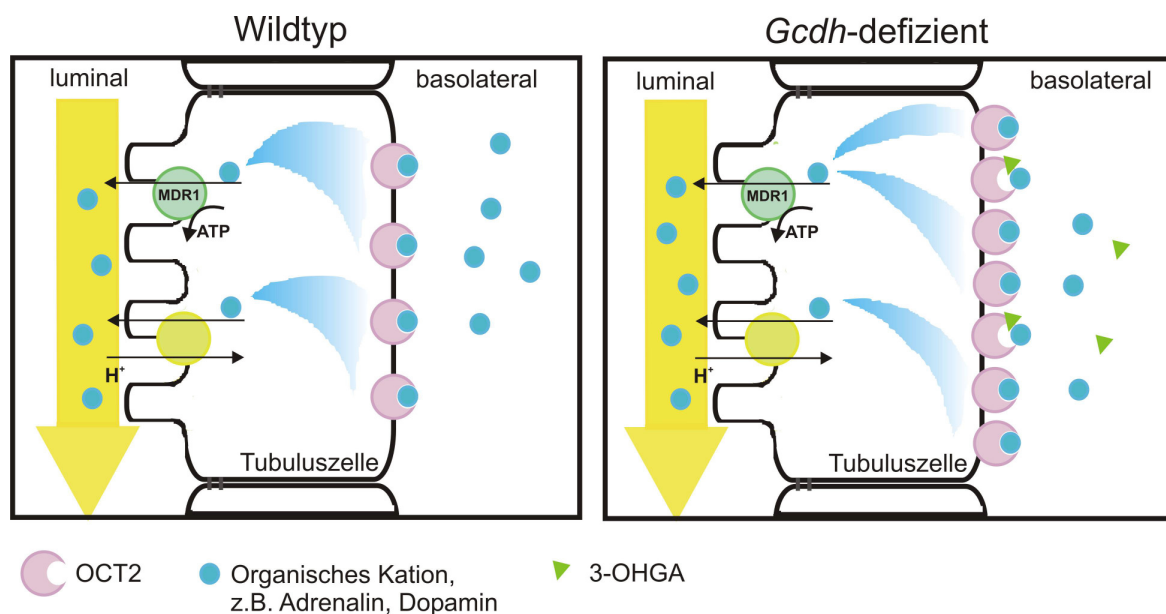
DNA-Microarray-Analysen zeigten eine Heraufregulation der renalen OCT2-Genexpression bei der *Gcdh*-defizienten Maus (Tab. 4; Nr. 53). Mittels Realtime-PCR konnte eine Vermehrung der OCT2-mRNA-Menge um den Faktor 1,7 in den Nieren weiblicher wie männlicher 42 Tage alter *Gcdh*-defizienter Tiere bestätigt werden (Abb. 11 A). Die Analysen beider Geschlechter erfolgten aufgrund geschlechtsspezifischer Expressionsunterschiede von OCT2 in der Niere (siehe 1.3.1.1, Slitt et al. 2002) sowie des geschlechtsabhängigen Ausmaßes der Progression der Nierenhypertrophie *Gcdh*-defizienter Mäuse (Abb. 6). Westernblot-Analysen belegten, dass die steady-state-Konzentration von OCT2 in den Nieren *Gcdh*-defizienter Tiere auch auf Proteinebene erhöht ist (Abb. 12). Während die Lokalisation und Substratspezifität des OCT2 bereits weitreichend charakterisiert sind (siehe hierzu 1.3.1.1), ist bezüglich Regulationsmechanismen zur Steuerung der Expression des Transporters bislang nur wenig bekannt. An



Ratten konnte gezeigt werden, dass das männliche Sexualhormon Testosteron zu einer Induktion der Transkription des OCT2-Gens führt, die mit einer erhöhten Aktivität des Kationen-Transporters einhergeht (Urakami et al. 2000). Unter Gabe des weiblichen Steroidhormons Estradiol sank die mRNA- und Proteinmenge sowie die OCT2-Aktivität jedoch ab. Weiterhin wurde von 5/6-nephrektomierten Ratten berichtet, die im Zuge des konsekutiven chronischen Nierenversagens verminderte Testosteron-Plasmaspiegel und herabgesetzte renale Expressionen des OCT2-Gens aufweisen, die durch Substitution des männlichen Steroids normalisiert werden konnten (Ji et al. 2002). *In vitro*-Studien zu Mechanismen der Transkriptionssteuerung von OCT2 an der Nierenepithelzelllinie LLC-PK1 postulieren eine Androgen-Rezeptor-abhängige Regulation und identifizierten zwei Androgen-responsive Elemente in der Promotorregion des OCT2-Gens (Asaka et al. 2006). Messungen der Testosteron-Konzentration im Serum 42 und 100 Tage alter männlicher *Gcdh*-defizienter Mäuse mittels RIA ergaben bei großen Schwankungen keine signifikanten Veränderungen im Vergleich mit entsprechenden Wildtyp-Tieren. Zur Analyse der OCT2-Expression unter Ausschluss etwaiger höherer systemischer Steuerungen wurden zwei *in vitro*-Ansätze gewählt. Sowohl Realtime-PCR- als auch Immunfluoreszenz-Mikroskopie-Analysen an primären Nierenrindenzellen ergaben eine vermehrte Expression des Kationen-Transporters bei *Gcdh*-Defizienz unabhängig von hormonellen Einflüssen (Abb. 11 B, 13). Dies macht eine auto- oder parakrine Stimulation der OCT2-Genexpression aufgrund *Gcdh*-Defizienz-spezifischer Metabolite, wie etwa 3-OHGA oder GA, über bislang ungeklärte Kaskaden wahrscheinlich.

Funktionelle *in vitro*-Studien an OCT2-überexprimierenden CHO-Zellen ergaben, dass OCT2 nicht in der Lage ist, Tritium-markierte 3-OHGA in die Zelle zu transportieren. Die organische Säure 3-OHGA ist aber in der Lage, die Aktivität des OCT2 bezüglich des Transports des Modellkations MPP um 30 Prozent zu hemmen (Abb. 15). Diese *cis*-inhibitorische Wirkung auf OCT2 kann die gesteigerte Expression des Kationen-Transporters um den Faktor 1,7 in den Nieren *Gcdh*-defizienter Mäuse im Sinne eines kompensatorischen Mechanismus zur Sicherstellung einer adäquaten renalen Kationen-Clearance gut erklären. Ließen sich die *in-vitro*-Daten auf das *in-vivo*-Modell der *Gcdh*-defizienten Maus übertragen, so wäre, bei mathematischer Korrektur der Hemmung des Kationen-

Transporters, mit einer effektiven Expressionssteigerung von OCT2 um den Faktor 1,2 zu rechnen (zur bildlichen Darstellung siehe Abb. 27). Eine derartige *cis*-Inhibition mit konsekutiver Heraufregulation der Genexpression ist für OCT2 bislang nicht beschrieben. Für andere Transporter hingegen konnten ähnliche Effekte bereits gefunden werden. So reagieren die Henle' Schleife und der distale Tubulus der Niere auf eine chronische Diuretika-Therapie mit Schleifendiuretika und Thiaziden mit einer verstärkten Genexpression der beiden von diesen Pharmaka gehemmten Natriumtransporter  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Kotransporter und  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ -Kotransporter (Na et al. 2003).



**Abb. 27: Modell zur effektiven Transportaktivität von OCT2 bei *Gcdh*-Defizienz**

Dargestellt ist eine Integration von *in vitro* nachgewiesenen Daten zur Hemmung der Aktivität des Kationen-Transporters OCT2 (violetter Transporter) durch das Anion 3-OHGA (grünes Dreieck) und *in vivo* gefundener renal gesteigerter Expression des Transporters bei *Gcdh*-Defizienz mit resultierend korrigierter Transportaktivität für organische Kationen (blaue Punkte).

Zur Untersuchung, ob OCT2 auch *in vivo* durch physiologische Konzentrationen von 3-OHGA in der Aktivität beeinflusst wird, wurden [<sup>14</sup>C]TEA-Verteilungsassays an 70 Tage alten Mäusen durchgeführt und die Transportaktivität in den einzelnen Organen indirekt über Messung der aufgenommenen Radioaktivität bestimmt. Es zeigte sich eine verstärkte Ansammlung des Modellkations [<sup>14</sup>C]TEA in der Leber, im Darm sowie in der Faeces der *Gcdh*-defizienten Tiere in Relation zu entsprechenden Wildtyp-Kontrollen (Abb. 14). In das Gehirn wurde weniger Radioaktivität aufgenommen, die Konzentration in der Niere und im Urin war unverändert. Diese Ergebnisse sprechen für eine effektive Kompensation der

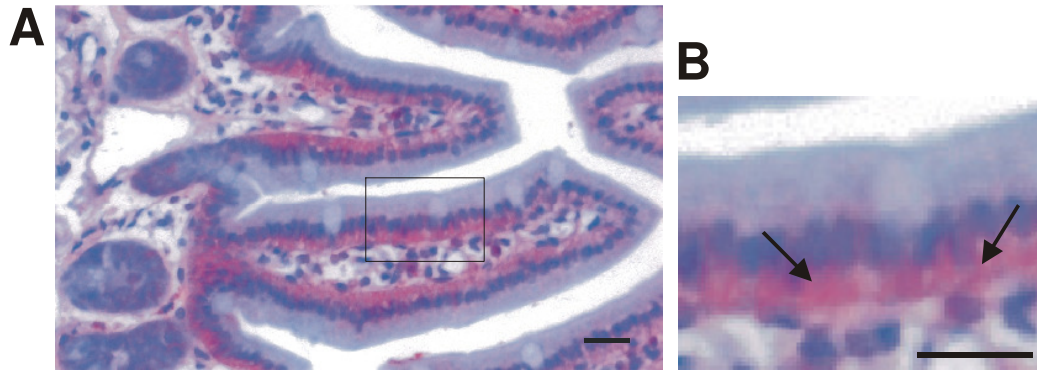
Hemmung von OCT2 durch 3-OHGA in der Niere mit konsekutiv normaler Kationenausscheidung über den Urin. Die geringe Aufnahme von [<sup>14</sup>C]TEA in das Gehirn ist überraschend, da in der Arbeitsgruppe durchgeführte DNA-Microarray-Analysen eine erhöhte Expression des OCT2-Gens im Cortex einer *Gcdh*-defizienten Maus zeigten. Sollte es im Gehirn aufgrund der 100- bis 1000-fach höheren Konzentration von 3-OHGA gegenüber dem Blut (Koeller et al. 2002, Strauss et al. 2003) und damit auch den übrigen Organen zu einer entsprechend starken Hemmung und verminderten Transportaktivität des OCT2 kommen, so wäre mit einer suffizienten Übernahme der Transportfunktion durch den Organische Kationen Transporter Typ 1 (OCT1) zu rechnen, wie es in Studien an OCT2-Single-Knock-out-Mäusen und OCT1/OCT2-Doppel-Knock-out-Mäusen gezeigt werden konnte (Jonker et al. 2003).

### 5.3.2 Bedeutung des Natrium-abhängigen Dicarboxylat Transporters Typ 3 (NaDC3)

Einer der Transporter, die im DNA-Microarray aus Nieren 42 Tage alter Mäuse beim *Gcdh*-defizienten Tier eine höhere Expression aufweisen als beim Wildtyp-Tier, ist der NaDC3 (Slc13a3, Tab. 4; Nr. 46). Die erhöhten mRNA-Spiegel des *Gcdh*-defizienten Tieres konnten mittels Realtime-PCR verifiziert werden (Abb. 16 B). Auf Proteinebene waren höhere NaDC3-Spiegel in der Niere allerdings nicht nachzuweisen, da der kommerziell erhältliche Antikörper im Westernblot nicht einsetzbar ist. Jedoch konnte die subzelluläre Lokalisation des NaDC3 an histologischen Schnitten von Nieren 42 Tage alter Mäuse eindeutig für alle proximalen Tubuluszellen an den Einfaltungen basolateraler Membranen nachgewiesen werden, ohne dass es aber gelang, quantitative Unterschiede in der Expression zwischen *Gcdh*-defizienten und Wildtyp-Mäusen aufzuzeigen.

Bemerkenswerterweise findet sich bei jungen (42 Tage alten) *Gcdh*-defizienten Mäusen in immunhistochemischen Untersuchungen eine basolaterale Lokalisation von NaDC3 im Dünndarm (Abb. 28). Diese Lokalisation des Dicarboxylat-Transporters ist bislang nicht beschrieben worden. Möglicherweise ist die Expression des NaDC3 im Darm funktionell bedeutsam für die unter 5.1.2.2 erwähnte altersabhängige Exkretion von 3-OHGA in die Faeces.

Das wichtigste Ergebnis dieses Teils der Arbeit war der Nachweis, dass NaDC3



**Abb. 28: Basolaterale Lokalisation von NaDC3 in Dünndarmzotten der Maus**

An histologischen Schnitten des Dünndarms wurde durch Immunhistochemie mit einem NaDC3-spezifischen Antikörper das Vorhandensein und die Lokalisation des Transporters nachgewiesen. A: Übersicht mit zwei Dünndarmzotten, die basolaterale Lokalisation zeigt sich als pinkfarbendes Band innerhalb der Zotten; Kasten: Areal der Vergrößerung in B. B: Die Pfeile zeigen die streng basale Färbung an, die die Kerngrenze nicht überschreitet. Balken: 20µm (Prof. Glatzel, Hamburg)

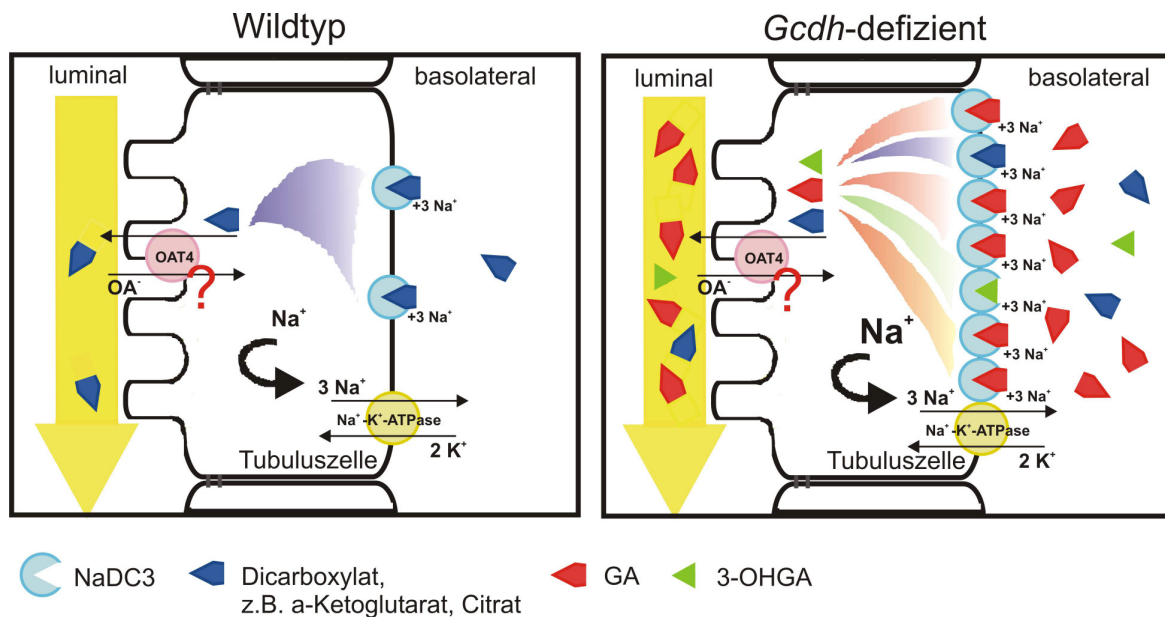
elektrogen den Transport von 3-OHGA vermittelt (Abb. 18). Dies ist die erste experimentelle Beschreibung eines Transporters für 3-OHGA. In Frosch-Oozyten exprimierter humaner NaDC3 induzierte 3-OHGA-Einwärtsströme von  $-13\text{nA}$  mit einer Kinetik, die etwa 50-fach höhere Konzentrationen an 3-OHGA erfordert als an GA ( $K_m[3\text{-OHGA}] = 0,95\text{mM}$ ,  $K_m[\text{GA}] = 0,02 - 0,04\text{mM}$ ; Burckhardt et al. 2005). NaDC3 ist am höchsten in Hirn und Nieren exprimiert und weist hochaffine Bindungsstellen für ein breites Spektrum an Dicarboxylat-haltigen Substraten auf, wie z.B.  $\alpha$ -Ketoglutarat, Succinat und GA (Burckhardt et al. 2005, Pajor et al. 2001). Neuere Studien an kultivierten Hirnzellen aus Ratten und Mäusen zeigten, dass NaDC3 ausschließlich in Astrozyten, nicht aber in Neuronen, lokalisiert ist. Im Gehirn scheint die Hauptfunktion des NaDC3 in der Bereitstellung von Intermediaten des Zitratzyklus, die in Astrozyten synthetisiert wurden, für Neurone sicherzustellen. Neurone benötigen diese Intermediate, die sie aufgrund eines Fehlens der Pyruvatcarboxylase nicht selber herstellen können, zur Synthese der Aminosäure-Neurotransmitter Glutamat und GABA sowie zur Energiebereitstellung (Hertz et al. 1999, Schousboe et al. 1997, Peng et al. 1991). Ob erhöhte cerebrale Konzentrationen an 3-OHGA und GA im Rahmen kataboler Krisen durch Konkurrenz die neuronale Versorgung mit Zitratzyklus-Intermediaten beeinträchtigen, ist bislang nicht geklärt. An *post mortem* gewonnenen Hirnbiopsien von Patienten mit GA-1 im basalen Status konnten mit einer Konzentration von 0,5 - 5mM ähnlich hohe 3-OHGA und GA-Spiegel gemessen werden, wie sie auch *Gcdh*-defiziente Mäuse unter basalen Bedingungen

aufweisen (Sauer et al. 2006). Während induzierter enzephalopathischer Krisen steigt hingegen die cerebrale Konzentration von 3-OHGA um 90 Prozent an (Goodman, persönliche Mitteilung).

In proximalen Tubuluszellen der Niere weist NaDC3, in Übereinstimmung mit den immunhistochemischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit, eine basolaterale Lokalisation auf und vermittelt so den Transport von Dicarboxylaten aus dem Interstitium in die Zelle hinein (Markovich et al. 2004, Abb. 29, links). Eine wichtige Funktion des NaDC3 besteht in der Aufnahme des Dicarboxylats  $\alpha$ -Ketoglutarat, das indirekt für die renale Sekretion einer Reihe von endo- und exogenen organischen Anionen, wie  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, Diuretika und nicht-steroidalen Antiphlogistika, über basolateralen Antiport, vermittelt durch die Organische Anionen Transporter OAT1 und OAT3, benötigt wird (Burckhardt et al. 2003, Dantzer 2002). Dicarboxylate, die nicht dem Antiport dienen oder intrazellulär weiter verstoffwechselt werden, gelangen vermutlich über multispezifische Transporter der luminalen Membran, beispielsweise den Organische Anionen Transporter Typ 4 (OAT4), in den Urin.

Unter basalen Bedingungen beträgt die Serum-GA-Konzentration der *Gcdh*-defizienten Mäuse etwa 0,15mM (Zinnanti et al. 2006). Zu der Serumkonzentration von 3-OHGA liegen bislang für die Maus keine Daten vor, bei Patienten mit GA-1 wurden Werte von 0,01-0,1 $\mu$ M (Strauss et al. 2003) ermittelt. Die durchschnittliche Dicarboxylat-Konzentration des Serums beträgt 0,05mM (Markovich et al. 2004). Es ist vorstellbar, dass es bei *Gcdh*-defizienten Mäusen in der Niere aufgrund der *in vitro* nachgewiesenen niedrigen  $K_m$  für den Transfer über NaDC3 und einer vermehrten Expression des Transporters zu einer relevanten NaDC3-vermittelten tubulären Sekretion von GA, möglicherweise unter Verdrängung der herkömmlichen Dicarboxylate kommt (Abb. 29). Die niedrigere Serumkonzentration von 3-OHGA sowie die hohe  $K_m$  für den Transport über NaDC3 legen die Vermutung nahe, dass neben NaDC3 noch weitere, bisher nicht identifizierte, Transportsysteme an dem Transfer des organischen Anions in die Nierentubuluszelle beteiligt sein könnten.

Welche Veränderungen des Dicarboxylat-Umsatzes an der proximalen Tubuluszelle während kataboler Krisen stattfinden und wie sich die Funktion der Nieren während des viertägigen Prozesses der Neuro- und Nephrodegeneration entwickelt, ist Aufgabe weiterer Studien. Unter experimentellen Bedingungen



**Abb. 29: Modell zur substratspezifischen Transportaktivität von NaDC3 bei Gcdh-Defizienz**  
 Dargestellt ist eine Integration von *in vitro* nachgewiesenen Daten zur Transportaktivität des Dicarboxylat-Transporters NaDC3 (hellblauer Transporter) für die Anionen GA (rote Fünfecke) und 3-OHGA (grüne Dreiecke) und *in vivo* gefundener renal gesteigerter Expression des Transporters bei *Gcdh*-Defizienz mit resultierend korrigierter Transportaktivität für herkömmliche Dicarboxylate (blaue Fünfecke).

konnte gezeigt werden, dass eine induzierte chronisch metabolische Azidose zu Veränderungen der renalen Expression zahlreicher Gene, unter anderem auch dem der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase 1 (*Pck1*) aus dem Stoffwechselweg der Gluconeogenese sowie dem des apikalen Dicarboxylat-Transporters NaDC1 (*Slc13a2*) führt (Curthoys et al. 2001, Aruga et al. 2000). Da sich beide Gene auch im DNA-Microarray der Niere der *Gcdh*-defizienten Maus heraufreguliert finden (Tab. 4; Nr. 8, 49) (wenngleich eine vermehrte Expression des NaDC1 nicht bestätigt werden konnte) und der Urin dieser Tiere signifikant saurer ist als der von Wildtyp-Mäusen (Abb. 20), gilt es weiterhin zu untersuchen, inwiefern die gesteigerte Expression sowohl von NaDC3 als auch von OCT2 der azidotischen Stoffwechsellage der *Gcdh*-defizienten Mäuse geschuldet ist.

Mit der Identifizierung des ersten Transporters, NaDC3, der direkt am Transport von 3-OHGA beteiligt ist und einem weiteren Transporter, OCT2, der durch erhöhte Konzentrationen an 3-OHGA in seiner Transportaktivität regulierbar ist, sind die ersten Zielmoleküle identifiziert worden, die in Zukunft möglicherweise rationale Therapien zur Absenkung hoher GA- und 3-OHGA-Spiegel ermöglichen.

## 5.4 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit gelang am Modell der *Gcdh*-defizienten Maus eine erste Charakterisierung von Veränderungen der Nierenmorphologie und -funktion, vor allem unter basalen Bedingungen, aber auch während induzierter enzephalopathischer Krisen, sowie eine Identifizierung spezifischer Transporter der Slc-Familie, die mit 3-OHGA interagieren. Die Arbeit hat aber auch viele Fragen unbeantwortet gelassen und neue Fragen aufgeworfen. Gänzlich unklar ist bislang, warum sich eine Krise nur bei jungen Tieren provozieren lässt. Auch sollte der zeitliche Ablauf der Entwicklung der Enzephalopathie, etwa mittels weiterer DNA-Microarray-Analysen, untersucht werden, um ein näheres Verständnis dieses Prozesses zu erlangen. Gleichzeitig muss geklärt werden, in welchem Beeinflussungs-Verhältnis Enzephalopathie und Nierendegeneration zueinander stehen. Weiterhin gilt es, sowohl nach weiteren Transportern für die bekannten Metabolite 3-OHGA und GA zu suchen, als auch neue GA-1-spezifische Metabolite, beispielsweise über Metabolomics-Analysen, zu identifizieren, die etwa aufgrund von Neuro- oder Nephrotoxizität an der Pathogenese der Erkrankung mitbeteiligt sein könnten. Die Etablierung von kultivierten Hirn- und Nierenzellen aus Wildtyp- und *Gcdh*-defizienten Mäusen ist anzustreben, um funktionelle Analysen auf zellulärer Ebene klarer und krankheitsrelevanter ausführen zu können.

Im Rahmen der klinischen Betreuung von Patienten mit GA-1 ist eine systematische Überwachung bezüglich Frühzeichen einer Nephropathie indiziert. Diese macht es zum einen möglich, etwaige renale Erkrankungen früh zu behandeln. Zum anderen dient sie dem Datengewinn zur Klärung der Frage, ob die bei der *Gcdh*-defizienten Maus beobachteten renalen Veränderungen ebenfalls bei Menschen mit *Gcdh*-Defizienz auftreten.

## 6 Zusammenfassung

Die Glutarazidurie Typ 1 (GA-1) ist eine primär neurometabolische Erkrankung, bei der es aufgrund eines Defekts der Glutaryl-CoA-Dehydrogenase (GCDH) zum gestörten Abbau spezifischer Aminosäuren und konsekutiv zur ubiquitären Akkumulation cytotoxischer Metabolite, wie 3-Hydroxyglutarsäure (3-OHGA), mit der Gefahr der Induktion einer akuten Enzephalopathie während kataboler Stoffwechsellagen kommt. Da *Gcdh*-defiziente Mäuse neben neurologischen Auffälligkeiten auch eine Nierenhypertrophie aufweisen, war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, renale Veränderungen bei diesen Tieren näher zu charakterisieren. Dabei konnte gezeigt werden, dass:

- der Nierenhypertrophie der *Gcdh*-defizienten Mäuse fibröse Veränderungen zu Grunde liegen, die unter Fütterung einer Hochproteindiät mit tubulären Atrophien einhergehen.
- die *Gcdh*-defizienten Mäuse unter Gabe von Hochproteindiät deutlich mehr Urin ausscheiden, im Gegensatz zu den Wildtyp-Tieren aber nicht die Trinkmenge dem erhöhten Wasserverlust anpassen.
- sich bei den *Gcdh*-defizienten Mäusen unter Hochproteindiät deutlich verringerte Konzentrationen der Elektrolyte Natrium, Kalium und Chlorid im Urin einstellen; Calcium dagegen vermehrt renal ausgeschieden wird.
- die Proteinausscheidung über den Urin bei den *Gcdh*-defizienten Mäusen, im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren, schon basal niedriger ist und unter Gabe von Hochproteindiät noch stärker abnimmt.
- bei den *Gcdh*-defizienten Mäusen auf mRNA-Ebene einige pro-hyperton wirkende Effektoren, wie Vasopressin und Renin, erhöht sind.
- in den Nieren der *Gcdh*-defizienten Mäuse der Organische Kationen Transporter Typ 2 (OCT2) verstärkt exprimiert wird und dass dieser nicht direkt am Transport von 3-OHGA beteiligt ist, aber von 3-OHGA in seiner Transportaktivität gehemmt werden kann.
- der Natrium-abhängige Dicarboxylat Transporter Typ 3 (NaDC3) der erste identifizierte und funktionell analysierte Transporter für 3-OHGA ist. Die Arbeit liefert damit zwei Zielproteine, OCT2 und NaDC3, die mögliche Kandidaten für rationale Therapien zur Senkung cytotoxischer Metabolite bei der GA-1 darstellen.



## 7 Literaturverzeichnis

- Aruga S, Wehrli S, Kaissling B, Moe OW, Preisig PA, Pajor AM, Alpern RJ (2000). Chronic metabolic acidosis increases NaDC-1 mRNA and protein abundance in rat kidney. *Kidney International* 58, 206-15.
- Asaka J, Terada T, Okuda M, Katsura T, Inui K (2006). Androgen receptor is responsible for rat organic cation transporter 2 gene regulation but not for rOCT1 and rOCT3. *Pharm Res* 23, 697-704.
- Antunes-Rodrigues J, De Castro M, Elias LLK, Valenca MM, McCann SM (2004). Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physio Rev* 84, 169-208.
- Balasubramanian S, Janakiraman L, Kumar SS, Muralinath S, Shivbalan S (2006). A reappraisal of the criteria to diagnose plasma leakage in dengue hemorrhagic fever. *Indian Pediatr* 43, 334-9.
- Bjugstad KB, Goodman SI, Freed CR (2000). Age at symptom onset predicts severity of motor impairment and clinical outcome of glutaric acidemia type 1. *J Pediatr* 137, 681-6.
- Blum H, Beier H, Gross HJ (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels. *Elektrophoresis* 8, 93-9.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-54.
- Brismar J, Ozand PT (1995). CT and MR of the brain in glutaric acidemia type I: a review of 59 published cases and a report of 5 new patients. *AJNR Am J Neuroradiol* 16, 675-83.
- Burckhardt BC, Burckhardt G (2003). Transport of organic anions across the basolateral membrane of proximal tubule cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 146, 95-158.
- Burckhardt BC, Lorenz J, Kobbe C, Buckhardt G (2005). Substrate specificity of the human renal sodium dicarboxylate cotransporter, hNaDC-3, under voltage-clamp conditions. *Am J Physiol Renal Physiol* 288, 792-9.
- Busquets C, Merinero B, Christensen E, Gelpi JL, Campistol J, Pineda M, Fernandez-Alvarez E, Prats JM, Sans A, Arteaga R, Marti M, Campos J, Martinez-Pardo M, Martinez-Bermejo A, Ruiz-Falco ML, Vaquerizo J, Orozco M, Ugarte M, Coll MJ, Ribes A (2000). Glutaryl-CoA dehydrogenase

- deficiency in Spain: evidence of two groups of patients, genetically, and biochemically distinct. *Pediatr Res* 48, 315-22.
- Curthoys NP, Gstraunthaler G (2001). Mechanism of increased renal gene expression during metabolic acidosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 281, 381-90.
- Dantzler WH (2002). Renal organic anion transport: a comparative and cellular perspective. *Biochim Biophys Acta* 1566, 169-81.
- Das AM, Lucke T, Ullrich K (2003). Glutaric aciduria 1: creatine supplementation restores creatinephosphate levels in mixed cortex cells from rat incubated with 3-hydroxyglutarate. *Mol Genet Metabol* 78, 108-11.
- Deodato F, Boenzi S, Santorelli FM, Dionisivici C (2006). Methylmalonic and propionic aciduria. *Am J Med Genet* 142, 104-12.
- Deng A, Munger KA, Valdivielso JM, Satriano J, Lortie M, Blantz RC, Thomsen SC (2003). Increased expression of Ornithine Decarboxylase in distal tubules of early diabetic rat kidneys. Are polyamines paracrine hypertrophic factors? *Diabetes* 52, 1235-9.
- Eddy AA (2000). Molecular basis of renal fibrosis. *Pediatr Nephrol* 15, 290-301.
- el-Essa MA, Rashed MS, Bakheet SM, Patay ZJ, Ozand PT (2000). Glutaric aciduria type II: observations in seven patients with neonatal- and late-onset disease. *J Perinatol* 20, 120-8.
- Forstner R, Hoffmann GF, Gassner I, Heideman P, De Klerk JB, Lawrenz-Wolf B, Doringe E, Weiss-Wichert P, Troger J, Colombo JP, Plochl E (1999). Glutaric aciduria type I: ultrasonographic demonstration of early signs. *Pediatr Radiol* 29, 138-43.
- Goodman SI, Markey SP, Moe PG, Miles BS, Teng CC (1975). Glutaric aciduria; a "new" disorder of amino acid metabolism. *Biochem Med* 12, 12-21.
- Goodman SI, Stein DE, Schlesinger S, Christensen E, Schwartz M, Greenberg CR, Elpeleg ON (1998). Glutaryl-CoA dehydrogenase mutations in glutaric acidemia (type I): review and report of thirty novel mutations. *Hum Mutat* 12, 141-4.
- Gordon N (2006). Glutaric aciduria types 1 and 2. *Brain Dev* 28, 136-40.
- Greenberg CR, Duncan AM, Gregory CA, Singal R, Goodman SI (1994). Assignment of human glutaryl-CoA dehydrogenase gene (GCDH) to the

- short arm of chromosome 19 (19p13.2) by in situ hybridization and somatic cell hybrid analysis. *Genomics* 21, 289-90.
- Gründemann D, Liebich G, Kiefer N, Köster S, Schömig E (1999). Selective substrates for non-neuronal monoamine transporters. *Mol Pharmacol* 65, 1-10.
- Hayer-Zillgen M, Brüss M, Bönisch H (2002). Expression and pharmacological profile of the human organic cation transporters hOCT1, hOCT2 and hOCT3. *Br J Pharmacol* 136, 829-836.
- Hedinger MA, Romero MF, Peng JB, Rolfs A, Takanaga H, Bruford EA (2004). The ABC of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. *Eur J Physiology* 447, 465-8.
- Hertz L, Dringen R, Schousboe A, Robinson SR (1999). Astrocytes: glutamate producers for neurons. *J Neurosci Res* 15, 417-28.
- Hörster F, Hoffmann GF (2004). Pathophysiology, diagnosis, and treatment of methylmalonic aciduria - recent advances and new challenges. *Pediatr Nephrol* 19,1071-4.
- Hoffmann GF, Gibson KM, Trefz FK, Nyhan WL, Bremer HJ, Rating D (1994). Neurological manifestations of organic acid disorders. *Eur J Pediatr* 153, 94-100.
- Hoffmann GF, Athanassopoulos S, Burlina AB, Duran M, de Klerk JB, Lehnert W, Leonard JV, Monavari AA, Muller E, Muntau AC, Naughten ER, Plecko-Starting B, Superti-Furga A, Zschocke J, Christensen E (1996). Clinical course, early diagnosis, treatment, and prevention of disease in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Neuropediatrics* 27, 115-23.
- Huang W, Wang H, Kekuda R, Fei Y, Friedrich A, Wang J, Conway SJ, Cameron RS, Leibach FH, Ganapathy V (2000). Transport of N-acetylaspartate by the Na(+)-dependent high-affinity dicarboxylate transporter NaDC3 and its relevance to the expression of the transporter in the brain. *J Pharmacol Exp Ther* 295, 392-403.
- Ikee R, Kobayashi S, Saigusa T, Namikoshi T, Yamada M, Hemmi N, Imakiire T, Kikuchi Y, Suzuki S, Miura S (2006). Impact of hypertension and hypertension-related vascular lesions in IgA nephropathy. *Hypertens Res* 29, 15-22.

- Ji L, Masuda S, Saito H, Inui K (2002). Down-regulation of rat organic cation transporter rOCT2 by 5/6 nephrectomy. *Kidney Int* 62, 514-24.
- Jonker JW, Wagenaar E, Van Eijl S, Schinkel AH (2003). Deficiency in the organic cation transporters 1 and 2 (Oct1/Oct2 [Slc22a1/Slc22a2]) in mice abolishes renal secretion of organic cations. *Mol Cell Biol* 23, 7902-8.
- Takehi M, Koyabu N, Nakamura T, Uchiumi T, Kuwanu M, Ohtani H, Sawada Y (2002). Functional characterization of mouse cation transporter mOCT2 compared with mOCT1. *Biochem Biophys Res Commun* 296, 644-650.
- Karbach U, Kricke J, Meyer-Wentrup F, Gorboulev V, Volk C, Loffing-Cueni D, Kaissling B, Bachmann S, Koepsell H (2000). Localization of organic cation transporters OCT1 and OCT2 in rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 279, 679-687.
- Kazanas N, Ely RW, Fields ML, Erdman JW (1984). Toxic effects of fermented and unfermented sorghum meal diets naturally contaminated with mycotoxins. *Appl Environ Microbiol* 47, 1118-25.
- Klinke R, Silbernagl S (2001). Lehrbuch der Physiologie, 3. Auflage. Thieme, Stuttgart New York.
- Kölker S, Koeller DM, Okun JG, Hoffmann GF (2004). Pathomechanisms of neurodegeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Ann Neurol* 55, 7-12.
- Kölker S, Garbade SF, Greenberg CR, Leonard JV, Saudubray JM, Ribes A, Kalkanoglu HS, Lund AM, Merinero B, Wajner M, Troncoso M, Williams M, Walter JH, Campistol J, Marti-Herrero M, Caswill M, Burlina AB, Lagler F, Maier EM, Schwahn B, Tokatli A, Dursun A, Coskun T, Chalmers RA, Koeller DM, Zschocke J, Christensen E, Burgard P, Hoffmann GF (2006). Natural history, outcome, and treatment efficacy in children and adults with glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatr Res* 59, 840-847.
- Koeller DM, Woontner M, Crnic LS, Kleinschmidt-DeMasters B, Stephens J, Hunt EL, Goodman SI (2002). Biochemical, pathologic and behavioral analysis of a mouse model of glutaric acidemia type I. *Hum Mol Genet* 11, 347-57.
- Koepsell H (1998). Organic cation transporters in intestine, kidney, liver, and brain. *Annu Rev Physiol* 60, 246-66.
- Koepsell H, Endou H (2004). The SLC22 drug transporter family. *Eur J Physiol* 447, 666-676.

- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- Liesert M, Zschocke J, Hoffmann GF, Muhlhauser N, Buckel W (1999). Biochemistry of glutaric aciduria type I: activities of *in vitro* expressed wild-type and mutant cDNA encoding human glutaryl-CoA dehydrogenase. *J Inherit Metab Dis* 22, 256-8.
- Lips KS, Volk C, Schmitt BM, Pfeil U, Arndt P, Miska D, Ermert L, Kummer W, Koepsell H (2005). Polyspecific cation transporters mediate luminal release of acetylcholine from bronchial epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33, 79-88.
- Lindner M, Kolker S, Schulze A, Christensen E, Greenberg CR, Hoffmann GF (2004). Neonatal screening for glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 27, 851-9.
- Liu Y (2006). Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney International* 69, 213-7.
- Löffler G, Petrides PE (1998). Biochemie und Pathobiochemie, 6. Auflage. Springer, Berlin Heidelberg New York.
- Loehr JP, Goodman SI, Ferman FE (1990). Glutaric acidemia type II: heterogeneity of clinical and biochemical phenotypes. *Pediatr Res* 27, 311-5.
- Markovich D, Murer H (2004). The SLC13 gene family of sodium sulphate/carboxylate cotransporters. *Eur J Physiol* 447, 594-602.
- Meyburg J, Schulze A, Kohlmüller D, Linderkamp O, Mayatepek E (2001). Postnatal changes in neonatal acylcarnitine profile. *Pediatr Res*. 49, 125-9.
- Morgensen CE (2003). Microalbuminuria and hypertension with focus on type 1 and type 2 diabetes. *J Intern Med* 254, 45-66.
- Morton DH, Bennett MJ, Seargeant LE, Nichter CA, Kelley RI (1991). Glutaric aciduria type I: a common cause of episodic encephalopathy and spastic paralysis in the Amish of Lancaster County, Pennsylvania. *Am J Med Genet*. 41, 89-95.
- Mühlhausen C, Ergun S, Strauss KA, Koeller DM, Crnic L, Woontner M, Goodman SI, Ullrich K, Bräulke T (2004). Vascular dysfunction as an additional pathomechanism in glutaric aciduria type I. *J Inherit Metab Dis* 27, 829-34.

- Mühlhausen C, Hoffmann GF, Strauss KA, Kolker S, Okun JG, Greenberg CR, Naughten ER, Ullrich K (2004). Maintenance treatment of glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 27, 885-92.
- Mühlhausen C, Ott N, Chalajour F, Tilki D, Freudenberg F, Shahhossini M, Thiem J, Ullrich K, Braulke T, Ergun S (2006). Endothelial effects of 3-hydroxyglutaric acid: implications for glutaric aciduria type I. *Pediatr Res*. 59, 196-202.
- Na KY, Oh YK, Han JS, Joo KW, Lee JS, Earm JH, Knepper MA, Kim GH (2003). Upregulation of Na-transporter abundances in response to chronic thiazide or loop diuretic treatment in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 284, 133-43.
- Nangaku M (2004). Mechanisms of tubulointerstitial injury in the kidney: final common pathways to end-stage renal failure. *Intern Med* 42, 9-17.
- Okada H, Inoue T, Kanno Y, Kobayashi T, Watanabe Y, Kopp JB, Carey RM, Suzuki H (2002). Interstitial fibroblast-like cells express renin-angiotensin system components in a fibrosing murine kidney. *Am J Pathol* 160, 765-72.
- Ott N (2005). Untersuchung zu *in vitro* und *in vivo* (*Mus musculus*, Linneaus L., 1758) Effekten von 3-Hydroxyglutarsäure. PhD - Dissertation. Universität Hamburg.
- Pajor AM, Gangula R, Yao X (2001). Cloning and functional characterization of a high-affinity Na(+)/dicarboxylate cotransporter from mouse brain. *Am J Physiol Cell Physiol* 280, 1215-23.
- Peng LA, Schousboe A, Hertz L (1991). Utilization of alpha-ketoglutarate as a precursor for transmitter glutamate in cultured cerebellar granule cells. *Neurochem Res* 16, 29-34.
- Pöge AP, Autschbach F, Korall H, Trefz FK, Mayatepek E (1997). Early clinical manifestation of glutaric aciduria type 1 and nephrotic syndrome during the first months of life. *Acta Paediatr* 86, 1144-7.
- Renz-Polster H, Krautzig S, Braun J (2004). Basislehrbuch Innere Medizin, 3. Auflage. Urban & Fischer, München Jena.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-91.

- Saito T, Higashiyama M, Nagasaka S, Sesaki S, Saito T, Ishikawa S (2001). Role of aquaporin-2 gene expression in hyponatremic rats with chronic vasopressin-induced antidiuresis. *Kidney International* 60, 1266-76.
- Sauer SW, Okun JG, Schwab MA, Crnic LR, Hoffmann GF, Goodman SI, Koeller DM, Kölker S (2005). Bioenergetics in Glutaryl-Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency. A role for glutaryl-coenzyme A. *J Biol Chem* 280, 21830-6.
- Sauer SW, Okun JG, Fricker G, Mahringer A, Müller I, Crnic LR, Mühlhausen C, Hoffmann GF, Hörster F, Goodman SI, Harding CO, Koeller DM, Kölker S (2006). Intracerebral accumulation of glutaric and 3-hydroxyglutaric acids secondary to limited flux across the blood-brain barrier constitute a biochemical risk factor for neurodegeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Neurochemistry* 97, 899-910.
- Schousboe A, Westergaard N, Waagepetersen HS, Larsson OM, Bakken IJ, Sonnewald U (1997). Trafficking between glia and neurons of TCA cycle intermediates and related metabolites. *Glia* 21, 99-105.
- Seaton B, Ali A (1984). Simplified manual high performance clinical chemistry methods for developing countries. *Med Lab Sci* 41, 327-36.
- Senard JM, Rouet P (2006). Dopamine beta-hydroxylase deficiency. *Orphanet J Rare Dis* 30, 1-7.
- Slitt AL, Cherrington NJ, Hartley DP, Leazer TM, Klaassen CD (2002). Tissue distribution and renal developmental changes in rat organic cation transporter mRNA levels. *Drug Metab Dispos* 30, 212-219.
- Steiner AA, Carnio EC, Antunes-Rodrigues J, Branco LG (1998). Role of nitric oxide in systemic vasopressin-induced hypothermia. *Am J Physiol* 275, 937-41.
- Stellmer F, Keyser B, Burckhardt BC, Koepsell H, Streichert T, Glatzel M, Jabs S, Thiem J, Herdering W, Koeller DM, Goodman SI, Lukacs Z, Ullrich K, Burckhardt G, Bräulke T, Mühlhausen C (2007). 3-Hydroxyglutaric acid is transported via the sodium-dependent dicarboxylate transporter NaDC3. *J Mol Med, in press*.
- Strauss KA, Puffenberger EG, Robinson DL, Morton DH (2003). Type I glutaric aciduria, part 1: natural history of 77 patients. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 121, 38-52.

- Strauss KA, Morton DH (2003) Type I glutaric aciduria, part 2: a model of acute striatal necrosis. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 121, 53-70.
- Strutz F, Müller GA (2006). Renal fibrosis and the origin of the renal fibroblast. *Nephrol Dial Transplant* (im Druck).
- Tauson AH, Hansen NE, Wamberg S (2001). High versus low protein diets to mink – postprandial plasma urea and creatinine response, osmotic load and pattern of nitrogen and electrolyte excretion. *Arch Tierernahr* 54, 141-58.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4.
- Treschan TA, Peters J (2006). The vasopressin system: physiology and clinical strategies. *Anesthesiology* 105, 599-612.
- Ullrich K, Flott-Rahmel B, Schluff P, Musshoff U, Das A, Lucke T, Steinfeld R, Christensen E, Jakobs C, Ludolph A, Neu A, Roper R (1999). Glutaric aciduria type I: pathomechanisms of neurodegeneration. *J Inherit Metab Dis* 22, 392-403.
- Urakami Y, Okuda M, Saito H, Inui K (2000). Hormonal regulation of organic cation transporter OCT2 expression in rat kidney. *FEBS Lett* 473, 173-6.
- Vallera DA, Carroll SF, Snover DC, Carlson GJ, Blazar BR (1991). Toxicity and efficacy of anti-T-cell ricin toxin A chain immunotoxins in a murine model of established graft-versus-host disease induced across the major histocompatibility barrier. *Blood* 77, 182-94.
- Wang J, Chen X, Zhu H, Peng L, Hong Q (2003). Relationship between aging and renal high-affinity Sodium-dependent Dicarboxylate Cotransporter-3. *J Gerontol* 10, 879-888.
- Westover JB, Goodman SI, Frerman FE (2001). Binding, hydration, and decarboxylation of the reaction intermediate glutaconyl-coenzyme A by human glutaryl-CoA dehydrogenase. *Biochemistry* 40, 14106-14.
- Yodoya E, Wada M, Shimada A, Katsukawa H, Okada N, Yamamoto A, Ganapathy V, Fujita T (2006). Functional and molecular identification of sodium-coupled dicarboxylate transporters in rat primary cultured cerebrocortical astrocytes and neurons. *J Neurochem* 97, 162-73.



Zinnanti WJ, Lazovic J, Wolpert EB, Antonetti DA, Smith MB, Connor JR, Woontner M, Goodman SI, Cheng KC (2006). A diet-induced mouse model for glutaric aciduria type I. *Brain* 129, 899-910.

Zinnanti WJ, Lazovic J, Wolpert EB, Antonetti DA, Smith MB, Connor JR, Woontner M, Goodman SI, Cheng KC (2006). New insights for glutaric aciduria type I. *Brain* 129, e55.

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin converting enzyme
A. dest.	destilliertes Wasser
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinder-Serumalbumin
cDNA	copy-DNA (zur mRNA komplementäre DNA)
CHO	chinesische Hamster-Ovar (-zellen)
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FKS	fötales Kälberserum
GA	Glutarsäure
GA-1	Glutarazidurie Typ 1
GCDH	Glutaryl-CoA-Dehydrogenase
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRP	horseradish peroxidase
i.v.	intravenös
kB	kilo Basen
kDa	kilo Dalton
MDR1	Multi Drug Resistance Protein Typ 1
MPP	1-Methyl-4-Phenylpyridinium
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
NaDC	Natrium-abhängiger Dicarboxylat Transporter
OAT	Organische Anionen Transporter

OATP	Organische Anionen transportierendes Peptid
OCT	Organische Kationen Transporter
OD	optische Dichte
ODC	Ornithin-Decarboxylase
3-OHGA	3-Hydroxyglutarsäure
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pfa	Paraformaldehyd
PNRZ	primäre Nierenrindenzellen
PNS	postnukleärer Überstand
RAS	Renin-Angiotensin-System
RIA	Radio-Immunassay
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Reverse Transkription
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLC	Solute Carrier
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEA	Tetraethylammonium
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TX-100	Triton X-100
+/+	Wildtyp
-/-	Knock-out (Gen-defizient)

Bei einigen Begriffen, wie z.B. blot und well, wurden die englischen Fachtermini verwendet, da in der deutschsprachigen Fachliteratur eine Übersetzung unüblich ist.

## 8.2 Primer und Schmelztemperaturen

<b>Maus-Gen-spezifische Primer</b>	<b>Sequenz (5'-3')</b>	<b>Annealing</b>
ACE	for ATT AAG CAA TGC ACA CGG GT rev CAA GAA GGC GAT TTT CTC TA	49°C
Angiotensinogen	for TCT TTC TAC CTT GGA TCC TT rev GTC AGT GGA TAA ATC CAG AG	53°C
Aquaporin 2	for CGG TGA GCC TCA AGA AGG GT rev AGA TGG ACG AGC ACT TTT AC	51°C
Aquaporin 4	for AAA TTT TAA AAC AGA AAT CT rev CCC TCC GAG GTA GTT TAT AA	45°C
GAPDH	for TCA TCA ACG GGA AGC CCA TCA CCA TCT TC rev GTC TTC TGG TTG GCA GTA ATG GCA TGG AC	61°C
GCDH (R21/F13)	for CTT CCG TAA CTA CTG GCA GGA GCG G rev AGC TCT CGG GTC AGA AGC CCA TAG G	62°C
NaDC1	for GGC ACT ATG GGC CTA TCG C rev ACA CCA CAG CAG CGC CAT	50°C
NaDC3	for CAC GGA GAT GCA GTT TCT TG rev AGA TGT TTC TGC GGT GTT CC	52°C
OCT2	for TTT CAG TCA TTA GTG AAC GT rev ATC AGG AGC CCA ACA GTA AA	56°C
Ornithin-Decarboxylase	for TTA CCT AGG CCA AAT TGG TG rev GAC GAC TGT CAG CAG TTG TT	53°C
Renin	for AAG AGG CCT TCC TTG ACC AA rev TCA AAC TTG GCC AGC ATG AA	53°C
Vasopressin	for ACG CTC TCC GCT TGT TTC CT rev CGC GGG TGA GGC GGA AAA AA	61°C
V2-Rezeptor	for AAA TGG CAG TGG GGT ATT TG rev GTC ATC CTC ACG GTC TTG GC	57°C

## 8.3 Bereits vorgestellte Ergebnisse

### Artikel:

Stellmer F, Keyser B, Burckhardt BC, Koepsell H, Streichert T, Glatzel M, Jabs S, Thiem J, Herdering W, Koeller DM, Goodman SI, Lukacs Z, Ullrich K, Burckhardt G, Braulke T, Mühlhausen C (2007). 3-Hydroxyglutaric acid is transported via the sodium-dependent dicarboxylate transporter NaDC3. *J Mol Med, in press.*

### Abstract:

Keyser B, Stellmer F, Ullrich K, Braulke T, Mühlhausen C (2006). Effects of 3-hydroxyglutaric acid on brain microvascular permeability in a GA1 mouse model. *Eur J Cell Biol* 85 Suppl. 56, 66.

## 8.4 Lebenslauf

Name: Franziska Stellmer

Geburtstag: 05. April 1982

Geburtsort: Hamburg

Familienstand: ledig

### Schulbildung:

1988 – 1992 Grundschule St. Antonius, Hamburg

1992 – 2001 Sophie-Barat-Schule, Hamburg  
Abschluss: Abitur

### Studium:

2001 – 2003 Grundstudium der Medizin in Hamburg  
– Physikum

ab 2003 Hauptstudium der Medizin in Hamburg

2004 – 2006 Medizindoktorandin in der Kinderklinik,  
Arbeitsbereich Molekularbiologie, UKE Hamburg  
und Kollegiatin des Graduiertenkollegs 336

Hamburg, Februar 2007

Franziska Stellmer

## 8.5 Erklärung

### EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

.....

# Danke schön!

Ich danke

Thomas Braulke und Chris Mühlhausen  
für die kompetente, engagierte, stetige und freundliche Betreuung

Britta Keyser  
für die Freundschaft sowie für tausend größere und zehntausend kleinere  
Gefallen

Nicola Ott  
für die geduldige Einarbeitung

Herrn Prof. Ullrich  
für die klinische Betreuung des Projekts

dem Graduiertenkolleg 336 und insbesondere Herrn Prof. Seitz  
für die Vermittlung des Themas sowie geistige und finanzielle Förderung

Herrn Prof. Goodman  
für die Bereitstellung der *Gcdh*-defizienten Mäuse

dem freundlichen Team aus der Tierhaltung  
für die engagierte Tierpflege

Frau Dr. Burckhardt und Herrn Prof. Koepsell  
für die funktionellen Studien zu NaDC3 und OCT2

Herrn Prof. Glatzel, Frau Prof. Lüllmann-Rauch und Herrn Prof. Helmchen  
für die histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen der Nieren

den noch nicht erwähnten Zeitgenossen aus dem Labor, Anne-Hélène, Armin,  
Arne, Bastian, Bernd, Bettina, Claudia, Denise, Ilona, Inke, Juliane, Malte, Marta,  
Sandra Ö., Sandra P. Stephan St., Stephan T. und Sylvia,  
für spaßige Zusammenarbeit und fröhliches Feiern

den Mäusen  
für ihr Leben und ihre Nierchen

Freunden  
für das Interesse am Thema im Allgemeinen und dem Befinden der Tiere im  
Speziellen sowie für moralische Unterstützung

Simon  
für kompetentes sonntägliches Abfüllen von Mausurin

den lieben Eltern  
für Alles