

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Arbeitsbereich Molekularbiologie

Leiter: Prof. Dr. rer. nat. T. Brulke

Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin

Direktor: Prof. Dr. med. Kurt Ullrich

Untersuchungen zur induzierten metabolischen Krise im Tiermodell der Glutarazidurie Typ I

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Bastian Thies

aus Aachen

Hamburg 2010

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 31.08.2011

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. T. Bräulke

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. M. Kemper

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. H. Ehmke

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
1 Einleitung	7
1.1 Glutarazidurie Typ I.....	7
1.2 <i>Gcdh</i> -defiziente Maus.....	10
1.3 Rolle von Transportproteinen bei GA1	12
1.3.1 Natriumabhängiger Dicarboxylat Transporter Typ 3 (NaC3)	17
1.3.2 Organischer Anionentransporter 1 (OAT1).....	17
1.3.3 Organischer Anionentransporter 2 (OAT2).....	17
1.3.4 Organisches anionentransportierendes Polypeptid 5 (Oatp1a6).....	18
1.3.5 Urea-Transporters A (UT-A).....	18
1.3.6 Aquaporin 2 (AQP2).....	19
1.3.7 Aquaporin 4 (AQP4).....	19
1.3.8 Natrium-abhängiger neutraler Aminosäure-Transporter 5 (SNAT5)	19
1.4 Rolle von ACE, HMGCS2 und PEPCK bei GA1.....	20
1.4.1 Angiotensin Converting Enzyme (ACE)	20
1.4.2 Mitochondriale 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A Synthase (HMGCS2)	20
1.4.3 Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (PEPCK)	21
2 Zielsetzung	22
3 Material und Methoden	23
3.1 Material.....	23
3.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	23
3.1.2 Enzyme und Nukleotide	23
3.1.3 Proteine und Proteinstandards.....	24
3.1.4 DNA-Standards.....	24
3.1.5 Kits.....	24
3.1.6 Puffer und Lösungen	24
3.1.7 Antikörper	25
3.1.7.1 Primäre AK	25
3.1.7.2 HRP-gekoppelte Sekundäre AK.....	25
3.1.8 Verbrauchsmaterialien	25
3.1.9 Geräte	25
3.2 Methoden	27
3.2.1 Genotypisierung.....	27

3.2.1.1	Isolierung genomischer DNA.....	27
3.2.1.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung.....	28
3.2.1.3	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	28
3.2.1.4	DNA-Elektrophorese	28
3.2.1.5	Tandem-Massenspektroskopie.....	29
3.2.2	Untersuchung der mRNA-Expression.....	29
3.2.2.1	RNA-Isolierung	30
3.2.2.2	cDNA-Synthese und quantitative RT-PCR	30
3.2.2.3	Microarray-Analyse.....	31
3.2.3	Proteinquantifizierung, SDS-Page und Western Blot.....	32
3.2.3.1	Proteinbestimmung in Organextrakten, Astrozyten und Neuronen	32
3.2.3.2	Isolierung von Membranproteinen.....	33
3.2.3.3	Gesamtproteinquantifizierung.....	33
3.2.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Tricin-SDS-PAGE)	33
3.2.3.5	Western Blot	34
3.2.4	Aminosäuren-Konzentration im Blut	35
3.2.5	Ammoniak-Konzentration im Blut	35
3.2.6	Hämoglobin-Nachweis im Urin	36
3.2.7	Urin-Mikroskopie	36
3.2.8	Tierexperimentelle Arbeit	36
3.2.8.1	Tierhaltung.....	36
3.2.8.2	Hochproteindiät.....	36
3.2.8.3	Gewinnung des Gewebematerials.....	37
3.2.9	Statistik.....	37
4	Ergebnisse	38
4.1	Etablierung der induzierten encephalopathischen Krise.....	38
4.1.1	Überlebensdauer der <i>Gcdh</i> ^{-/-} Mäuse unter Hochproteindiät	38
4.1.2	Gewichtsentwicklung der <i>Gcdh</i> ^{-/-} Mäuse unter Hochproteindiät.....	39
4.1.3	Reversibilität von Folgen der Hochproteindiät.....	40
4.1.3.1	Überleben und Symptome.....	41
4.1.3.2	Gewichtsverlauf	41
4.2	Genexpression in der Niere von <i>Gcdh</i> ^{-/-} Mäusen vor und während der induzierten encephalopathischen Krise.....	42
4.2.1	<i>NaC3</i> -Expression im Nierengewebe.....	42
4.2.2	Renale organische Anionentransporter	43
4.2.2.1	Genexpression von <i>Oat1</i> im Nierengewebe	44

4.2.2.2 Proteinquantifizierung von <i>Oat1</i> im Nierengewebe.....	47
4.2.3 Genexpression von <i>Oat2</i> im Nierengewebe	50
4.2.4 Genexpression von <i>Oatp1a6</i> im Nierengewebe	51
4.2.5 Genexpression von <i>Ut-A</i> im Nierengewebe.....	52
4.2.6 Genexpression von <i>Aqp2</i> im Nierengewebe.....	53
4.2.7 Genexpression von <i>Ace</i> im Nierengewebe	54
4.2.8 Genexpression von <i>Pepck</i> im Nierengewebe.....	55
4.2.9 Genexpressionen im Nierengewebe von <i>Oat2</i> , <i>Oatp1a6</i> , <i>Ace</i> und <i>Ut-A</i> nach 36 Stunden Hochproteindiät	56
4.2.10 Reversibilität der mRNA-Spiegel von <i>Oat2</i> , <i>Oatp1a6</i> , <i>Ace</i> und <i>Ut-A</i> im Nierengewebe ..	58
4.3 Expressionsuntersuchungen am Hirnstammgewebe	59
4.3.1 Genexpression von <i>Aqp4</i> im Hirnstammgewebe.....	59
4.3.2 Genexpression von <i>Snat5</i> im Hirnstammgewebe.....	61
4.3.3 Expression von <i>Hmgcs2</i>	62
4.4 Metabolischer Status während der induzierten metabolischen Krise	64
4.4.1 Aminosäuren-Konzentrationen im Blut	64
4.4.2 Induktion einer metabolischen Azidose.....	66
4.4.3 Ammoniak-Konzentration im Blut	68
4.5 Veränderungen im Urin vor und während der induzierten encephalopathischen Krise	69
4.5.1 Hämoglobinnachweis mit Urin-Teststreifen	69
4.5.2 Mikroskopische Untersuchung des Urins	71
5 Diskussion	72
5.1 Renal exprimierte Transporter organischer Anionen.....	72
5.2 <i>Aqp2</i> - und <i>Ut-A</i> -mRNA-Expression im Nierengewebe	76
5.3 Hämaturie	76
5.4 Kataboler Metabolismus der <i>Gcdh</i> ^{-/-} Mäuse unter Hochproteindiät	78
5.5 Induktion einer metabolischen Azidose	78
5.6 Aminosäuren- und Ammoniak-Konzentrationen im Blut	79
5.7 <i>Aqp4</i> - und <i>Snat5</i> -Expression im Hirnstammgewebe	81
5.8 <i>Hmgcs2</i> -Expression im Hirnstammgewebe.....	84
6 Zusammenfassung.....	85
7 Literatur	87
8 Anhang.....	96
8.1 Abkürzungsverzeichnis	96
8.2 Microarray aus Hirnstammgewebe	99
8.3 Primer & Sonden.....	102

8.3.1 Gene Expression Assays	102
8.3.2 Primer	102
8.4 Publikationen und Kongressbeiträge.....	103
8.5 Lebenslauf.....	104
8.6 Eidesstaatliche Versicherung.....	105
Danksagung.....	106

1 Einleitung

1.1 Glutarazidurie Typ I

Die Glutarazidurie Typ I (GA1) ist eine autosomal rezessive Stoffwechselerkrankung, die erstmals 1975 von Stephen I. Goodman beschrieben wurde (Goodman et al. 1975). Ursache ist die Defizienz des mitochondrialen Enzyms Glutaryl-CoA-Dehydrogenase (GCDH). Die GCDH ist beteiligt am Abbau der Aminosäuren Lysin, Hydroxylysin und Tryptophan. Sie katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Glutaryl-CoA über Glutaconyl-CoA zu Crotonyl-CoA (Abbildung 1).

Aus den akkumulierenden Substraten entstehen die pathologischen Metabolite Glutarsäure (GA) und 3-Hydroxyglutarsäure (3OHGA). Erhöhte Konzentrationen dieser organischen Säuren können in allen Geweben und Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden (Koeller et al. 2002). Die Ausscheidung von GA und 3OHGA geschieht größtenteils über die Niere und nach neueren Erkenntnissen anteilig auch über den Gastrointestinaltrakt (Keyser et al. 2008).

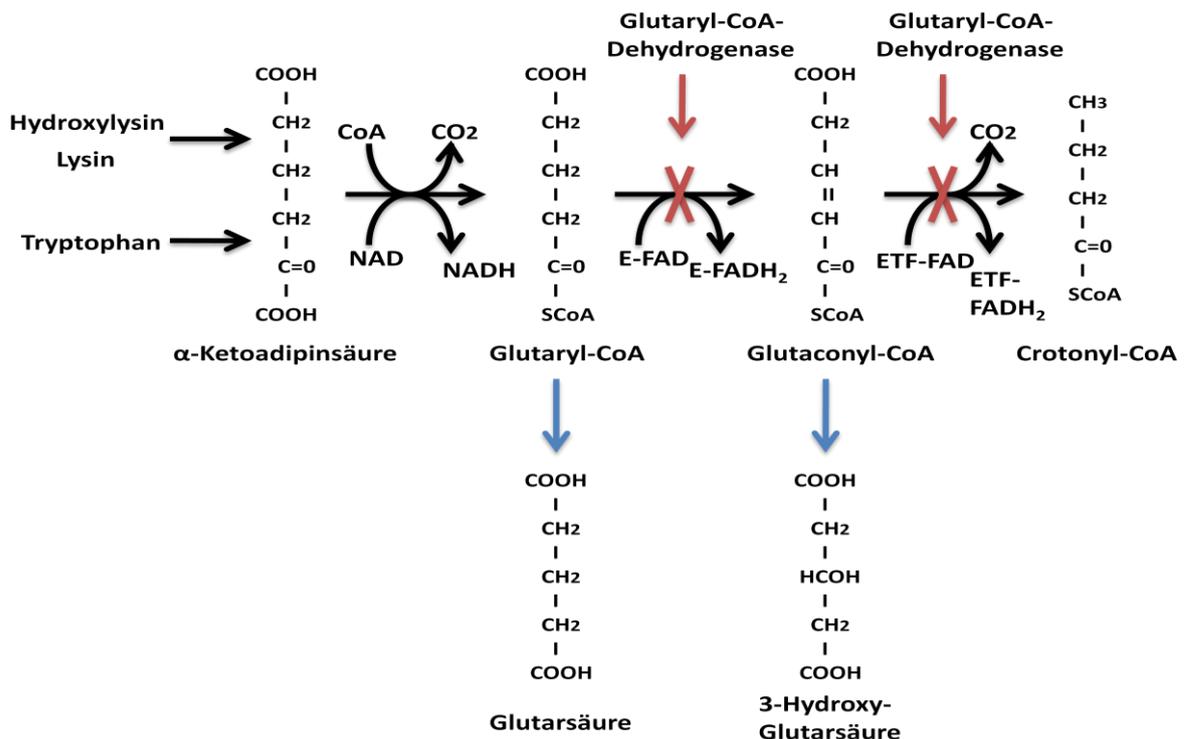


Abbildung 1: Stark schematisierte Darstellung des Abbaus der Aminosäuren Lysin, Hydroxylysin und Tryptophan und die resultierende Entstehung von Glutarsäure und 3-Hydroxyglutarsäure bei Funktionseinschränkung der GCDH (Mühlhausen et al. 2008).

Das Gen der GCDH ist auf Chromosom 19p13.2 lokalisiert. Es sind über 150 verschiedene Mutationen im *GCDH*-Gen bekannt, die mit einer unterschiedlichen spezifischen Aktivität des translatierten Enzyms einhergehen. Diese „Restaktivität“ ist entscheidend für die Konzentration der akkumulierenden pathologischen Metabolite, nicht jedoch für die Ausprägung des klinischen Phänotyps bei Erkrankten (Christensen et al. 2004).

Neugeborene mit GA1 sind klinisch häufig unauffällig oder weisen nur diskrete klinische Zeichen auf. Dazu gehört eine Makrocephalie und seltener eine Stammhypotonie (Hoffmann et al. 1994; Kölker et al. 2006). Im Verlauf der Erkrankung kann es zur Entwicklung von chronischen subduralen Hämatomen kommen, diese können jedoch auch schon pränatal entstehen (Strauss et al. 2003; Mühlhausen et al. 2004). Darüber hinaus kann auch oft eine frontotemporale Atrophie (bei ca. 50 % der Patienten) und eine Erweiterung der Fissura Sylvii in der kraniellen Bildgebung beobachtet werden (Forstner et al. 1999).

Bei GA1-Patienten kommt es meistens innerhalb der ersten 18 Lebensmonate im Rahmen kataboler Situationen – wie eines fieberhaften Infektes – zur Ausbildung einer sogenannten enzephalopathischen oder metabolischen Krise (Strauss und Morton 2003; Mühlhausen et al. 2004). Sie entwickelt sich innerhalb weniger Stunden bis Tage und führt zu einer irreversiblen – im Wesentlichen die Stammganglien betreffenden – Neurodegeneration. Die Folge ist eine variabel ausgeprägte dystonodyskinetische Bewegungsstörung (Goodman und Frerman 2001).

Die Erkrankung kann bei Neugeborenen durch die Bestimmung von Glutarylarnitin im Trockenblut mittels Tandem-Massenspektroskopie im Rahmen des erweiterten Neugeborenen Screenings in Deutschland frühzeitig erkannt werden.

Die Leitlinien zur Behandlung der GA1 beinhalten für die präventive Langzeittherapie eine eingeschränkte Lysin- und gegebenenfalls auch Tryptophan-Einfuhr sowie eine Supplementation mit Carnitin. Diese Diät sollte zumindest bis zum Ende des sechsten Lebensjahres eingehalten werden. Für die Zeit danach sind Ausbrüche der metabolischen Krise nur noch in Einzelfällen beschrieben und die diätetischen Maßnahmen können weniger streng gehandhabt werden. Darüber hinaus sollte eine intensive Notfallbehandlung zur Vermeidung einer Katabolie mit Kalorien- und Volumenzufuhr, Carnitingabe, einer Karenz von natürlichem Protein und gegebenenfalls

eine pharmakologische Behandlung z.B. mit Antipyretika oder Antibiotika erfolgen (Kölker et al. 2007).

Bei einer frühen Diagnosestellung und mit präventiven und therapeutischen Maßnahmen ist es heutzutage möglich, bei 65-95% der Kinder den Ausbruch einer enzephalopathischen Krise zu verhindern (Kölker et al. 2006).

Es ist bis heute unklar, welche Pathomechanismen letztlich zur Zerstörung des Corpus Striatums führen. Lange Zeit wurde als alleiniger Hauptmechanismus die Exzitotoxizität (Kölker et al. 2004), also eine Übererregung von Neuronen über den glutamatergen NMDA-Rezeptor, verantwortlich gemacht. Dieser Überlegung lagen *in vitro*-Experimente an kultivierten Neuronen aus Ratten (Ullrich et al. 1999) und Hühnchen (Kölker et al. 2001) zu Grunde, die eine Absterberate der Neuronen von ca. 40 % nach Applikation von 3OHGA zeigten, die teilweise (Das et al. 2003) durch die Gabe von MK-801 – einem NMDA-Antagonisten – aufgehoben werden konnten. Aus diesen Ergebnissen wurde abgeleitet, dass neurotoxische Effekte von 3OHGA bei GA1 über den NMDA-Rezeptor vermittelt werden.

In anderen Studien konnten jedoch die Effekte von GA und 3OHGA nicht reproduziert werden (Freundenberg et al. 2004; Lund et al. 2004). Zudem wurden die oben genannten Experimente mit 3OHGA-Konzentrationen von 0,5-5 mM (Ullrich et al. 1999; Kölker et al. 2000; Das et al. 2003) durchgeführt und sind damit wesentlich höher als die tatsächlichen Konzentrationen im Hirngewebe: diese liegen bei Patienten post mortem bei 200 µM (Kulkens et al. 2005).

Es folgten verschiedene Studien, die die Exzitotoxizitäts-Hypothese als alleiniges Erklärungsmodell in Frage stellten. So konnte z.B. auch eine Zelltoxizität von 3OHGA an Zellen ohne NMDA-Rezeptor gezeigt werden (Gerstner et al. 2005; Mühlhausen et al. 2006)

Die Exzitotoxizität kann also nur als ein möglicher Aspekt der Pathogenese der GA1 betrachtet werden, der die Gesamtheit der beobachteten Effekte jedoch nicht erklärt.

Darüber hinaus scheint auch ein zentralnervöser Energiemangel an der Neuronendegeneration beteiligt zu sein. Eine Einschränkung der anaplerotischen Reaktion, der Bereitstellung von Mediaten des Citratzyklus in Neuronen durch Astrozyten, ist hierbei wahrscheinlich ein wesentlicher Aspekt (Lamp et al. 2011). Ein

Energiemangel kann auch die Toxizität von 3OHGA über NMDA-Rezeptoren verstärken oder kann an sich exzitotoxisch wirken (Ullrich et al. 1999).

Als weiterer möglicher Pathomechanismus wird eine durch 3OHGA vermittelte Beeinflussung der Funktion, der Struktur und des Wachstums des Endothels diskutiert. Diese Effekte wurden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beobachtet (Mühlhausen et al. 2004; Mühlhausen et al. 2006). Möglicherweise bedingen diese Veränderungen die subarachnoidalen Blutungen und subduralen Hämatomen bei Patienten (Strauss et al. 2003).

Insgesamt bestehen weiterhin noch große Defizite im Verständnis der kausalen Veränderungen bei der Glutarazidurie Typ I, die eine gezieltere Behandlung von Betroffenen noch nicht erlauben.

1.2 *Gcdh*-defiziente Maus

Das *Gcdh*-defiziente Mausmodell der GA1 (*Gcdh*^{-/-}) wurde 2002 durch die gezielte Deletion der Exons 1-7 des *Gcdh*-Gens und die Insertion eines beta-Galactosidase-Gens generiert. Dadurch kommt es zu einem kompletten Verlust der *Gcdh*-Aktivität (Koeller et al. 2002).

Der biochemische Phänotyp des Mausmodells gleicht dem der humanen Erkrankung: GA und 3OHGA akkumulieren in Körperflüssigkeiten und Geweben. Die Konzentrationen von GA und 3OHGA im Plasma der *Gcdh*^{-/-} Mäuse liegen bei 255 µM bzw. 7 µM (Keyser et al. 2008). Für GA1-Patienten werden ähnliche Plasmakonzentrationen von 45 µM GA und 26 µM 3OHGA gemessen (Baric et al. 1999). Bei einer gesunden Kontrollgruppe von Menschen liegen die 3OHGA-Konzentrationen im Plasma wesentlich niedriger (bei etwa 0,3 µM und die von GA bei 2 – 9 µM) (Baric et al. 1999).

Wie auch bei GA1-Patienten findet sich bei der *Gcdh*-defizienten Maus als neuropathologischer Befund eine diffuse spongiforme Myelinopathie. Ferner weisen die Tiere schon in den ersten Lebenstagen im Rotorad-Versuch dezente motorische Defizite auf und es zeigen sich Auffälligkeiten an den Nieren der *Gcdh*^{-/-} Mäuse. Das Gewicht der Nieren ist bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen signifikant gegenüber dem von Wildtyp-Mäusen (WT-Mäusen) erhöht (Koeller et al. 2002). Dies ist wahrscheinlich auf eine vermehrte Menge an Extrazellulärmatrix zurückzuführen (Stellmer 2007). Desweiteren kommt

es zu Expressionsveränderungen von über 100 Genen, darunter renal exprimierte Dicarboxylat-Transporter wie NaC3 (Stellmer et al. 2007).

Darüber hinaus zeigen sich keine weiteren Symptome bei den *Gcdh*^{-/-} Mäusen und es entwickelt sich auch nach Provokation mit Kälte, metabolischem Stress oder Injektion von Lipopolysacchariden oder Interferon alpha – als Simulation einer bakteriellen, bzw. viralen Infektion – keine encephalopathische Krise (Koeller et al. 2002).

Erst durch die Applikation einer Hochprotein- bzw. Hochlysindiät gelang es bei *Gcdh*-defizienten Mäusen eine encephalopathische Krise auszulösen. Dabei zeigte sich auch im Mausmodell eine deutliche Altersabhängigkeit hinsichtlich der Auslösbarkeit und des Verlaufs der Krise, wie sie auch bei Menschen beobachtet wird (Zinnanti et al. 2006).

Die Verfügbarkeit der *Gcdh*^{-/-} Maus und die Möglichkeit zur Induzierbarkeit der metabolischen Krise erlauben damit Untersuchungen zum Pathomechanismus der Glutarazidurie Typ I, die die durchgeführten *in vitro*-Studien sinnvoll ergänzen können.

In Abbildung 2 soll ein zusammenfassender Überblick über die möglichen Pathomechanismen der GA1 gegeben werden.

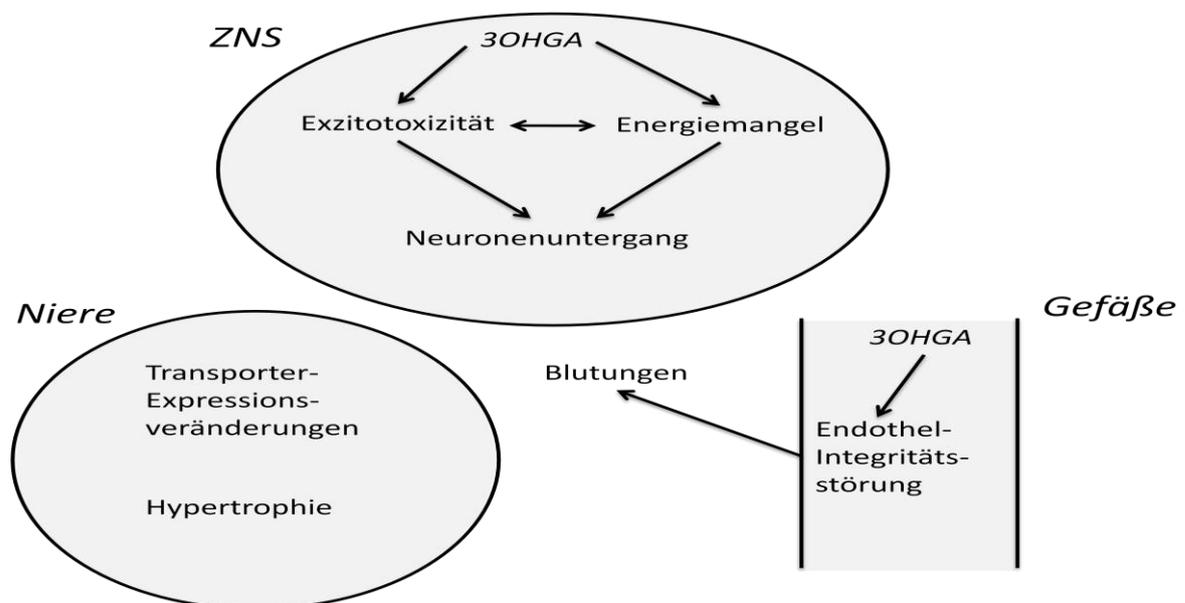


Abbildung 2: Die Hypothesen zur Pathogenese und beobachteten Veränderungen der GA1 sind in der Abbildung schematisch einzelnen Organen zugeordnet.

1.3 Rolle von Transportproteinen bei GA1

Wie GA und 3OHGA innerhalb der Zelle (aus dem Mitochondrium in das Cytoplasma) und aus der Zelle hinaus transportiert werden und wie die Ausschleusung aus dem Körper geschieht ist bisher kaum untersucht.

Als ersten experimentellen Ansatz zur Identifizierung von Transportern, die GA und 3OHGA translozieren können, wurden vergleichende Microarray-Analysen an Nierengewebe von Wildtyp- und *Gcdh*^{-/-} Tieren durchgeführt. Dieser Array wurde unter basalen Bedingungen, d.h. außerhalb einer induzierten metabolischen Krise, erstellt (Stellmer 2007).

Erste Ergebnisse weisen auf eine aktive Sezernierung von 3OHGA im proximalen Tubulus und auf eine regulierte Expression der beteiligten Transporter hin (Burckhardt und Burckhardt 2003; Stellmer et al. 2007). Ca. 25% der veränderten Gene im Microarray betrafen Transporter aus der Slc-Familie (Stellmer 2007). Kenntnisse über die beteiligten Transporter sind besonders wichtig, da sie einen potentiellen Ansatzpunkt für eine pharmakologisch beschleunigte Elimination der toxischen Substanzen aus dem Körper darstellen könnten.

Im Folgenden sind die Transporter aufgelistet, die – mit Ausnahme von Oat1 – im Microarray der Niere (Stellmer et al. 2007) bzw. des Hirnstammes (siehe 3.2.2.3) bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen eine veränderte Expression aufwiesen und deren Expression im experimentellen Teil der Arbeit weiter untersucht werden (Tabelle 1).

Tabelle 1: Charakterisierung von Transportern, die im Microarray der Niere (Stellmer 2007) bzw. des Hirnstammes von 42 Tage alten *Gcdh*^{-/-} Mäusen in der Expression verändert waren.

Protein-abkürzung	Transporter	Gen-symbol	Chromosomale Lokalisation	Gewebe-lokalisierung	Intrazelluläre Lokalisation	Substrate	Knockout-Maus Phänotyp	Referenzen
NaC3	Natriumabhängiger Dicarboxylat Transporter Typ 3	<i>Slc13a3</i>	2q24	Niere, ZNS	Niere: basolateral	Polyspezifisch: z.B. Alpha-Ketoglutarat, GA, Succinat, 2,3-Dimethyl- und 2,3-Dimercaptosuccinat		(Pajor et al. 2001; Burckhardt und Burckhardt 2003; Wada et al. 2006; Yodoya et al. 2006; Stellmer et al. 2007)
OAT1	Organischer Anionentransporter 1	<i>Slc22a6</i>	11q13.1-q13.2	Niere, ZNS (nur Neurone), Plazenta, Skelettmuskel	Niere: basolateral	Organische Anionen, polyspezifisch: z.B. PAH, PGE2, Urate	Erhebliche Reduktion bei der Ausschleusung bestimmter organischer Anionen, z.B. PAH	(Koepsell und Endou 2004; Anzai et al. 2006; Eraly et al. 2006)

Protein-abkürzung	Transporter	Gen-symbol	Chromosomale Lokalisation	Gewebe-lokalisation	Intrazelluläre Lokalisation	Substrate	Knockout-Maus Phänotyp	Referenzen
OAT2	Organischer Anionentransporter 2	<i>Slc22a7</i>	6p21.2-p21.1	Niere, Leber	Niere: basolateral bei Menschen, apikal bei Ratten; Leber: sinusoidal	Organische Anionen, polyspezifisch: z.B. PGE ₂ , Tetracycline, GA		(Koepsell und Endou 2004; Kobayashi et al. 2005; Anzai et al. 2006)
Oatp1a6	Organisches anionentransportierendes Polypeptid 5	<i>Slc21a13</i> (neu: <i>Slco1a6</i>)	Chromosom 6	Niere, Leber	Noch nicht bekannt	Noch nicht bekannt		(Choudhuri et al. 2001; Hagenbuch und Meier 2004; Cheng et al. 2005)

Protein-abkürzung	Transporter	Gen-symbol	Chromosomale Lokalisation	Gewebe-lokalisierung	Intrazelluläre Lokalisation	Substrate	Knockout-Maus Phänotyp	Referenzen
UT-A	Urea Transporter-A	<i>Slc14a2</i>	18q12.1-q21.1	Niere: UT-A1/3: Sammelrohr, UT-A2: dünner Teil der Henle-Schleife, UT-A4: inneres Mark, UT-A5: nur in Tub. seminiferi contorti des Hodens; auch: Herz, ZNS und Leber	Niere: UT-A1: apikal, UT-A2: keine Polarisation, UT-A3: basolateral in der Maus, UT-A4: unbekannt	Harnstoff	<i>Ut-A1/3^{-/-}</i> Maus hat ein Defizit in der Urinkonzentrierung und einen vermehrten Trinkbedarf von über 200% gegenüber Wildtyp-Maus; <i>Ut-A2^{-/-}</i> Maus hat dieses Defizit nur bei einer low-protein-diet	(Fenton et al. 2002; Fenton et al. 2004; Bagnasco 2005; Uchida et al. 2005; Maciver et al. 2008)
AQP2	Aquaporin 2	<i>aqp2</i>	12q13	Niere (Sammelrohr), distales Kolon	Niere: apikal (bzw. in vesikulären Speichern)	H ₂ O	Globale <i>Aqp2^{-/-}</i> Maus stirbt 5-12 Tage postnatal; isolierte Sammelrohr- <i>Aqp2^{-/-}</i> Maus hat Defizit in der Urinkonzentrierung	(Gallardo et al. 2001; Bonilla-Felix 2004; Rojek et al. 2006)

Protein-abkürzung	Transporter	Gen-symbol	Chromosomale Lokalisation	Gewebe-lokalisierung	Intrazelluläre Lokalisation	Substrate	Knockout-Maus Phänotyp	Referenzen
AQP4	Aquaporin 4	<i>aqp4</i>	18q11.2-q12.1	Niere, ZNS	Niere: Basolateral, Gehirn: Astrozytenausläufer, adulte neuronale Stammzellen	H ₂ O	Mildes Defizit in der Urinkonzentrierung, Protektion u.a. gegenüber Hirnödemen und Exzitotoxizität	(Chou et al. 1998; Bonilla-Felix 2004; Kong et al. 2008; Moe et al. 2008)
SNAT5	Natrium-abhängiger neutraler Aminosäure-Transporter 5	<i>Slc38a5</i>	Xp11.23	Niere, ZNS, Leber, Fettgewebe, Retina	Gehirn: Neurone, Astrozyten-Zellkörper und Ausläufer	Glutamin, Histidin, Serin, Glycin		(Mackenzie und Erickson 2004; Cubelos et al. 2005)

1.3.1 Natriumabhängiger Dicarboxylat Transporter Typ 3 (NaC3)

NaC3 hat 11 Transmembrandomänen mit zwei Glykolisierungsstellen am extrazellulären C-Terminus (Markovich und Murer 2004). Der Transporter wird sowohl in der Niere als auch im Gehirn exprimiert. Im ZNS wird NaC3 primär in Astrozyten, aber auch in Neuronen exprimiert. Er ist für die Bereitstellung von Metaboliten des Citratzyklus für die Neurone mitverantwortlich (Fujita et al. 2005; Yodoya et al. 2006).

NaC3 hat eine geringe Substratspezifität (Hagos et al. 2008) und wurde als erster Transporter identifiziert, der 3OHGA translozieren kann, wenn auch mit einer wesentlich geringeren Affinität als zu GA. Bei 42 Tage alten *Gcdh*^{-/-} Mäusen ist die NaC3-mRNA-Expression im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen in der Niere erhöht (Stellmer et al. 2007).

Es ist eine Inhibition des NaC3 in Astrozyten durch GA beobachtet worden, die einen zerebralen Energiemangel zur Folge haben könnte (Mühlhausen et al. 2008).

1.3.2 Organischer Anionentransporter 1 (OAT1)

Als weiterer hochaffiner Transporter für 3OHGA – aber auch für andere Dicarboxylate wie z.B. α -Ketoglutarat und GA – wurde kürzlich OAT1 identifiziert (Hagos et al. 2008). Er hat zwölf Transmembrandomänen mit einer großen extrazellulären Schleife zwischen TMD 1 und 2 (You 2004) und wird überwiegend in der Niere exprimiert (Buist et al. 2002). OAT1 ist ein Transporter mit weitem Substratspektrum (Koepsell und Endou 2004; Anzai et al. 2006), der bei der renalen Ausschleusung vieler klinischer Präparate – wie z.B. β -Lactam Antibiotika, nichtsteroidaler Antibiotika oder ACE-Hemmern – eine wichtige Rolle spielt (Anzai et al. 2006).

Die renale Expression von Oat1 in der Maus ist auf die S1- und S2-Segmente des proximalen Tubulus beschränkt (Bahn et al. 2005). Zumindest bei Kaninchen scheint es eine weitergehende Differenzierung mit einer Dominanz im S2-Segment zu geben (Lungkaphin et al. 2006). Innerhalb des zentralen Nervensystems wird er vor allem im Plexus choroideus exprimiert (Choudhuri et al. 2003; Ohtsuki 2004).

1.3.3 Organischer Anionentransporter 2 (OAT2)

OAT2 ist – strukturell ähnlich dem OAT1 – aus zwölf Transmembrandomänen (TMD) aufgebaut (You 2004). Er wird sowohl in der Leber als auch in der Niere exprimiert (Koepsell und Endou 2004).

Die renale Lokalisation des OAT2 – intrazellulär, als auch innerhalb des Organs – ist Spezies abhängig. Beim Menschen wurde er an der basolateralen Membran des proximalen Tubulus nachgewiesen (Enomoto et al. 2002), während bei Nagern sowohl eine Lokalisation an der apikalen Membran des aufsteigenden Teils der Henle'schen Schleife und des Sammelrohrs (Kojima et al. 2002) als auch an der apikalen Membran im S3-Segment des proximalen Tubulus beschrieben wurde (Ljubojevic et al. 2007). Außerdem gibt es gegenteilige Untersuchungsergebnisse, ob Oat2 geschlechtsabhängig in der Niere von Mäusen exprimiert wird (Buist et al. 2002; Anzai et al. 2006; Ljubojevic et al. 2007). Aufgrund seiner geringen Substratspezifität kann hOAT2 unter anderem auch GA tranlozieren (Kobayashi et al. 2005).

1.3.4 Organisches anionentransportierendes Polypeptid 5 (Oatp1a6)

Oatp1a6 hat vermutlich zehn Transmembrandomänen (Choudhuri et al. 2001) und gehört zur Familie der OATP1 (mit 40 % Aminosäuren-Homologie) und zur Unterfamilie der OATP1A (mit 60 % Aminosäuren-Homologie) (Hagenbuch und Meier 2004). Oatp1a6 wird ausschließlich bei Nagern und auf mRNA-Ebene größtenteils in der Niere exprimiert (Cheng et al. 2005). Über die Substratspezifität, eine Expression in bestimmten Tubulusanteilen oder die zelluläre Lokalisation ist bisher nichts Genaueres bekannt (Choudhuri et al. 2001; Hagenbuch und Meier 2004; Sekine et al. 2006).

1.3.5 Urea-Transporters A (UT-A)

Harnstofftransporter haben zwei TMD mit einer Glykosylierungsstelle in der extrazellulären Schleife (Shayakul und Hediger 2004). Der renale Harnstofftransporter A ist im absteigenden Teil der Henle'schen Schleife und dem innermedullären Anteil des Sammelrohrs lokalisiert (Bagnasco 2005) und vermittelt die Translokation des Harnstoffs vom Lumen ins Cytoplasma (Maciver et al. 2008).

Es gibt sechs UT-A-Proteinvarianten (UT-A1 bis UT-A6), die unter zwei verschiedenen Promotorregionen stehen (Bagnasco 2005). Die Expression der verschiedenen Harnstofftransporter wird von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst und sie haben differierende Funktionen im Organismus. Das wird besonders deutlich in unterschiedlichen Phänotypen bei *Ut-A*^{-/-} Mäusen (Fenton et al. 2004; Uchida et al. 2005). Die UT-A1- und UT-A3-Funktion wird durch ADH aktiviert und die UT-A2-Expression durch ADH erhöht (Bankir und Trinh-Trang-Tan 2000; Wade et al. 2000; Stewart et al. 2007).

1.3.6 Aquaporin 2 (AQP2)

AQP2 gehört zu einer Familie mit 13 Mitgliedern (AQP bis AQP12) (Ishibashi 2009). Aquaporine sind Homotetramere, bei denen jedes Monomer sechs TMD besitzt (Verkman und Mitra 2000). In der Niere ist AQP2 im Sammelrohr lokalisiert. Die Hauptfunktion besteht in einer ADH-abhängigen Wasserrückresorption aus dem Sammelrohr-Lumen. Schon bei relativ geringen Plasmakonzentrationen von ADH werden hochaffine V_2 -Rezeptoren an den Hauptzellen im Sammelrohr besetzt und es kommt – vermittelt über eine erhöhte intrazelluläre cAMP-Konzentration – zu einer Umverteilung der AQP2 aus intrazellulären Vesikeln in die Plasmamembran (Klinke und Silbernagel 2003). An der Mobilisierung zur Membran ist außerdem eine Phosphorylierung des AQP2 durch Proteinkinase A beteiligt (Takata et al. 2008). Langfristig führt ein erhöhter ADH-Spiegel zu einer vermehrten mRNA-Expression von AQP2 (Baron 2002).

1.3.7 Aquaporin 4 (AQP4)

AQP4 ist das zentrale Molekül der Wasser- und Elektrolyt-Homöostase im zentralen Nervensystem (Kong et al. 2008). Im ZNS wird AQP4 hauptsächlich in den Ausläufern der Astrozyten exprimiert (Papadopoulos und Verkman 2007). Wie auch AQP2 transportiert AQP4 selektiv Wasser (Verkman und Mitra 2000). *Aqp4*^{-/-} Mäuse weisen erhöhte extrazelluläre Dopamin-Konzentrationen, einen Schutz gegenüber eines – durch Ischämie, hypotoner Hyperhydratation oder Meningitis vermittelten – Hirnödems und einer Glutamat vermittelten Zelltoxizität auf (Verkman et al. 2006; Ding et al. 2007; Papadopoulos und Verkman 2007; Zeng et al. 2007).

1.3.8 Natrium-abhängiger neutraler Aminosäure-Transporter 5 (SNAT5)

SNAT5 hat fünf TMD (Baird et al. 2006) und gehört zu einer Familie mit fünf Mitgliedern (SNAT1 bis SNAT5). Im ZNS wird SNAT5 vor allem in der Großhirnrinde, Hippocampus, Rückenmark und Striatum exprimiert. SNAT5 ist im ZNS ausschließlich in Astrozyten nachweisbar. Es wird angenommen, dass SNAT5 am Efflux von Glutamin – innerhalb des Glutamat-Glutamin-Zyklus – beteiligt ist (Cubelos et al. 2005). Dieser Zyklus ist Grundlage für die Aufnahme von Glutamat aus dem synaptischen Spalt in die Astrozyten, dem dortigen Umbau in Glutamin und den Rücktransport in die Neurone für die Resynthese von Glutamat (Chaudhry et al. 2002; Bak et

al. 2006). Die Transporteigenschaften von SNAT5 sind pH-abhängig. Bei einer Erhöhung des pH-Wertes von 7 nach 8 steigt die Substrat-Transportrate (z.B. von Serin) in SNAT5-überexprimierten *Xenopus* Oocyten ca. um den Faktor 3 (Baird et al. 2006).

1.4 Rolle von ACE, HMGCS2 und PEPCK bei GA1

1.4.1 Angiotensin Converting Enzyme (ACE)

Die klassische Funktion von ACE ist die Hydrolyse von Angiotensin I zu Angiotensin II. Darüber hinaus ist ACE am Abbau des vasodilatatorischen Bradykinins beteiligt (Dean et al. 2005). Hypovolämie ist ein möglicher Stimulus für das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), in das ACE eingebettet ist (Klinke und Silbernagel 2003). Angiotensin II wirkt vor allem über den Angiotensin II-Typ 1-Rezeptor (AT₁R) (Dean et al. 2005) und hat eine starke Vasokonstriktion zur Folge (Widdop et al. 2008). Angiotensin II bewirkt außerdem eine vermehrte Freisetzung des Mineralocorticoids Aldosteron aus der Nebennierenrinde (Klinke und Silbernagel 2003). Angiotensin II wird durch ACE2 – funktionell wahrscheinlich ein Gegenspieler der ACE – zu Angiotensin(1-7) abgebaut (Danilczyk und Penninger 2006). ACE stellt einen pharmakologischen Angriffspunkt der antihypertensiven Therapie dar. Eine Inhibierung des ACE führt – entsprechend den oben aufgeführten Funktionen – zu einer Senkung des Blutdrucks und zu einer verminderten Na⁺- und Wasserrückresorption (Karow und Lang-Roth 2005). *Ace*^{-/-} Mäuse weisen einen niedrigen Blutdruck und eine vaskuläre Hyperplasie mit entzündlichen perivaskulärem Infiltrat auf (Esther et al. 1996).

1.4.2 Mitochondriale 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A Synthase (HMGCS2)

HMGCS2 katalysiert die Kondensation von Acetyl-CoA mit Acetoacetyl-CoA zu HMG-CoA und CoA (Ayte et al. 1993). Damit hat HMGCS2 – zusammen mit der Carnitin Palmitoyltransferase I – eine Schlüsselfunktion in der Ketonkörpersynthese (Mascaro et al. 1995; Camarero et al. 2006). HMGCS2 wird überwiegend in der Leber – dem primären Syntheseort der Ketonkörper – und in geringerem Ausmaß auch z.B. in der Niere, den Lymphozyten und im Gehirn exprimiert (Camarero et al. 2006). Bei einem genetischen Defekt des Enzyms bei Menschen kann der Körper im Fastenzustand nicht mit einer physiologischen Ketonkörpersynthese für die zerebrale

Energiebereitstellung reagieren und es kommt vermehrt zu Bewusstlosigkeit (Morris et al. 1998).

1.4.3 Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (PEPCK)

PEPCK katalysiert die phosphorylierende Decarboxylierung von Oxalacetat zu Phosphoenolpyruvat, den geschwindigkeitslimitierenden Schritt der Glukoneogenese (Zimmer und Magnuson 1990). In der Niere wird PEPCK vor allem im Segment 3 des proximalen Tubulus exprimiert (Drewnowsk et al. 2002). Es gibt in jeder untersuchten Spezies zwei Isoformen der PEPCK: Eine zytosolische und eine mitochondriale (Monteil et al. 1995). Die Expression der PEPCK wird über zirkulierende Hormone reguliert (Burgess et al. 2007). Glukocortikoide und eine erhöhte cAMP-Konzentration steigern die Expression, während Insulin inhibitorisch wirkt (Liao et al. 1998). Auch in einer azidotischen Stoffwechsellage wird die mRNA-Expression der *Pepck* gesteigert (Moret et al. 2007).

2 Zielsetzung

Mit dieser Arbeit sollte eine genauere Charakterisierung von Veränderungen in der induzierten metabolischen Krise im Tiermodell der Glutarazidurie Typ I erfolgen. Um diesem weiten Feld einen Rahmen zu geben wurden verschiedene Schwerpunkte gesetzt:

Zunächst musste die Provokation der encephalopathischen Krise im Mausmodell weiter etabliert werden.

Es sollte eine Verifizierung von Daten aus Microarray-Analysen (siehe 1.3) zwischen Wildtyp- und *Gcdh*^{-/-} Mäusen erfolgen und zwar durch mRNA-, mittels Realtime-PCR, und Protein-Expressionsanalysen in Nieren- und Hirnstammgewebe. Weiterhin sollten Expressionsanalysen in der induzierten encephalopathischen Krise durchgeführt werden. Die Expression ausgewählter Gene wurde zudem im zeitlichen Verlauf untersucht.

Besonderes Gewicht wurde hierbei auf die Expressionsveränderungen von Transportern insbesondere in der Niere und im Hirn gelegt. Dabei sollte besonders der organische Anionentransporter 1 (Oat1) genauer auf Gen- und auf Proteinebene untersucht werden.

Da es Hinweise auf eine Nierenschädigung bei *Gcdh*-defizienten Tieren in der metabolischen Krise gab, sollten quantitative und qualitative Urinuntersuchungen im Verlauf der metabolischen Krise durchgeführt werden.

Schließlich sollten selektive Stoffwechsel-Parameter und -Zustände wie die Induktion einer metabolischen Azidose und die Aminosäure-Konzentrationen im Blut analysiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid 30% / Bisacrylamid 0,8%	Roth, Karlsruhe
Agarose	GIBCO/BRL, Eggenstein
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München
Chloroform	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dithiotreitol (DTT)	Serva, Heidelberg
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure-	Roth, Karlsruhe
Dinatriumsalz (EDTA)	
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Milchpulver, blotting grade	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Saccharose	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Tween-20	Serva, Heidelberg
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck, Darmstadt

3.1.2 Enzyme und Nukleotide

dNTP-Set, ultrapure	Applied Biosystems, USA
---------------------	-------------------------

Oligo d(T) ₁₆ -Primer	Roche Diagnostics, Mannheim
PCR-Primer	MWG-Biotech AG, Ebersberg
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma, Deisenhofen
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Random Hexamers	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

3.1.3 Proteine und Proteinstandards

Rainbow™-coloured Protein-Standard	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg

3.1.4 DNA-Standards

DNA-Ladder, 100 Bp	GIBCO/BRL, Eggenstein
--------------------	-----------------------

3.1.5 Kits

Ammonia Test Kit II	Arkray, Japan
TriReagent (RNA-Isolierung)	Sigma, Deisenhofen
Superscript III Reverse Transkriptase	Invitrogen, USA
Universal PCR-Mastermix	Applied Biosystems, USA

3.1.6 Puffer und Lösungen

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

3.1.7 Antikörper

3.1.7.1 Primäre AK

HMGCS2	Genway, USA
	Spezies: Huhn
	Reaktivität: Maus, Ratte, Mensch
	Verdünnung: 1:300 im Western-Blot
MnSOD	Upstate, USA
	Spezies: Kaninchen
	Reaktivität: Maus, Ratte, Mensch
	Verdünnung: 1:1000 im Western-Blot
Oat1	Alpha Diagnostics, USA
	Spezies: Kaninchen
	Reaktivität: Maus, Ratte, Mensch
	Verdünnung: 1/6 µg/ml im Western-Blot

3.1.7.2 HRP-gekoppelte Sekundäre AK

Kaninchen	Jackson ImmunoResearch Laboratories,
	Spezies: Ziege
	Verdünnung: 1:5000 im Western-Blot
Huhn	Santa Cruz Biotechnology, USA
	Spezies: Ziege
	Verdünnung: 1:5000 im Western-Blot

3.1.8 Verbrauchsmaterialien

Multistix 10 SG (Urin-Teststreifen)	Bayer, Leverkusen
Nitrocellulose Blotting Membran 0,2 µm	BioRad, München
Objektträger und Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
Röntgenfilme, XAR-5	Kodak, Stuttgart
Whatman GB002-Papier	Schleicher & Schüll, Daßel

3.1.9 Geräte

Ammonia Checker II	Arkray, Japan
--------------------	---------------

Analysenwaagen Typ AC 100	Mettler Waagen, Giessen
Analysenwaagen Typ BP 2100S	Sartorius, Göttingen
Blot-System, Transphor Typ SE 600	Hofer Scientific Instruments, USA
Eismaschine AF 10	Scotsman, Italien
Elektrophoresekammern für Agarosegele	BioRad, München
Elektrophoresekammern für Polyacrylamidgele	Hofer Scientific Instruments, USA
Filmentwicklungsmaschine, Gevamic 60	Agfa-Gevaert, Leverkusen
Gefrierschrank –80 °C	New Brunswick, Edison, USA
Heizblock Modell Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Homogenisator (Model 985-370)	Dremel, USA
Kamera, DP 50	Olympus, Hamburg
Metabolischer Käfig für Mäuse Typ 3600M021	Tecniplast, Italien
Lichtmikroskop, Axiovert 100	Zeiss, Jena
Mikrowellenherd	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe
pH-Meter Knick 647	Schütt, Göttingen
<u>PCR-Thermocycler:</u>	
- Mx3000P™	Stratagene, USA
- Mastercycler, Gradient	Eppendorf, Hamburg
Photometer, Modell RS 232 C	Eppendorf, Hamburg
Pipetten für Volumina im µl-Bereich	Eppendorf, Hamburg und Sarstedt, Nümbrecht
Ultraschall-Desintegrator Sonifier W-450	Branson Ultrasonic SA, USA
UV-Transilluminator Darkroom Evo III	Raytest, Straubenhardt
Vortex-Genie	Bender & Hobein AG, Zürich

Zentrifugen:

- Kühlzentrifuge 5417	Eppendorf, Hamburg
- Tischzentrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
- Discovery M120 (Ultrazentrifuge)	Thermo Fisher Scientific, USA
S 100 AT4, S55S-Rotatoren	Thermo Fisher Scientific, USA
UltraThurax (Zerkleinerer)	IKA, Staufen

3.2 Methoden

3.2.1 Genotypisierung

Zur Nachzucht von *Gcdh*^{-/-} Tieren wurden heterozygote Mäuse miteinander verpaart, die jeweils aus unterschiedlichen genetischen Hintergründen – GAC57Bl6 und GA129SV – stammten. Nur die Tiere der F1-Generation dieser Hybridkreuzung wurden für die weiteren Experimente verwendet. Da der Genotyp der Mäuse äußerlich nicht erkennbar war, musste er mittels PCR-vermittelter Genotypisierung unter Verwendung spezifischer Primer für das Wildtyp-*Gcdh*-Exon und für die *Gcdh*^{-/-}-spezifische Neo-Kassette erfolgen. Die Befunde der Genotypisierung wurden anhand metabolischer Blut-Parameter verifiziert. Dazu wurden mittels Tandem-Massenspektroskopie die Glutarylarnitin-Konzentrationen im Trockenblut bestimmt.

3.2.1.1 Isolierung genomischer DNA

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

Für die Isolierung wurde Gewebe aus Mausschwanzspitzen über Nacht mit 500 µl Lysispuffer, 15 µl SDS-Lösung und 20 µl Proteinase K-Lösung auf dem Schüttler bei 56 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 20800 x g bei Raumtemperatur für 5 Minuten. Der Überstand wurde abgenommen und die enthaltene DNA durch Zugabe von 500 µl Isopropanol gefällt. Es erfolgte die Präzipitation der DNA durch mehrmalige Invertierung und erneute Zentrifugation bei 20800 x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet

getrocknet. Anschließend wurde es mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen und bei 37°C getrocknet. Schließlich wurde das Pellet durch 30minütiges Schütteln bei 37°C in 100 µl H₂O gelöst.

3.2.1.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die gewonnene DNA-Lösung wurde im Verhältnis 1:50 mit H₂O verdünnt und die Konzentration mit einem Photometer bei 260 nm gemessen. Die Probe wurde anhand des Ergebnisses auf eine Endkonzentration von 100 µg/ml verdünnt.

3.2.1.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

PCR-Lösung (10-fache Menge)	2,5 µl	<i>Gcdh</i> -Primer forward (10 pmol/µl)
	2,5 µl	<i>Gcdh</i> -Primer reverse (10 pmol/µl)
	5 µl	dNTP-Lösung (10 mM je Nukleotid)
	25 µl	10 x PCR-Puffer aus „Universal PCR-Mastermix“
	7,5 µl	MgCl ₂ 50mM
	25 µl	DMSO
	1,3 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)
	141,2 µl	H ₂ O

Zu 0,4 µg der gelösten DNA wurden 21 µl der PCR-Lösung beigemischt und die DNA im Thermocycler über 30 Zyklen amplifiziert. Ein Zyklus setzte sich zusammen aus einer Denaturierung für 15 Sekunden bei 94 °C, einer Primerhybridisierung für 1 Minute bei 63 °C und einer Elongation für 1 Minute bei 72 °C. Bei jeder PCR wurde eine H₂O-Kontrolle ohne DNA-Template mitgeführt.

3.2.1.4 DNA-Elektrophorese

TAE-Puffer	40 mM	Tris/HCl, pH8,5
	20 mM	Essigsäure
	2 mM	EDTA
DNA-Puffer	40 %	Sacharose
	1 mM	EDTA
	0,25 %	Bromphenolblau

Agarose wurde durch Aufkochen in TAE-Puffer (1 % w/v) gelöst und in Abhängigkeit von der Größe des benötigten Gels in jeweils verschiedenen Volumina angesetzt. Nach der Abkühlung auf ca. 55 °C und Hinzufügung von Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 µg/ml) wurden schließlich nach Polymerisierung des Gels 25 µl der Probe mit 5 µl DNA-Ladepuffer vermengt und in die Geltaschen aufgetragen. Die DNA-Fragmente wurden durch Anlegen einer Spannung von 3-4 V/cm aufgetrennt und die Banden anschliessend mittels einer UV-Lampe und einer LCD-Kamera visualisiert. Anschließend konnten anhand der Banden – des *Gcdh*- bzw. des *Gcdh*^{-/-}-spezifischen Neo-Gens – die Genotypen bestimmt werden.

3.2.1.5 Tandem-Massenspektroskopie

Innerhalb der ersten Lebensstage wurde Blut aus der Schwanzspitze der Mäuse auf Filterpapier aufgetragen, getrocknet und anschließend mittels Tandem-Massenspektroskopie ein quantitatives Acylcarnitinprofil aus dem Trockenblut erstellt. Diese Untersuchungen wurden freundlicherweise im Stoffwechsellabor der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Eppendorf (Dr. Lukacz) durchgeführt. *Gcdh*-defiziente Mäuse konnten durch signifikant erhöhte C5DC-Werte von heterozygoten und Wildtyp-Mäusen unterschieden werden. Dieses Verfahren findet auch im erweiterten Neugeborenenenscreening Anwendung.

3.2.2 Untersuchung der mRNA-Expression

Die Expression spezifischer Gene kann über quantitative-PCR – auch als Realtime-PCR bezeichnet – gemessen werden. Dazu wird mRNA aus dem Gewebe isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Menge an cDNA von spezifischen Genen kann anschließend quantifiziert werden.

3.2.2.1 RNA-Isolierung

DEPC-Wasser 1:1000 Diethylpyrocarbonat in H₂O über Nacht gerührt, anschließend autoklaviert

DEPC-Ethanol 70 % Ethanol in DEPC-Wasser

Es wurden 50-100 mg Gewebe aus Niere bzw. „Hirnstamm“ mit dem Skalpell entnommen, zu 1 ml TriReagent hinzugegeben und mit dem UltraThurrax homogenisiert. Das Homogenat ruhte für 5 Minuten bei Raumtemperatur, anschließend wurden 200 µl Chloroform zur Phasentrennung zugefügt und das Gemisch für 15 Sekunden gevortext. Nach einer erneuten Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Proben für 15 Minuten bei 12.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde die oberste (RNA-enhaltende) Phase abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß gefüllt. Die RNA wurde durch Zugabe von 500 µl Isopropanol gefällt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Danach wurde sie für 10 Minuten bei 12.000 g und 4 °C abzentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 1 ml DEPC-Ethanol gewaschen und für 10 Minuten bei 12.000 x g und 4°C ein weiteres Mal zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in DEPC-Wasser gelöst und es erfolgte eine photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA bei 260 nm. Die gewonnene RNA wurde bei -80 °C gelagert.

3.2.2.2 cDNA-Synthese und quantitative RT-PCR

Mastermix	4 µl	Random Primer 10x
	4 µl	RT-Puffer 10x
	1,6 µl	dNTP-Mix 25x
	2 µl	Reverse Transkriptase
	8,4 µl	DEPC-Wasser

Es wurden 2 µl der gelösten RNA zu 18 µl DEPC-Wasser und 20 µl Mastermix gegeben. Die Proben wurden für 10 Minuten bei 25 °C und für 120 Minuten bei 37 °C in den Thermocycler gegeben. Die so synthetisierte cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Für die quantitative RT-PCR wurden 7 µl H₂O mit 10 µl Universal PCR-Mastermix (siehe 3.1.5) und 1 µl der Gen-spezifischen Primerlösung (Taqman-Assays) ver-

menget. Es wurden 2 µl der gelösten cDNA beigefügt und der Reaktionsansatz für 40 Zyklen in den Mx3000P-Thermocycler gegeben.

Jedes Template (Matrize) wurde pro Zyklus einmal repliziert. Ein Zyklus besteht aus einer 30-sekündigen Phase der Denaturierung bei 95 °C und einer einminütigen Phase der Primerhybridisierung und der Elongation bei 60 °C. Die verwendete Primerlösung ist eine Zusammensetzung aus 3'- und 5'-Primern und fluoreszierenden Sonden. Dabei wird für jede Replikation einer Matrize genau eine Sonde verbraucht. Diese legt wiederum genau einen fluoreszierenden Farbstoff für die Detektion offen. Damit ist die Menge des fluorometrisch messbaren Farbstoffes proportional zur Menge der replizierten Matrizen.

Das Verfahren der quantitativen RT-PCR wird im Folgenden gleichbedeutend als Realtime-PCR bezeichnet.

Die Auswertung erfolgte nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode. Diese vergleicht die relative Konzentration der mRNA eines gesuchten Gens (GOI = gene of interest) mit der Konzentration der mRNA eines Referenz-Gens. In der vorliegenden Arbeit wurde *Gapdh* als „Housekeeping-Gen“ verwendet – unter der Annahme, dass *Gapdh* unter allen Bedingungen gleichbleibend exprimiert wird. Bei der Kontrolle gegen β -Actin – einem weiteren Referenz-Gen – wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den mRNA-Expressionen von β -Actin und *Gapdh* gefunden. Es wurde die Relation der mRNA des untersuchten Gens zu *Gapdh* von zwei Mäusen verschiedener Versuchsbedingungen bestimmt und miteinander verglichen. Mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode können zwar keine Aussagen über die absoluten Konzentrationen erlangt, aber Informationen über die Relation der spezifischen mRNA-Menge zwischen zwei Genotypen oder Untersuchungsbedingungen gewonnen werden (Livak und Schmittgen 2001).

3.2.2.3 Microarray-Analyse

Die Microarray-Analyse ermöglicht die Untersuchung der Expression einer großen Anzahl von Genen. Bei dem hier verwendeten Affymetrix-System sind spezifische Oligonukleotide – die mit 14.000 Genen einen großen Anteil des Mausgenoms repräsentieren – auf einen Chip aufgetragen.

Um Informationen bezüglich der unterschiedlichen Expression zu erlangen wird mRNA aus zu vergleichenden Proben (z.B. Hirnstamm aus verschiedenen Genoty-

pen) isoliert, beim Umschreiben in cDNA mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und mit dem Chip inkubiert. Dabei können die spezifischen cDNAs mit ihren korrespondierenden Oligonukleotiden hybridisieren. Nach dem Waschen können anhand der Fluoreszenzsignalintensität Aussagen über die Expressionsrelationen spezifischer Gene im Vergleich zwischen zwei Proben gemacht werden.

Für den durchgeführten Microarray-Versuch wurde mRNA aus dem Hirnstamm von jeweils zwei 42 Tage alten *Gcdh*^{-/-} Mäusen mit Hochproteindiät und Normaldiät verwendet. Die Microarray-Analyse erfolgte unter Verwendung des Mouse Genome 430A 2.0 Array der Firma Affymetrix im Service-Labor des Instituts für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Eppendorf (Dr. Streichert).

Bei der Analyse der Daten konnten durch Kreuzvergleiche zwischen den vier Tieren Hinweise auf Expressionsveränderungen von verschiedenen Genen gewonnen werden. Dabei wurden nur die Gene als verändert beurteilt, die bei sämtlichen Vergleichen – jeweils *Gcdh*^{-/-} Maus mit Normaldiät (*Gcdh*^{-/-} ND) gegen *Gcdh*^{-/-} Maus mit Hochproteindiät (*Gcdh*^{-/-} HPD) – dieselbe Tendenz aufwiesen.

In dieser Arbeit werden an mehreren Stellen die Ergebnisse eines weiteren Microarrays zitiert, der bereits von Stellmer et al. (2007) unter basalen Bedingungen – also ohne Hochproteindiät – mit Nierengewebe durchgeführt wurde.

3.2.3 Proteinquantifizierung, SDS-Page und Western Blot

Nach der Gewinnung und der Konzentrationsbestimmung von Proteinen aus den untersuchten Geweben wurden diese im SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran geblottet. Die Zielproteine wurden mittels spezifischer Antikörper markiert und unter Chemieluminiszenz detektiert. Anhand der Signalintensitäten konnte eine quantitative Auswertung erfolgen.

3.2.3.1 Proteinbestimmung in Organextrakten, Astrozyten und Neuronen

Homogenisierungspuffer	50 mM	Tris, pH 7,4
	2 mM	EDTA

Bei Extraktion aus Organen wurde etwa 100 mg des jeweils untersuchten Organs in 500 µl Homogenisierungspuffer (pH 7,4) bis zur Bildung eines Homogenats mehrfach mit einer 0,9 mm-Kanüle aufgezogen. Die Zellkerne wurden für 5 Minuten bei 1000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Anschließend wurde dem Homogenat ein Protease-

Inhibitor-Cocktail zugegeben. Zur Proteingewinnung aus Astrozyten und Neuronen wurden diese zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 1,5 ml PBS gelöst. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 900 x g und 4 °C. Das Zellpellet wurde in 100 µl Lysispuffer und Proteinase Inhibitor Cocktail resuspendiert, gevortext und war 30 Minuten auf Eis. Es erfolgte eine Abzentrifugation der Zelltrümmer für 10 Minuten bei 20.000 x g und 4 °C. Es wurde die Proteinkonzentration im Überstand bestimmt und das Extrakt bis zum Beginn des Versuches bei -20 °C gelagert.

3.2.3.2 Isolierung von Membranproteinen

MP-Lösung	10 mM	Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), pH 7,4
	0,5 %	Triton X-100
	2 %	Proteinase-Inhibitor-Cocktail

Es wurden Membranen aus 200 µl des Organextraktes (siehe 3.2.3.1) nach einer 30-minütigen Zentrifugation bei 100.000 x g gewonnen. Diese wurden in 200 µl MP-Lösung im Ultraschall-Desintegrator resuspendiert. Anschließend wurden Triton X100-unlösliche Membranreste für 30 Minuten bei 100.000 x g abgetrennt und die Proteinkonzentration im Überstand nach der Bradford-Methode (siehe 2.2.3.3) bestimmt.

3.2.3.3 Gesamtproteinquantifizierung

Die Proteinkonzentration wurde anhand einer Standardkurve mit BSA als Standardprotein mit dem BioRad Protein Assay (Bradford 1976) bestimmt.

3.2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Tricin-SDS-PAGE)

Tricin-Sammelgel	4 %	Acrylamid
	0,7 M	Tris / HCl, pH 8,45
	0,3 %	SDS
	0,04 %	APS
	0,16 %	TEMED

Tricin-Trenngel	10 %	Acrylamid
	1 %	Tris / HCl, pH 8,45
	0,1 %	SDS
	0,025 %	APS
	0,07 %	TEMED
Solubilizer	250 mM	Tris / HCl, pH 6,8
	2 %	SDS
	20 %	Glycerin
		Coomassie Blue G (reduzierend: + 20 mM DTT)
Anodenpuffer	200 mM	Tris / HCl, pH 8,9
Kathodenpuffer	300 mM	Tris, pH 7,4
	300 mM	Glycin
	0,3 % (w/v)	SDS

Um die spezifische Proteinexpression zu ermitteln wurden gleiche Gesamtproteinmengen miteinander verglichen. Diese wurden mit H₂O zu einem gleichen Probenvolumen aufgefüllt und nach der Zugabe von Solubilizer für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und in die Taschen des Sammelgels gegeben. Das Gel wurde mit einer Spannung von 85 V bei Raumtemperatur gestartet und nach Einlaufen der Proben in das Trenngel auf 180 V erhöht bis die Lauffront am unteren Gelrand angekommen war.

3.2.3.5 Western Blot

Transfer-Puffer	25 mM	Tris
	192 mM	Glycin
	20 %	Methanol
PBS+Tween	10 mM	PBS
	0,1 %	Tween-20

ECL S1	100 µl	Luminol 250 mM
	44 µl	90 mM p-Cumarinsäure
	1 ml	1 M Tris / HCl, pH 8,5
	8,85 ml	H ₂ O
ECL S2	6 µl	H ₂ O ₂ (30 %)
	1 ml	1 M Tris / HCl, pH 8,5
	9 ml	H ₂ O

Der Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrocellulosemembran wurde für 2 h bei 900 mA in einer Elektrolott-Apparatur durchgeführt. Anschließend wurden freie Bindungsstellen auf der Membran durch Inkubation in 5 % Milchpulver in PBS+Tween blockiert. Danach wurde die Membran mit Erstantikörper in 5 % Milchpulver in PBS+Tween für mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Membranen dreimal mit PBS+Tween gewaschen. Mit der lichtgeschützten Inkubation mit, in 5 % Milchpulver in PBS+Tween gelöstem, HRP-gekoppelten Zweitantikörper für eine Stunde wurden die antigengebundenen Erstantikörper detektiert. Als nächstes wurde die Membran für 1 Minute mit einem Gemisch von ECL S1 und S2 benetzt, um die gebundenen Zweitantikörper per Chemielumineszenz zu detektieren. Dazu wurde ein Röntgenfilm mit der Membran in einer Röntgenkassette belichtet und anschließend im Fotolabor entwickelt und fixiert.

3.2.4 Aminosäuren-Konzentration im Blut

Die Konzentration unterschiedlicher Aminosäuren wurde im Trockenblut – das unmittelbar post mortem mit einer EDTA-beschichteten Kanüle aus dem linken Ventrikel entnommen worden war – per Tandem-Massenspektroskopie bestimmt. Diese Untersuchungen wurden freundlicherweise im Stoffwechsellabor der Klinik und Polyklinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Eppendorf (Dr. Lukacz) durchgeführt.

3.2.5 Ammoniak-Konzentration im Blut

Mäusen wurde unmittelbar post mortem Blut mit einer EDTA-beschichteten Kanüle entnommen. Innerhalb eines zehninütigen Zeitfensters wurde die Ammoniak-Konzentration im Blut mittels Teststreifen bestimmt. Die Messung erfolgte über die Reaktion des Ammoniaks mit Borat, wobei das hierbei entstehende Gas den Brom-

kresolgrün-Indikator des Teststreifens verfärbt. Die Verfärbung verhält sich proportional zur Ammoniakkonzentration des untersuchten Materials und wurde mit dem Ammonia Checker II quantifiziert.

3.2.6 Hämoglobin-Nachweis im Urin

Die Bestimmung des Hämoglobins im Urin der Mäuse wurde mit Urin-Teststreifen durchgeführt.

3.2.7 Urin-Mikroskopie

Die Gewinnung des Mäuseurins erfolgte über 24 Stunden in einem metabolischen Käfig. Für die mikroskopische Analyse wurden 2 ml des Urins für 5 Minuten und 1000 x g bei 4°C zentrifugiert. Im Anschluss wurden 80 µl des entstandenen Sedimentes auf einen Objektträger aufgetragen und mit einem Deckplättchen versehen. Das mit dem Mikroskop 400-fach vergrößerte Bild wurde mit einer DP 50-Fotokamera aufgenommen.

3.2.8 Tierexperimentelle Arbeit

Die Genehmigungen der Behörde für Arbeit, Gesundheit und Soziales der Freien und Hansestadt Hamburg für die Tierhaltung und die Tötung der Tiere zum Zwecke der Organentnahme gemäß §6 Abs. 1 Satz 2 Nr. 4 TierSchG (AZ G21132/591-00.33 vom 26.09.2001) sowie zur Durchführung der in diesem Antrag beschriebenen Tierversuche (AZ 26/05, Genehmigung vom 2.6.2005 und Ergänzungsgenehmigung vom 1.6.2006) – wie die Haltung der Tiere in metabolischen Käfigen – liegen vor.

3.2.8.1 Tierhaltung

Für die hier beschriebenen Experimente wurden nur 42 Tage alte Tiere verwendet. Den Mäusen war Futter und Wasser unbegrenzt zugänglich, auch wurde auf die Einhaltung eines Licht-/Dunkelheitszyklus von zwölf Stunden geachtet. Einzelne Tiere wurden in speziellen metabolischen Käfigen gehalten, mit denen es möglich war, Urin und Kot für spätere Analysen getrennt aufzufangen. Bevor Tiere in metabolischen Käfigen eine Hochproteindiät bekamen, wurden sie für mindestens einen Tag an den metabolischen Käfig adaptiert.

3.2.8.2 Hochproteindiät

Um bei den *Gcdh*^{-/-} Mäusen eine encephalopathische Krise zu induzieren, wurde ihnen eine Hochproteindiät angeboten (siehe 1.2). Das proteinangereicherte Futter

(TD.03637, Harland Tekland, USA) hatte einen Gesamtproteingehalt von 62% und bestand aus 51% Casein und 49% Standard-Tiernahrung (mit einem Proteingehalt von 22%).

3.2.8.3 Gewinnung des Gewebematerials

Bei den Tieren wurde unmittelbar nach Beginn einer typischen Symptomatik – die erfahrungsgemäß ein baldiges Sterben der Mäuse (innerhalb der nächsten 24 Stunden) zur Folge hätte – der Tod herbeigeführt. Symptome einer beginnenden encephalopathischen Krise waren eine gekrümmte Körperhaltung, Hypothermie, verstärkte Gewichtsabnahme (ermittelt in Abständen von 24 Stunden), struppiges Fell, Trinkverweigerung (ermittelt durch Wiegen der Trinkflasche in Abständen von 24 Stunden), Nahrungsverweigerung, Defizite in motorischen Tests (Balance auf Teststab) und Schnappatmung. Diese Phase wurde ausgewählt, da sich hier bereits eindeutig pathologische Veränderungen abzeichnen, die Organe gleichsam dem unmittelbar verstorbenen Organismus entnommen werden konnten.

Die Tiere wurden durch CO₂ narkotisiert und cervikal disloziert. Nach Eröffnung des Thorax wurde über eine Punktion aus dem Herzen Blut gewonnen. Im unmittelbaren Anschluss daran wurden die benötigten Organe entnommen: in der Regel waren dies Leber, Nieren, Jejunum, Cortex und Hirnstamm. Mit dem unmittelbaren Einfrieren in flüssigem Stickstoff und der Lagerung bei -80 °C wurden die Organe für weitere experimentelle Analysen konserviert.

3.2.9 Statistik

Die statistische Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit erfolgte mit SPSS 15.0. Die Signifikanz von Haupteffekten und deren Interaktion wurde anhand eines allgemeinen linearen Modells überprüft. Die signifikanten Unterschiede zwischen zwei Gruppen, z.B. bei Expressionsuntersuchungen mit der Realtime-PCR, wurden mit einem Least Significant Difference-Test mit den geschätzten Mittelwerten und Standardfehlern der dCT-Werte überprüft. Die beispielhafte Auswertung einer Realtime-PCR-Analyse ist in 4.2.2.1 dargestellt. Eine Signifikanz wurde ab einem p-Wert $\leq 0,05$ angenommen. In den Abbildungen wurde ein p-Wert $\leq 0,05$ mit zwei und ein p-Wert $\leq 0,01$ mit drei Sternen gekennzeichnet.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung der induzierten encephalopathischen Krise

Zunächst sollte die bei Zinnanti (Zinnanti et al. 2006) beschriebene Methode zur Induktion einer encephalopathischen Krise in unserem Labor etabliert und standardisiert werden. Dazu wurde *Gcdh*^{-/-} Mäusen eine Hochproteindiät appliziert und der Verlauf mit charakteristischen Symptomen (siehe 3.2.8.3) beobachtet. Zu Beginn der Hochproteindiät waren sämtliche Mäuse – die für die Experimente dieser Arbeit verwendet wurden – 42 Tage alt. Dadurch sollte eine möglichst homogene Untersuchungsgruppe gewährleistet werden, da in Vorversuchen eine Altersabhängigkeit bei der Entwicklung der induzierten metabolischen Krise gezeigt wurde (Zinnanti et al. 2006; Keyser et al. 2008). Es wurden grundlegende Parameter der induzierten metabolischen Krise – wie die Überlebensdauer, der Gewichtsverlauf und die Reversibilität der HPD-induzierten Krise – untersucht.

4.1.1 Überlebensdauer der *Gcdh*^{-/-} Mäuse unter Hochproteindiät

Die Überlebenszeit von *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Normal- und Hochproteindiät wurde statistisch erfasst. Dazu wurde die Zeitspanne vom Diätbeginn bis zur Tötung – nach dem Einsetzen von Symptomen einer encephalopathischen Krise – gemessen.

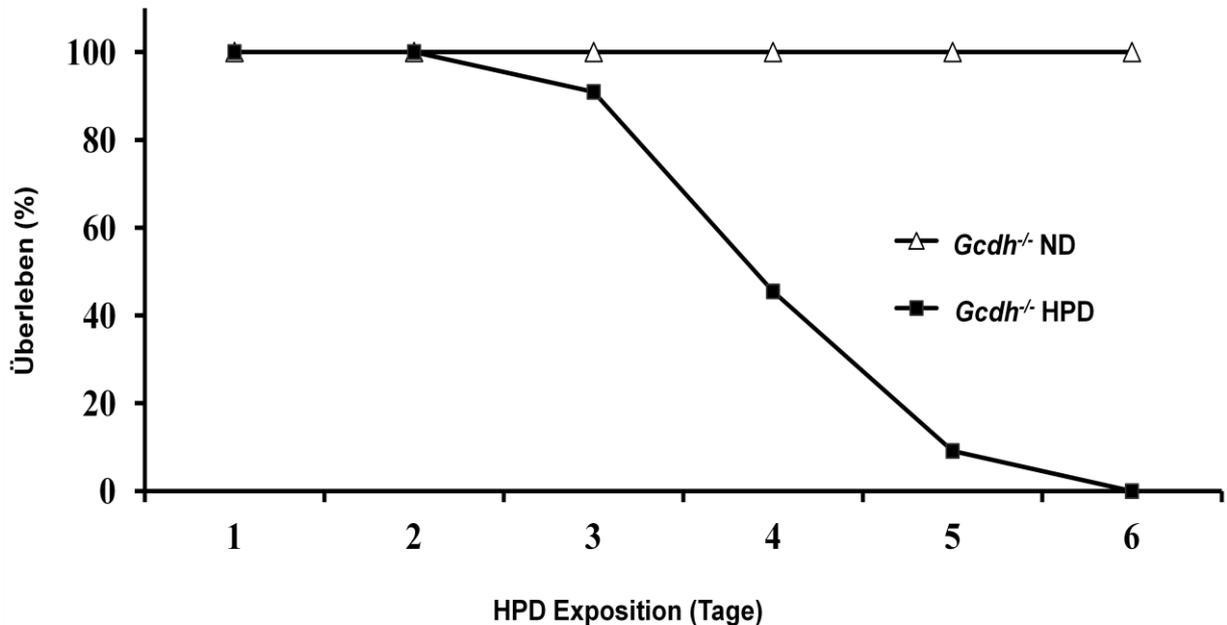


Abbildung 3: Überlebensrate von $Gcdh^{-/-}$ Mäusen unter Hochproteindiät (HPD; $n=11$) im Vergleich zur Normaldiät (ND; $n=11$). Die Diät wurde im Alter von 42 Tagen begonnen.

Bei $Gcdh^{-/-}$ Mäusen unter Hochproteindiät wiesen 91 % der Tiere am dritten bis fünften Tag nach Diätbeginn eindeutige Krisensymptome auf, die schließlich zur Tötung führten (Abbildung 3). Bei $Gcdh^{-/-}$ Mäusen mit Normaldiät kam es zu keinen Symptomen. Es zeigte sich ein Trend zu einer früheren Entwicklung von Symptomen bei männlichen $Gcdh^{-/-}$ Mäusen unter HPD, dieser war jedoch nicht signifikant.

4.1.2 Gewichtsentwicklung der $Gcdh^{-/-}$ Mäuse unter Hochproteindiät

Ein Symptom der encephalopathischen Krise im Tiermodell ist die Gewichtsabnahme der erkrankten Mäuse. Es wurde der Gewichtsverlauf von $Gcdh^{-/-}$ und Wildtyp-Mäusen unter Hochproteindiät miteinander verglichen.

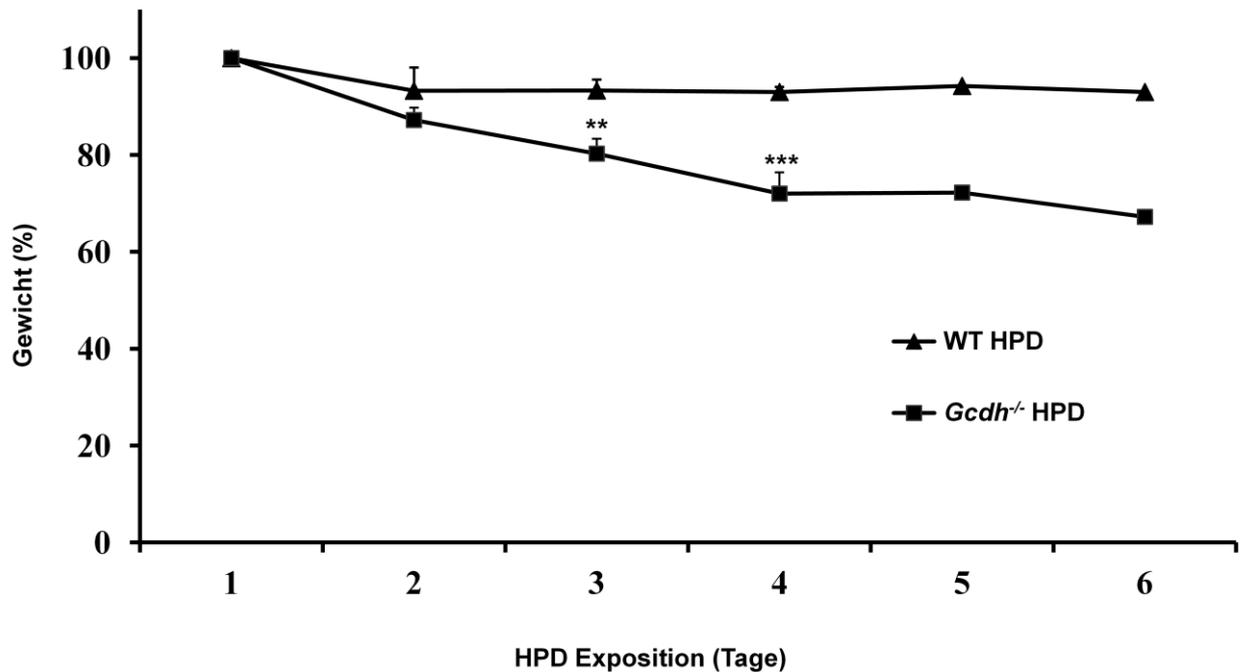


Abbildung 4: Darstellung des Verlaufs der durchschnittlichen relativen Körpergewichte im Verhältnis zum Gewicht am Versuchsbeginn von $Gcdh^{-/-}$ ($n=8$) und Wildtyp (WT)-Mäusen ($n=5$) unter Hochproteindiät (HPD). ** $p<0,05$; *** $p<0,01$ im zweiseitigen Students t -Test mit ungepaarten Stichproben. Am 5. und 6. Tag der HPD-Exposition wurde keine statistische Auswertung durchgeführt, da jeweils nur ein Tier in jeder Versuchsgruppe überlebt hat.

Schon drei Tage nach HPD-Exposition zeigt sich bei $Gcdh^{-/-}$ Mäusen eine signifikante Gewichtsabnahme um 14 % im Vergleich zu Wildtyp Mäusen unter HPD (Abbildung 4). Zu diesem Zeitpunkt weisen die Mäuse noch keine weiteren Anzeichen einer beginnenden encephalopathischen Krise auf. Die Gewichtsabnahme stellt somit das erste klinische Anzeichen einer induzierten encephalopathischen Krise bei $Gcdh^{-/-}$ Mäusen dar. Nach 5-6 Tagen HPD-Exposition war das Körpergewicht der $Gcdh^{-/-}$ Mäuse um 22 %, bzw. 26 % im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen reduziert.

4.1.3 Reversibilität von Folgen der Hochproteindiät

Es sollte untersucht werden, inwieweit Symptome und Veränderungen, die bereits in den ersten drei Tagen der induzierten encephalopathischen Krise einsetzen, durch das Absetzen der Hochproteindiät und die Fütterung einer Normaldiät reversibel oder irreversibel sind und dann trotz Normaldiät gegebenenfalls zum Tode führen. Dazu wurden $Gcdh^{-/-}$ Mäuse für ein, zwei oder drei Tage mit Hochproteindiät gefüttert und bekamen im Anschluss wieder herkömmliches Futter (Abbildung 5). Anhand von drei wesentlichen Kriterien sollte untersucht werden, welche Veränderungen sich bei den

Tieren unter diesen Bedingungen zeigten. Das einfachste und gleichsam wichtigste Merkmal war das Überleben bis zum siebten Tag der Normaldiät und die klinischen Symptome der Maus. Darüber hinaus wurden das Gewicht und mRNA-Expressionsveränderungen von *Oat2*, *Oatp1a6*, *Ut-A* und *Ace* im Nierengewebe der Mäuse untersucht (siehe 4.2.9).

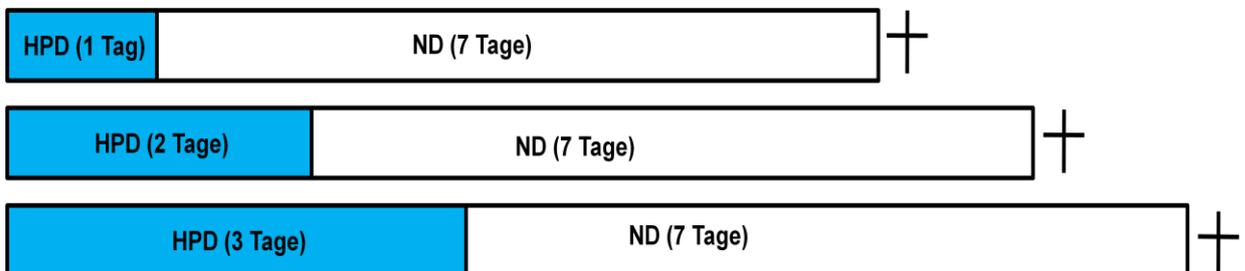


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Es wurde jeweils einer *Gcdh*^{-/-} Maus am 42. Lebenstag für ein, zwei oder drei Tage Hochproteindiät (HPD) und anschließend für sieben Tage Normaldiät (ND) verfüttert bevor sie getötet wurde.

4.1.3.1 Überleben und Symptome

Alle getesteten *Gcdh*^{-/-} Mäuse, denen für 1, 2 oder 3 Tage HPD verfüttert wurde haben die Versuchsanordnung bis zur Tötung – nach sieben Tagen unter Normaldiät – überlebt. Innerhalb dieser Zeitspanne zeigten sich – außer einem Gewichtsverlust bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen, die für 2, bzw. 3 Tage HPD erhielten (siehe 4.1.3.2) – keine Symptome einer encephalopathischen Krise.

4.1.3.2 Gewichtsverlauf

Es wurde untersucht wie sich das Gewicht der Mäuse, die zwei bzw. drei Tage Hochproteindiät bekamen, unter diesen speziellen Bedingungen verhält. Das Ergebnis wurde mit dem Gewichtsverlauf der *Gcdh*^{-/-} und Wildtyp-Mäuse unter anhaltender Hochproteindiät verglichen.

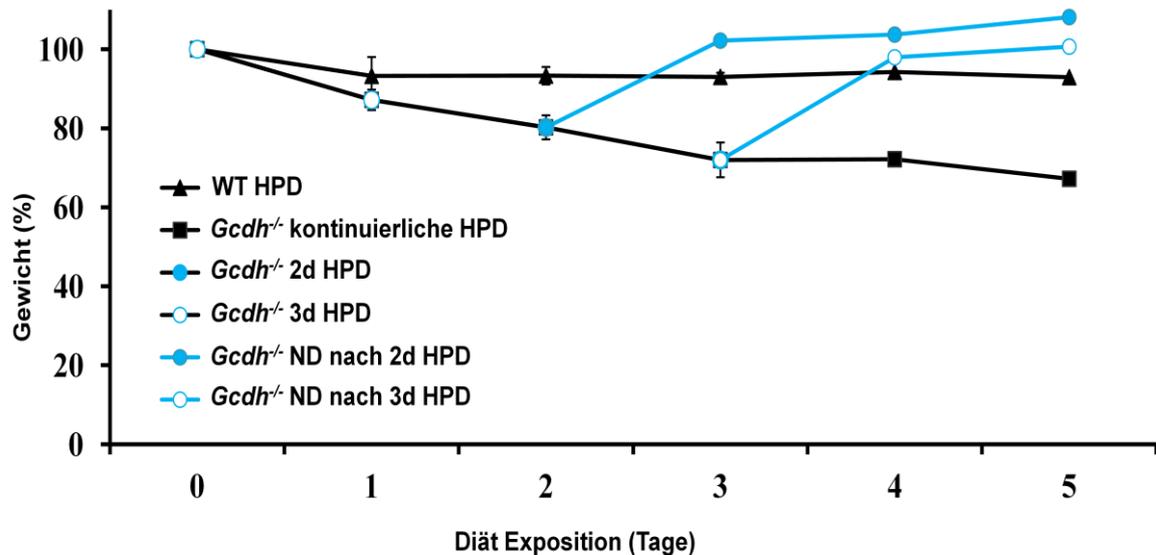


Abbildung 6: Der Gewichtsverlauf der *Gcdh*^{-/-} Mäuse während der zwei bzw. drei Tage applizierten Hochproteindiät (HPD, je n = 1) und unter der anschließenden Normaldiät (ND) wurden aufgetragen und mit dem Gewichtsverlauf der *Gcdh*^{-/-} und Wildtyp-Mäuse unter dauerhaften Hochproteindiät verglichen.

Nach Beendigung der zwei, bzw. dreitägigen HPD und der erneuten Fütterung mit Normaldiät zeigten die *Gcdh*^{-/-} Mäuse eine schnelle Regeneration des Gewichtes: Schon einen Tag nach der erneuten Gabe von herkömmlichem Futter nahmen die Tiere über die Kontrollgruppe (Wildtyp-Mäuse unter HPD) hinaus an Gewicht zu (Abbildung 6).

4.2 Genexpression in der Niere von *Gcdh*^{-/-} Mäusen vor und während der induzierten encephalopathischen Krise

Vorab war in der Arbeitsgruppe mit RNA aus Nieren von Wildtyp- und *Gcdh*^{-/-} Mäusen eine Microarray-Analyse durchgeführt worden, mit dem Ziel, eventuell am Transfer organischer Säuren beteiligte Transporter zu identifizieren (Stellmer et al. 2007). Aus dieser Liste veränderter Genexpressionen wurden Kandidatengene ausgewählt und ihr Expressionsmuster mittels Realtime-PCR unter basalen Bedingungen und nach 3-5 Tagen HPD in der induzierten encephalopathischen Krise untersucht.

4.2.1 NaC3-Expression im Nierengewebe

Die Auswertung der Realtime-PCR-Daten durch eine ANOVA-Analyse ergab signifikante bzw. hochsignifikante Haupteffekte des Genotypes ($p = 0,041$) und der Diät (p

= 0,002), als auch eine signifikante Wechselwirkung zwischen Genotyp und Diät ($p = 0,037$) in Bezug auf die Genexpression von NaC3. Eine detaillierte Beschreibung der statistischen Auswertung erfolgt in 4.2.2.1.

In der Microarray-Analyse der Niere wurde eine Hochregulation der *NaC3*-mRNA bei 42 Tage alten *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter ND um den Faktor 1,7 im Verhältnis zu Wildtyp-Mäusen unter Normaldiät gemessen (Stellmer 2007). Eine hochsignifikante 2,6-fache Hochregulation der *NaC3*-mRNA-Expression in der Niere von *Gcdh*^{-/-} im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen unter Normaldiät konnte auch in der Realtime-PCR gefunden werden (Abbildung 7). Ferner zeigte sich, dass sich die mRNA-Expression von *NaC3* bei Wildtyp-Tieren unter HPD um den Faktor 3,8 im Vergleich zu Wildtyp-Tieren unter Normaldiät erhöht. Bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter HPD zeigt sich jedoch keine signifikante Veränderung der Genexpression von *NaC3* im Vergleich zur Normaldiät.

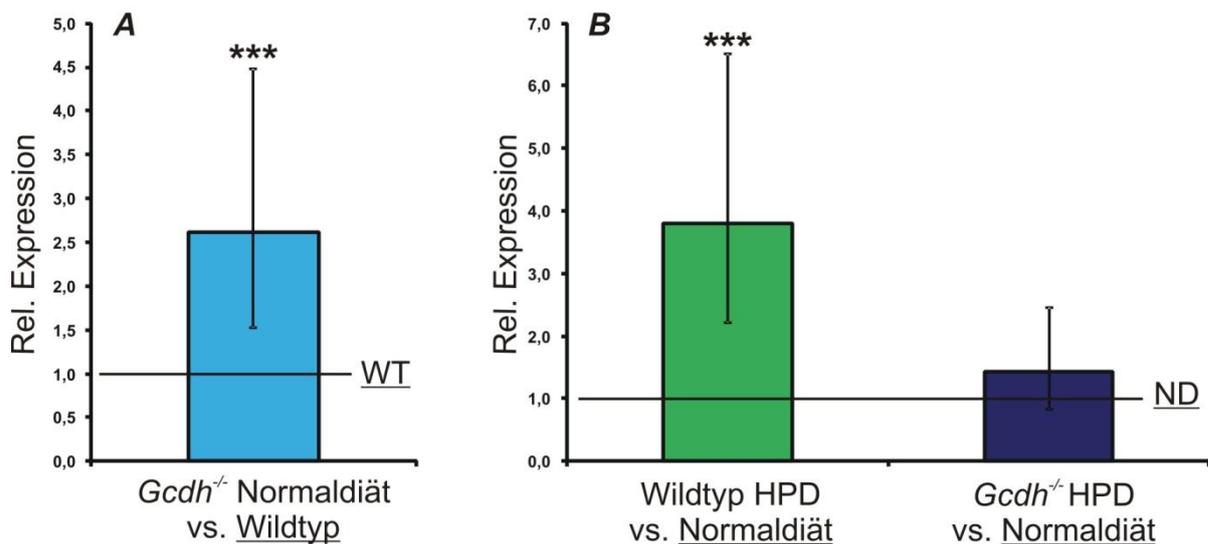


Abbildung 7: Relative *NaC3*-Genexpression im Nierengewebe. Die Höhe der Balken gibt die relative Expression und das 95 %-Konfidenzintervall zu der jeweiligen Bezugsgruppe an. **A** *Gcdh*^{-/-} im Vergleich zu Wildtyp (WT)-Mäusen unter Normaldiät (jeweils $n = 3$). **B** Wildtyp- und *Gcdh*^{-/-} Mäuse unter HPD (Hochproteindiät) im Vergleich zur Normaldiät (ND; jeweils $n = 3$). Die Hilfslinie kennzeichnet eine unveränderte Expression im Vergleich zur Bezugsgruppe (relative Expression = 1). *** $p < 0,01$ im LSD (Least Significant Difference)-Test.

4.2.2 Renale organische Anionentransporter

Die organischen Anionentransporter hOAT1 und hOAT4 wurden kürzlich als hochaffine Transporter für GA und 3OHGA identifiziert (Hagos et al. 2008). Daher sollte die Expression von *mOat1* und *mOat2* – murine Homologe zu *hOAT1* bzw. *hOAT4* (G.

Burckhardt, Göttingen, persönliche Mitteilung) – in Nieren von *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter basalen Bedingungen und in der HPD-induzierten encephalopathischen Krise untersucht werden.

4.2.2.1 Genexpression von *Oat1* im Nierengewebe

Die statistische Auswertung der Realtime-PCR-Analysen soll im Folgenden beispielhaft anhand der *Oat1*-Genexpression im Nierengewebe dargestellt werden. Die weiteren untersuchten Gene wurden identisch analysiert. Für eine bessere Übersichtlichkeit wurde sich hier jedoch auf eine graphische Darstellung der paarweisen Vergleiche beschränkt.

Im Fall von *Oat1* wurden für jede Versuchsbedingung (Wildtyp unter Normaldiät, Wildtyp unter HPD, *Gcdh*^{-/-} unter Normaldiät, *Gcdh*^{-/-} unter HPD) bei jeweils drei Tieren (mit 1-3 gekennzeichnet) die Genexpressionen im Nierengewebe untersucht. Es wurden dreifach-Bestimmungen der CT-Werte (Cycle Threshold) eines sogenannten Housekeeping-Gens (hier: *Gapdh*) und des sogenannten „Gen of Interest“ (hier: *Oat1*) durchgeführt. Die Differenzen wurden arithmetisch gemittelt und werden im Folgenden dCT-Wert genannt.

Tabelle 2: Arithmetische gemittelte Differenzen der CT-Werte von *Gapdh* und *Oat1* im Nierengewebe.

	dCT-Wert
Wildtyp Normaldiät 1	4,30
Wildtyp Normaldiät 2	5,10
Wildtyp Normaldiät 3	4,20
Wildtyp HPD 1	4,50
Wildtyp HPD 2	3,90
Wildtyp HPD 3	3,60

	dCT-Wert
<i>Gcdh</i> ^{-/-} Normaldiät 1	3,10
<i>Gcdh</i> ^{-/-} Normaldiät 2	3,20
<i>Gcdh</i> ^{-/-} Normaldiät 3	3,50
<i>Gcdh</i> ^{-/-} HPD 1	4,10
<i>Gcdh</i> ^{-/-} HPD 2	4,70
<i>Gcdh</i> ^{-/-} HPD 3	4,00

Die dCT-Werte wurden mittels eines allgemeinen linearen Modells mit SPSS 15.0 analysiert. Hierbei wurden die Effekte des Genotypes, der Diät und deren Wechselwirkung auf die Genexpression von *Oat1* untersucht.

Tabelle 3: Effekte des Genotyps, der Diät und deren Wechselwirkung auf die dCT-Werte von *Oat1*.

Quelle	Signifikanz
Genotyp	0,062
Diät	0,342
Genotyp * Diät	0,011

Es zeigten sich keine signifikanten Effekte der Einflussfaktoren Genotyp oder Diät (im folgenden Haupteffekte genannt) auf die Genexpression von *Oat1*, jedoch signifikante Wechselwirkungen zwischen Genotyp und Diät mit einem p-Wert < 0,05.

Für die weitere Analyse wurden außerdem Schätzungen der Mittelwerte, der Standardfehler und des resultierenden 95% Konfidenzintervalls (mit SPSS 15.0) von den dCT-Werten aufgestellt.

Tabelle 4: Mittelwerte, Standardfehler und 95% Konfidenzintervalle der dCT-Werte.

Genotyp	Diät	Mittelwert	Standardfehler	95% Konfidenzintervall	
				Untergrenze	Obergrenze
Wildtyp	Normaldiät	4,533	0,231	4,001	5,066
	Hochproteindiät	4,000	0,231	3,467	4,533
<i>Gcdh</i> ^{-/-}	Normaldiät	3,267	0,231	2,734	3,799
	Hochproteindiät	4,267	0,231	3,734	4,799

Mittels LSD (= Least Significant Difference)-Tests wurden die Daten auf signifikante Unterschiede der dCT-Mittelwerte zwischen den einzelnen Untergruppen getestet. Hier wurden die Gruppen Wildtyp gegen *Gcdh*^{-/-} unter Normaldiät, Wildtyp unter Normal- gegen Hochproteindiät und *Gcdh*^{-/-} unter Normal- gegen Hochproteindiät miteinander verglichen.

Tabelle 5: Paarweise Vergleiche mit LSD (= Least Significant Difference)-Test zwischen Wildtyp und *Gcdh*^{-/-} unter Normaldiät, Wildtyp unter Normal- und Hochproteindiät und *Gcdh*^{-/-} unter Normal- und Hochproteindiät.

			Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95% Konfidenzintervall für die Differenz	
						Obergrenze	Untergrenze
Normaldiät	Wildtyp	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	1,267	0,327	0,005	0,514	2,020
Wildtyp	Normaldiät	Hochproteindiät	0,533	0,327	0,141	-0,220	1,286
<i>Gcdh</i> ^{-/-}	Normaldiät	Hochproteindiät	-1,000	0,327	0,016	-1,753	-0,247

Hierbei zeigten sich signifikante Expressionsunterschiede zwischen Wildtyp- und *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Normaldiät und zwischen *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Normal- und Hochproteindiät (mit einem p-Wert < 0,05).

Für die Berechnung der relativen Expressionen der drei oben genannten Vergleiche wurden die geschätzten Mittelwerte und die Standardfehler der dCT-Werte mithilfe der ddCT-Methode (Livak und Schmittgen 2001) umgerechnet.

Tabelle 6: Mit ddCT*-Methode errechnete relative Expression und 95%-Konfidenzintervall.

Versuchsbedingung	Im Vergleich zu	Rel. Expression	Obergrenze**	Untergrenze**
<i>Gcdh</i> ^{-/-} Normaldiät	Wildtyp Normaldiät	2,41	3,75	1,54
Wildtyp HPD	Wildtyp Normaldiät	1,45	2,26	0,93
<i>Gcdh</i> ^{-/-} HPD	<i>Gcdh</i> ^{-/-} Normaldiät	0,50	0,78	0,32

* ddCT-Werte entsprechen den Differenzen der geschätzten dCT-Mittelwerte der zu vergleichenden Gruppen. ** Die Obergrenze und Untergrenze wurden anhand der Formel $2(-ddCT \pm 1,96 \times \sqrt{(\text{Stand. Abw } 1^2 + \text{Stand. Abw } 2^2)})$ ermittelt.

Diese relativen Expressionen wurden graphisch mit einem Balkendiagramm dargestellt.

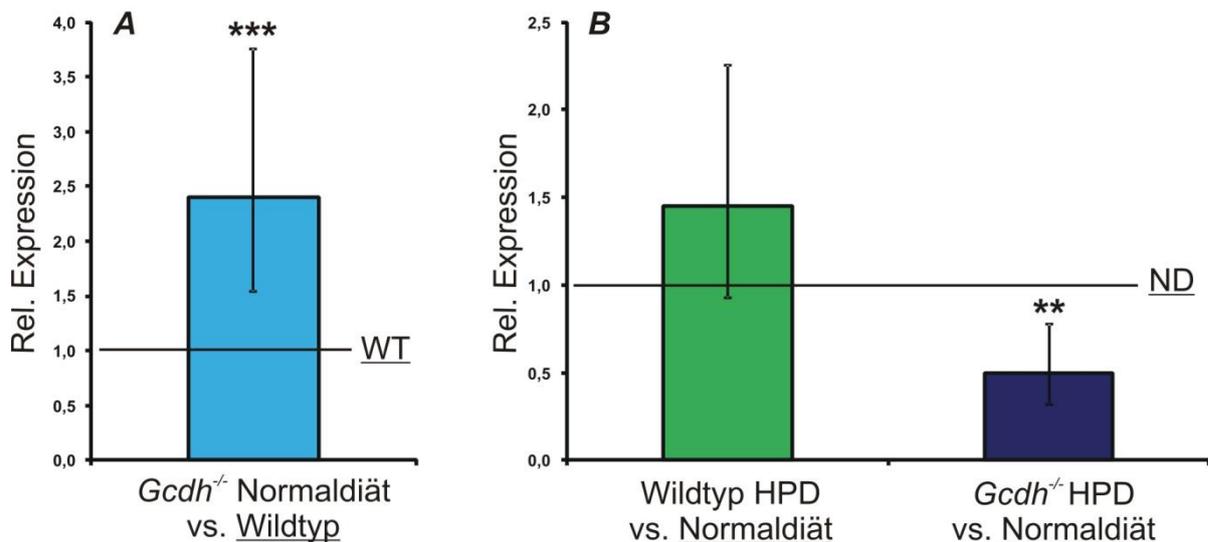


Abbildung 8: Relative *Oat1*-Genexpression im Nierengewebe. Die Höhe der Balken gibt die relative Expression und das 95 %-Konfidenzintervall zu der jeweiligen Bezugsgruppe an. **A** $Gcdh^{-/-}$ im Vergleich zu Wildtyp (WT)-Mäusen unter Normaldiät (jeweils $n = 3$). **B** Wildtyp- und $Gcdh^{-/-}$ Mäuse unter HPD (Hochproteindiät) im Vergleich zur Normaldiät (ND; jeweils $n = 3$). Die Hilfslinie kennzeichnet eine unveränderte Expression im Vergleich zur Bezugsgruppe (relative Expression = 1). ** $p < 0,05$, *** $p < 0,01$ im LSD (Least Significant Difference)-Test.

Die *Oat1*-mRNA-Expression ist im Nierengewebe von $Gcdh^{-/-}$ gegenüber Wildtyp-Mäusen unter Normaldiät signifikant auf das ca. 2,4-fache erhöht (Abbildung 8 A). Der ca. 1,5-fache Expressionsunterschied zwischen Wildtyp-Tieren unter HPD und unter Normaldiät ist nicht signifikant (Abbildung 8 B). Des Weiteren ist die *Oat1*-Genexpression von $Gcdh^{-/-}$ Mäusen in der HPD-induzierten Krise im Vergleich zu $Gcdh^{-/-}$ Mäusen unter Normaldiät in der Niere um die Hälfte reduziert.

4.2.2.2 Proteinquantifizierung von *Oat1* im Nierengewebe

Um zu überprüfen, ob Expressionsveränderungen auf mRNA-Ebene auch Auswirkungen auf die *Oat1*-Proteinmenge haben, wurden *Oat1*-spezifische Western Blots mit extrahierten Membranproteinen aus Mäusenieren durchgeführt. Mit der Verwendung eines Tris/Tricin Gels konnte eine bessere Auftrennung der Proteinfractionen erreicht werden. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von MnSOD.

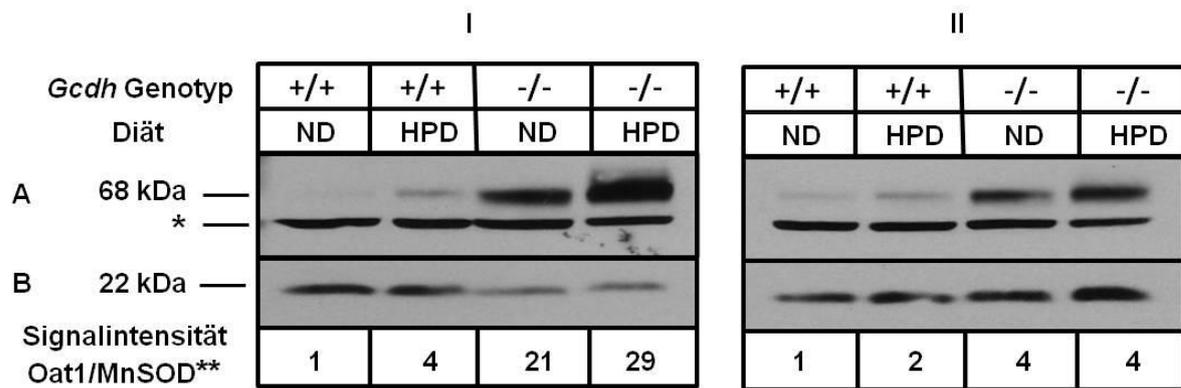


Abbildung 9: **A** Oat1-spezifische Western Blots von Membranproteinextrakten (250 µg Protein) aus Nieren. Western Blots von zwei unabhängigen Versuchsansätzen (I und II) sind dargestellt. 42 Tage alte Wildtyp und *Gcdh*^{-/-} Mäuse wurden nach 4 Tagen unter Normal- (ND) und Hochproteindiät (HPD) analysiert. **B** Ladekontrolle mit dem mitochondrialen Markerprotein Mangan-Superoxiddismutase (MnSOD). * unspezifische Bande bei 64 kDa. ** Relative Signalintensität der spezifischen Oat1-immunreaktiven Bande im Verhältnis zur MnSOD-Bande. Dabei wurde die relative Oat1-Expression bei Wildtyp unter Normaldiät als 1 gesetzt.

Die densitometrische Auswertung von zwei Western Blots (Abbildung 9) ergab eine – relativ zur MnSOD-Menge - durchschnittlich 7,4-fach erhöhte Oat1-Proteinmenge im Nierengewebe von *Gcdh*^{-/-} im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Bei den Wildtyp-Mäusen wird unter HPD 3-fach mehr Oat1-Protein exprimiert als unter Normaldiät. Bei Versuchsgruppe I war die Oat1-Konzentration bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Hochproteindiät 1,4-fach höher als bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Normaldiät. In Versuchsgruppe II war die relative Oat1-Konzentration bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Hochproteindiät im Vergleich zur Normaldiät unverändert.

Um zu untersuchen, ob es sich bei der 68 kDa-immunreaktiven Bande um Oat1 handelt, wurden Extrakte verschiedener Organe von Wildtyp- und *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Normaldiät durch einen mOat1-Western Blot analysiert.

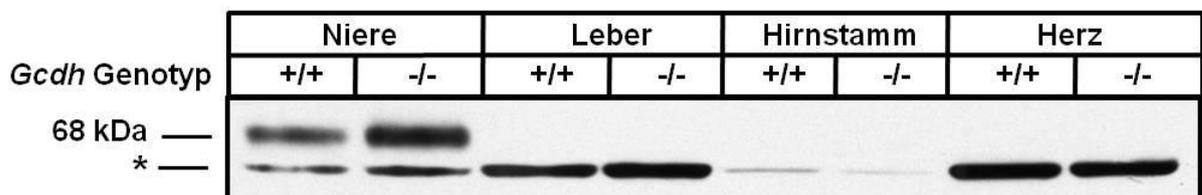


Abbildung 10: Oat-1-spezifischer Western Blot von Membranproteinextrakten aus unterschiedlichen Mausorganen von Wildtyp und *Gcdh*^{-/-} Mäusen mit Normaldiät. * unspezifische Bande bei 64 kDa.

Das 68 kDa-Oat1-Polypeptid war nur im Nierengewebe nachweisbar, nicht jedoch in Leber, Hirnstamm oder Herz. Die zweite reaktive Bande mit erhöhter elektrophoretischer Mobilität, die in allen Organen nachweisbar ist, muss als unspezifisch angesehen werden.

Zusammenfassend sind die *Oat1*-mRNA-Spiegel bei 42 Tage alten *Gcdh*^{-/-} Mäusen im Nierengewebe unter Normaldiät höher als bei Wildtyp Mäusen. Bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter HPD ist die *Oat1*-mRNA-Expression im Vergleich zu *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Normaldiät vermindert (Abbildung 8), wohingegen auf Proteinebene zu diesem Zeitpunkt eine erhöhte, bzw. unveränderte Expression von Oat1 bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter HPD im Vergleich zu *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Normaldiät nachweisbar ist (Abbildung 9).

4.2.3 Genexpression von *Oat2* im Nierengewebe

Die Auswertung der Realtime-PCR-Daten durch eine ANOVA-Analyse ergab einen hochsignifikanten Haupteffekt des Genotypes ($p = 0,001$), keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Diät ($p = 0,824$) und eine hochsignifikante Wechselwirkung zwischen Genotyp und Diät ($p < 0,001$) in Bezug auf die Genexpression von *Oat2* im Nierengewebe.

In der Microarray-Analyse der Niere wurde eine Hochregulation der *Oat2*-mRNA bei 42 Tage alten *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Normaldiät um den Faktor 1,7 im Verhältnis zu Wildtyp-Mäusen unter Normaldiät gemessen (Stellmer 2007). Diese Tendenz konnte mittels Realtime-PCR bestätigt werden (Abbildung 11 A). Es zeigte sich außerdem eine signifikant erhöhte *Oat2*-Expression in Nieren von Wildtyp-Mäusen unter Hochproteindiät gegenüber Wildtyp-Tieren mit Normaldiät um den Faktor 4,2 (Abbildung 11 B). Während der induzierten metabolischen Krise sinkt jedoch die *Oat2*-mRNA-Expression bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen am 4. Tag unter HPD gegen über *Gcdh*^{-/-} Mäuse unter Normaldiät um den Faktor 3,9.

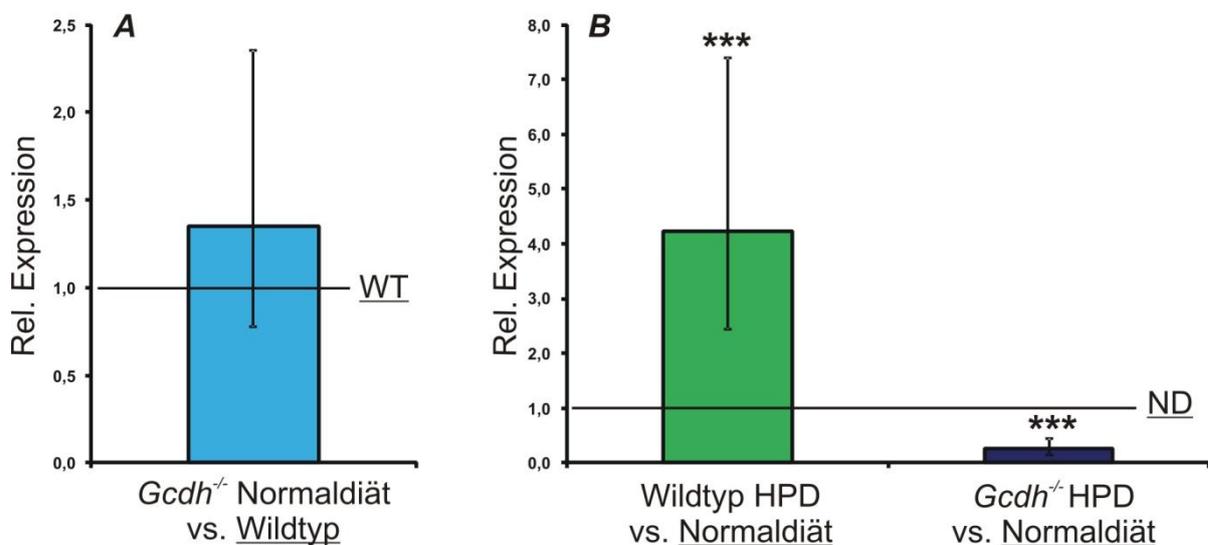


Abbildung 11: Relative *Oat2*-Genexpression im Nierengewebe. Die Höhe der Balken gibt die relative Expression und das 95 %-Konfidenzintervall zu der jeweiligen Bezugsgruppe an. **A** *Gcdh*^{-/-} im Vergleich zu Wildtyp (WT)-Mäusen unter Normaldiät (jeweils $n = 3$). **B** Wildtyp- und *Gcdh*^{-/-} Mäuse unter HPD (Hochproteindiät) im Vergleich zur Normaldiät (ND; jeweils $n = 3$). Die Hilfslinie kennzeichnet eine unveränderte Expression im Vergleich zur Bezugsgruppe (relative Expression = 1). *** $p < 0,01$ im LSD (Least Significant Difference)-Test. Für eine detaillierte Beschreibung der statistischen Auswertung siehe 4.2.2.1.

4.2.4 Genexpression von *Oatp1a6* im Nierengewebe

Die Auswertung der Realtime-PCR-Daten durch eine ANOVA-Analyse ergab sowohl hochsignifikante Haupteffekte des Genotypes ($p < 0,001$) und der Diät ($p < 0,001$), als auch hochsignifikante Wechselwirkungen zwischen Genotyp und Diät ($p < 0,001$) in Bezug auf die Genexpression von *Oatp1a6*.

In der Microarray-Analyse der Niere wurde eine Hochregulation der *Oatp1a6*-mRNA bei 42 Tage alten *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Normaldiät um den Faktor 1,7 im Verhältnis zu Wildtyp-Mäusen unter Normaldiät gemessen (Stellmer 2007). Dies lässt sich durch Realtime-PCR nicht bestätigen (Abbildung 12 A). Es zeigt sich die Tendenz einer verminderten *Oatp1a6*-Genexpression bei Wildtyp-Tieren unter HPD, die im Vergleich zu Wildtyp-Tieren unter Normaldiät auf 72 % absinkt (Abbildung 12 B). Die mRNA-Expression von *Oatp1a6* in Nierengewebe von *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter HPD ist im Vergleich zu *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Normaldiät signifikant auf etwa 13 % reduziert.

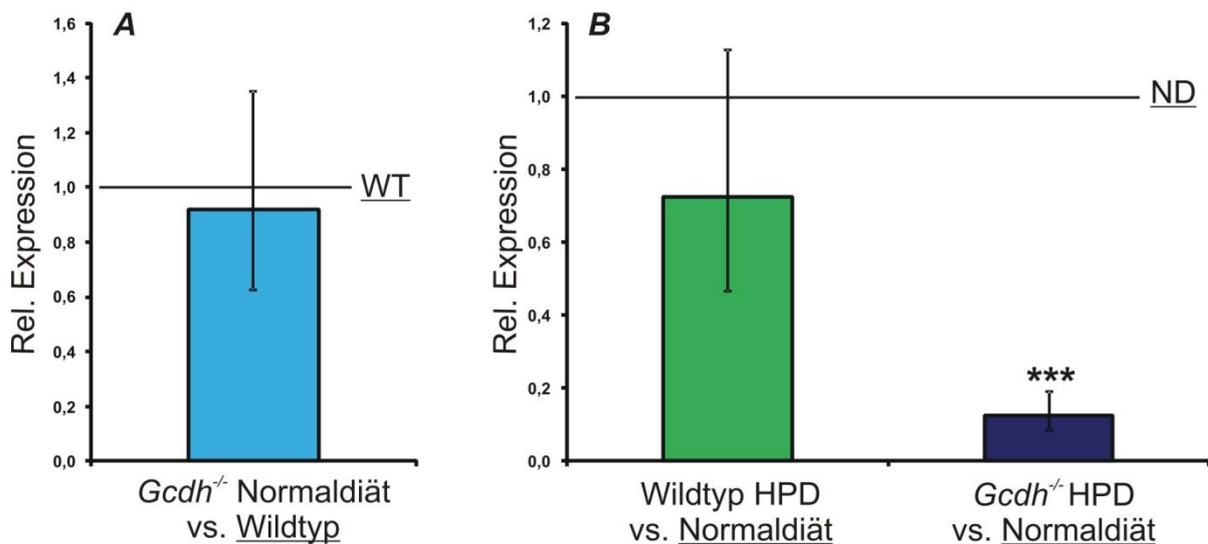


Abbildung 12: Relative *Oatp1a6*-Genexpression im Nierengewebe. Die Höhe der Balken gibt die relative Expression und das 95 %-Konfidenzintervall zu der jeweiligen Bezugsgruppe an. **A** *Gcdh*^{-/-} im Vergleich zu Wildtyp (WT)-Mäusen unter Normaldiät (jeweils $n = 5$). **B** Wildtyp ($n = 3$)- und *Gcdh*^{-/-} ($n = 4$) Mäuse unter HPD (Hochprotein-diät) im Vergleich zur Normaldiät (ND; jeweils $n = 3$). Die Hilfslinie kennzeichnet eine unveränderte Expression im Vergleich zur Bezugsgruppe (relative Expression = 1). *** $p < 0,01$ im LSD (Least Significant Difference)-Test. Für eine detaillierte Beschreibung der statistischen Auswertung siehe 4.2.2.1.

4.2.5 Genexpression von *Ut-A* im Nierengewebe

Die Auswertung der Realtime-PCR-Daten durch eine ANOVA-Analyse ergab sowohl signifikante bzw. hochsignifikante Haupteffekte des Genotypes ($p = 0,014$) bzw. der Diät ($p < 0,001$), als auch signifikante Wechselwirkungen zwischen Genotyp und Diät ($p = 0,033$) in Bezug auf die Genexpression von *Ut-A*.

In der Microarray-Analyse der Niere wurde eine Hochregulation der *Ut-A*-mRNA bei 42 Tage alten *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Normaldiät um den Faktor 2,3 im Verhältnis zu Wildtyp-Mäusen unter Normaldiät gemessen (Stellmer 2007). In der Realtime-PCR zeigt sich eine gegenteilige Tendenz: hier ist die *Ut-A*-mRNA-Expression in der Niere bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Normaldiät im Vergleich zu Wildtyp-Tieren unter Normaldiät um das 25-Fache reduziert (Abbildung 13 A). Bei Wildtyp-Mäusen kommt es unter 4 Tagen HPD zu einem nicht-signifikanten 5,4-fachen Anstieg der *Ut-A*-Expression in der Niere im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen unter Normaldiät (Abbildung 13 B). Bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter HPD ist die Genexpression von *Ut-A* im Vergleich zu *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Normaldiät hochsignifikant auf das 106-Fache erhöht.

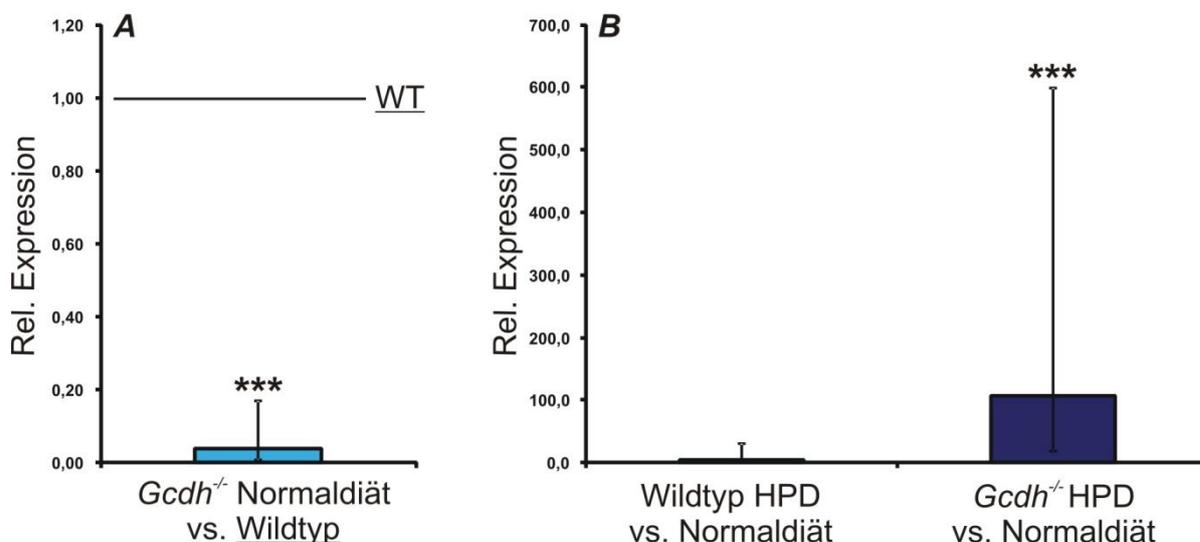


Abbildung 13: Relative *Ut-A*-Genexpression im Nierengewebe. Die Höhe der Balken gibt die relative Expression und das 95 %-Konfidenzintervall zu der jeweiligen Bezugsgruppe an. **A** *Gcdh*^{-/-} im Vergleich zu Wildtyp (WT)-Mäusen unter Normaldiät (jeweils $n = 5$). **B** Wildtyp- und *Gcdh*^{-/-} Mäuse unter HPD (Hochproteindiät, jeweils $n = 3$) im Vergleich zur Normaldiät (ND; jeweils $n = 5$). Die Hilfslinie kennzeichnet eine unveränderte Expression im Vergleich zur Bezugsgruppe (relative Expression = 1). *** $p < 0,01$ im LSD (Least Significant Difference)-Test. Für eine detaillierte Beschreibung der statistischen Auswertung siehe 4.2.2.1.

4.2.6 Genexpression von *Aqp2* im Nierengewebe

Die Auswertung der Realtime-PCR-Daten durch eine ANOVA-Analyse ergab einen signifikanten Haupteffekt der Diät ($p = 0,013$), jedoch keinen Effekt des Genotypes ($p = 0,140$) oder der Interaktion zwischen Genotyp und der Diät ($p = 0,701$) in Bezug auf die Genexpression von *Aqp2*.

In der Microarray-Analyse der Niere wurde eine Hochregulation der *Aqp2*-mRNA bei 42 Tage alten *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Normaldiät um den Faktor 2,1 im Verhältnis zu Wildtyp-Mäusen unter Normaldiät gemessen (Stellmer 2007). In der Realtime-PCR zeigt sich diese Art der Genregulation nicht (Abbildung 14 A). Sowohl bei Wildtyp- als auch bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen kommt es unter HPD zu einer Hochregulation der *Aqp2*-mRNA-Expression im Vergleich zur Normaldiät auf das 2,8 bzw. das 2,2-Fache im Vergleich zur Normaldiät (Abbildung 14 B).

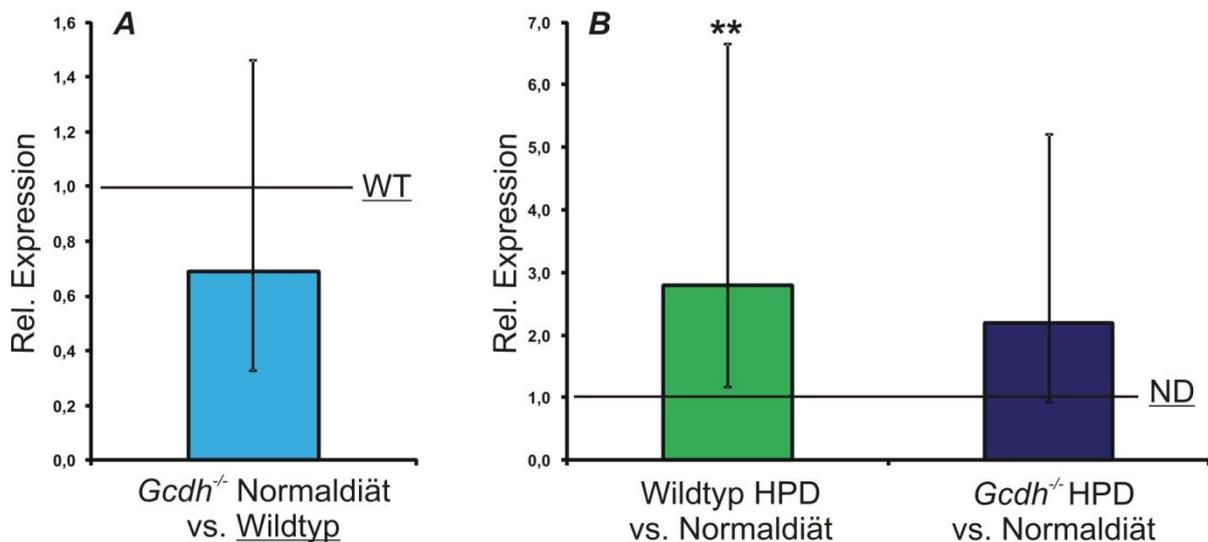


Abbildung 14: Relative *Aqp2*-Genexpression im Nierengewebe. Die Höhe der Balken gibt die relative Expression und das 95 %-Konfidenzintervall zu der jeweiligen Bezugsgruppe an. **A** *Gcdh*^{-/-} im Vergleich zu Wildtyp (WT)-Mäusen unter Normaldiät (jeweils $n = 5$). **B** Wildtyp- und *Gcdh*^{-/-} Mäuse unter HPD (Hochproteindiät, jeweils $n = 3$) im Vergleich zur Normaldiät (ND; jeweils $n = 5$). Die Hilfslinie kennzeichnet eine unveränderte Expression im Vergleich zur Bezugsgruppe (relative Expression = 1). ** $p < 0,05$ im LSD (Least Significant Difference)-Test. Für eine detaillierte Beschreibung der statistischen Auswertung siehe 4.2.2.1.

4.2.7 Genexpression von *Ace* im Nierengewebe

Die Auswertung der Realtime-PCR-Daten durch eine ANOVA-Analyse ergab einen signifikanten Haupteffekt des Genotypes ($p = 0,021$), keine signifikanten Unterschiede der Diät ($p = 0,866$) und eine signifikante Wechselwirkung zwischen Genotyp und Diät ($p = 0,029$) in Bezug auf die Genexpression von *Ace*.

In der Microarray-Analyse der Niere wurden 2,1-fach erhöhte *Ace*-mRNA-Spiegel bei 42 Tage alten *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Normaldiät im Verhältnis zu Wildtyp-Mäusen unter Normaldiät gemessen (Stellmer 2007). Dieses Ergebnis konnte in der Realtime-PCR nicht bestätigt werden (Abbildung 15 A). Während sich bei Wildtyp-Mäusen unter HPD im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen unter Normaldiät die Tendenz einer *Ace*-mRNA-Expressionserhöhung zeigt, gibt es bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter HPD im Vergleich zu *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Normaldiät die Tendenz einer Runterregulation auf 60 % (Abbildung 15 B).

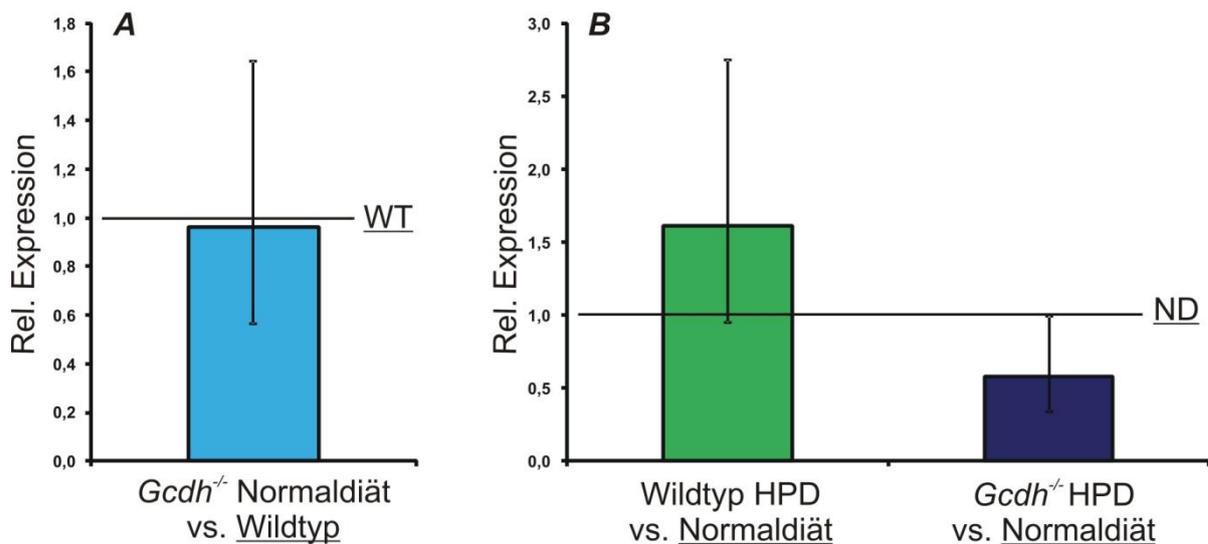


Abbildung 15: Relative *Ace*-Genexpression im Nierengewebe. Die Höhe der Balken gibt die relative Expression und das 95 %-Konfidenzintervall zu der jeweiligen Bezugsgruppe an. **A** *Gcdh*^{-/-} im Vergleich zu Wildtyp (WT)-Mäusen unter Normaldiät (jeweils $n = 3$). **B** Wildtyp- und *Gcdh*^{-/-} Mäuse unter HPD (Hochproteindiät) im Vergleich zur Normaldiät (ND, jeweils $n = 3$). Die Hilfslinie kennzeichnet eine unveränderte Expression im Vergleich zur Bezugsgruppe (relative Expression = 1). Für eine detaillierte Beschreibung der statistischen Auswertung siehe 4.2.2.1.

4.2.8 Genexpression von *Pepck* im Nierengewebe

Die Auswertung der Realtime-PCR-Daten durch eine ANOVA-Analyse ergab hochsignifikante Haupteffekte des Genotypes ($p = 0,005$) und der Diät ($p < 0,001$), jedoch keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Wechselwirkung zwischen Genotyp und Diät ($p = 0,350$) in Bezug auf die Genexpression von *Pepck*.

In der Microarray-Analyse der Niere wurde eine Hochregulation der *Pepck*-mRNA-Spiegel bei 42 Tage alten *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Normaldiät um den Faktor 2,3 im Verhältnis zu Wildtyp-Mäusen unter Normaldiät gemessen (Stellmer 2007). Auch in der Realtime-PCR zeigt sich eine Hochregulation der *Pepck*-Genexpression in *Gcdh*^{-/-} gegenüber Wildtyp-Mäusen unter Normaldiät auf das 2,9-Fache (Abbildung 16 A). Unter Hochproteindiät kommt es bei Wildtyp-Mäusen zu einer etwa 4,3-fach vermehrten mRNA-Expression von *Pepck* im Vergleich zur Normaldiät (Abbildung 16 B). Die *Pepck*-mRNA-Expression von *Gcdh*^{-/-} Mäusen in der HPD-induzierten Krise ist im Vergleich zu *Gcdh*^{-/-} Mäusen mit Normaldiät 2,8-fach erhöht.

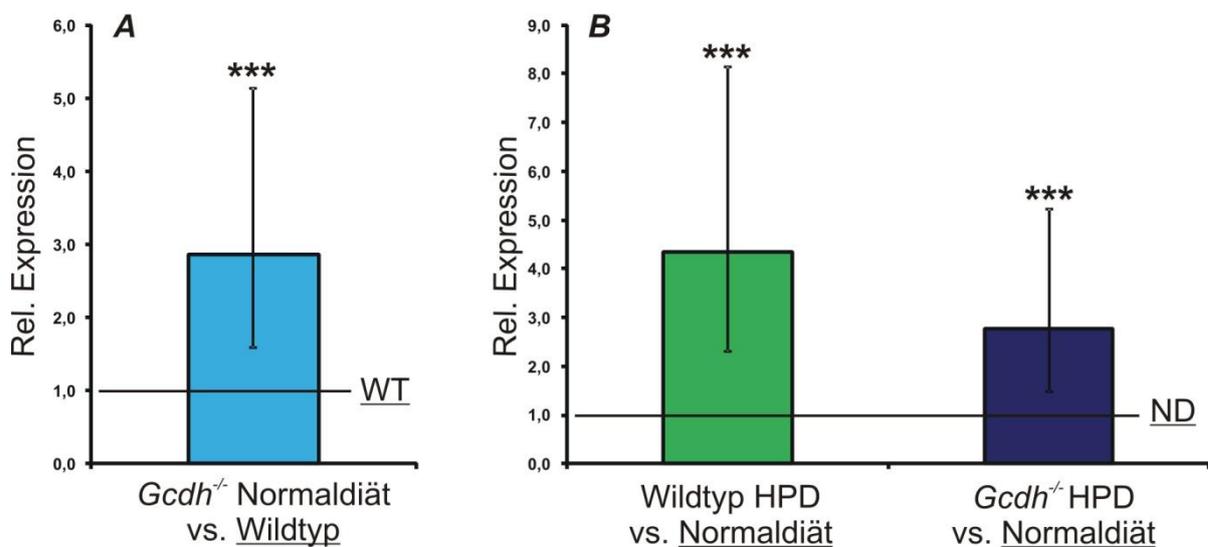


Abbildung 16: Relative *Pepck*-Genexpression im Nierengewebe. Die Höhe der Balken gibt die relative Expression und das 95 %-Konfidenzintervall zu der jeweiligen Bezugsgruppe an. **A** *Gcdh*^{-/-} im Vergleich zu Wildtyp (WT)-Mäusen unter Normaldiät (jeweils $n = 4$). **B** Wildtyp- und *Gcdh*^{-/-} Mäuse unter HPD (Hochproteindiät, jeweils $n = 3$) im Vergleich zur Normaldiät (ND; jeweils $n = 4$). Die Hilfslinie kennzeichnet eine unveränderte Expression im Vergleich zur Bezugsgruppe (relative Expression = 1). *** $p < 0,01$ im LSD (Least Significant Difference)-Test. Für eine detaillierte Beschreibung der statistischen Auswertung siehe 4.2.2.1.

4.2.9 Genexpressionen im Nierengewebe von *Oat2*, *Oatp1a6*, *Ace* und *Ut-A* nach 36 Stunden Hochproteindiät

Es sollte überprüft werden, ob Expressionsveränderungen auf mRNA-Ebene in der Niere schon nach 36 Stunden Hochproteindiät einsetzen. Dazu wurden einer Wildtyp und einer *Gcdh*^{-/-} Maus für 36 Stunden eine Hochproteindiät appliziert und sie sofort im Anschluß getötet. Zum Zeitpunkt des Todes wiesen die *Gcdh*^{-/-} Mäuse noch keine Symptome einer HPD-induzierten Krise auf. Den Tieren wurde Nierengewebe entnommen und mittels Realtime-PCR die mRNA-Expression von *Oat2*, *Oatp1a6*, *Ace* und *Ut-A* untersucht.

Die mRNA-Expression von *Oat2* und *Ace* in der Niere ist bei der *Gcdh*^{-/-} Maus nach 36 Stunden Hochproteindiät im Vergleich zu *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Normaldiät unverändert bzw. leicht erhöht und sinkt erst im Verlauf weiterer 60 Stunden HPD deutlich ab (Abbildung 11, 15 und 17). Bei den Wildtyp-Mäusen steigt die mRNA-Expression von *Oat2* schon während der ersten 36 Stunden HPD an und bleibt dann bis zum vierten Tag HPD erhöht. Die mRNA-Expression von *Ace* steigt bei Wildtyp-Tieren erst im Zeitraum zwischen 36 und 96 Stunden HPD.

Der mRNA-Expressionsunterschied von *Ut-A* und *Oatp1a6* ist bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen bereits nach 36 Stunden HPD im Vergleich zur Normaldiät dysreguliert und weist die gleiche Tendenz auf (bei *Ut-A* ca. 100-facher Anstieg) wie in der HPD-induzierten metabolischen Krise.

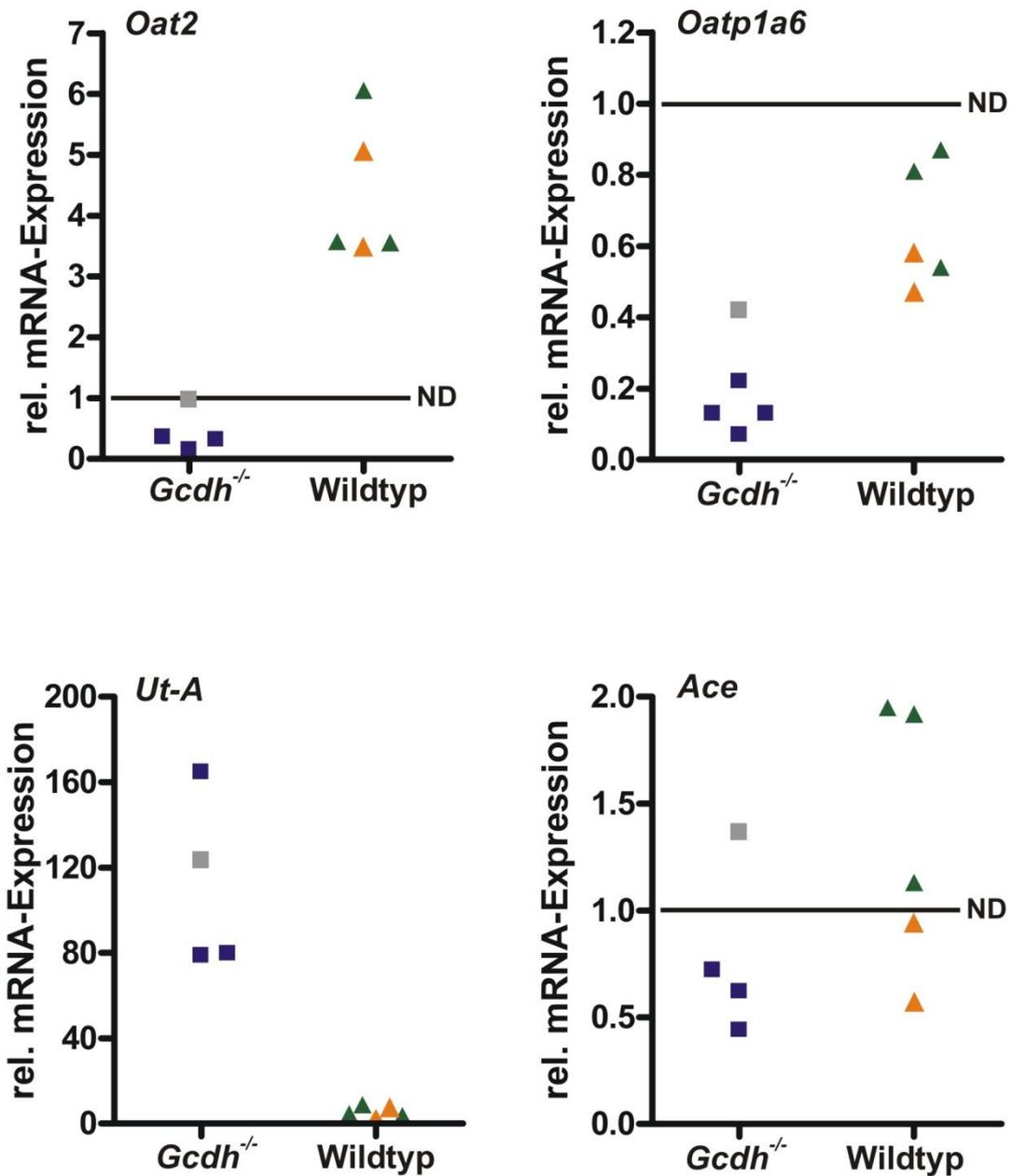


Abbildung 17: Relative Oat2-, Oatp1a6-, Ut-A- und Ace-Genexpression im Nierengewebe von $Gcdh^{-/-}$ (■, $n = 1$) und Wildtyp-Mäusen (▲, $n = 2$) unter 36-stündiger Hochproteindiät und unter 4-tägiger Hochproteindiät (■ und ▲, $n = 3$ bzw. $n = 4$ bei Oatp1a6). Die Expression wurde jeweils auf den mittleren dCT-Wert von $Gcdh^{-/-}$ und Wildtyp-Mäusen unter Normaldiät (ND) bezogen. Die Hilfslinie kennzeichnet eine unveränderte Expression im Vergleich zur Bezugsgruppe (relative Expression $n = 1$).

4.2.10 Reversibilität der mRNA-Spiegel von *Oat2*, *Oatp1a6*, *Ace* und *Ut-A* im Nierengewebe

In einem Pilotversuch wurde einer *Gcdh*^{-/-} Maus einen Tag HPD und anschließend für eine Woche Normaldiät appliziert bevor sie getötet wurde (zum Versuchsaufbau siehe auch 4.1.3). Über die klinischen Symptome und das Gewicht hinaus wurde das mRNA-Expressionsmuster von *Oat2*, *Oatp1a6*, *Ace* und *Ut-A* in der Niere mittels Realtime-PCR untersucht. Die dCT-Werte dieser Gene wurden in Relation zu den mRNA-Spiegeln bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Normaldiät gesetzt und mit den relativen Expressionen bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen nach 4 Tagen HPD verglichen.

Während die Genexpressionen von *Oat2* und *Oatp1a6* in der Niere von *Gcdh*^{-/-} Mäusen in der induzierten metabolischen Krise erniedrigt sind, zeigt sich nach einem Tag HPD und angeschlossenen 7 Tagen Normaldiät eine 2- bzw. 1,2-fach erhöhte mRNA-Expression im Vergleich zu *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Normaldiät (Abbildung 18).

Die *Ut-A*-mRNA-Expression ist bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter 4-tägiger HPD ca. 100-fach erhöht im Vergleich zu *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Normaldiät. Die *Ut-A*-mRNA-Spiegel verbleiben bei der *Gcdh*^{-/-} Maus unter einem Tag HPD und anschließenden 7 Tagen Normaldiät auf dieser Expressionshöhe.

Auch bei *Ace*, deren mRNA-Spiegel nach 4 Tagen HPD bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen halbiert sind, ist die erniedrigte Genexpression bei der *Gcdh*^{-/-} Maus nach 7 Tagen Normaldiät nicht reversibel.

Es gibt also Gene (*Ut-A* und *Ace*), bei denen eine eintägige HPD und ausreichend ist, Expressionsveränderungen bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen wie in der induzierten encephalopathischen Krise auszulösen, die durch eine anschließende 7-tägige Normaldiät nicht reversibel sind. Bei anderen Genen (*Oat2* und *Oatp1a6*) sind die Veränderungen in der mRNA-Expression durch 7-tägige Normaldiät reversibel und vergleichbar mit den Expressionen bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Normaldiät.

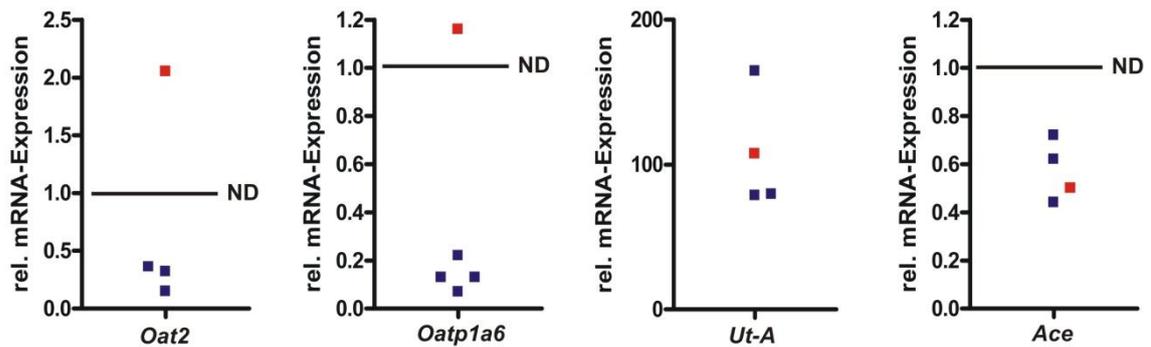


Abbildung 18: Relative *Oat2*-, *Oatp1a6*-, *Ut-A* und *Ace*-Genexpression im Nierengewebe von *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter 4-tägiger Hochproteindiät (■, n = 3 je Versuchsbedingung bzw. n = 4 bei *Oatp1a6*) und unter eintägiger Hochproteindiät und anschließenden 7 Tagen Normaldiät (■, n = 1). Die Expression wurde jeweils auf den mittleren *dCT*-Wert von *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Normaldiät (ND) bezogen. Die Hilfslinie kennzeichnet eine unveränderte Expression im Vergleich zur Bezugsgruppe (relative Expression = 1).

4.3 Expressionsuntersuchungen am Hirnstammgewebe

Das Hirngewebe der Maus besteht nach der Entfernung des Cortex und des Cerebellums hauptsächlich aus Striatum und Thalamus. Dieses wird im Folgenden zusammenfassend als Hirnstamm bezeichnet.

Es wurde eine vergleichende Microarray-Analyse mit mRNA aus dem Hirnstamm von *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Hochproteindiät im Vergleich zu Normaldiät durchgeführt. Aus den stark dysregulierten Genen wurden Kandidaten (*Aqp4*, *Snat5*, *NaC3*, *Ut-A*, *Oatp1a6*) für die Verifizierung der Ergebnisse mittels Realtime-PCR ausgewählt. Darüber hinaus wurde das stoffwechselaktive Enzym *Hmgcs2* untersucht, das sich im Microarray der Niere auffällig darstellte. Eine Liste von dysregulierten Genen im Hirnstammgewebe ist im Anhang angefügt (Tabelle 10 und 11, Anhang).

4.3.1 Genexpression von *Aqp4* im Hirnstammgewebe

Die relative *Aqp4*-mRNA-Expression im Hirnstamm war in der Microarray-Analyse um einen Faktor zwischen 2,04 und 2,6, bei Messungen mit drei verschiedenen *Aqp4*-spezifischen Oligonukleotiden, herunterreguliert (Tabelle 7).

Tabelle 7: Genregulationen von *Aqp4*-mRNA in der Microarray-Analyse des Hirnstammes.

Affymetrix ID	Gentitel	Gensymbol	Relative Expression (<i>Gcdh</i> ^{-/-} HPD vs. <i>Gcdh</i> ^{-/-} ND)
1425382_a_at	<i>Aquaporin 4</i>	<i>Aqp4</i>	-2,60
1434449_at	<i>Aquaporin 4</i>	<i>Aqp4</i>	-2,38
1447745_at	<i>Aquaporin 4</i>	<i>Aqp4</i>	-2,04

Hierbei bezieht sich die relative Expression auf das Verhältnis der mRNA Expression bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Hochproteindiät gegen *Gcdh*^{-/-} Mäuse unter Normaldiät (je $n = 2$). Die Affymetrix ID sind Zuweisungen des Chipherstellers und beziehen sich auf verschiedene Sequenzabschnitte der *Aqp4*-kodierenden mRNA.

Um das Ergebnis des Microarrays zu verifizieren und – neben den im Microarray bestimmten relativen Expressionen zwischen *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter HPD vs. *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Normaldiät – auch die Expressionsverhältnisse bei Wildtyp unter HPD und Wildtyp unter Normaldiät zu erfassen, wurden Realtime-PCR-Untersuchungen mit mRNA aus Hirnstammgewebe durchgeführt.

Die Auswertung der Realtime-PCR-Daten durch eine ANOVA-Analyse ergab einen hochsignifikanten Haupteffekt der Diät ($p = 0,001$) und signifikante Wechselwirkungen zwischen Genotyp und der Diät ($p = 0,050$), jedoch keinen signifikanten Haupteffekt des Genotypes ($p = 0,087$) in Bezug auf die Genexpression von *Aqp4*.

Die mRNA-Expression von *Aquaporin 4* ist bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter HPD im Hirnstamm gegenüber Normaldiät signifikant auf das 0,4-Fache reduziert (Abbildung 19). Dies entspricht dem Ergebnis der Microarray-Analyse. Es zeigen sich keine wesentlichen Regulationen zwischen *Gcdh*^{-/-} und Wildtyp-Mäusen unter Normaldiät oder zwischen Wildtyp-Mäusen unter Normaldiät und HPD.

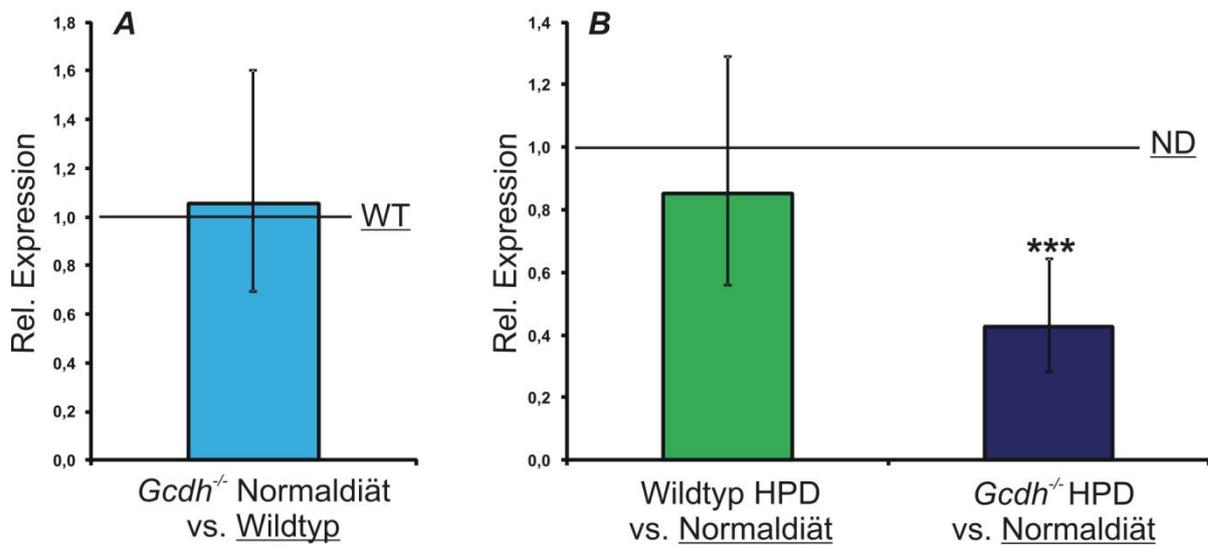


Abbildung 19: Relative Aqp4-Genexpression im Nierengewebe. Die Höhe der Balken gibt die relative Expression und das 95 %-Konfidenzintervall zu der jeweiligen Bezugsgruppe an. **A** Gcdh^{-/-} im Vergleich zu Wildtyp (WT)-Mäusen unter Normaldiät (jeweils n = 3). **B** Wildtyp- und Gcdh^{-/-} Mäuse unter HPD (Hochproteindiät) im Vergleich zur Normaldiät (ND; jeweils n = 3). Die Hilfslinie kennzeichnet eine unveränderte Expression im Vergleich zur Bezugsgruppe (relative Expression = 1). ***p<0,01 im LSD (Least Significant Difference)-Test. Für eine detaillierte Beschreibung der statistischen Auswertung siehe 4.2.2.1.

4.3.2 Genexpression von Snat5 im Hirnstammgewebe

In der Microarray-Analyse des Hirnstammes wurde eine starke Herabregulation der Snat5-mRNA um den Faktor -14,7 gefunden (Tabelle 8). Damit war Snat5 das am stärksten dysregulierte Gen eines Transporters im Microarray (Tabelle 11, Anhang).

Tabelle 8: Genregulationen von Snat5-mRNA in der Microarray-Analyse des Hirnstammes.

Affymetrix ID	Gentitel	Gensymbol	Relative Expression (Gcdh ^{-/-} HPD vs. Gcdh ^{-/-} ND)
1454622_at	Snat5	Slc38a5	-14,67

Hierbei bezieht sich die relative Expression auf das Verhältnis der mRNA Expression bei Gcdh^{-/-} Mäusen unter Hochproteindiät gegen Gcdh^{-/-} Mäuse unter Normaldiät (je n = 2). Die Affymetrix ID sind Zuweisungen des Chipherstellers.

Zur Quantifizierung der Snat5-Proteinmenge wurden spezifische Western Blots angeschlossen. Mehrere Versuche mit Extrahierung von Membranproteinen und

Deglykosylierung blieben angesichts einer unspezifischen Antikörperbindung erfolglos.

4.3.3 Expression von *Hmgcs2*

Die Auswertung der Realtime-PCR-Daten durch eine ANOVA-Analyse ergab signifikante bzw. hochsignifikante Haupteffekte des Genotypes ($p = 0,041$) und der Diät ($p = 0,006$), jedoch keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Wechselwirkung zwischen Genotyp und Diät ($p = 0,717$) in Bezug auf die Genexpression von *Hmgcs2*.

In der Microarray-Analyse des Nierengewebes von 42 Tage alten Tieren war eine starke Herabregulierung von *Hmgcs2* um den Faktor 25 bei *Gcdh*^{-/-} gegenüber Wildtyp-Tieren unter Normaldiät gefunden worden (Stellmer 2007). Diese Befunde ließen sich mit Realtime-PCR aus Nierengewebe auf mRNA-Ebene nicht verifizieren ($n = 3$, nicht gezeigt). Bei der quantitativen Untersuchung der mRNA-Expression von *Hmgcs2* im Hirnstammgewebe von 42 Tage alten Tieren zeigten sich signifikant erniedrigte *Hmgcs2*-mRNA-Expressionen bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter HPD im Vergleich zur Normaldiät (Abbildung 21).

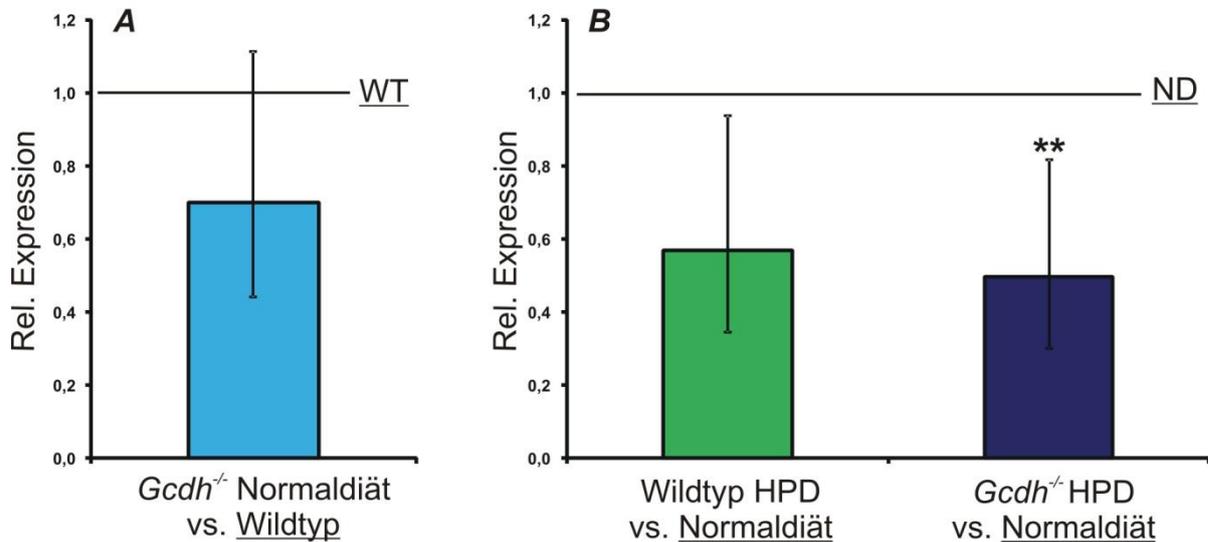


Abbildung 20: Relative *Hmgcs2*-Genexpression im Nierengewebe. Die Höhe der Balken gibt die relative Expression und das 95 %-Konfidenzintervall zu der jeweiligen Bezugsgruppe an. **A** *Gcdh*^{-/-} im Vergleich zu Wildtyp (WT)-Mäusen unter Normaldiät (jeweils $n = 3$). **B** Wildtyp- und *Gcdh*^{-/-} Mäuse unter HPD (Hochproteindiät) im Vergleich zur Normaldiät (ND; jeweils $n = 3$). Die Hilfslinie kennzeichnet eine unveränderte Expression im Vergleich zur Bezugsgruppe (relative Expression = 1). ** $p < 0,05$ im LSD (Least Significant Difference)-Test. Für eine detaillierte Beschreibung der statistischen Auswertung siehe 4.2.2.1.

Um die Expression von Hmgcs2 auf Proteinebene zu überprüfen, wurde anschließend Western Blots mit Leber- und Hirnstammextrakten durchgeführt.

Zur Eingrenzung der Zelltyp-spezifischen Hmgcs2-Expression innerhalb der ZNS wurden auch Extrakte aus primär kultivierten Astrozyten und neuronalen Zellen, die aus Hirnen von Wildtyp-Mäusen isoliert worden waren, analysiert.

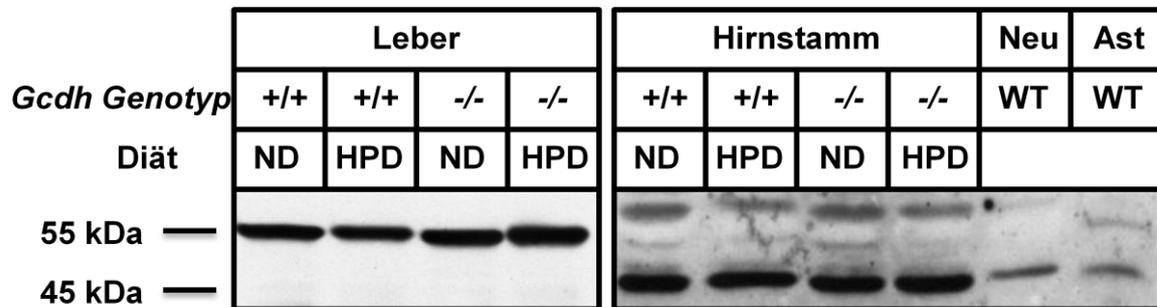


Abbildung 21: Hmgcs2-spezifischer Western Blot von 42 Tage alten Wildtyp und *Gcdh*^{-/-} Mäusen nach 4 Tagen unter Normal- (ND) und Hochproteindiät (HPD). Extrakte aus Leber- (25 µg) und Hirnstammgewebe (100 µg) wurden hierfür durch Tris/Tricin-SDS-Page getrennt. Da es aufgrund der hohen Expression von Hmgcs2 im Lebergewebe trotz geringerer Proteinmenge noch zu einer stärkeren Reaktion kommt wurde zur besseren Darstellbarkeit hier eine kürzere Belichtungszeit gewählt.

In der Leber zeigte sich eine spezifische Bande mit einer molaren Masse von 55 kDa, entsprechend der in der Literatur beschriebenen Masse des Proteins (Abbildung 21). Es ist eine verminderte Signalintensität von Wildtyp Mäusen unter HPD gegenüber den anderen Bedingungen zu erkennen. Ansonsten ergaben sich keine Unterschiede in der Proteinexpression von Hmgcs2 in der Leber zwischen den verschiedenen Bedingungen (Wildtyp ND, *Gcdh*^{-/-} ND, *Gcdh*^{-/-} HPD).

Im Hirnstammgewebe, Astrozyten und Neuronen zeigte sich keine spezifische Bande auf Höhe von 55 kDa. Auch bei längerer Exposition sind diese nicht zu erkennen (nicht gezeigt). Die Proteinexpression in diesen Geweben und Zelltypen scheint zu schwach zu sein um sie mit einem Hmgcs2-spezifischen Western Blot darzustellen.

Alle übrigen mit Realtime-PCR untersuchten Gene (*NaC3*, *Ut-A*, *Oatp1a6*) im Hirnstammgewebe wiesen keine Expressionsunterschiede zwischen den untersuchten Gruppen auf.

4.4 Metabolischer Status während der induzierten metabolischen Krise

Um zu testen, welche metabolischen Parameter im Rahmen der HPD-induzierten encephalopathischen Krise verändert sind, wurden die Konzentrationen der Aminosäuren im Blut bestimmt und die Ammoniak-Konzentration gemessen. Weiterhin wurden bestimmte Transporter, die unter HPD bei *Gcdh*^{-/-} Tieren dysreguliert waren, unter Bedingungen einer induzierten metabolischen Azidose untersucht.

4.4.1 Aminosäuren-Konzentrationen im Blut

Es wurde die Aminosäuren-Konzentrationen im Trockenblut von Wildtyp- und *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Normal- und Hochproteindiät mittels Tandem-Massenspektroskopie bestimmt.

Tabelle 9: Übersicht über die mit Tandem-Massenspektroskopie untersuchten Aminosäuren im Blut von insgesamt 17,42 Tage alten, Tieren (Mittelwert und Standardabweichung (SD); in $\mu\text{mol/l}$ oder als Quotient bei Leu/Phe, Phe/Tyr und Tyr/Phe)

Aminosäuren	WT ND	SD	<i>Gcdh</i> ^{-/-} ND	SD	WT HPD	SD	<i>Gcdh</i> ^{-/-} HPD	SD
Ala	218	52	195	31	196	104	293	65
Asx	47	16	20	10	55	44	77	39
Glx	64	9	54	8	56	33	68	21
His	6,6	1,8	4,4	2,2	7,4	2,5	16,2	10,5
Leu/Phe	2,4	0,1	2,2	0,1	2,9	0,4	5,0	0,7
Met	30	9	26	3	29	17	40	11
Phe/Tyr	1,4	0,3	1,4	0,1	1,1	0,3	1,8	0,3
Pro	76	26	67	4	95	62	89	35
Ser	31	6	27	7	31	13	35	13
Thr	16	4	14	4	19	13	28	9
Trp	9,1	1,2	8,1	1,2	8,1	4,5	8,8	2,3
Tyr	40	11	40	6	56	33	42	4
Tyr/Phe	0,8	0,2	0,8	0,1	1,0	0,3	0,6	0,1
Val	125	19	119	12	187	103	452	124
Xle	136	30	244	260	172	95	399	88
Cit	24	7	28	8	26	17	97	63
Lys	178	24	158	54	151	89	404	199
Orn	16	4	13	4	20	2	23	6
Arg	32	8	32	9	28	12	36	15
Gly	286	123	189	30	339	6	388	126

Leu, Phe und Tyr werden als Quotient, Leucin und Isoleucin (=Xle), Asparagin und Aspartat (=Asx), und Glutamin und Glutamat (=Glx) als Summe dargestellt, da diese Aminosäuren nicht isoliert gemessen werden können. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsanordnungen sind rot gekennzeichnet. Die Markierung von zwei Zahlen in einer Zeile kennzeichnet einen p -Wert $< 0,05$ und wird als signifikanter Unterschied zwischen diesen Gruppen gedeutet. Bei den Zeilen mit nur einer roten Markierung ist *Gcdh*^{-/-} HPD im Vergleich zu allen anderen Bedingungen signifikant erhöht. Die Markierung von drei Zahlen in einer Zeile beschreibt eine signifikante Erhöhung von *Gcdh*^{-/-} HPD im Vergleich zu Wildtyp (WT) ND und WT HPD.

Es zeigen sich keine signifikanten Abweichungen im Gehalt von Aminosäuren im Trockenblut von Wildtyp-Mäusen mit Normaldiät und Hochproteindiät (Tabelle 9). Es ergaben sich jedoch eine Vielzahl von signifikanten Unterschieden in den Aminosäure-Konzentrationen im Blut der *Gcdh*^{-/-} Mäuse. Im Folgenden soll nur auf eine Auswahl dieser Veränderungen eingegangen werden.

Die *Gcdh*^{-/-} Mäuse in der HPD-induzierten Krise weisen signifikant erhöhte Spiegel der verzweigtkettigen Aminosäuren (Valin, Leucin-Isoleucin-Summe und Leucin-Phenylalanin-Quotient) auf. Auch ist die Konzentration von Citrullin im Blut von

Gcdh^{-/-} Mäusen unter HPD stark gegenüber den anderen Mäusen mit unterschiedlicher Diät erhöht. Diese Veränderungen sind jedoch nicht signifikant. Bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Hochproteindiät liegt ein signifikant erhöhter Spiegel an Alanin im Blut vor, im Vergleich zu *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Normaldiät vor.

4.4.2 Induktion einer metabolischen Azidose

In der Genarray-Analyse fiel eine Erhöhung der *Pepck*-mRNA-Expression im Nierengewebe von *Gcdh*^{-/-} im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen unter Normaldiät auf (Stellmer 2007). Diese konnte durch Realtime-PCR-Experimente bestätigt werden. Außerdem zeigte sich eine erhöhte *Pepck*-mRNA-Expression bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter HPD im Vergleich zur Normaldiät.

Da eine vermehrte *Pepck*-Expression in der Niere auch in azidotischer Stoffwechselsituation bei Mäusen beschrieben worden ist (Moret et al. 2007), sollte überprüft werden, ob eine experimentell induzierte Azidose bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen Expressionsveränderungen und Symptome wie in der HPD-induzierten encephalopathischen Krise auslöst. Dazu wurde in einem Pilotexperiment einer *Gcdh*^{-/-} und einer Wildtyp-Maus, mit einer etablierten Methode zur Induktion einer metabolischen Azidose, NH₄Cl (0,25 mol/l) mit dem Trinkwasser appliziert (Bento et al. 2005).

Die Wildtyp- und die *Gcdh*^{-/-} Maus wiesen während der induzierten metabolischen Azidose keine Symptome auf. So kam es weder zu einem Gewichtsverlust noch zu einem Versterben innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 14 Tagen.

Um die Induktion der metabolischen Azidose zu verifizieren, sollte die *Pepck*-mRNA-Expression im Nierengewebe mit Realtime-PCR untersucht und mit den anderen Bedingungen verglichen werden.

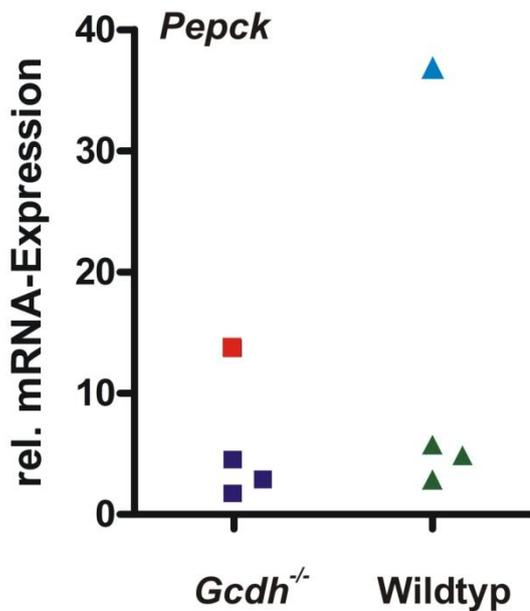


Abbildung 22: Relative *Pepck*-Genexpression im Nierengewebe von $Gcdh^{-/-}$ (■, n = 1) und Wildtyp-Mäusen (▲, n = 1) mit induzierter metabolischer Azidose und unter 4-tägiger Hochproteindiät (■ und ▲, n = 3). Die Expression wurde jeweils auf den mittleren dCT-Wert von $Gcdh^{-/-}$ und Wildtyp-Mäusen unter Normaldiät bezogen.

Es zeigt sich auch bei den Mäusen in der induzierten metabolischen Azidose eine erhöhte *Pepck*-mRNA-Expression im Vergleich zu Tieren unter Normaldiät (Abbildung 22).

Im Folgenden wurden die mRNA-Expressionen von renalen Transportern, die in der HPD-induzierten encephalopathischen Krise signifikante Expressionsregulationen aufwiesen, in der NH_4Cl -induzierten metabolischen Azidose mit Realtime-PCR untersucht und mit den anderen Bedingungen verglichen. Es sollte überprüft werden, ob es zu übereinstimmenden Genexpressions-Regulationen in der induzierten metabolischen Azidose und encephalopathischen Krise kommt.

Wie unter 4.2.2.1, 4.2.3, 4.2.4 und 4.2.7 beschrieben, war die HPD bei $Gcdh^{-/-}$ Mäusen bei 4 untersuchten Genen (*Oat1*, *Oat2*, *Oatp1a6* und *Ace*) mit einer Reduktion der mRNA-Spiegel verbunden. Dagegen erhöhte sich die mRNA-Expression der untersuchten Gene bei der $Gcdh^{-/-}$ Maus, mit Ausnahme von *Oat1*, um das 1,8 – 4-fache unter der induzierten metabolischen Azidose (Abbildung 23). Die *Oat1*-Expression bei $Gcdh^{-/-}$ Mäusen unter Normaldiät und Bedingungen der induzierten metabolischen Azidose war nur leicht reduziert auf das 0,8-Fache.

Die Daten lassen vermuten, dass weder die erhöhte *Pepck*-mRNA-Expression bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter HPD, noch die erniedrigte Expression von *Ace*, *Oat1*, *Oat2* oder *Oatp1a6* durch eine begleitende (sekundäre) Azidose bedingt sind.

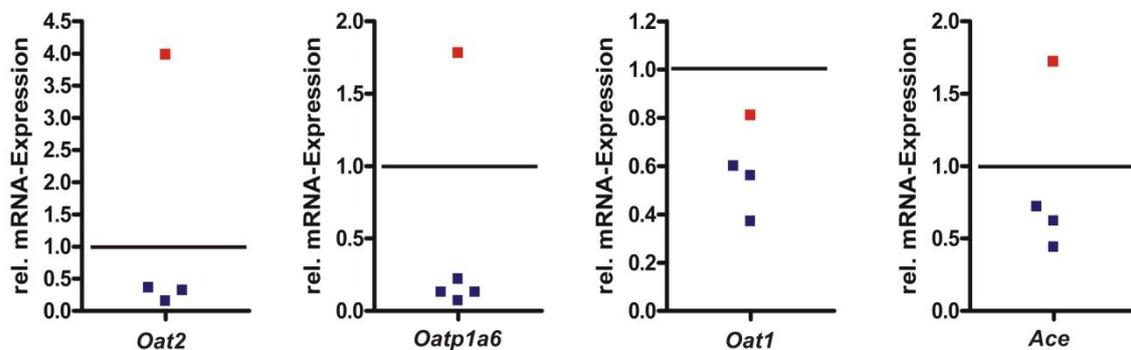


Abbildung 23: Relative *Oat2*-, *Oatp1a6*-, *Oat1*- und *Ace*-Genexpression im Nierengewebe von *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter 4-tägiger Hochproteindiät (■, n = 3 je Versuchsbedingung bzw. n = 4 bei *Oatp1a6*) und unter induzierter metabolischer Azidose (■, n = 1). Die Expression wurde jeweils auf den mittleren dCT-Wert von *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Normaldiät bezogen.

4.4.3 Ammoniak-Konzentration im Blut

Die Harnstoffausscheidung durch den Urin bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter HPD ist beeinträchtigt. Während es bei Wildtyp-Mäusen unter HPD im Vergleich zur Normaldiät zu einem 5-fachen Anstieg der Harnstoffausscheidung im Urin kommt, ist bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter HPD im Vergleich zur Normaldiät kein wesentlicher Anstieg der Harnstoffausscheidung mit dem Urin feststellbar (Stellmer 2007). Harnstoff wird im Harnstoffzyklus der Leber als Ausscheidungsprodukt von Ammoniak synthetisiert. Es sollte überprüft werden, ob es neben der verminderten Ausscheidung des Harnstoffs auch zu einer systemischen Akkumulation des toxischen Ammoniaks kommt. Dazu wurden die Ammoniakkonzentrationen im Vollblut der *Gcdh*^{-/-} und Wildtyp-Mäuse unter HPD und Normaldiät gemessen.

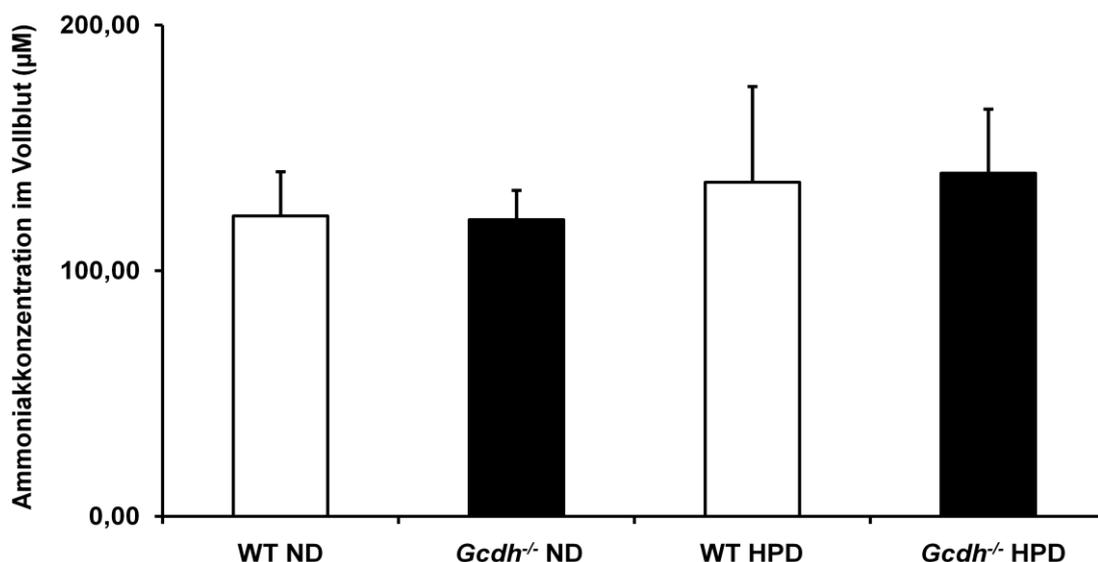


Abbildung 24: Ammoniakkonzentrationen im Vollblut von insgesamt 22 Mäusen der verschiedenen Versuchsbedingungen: Wildtyp (WT) und *Gcdh*^{-/-} mit Hochproteindiät (HPD) und Normaldiät (ND).

Es zeigen sich keine signifikanten Veränderungen des Ammoniakspiegels im Vollblut zwischen den verschiedenen untersuchten Versuchsgruppen (Abbildung 24). Die geringe Harnstoff-Ausscheidung von *Gcdh*^{-/-} Mäusen in der HPD-induzierten metabolischen Krise ist nicht durch veränderte Ammoniak-Spiegel im Blut bedingt und es kommt in der induzierten metabolischen Krise zu keiner relevanten Beeinträchtigung des Harnstoffzyklus.

4.5 Veränderungen im Urin vor und während der induzierten encephalopathischen Krise

Aufgrund der Veränderungen der Niere bezüglich der Expressionsveränderungen verschiedener Transporter (Stellmer et al. 2007), der Nierengröße (Koeller et al. 2002; Keyser et al. 2008) und der veränderten Ausscheidung von Elektrolyten (Stellmer 2007) wurde der Urin der *Gcdh*^{-/-} Mäuse unter Hochprotein- und Normaldiät auf weitere Pathologien, wie eine Hämaturie, untersucht.

4.5.1 Hämoglobinnachweis mit Urin-Teststreifen

Mit dieser Versuchsanordnung sollte ermittelt werden, ob es – gegebenenfalls als Folge einer strukturellen Nierenschädigung – zu einer Blutausscheidung im Urin kommt. Eine Makrohämaturie ist unter keiner Versuchsbedingung (Wildtyp unter

Normaldiät, Wildtyp unter HPD, $Gcdh^{-/-}$ unter Normaldiät, $Gcdh^{-/-}$ unter HPD) festgestellt worden. Für das Experiment wurde der Urin eines Kontrolltieres ($Gcdh^{-/-}$ unter Normaldiät) über einen Zeitraum von fünf Tagen mit dem Urin von vier $Gcdh^{-/-}$ Mäusen unter Hochproteindiät verglichen.

Bei $Gcdh^{-/-}$ Mäusen unter HPD führte die induzierte Krise nach unterschiedlicher Dauer zum Tod (Tag der letzten Messung). Während beim Kontrolltier keine Auffälligkeiten des Urins auftraten, zeigte sich bei $Gcdh^{-/-}$ Mäusen in der HPD-induzierten Krise spätestens nach vier Tagen eine Hämaturie (Abbildung 25). Der Zeitraum bis zum Auftreten von Hämoglobin im Urin schwankte stark. So konnte bei der $Gcdh^{-/-}$ Maus Nr. 1 schon am zweiten und bei Maus Nr. 4 erst am vierten Tag eine Hämaturie nachgewiesen werden. Konstant war hingegen der Abstand zwischen dem ersten Auftreten der Hämaturie und dem Versterben der Tiere. Bei allen Tieren war einen Tag vor ihrem Versterben erstmals Hämoglobin im Urin nachweisbar.

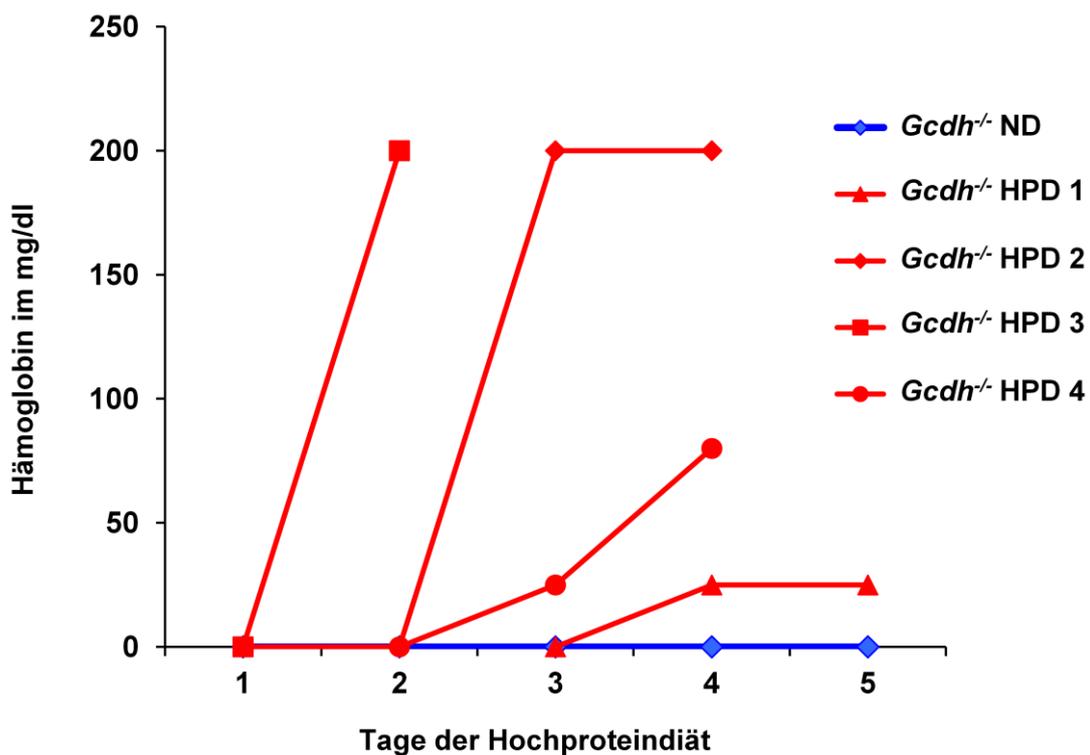


Abbildung 25: Hämoglobin-Konzentrationen (in mg/dl) im Urin von $Gcdh^{-/-}$ Mäusen unter Normaldiät (ND, $n=1$) und unter Hochproteindiät (HPD; $n=4$), verabreicht über fünf Tage beziehungsweise bis zum Versterben der Tiere. Die Messung der Hämoglobin-Konzentration erfolgte mittels Urin-Teststreifen.

4.5.2 Mikroskopische Untersuchung des Urins

Einer Hämaturie können grundsätzlich verschiedene Ursachen wie z.B. eine Störung des Gerinnungssystems, Entzündungen der ableitenden Harnwege oder Nierensteine zugrunde liegen (Herold 2005). Hierbei kann eine mikroskopische Untersuchung des Harnsediments differentialdiagnostische Hinweise geben. Pathologische Befunde im Urin können ein vermehrtes Auftreten einzelner Erythrozyten oder z.B. sogenannte Erythrozyten-Zylinder sein. Dabei sind Erythrozytenzylinder aus Erythrozyten, Tamm-Horsfall- und anderen Plasmaproteinen aufgebaut. Das Auftreten von Erythrozytenzylindern im Urin weist auf eine glomeruläre Nierenschädigung hin (Renz-Polster 2004).

Das Urinsediment von zwei $Gcdh^{-/-}$ Mäusen wurde am dritten Tag der Hochproteindiät untersucht und mit dem Urinsediment von Mäusen unterschiedlicher Bedingungen (Wildtyp ND, Wildtyp HPD, $Gcdh^{-/-}$ ND) verglichen.

Bei $Gcdh^{-/-}$ Mäusen in der HPD-induzierten encephalopathischen Krise fanden sich im Urin häufige Erythrozytenzylinder (Abbildung 26). Die Tiere ohne induzierte Krise wiesen einen unauffälligen Urinbefund auf (Bilder werden nicht gezeigt).



Abbildung 26: Urinsediment einer $Gcdh^{-/-}$ Maus an Tag 3 der Hochproteindiät. Typische Erythrozytenzylinder sind im Zentrum des Bildausschnittes (400-fache Vergrößerung) sichtbar.

5 Diskussion

5.1 Renal exprimierte Transporter organischer Anionen

3OHGA und GA sind pathologische organische Säuren, die in erhöhten Konzentrationen bei GA1-Patienten im Serum und Urin vorliegen und durch den gestörten Abbau von Lysin, Hydroxylysin und Tryptophan entstehen. Ihnen wird eine zentrale Rolle in der Genese der Erkrankung zugeschrieben (Mühlhausen et al. 2008). Über den genauen Eliminationsweg von 3OHGA und GA aus dem Organismus ist bisher wenig bekannt. Detaillierte Kenntnisse über die Ausschleusungsmechanismen der toxischen GA- und 3OHGA-Metabolite könnten Ansatzpunkte für eine potentielle spezifische pharmakologische Therapie der GA1 aufzeigen.

Funktionelle Studien an *in vitro*-Zellsystemen zeigten, dass renal exprimierte organische Anionentransporter – wie OAT1 und OAT4 (Hagos et al. 2008) – und der Dicarboxylat-Transporter NaC3 (Stellmer et al. 2007) 3OHGA und GA über Membranen translozieren können.

Sämtliche der hier untersuchten Transporter (Oat1, Oat2, NaC3) sind – mit Ausnahme von Oatp1a6, dessen Lokalisation noch nicht bestimmt wurde – im proximalen Tubulus lokalisiert (siehe 1.3.1-1.3.4). Die Hauptaufgaben des proximalen Tubulus sind zum Einen die Aufnahme von Wasser, Elektrolyten und organischen Substanzen (z.B. Aminosäuren und Harnstoff) und zum Anderen die Sekretion von Abbauprodukten und potentiell toxischen Substanzen zur Ausscheidung mit dem Urin (Burckhardt und Burckhardt 2003).

Es ist bekannt, dass erhöhte Konzentrationen von Substraten die mRNA- und Proteinexpression ihrer Transporter beeinflussen (Sai 2005; Terada und Inui 2007). Folglich wurde am Tiermodell der GA1 die Dysregulation von Genen, besonders von Transportern in der Niere, untersucht, um potentielle GA- und 3OHGA-Transporter zu identifizieren (Stellmer et al. 2007). So wurde der NaC3 als erster, allerdings niedrig affiner GA/3OHGA-Transporter, identifiziert. NaC3 wird auf mRNA-Ebene im Nierengewebe bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen 2,6-fach mehr exprimiert als bei Wildtyp-Mäusen unter Normaldiät (Abbildung 7). In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals zusätzlich die Expressionen von Transportern in der HPD-induzierten encephalopathischen Krise bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen analysiert. Während es bei Wildtyp-Mäusen zu einer vermehrten

NaC3-mRNA-Expression unter HPD kommt, zeigte sich bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen in der HPD-induzierten encephalopathischen Krise keine Dysregulation von *NaC3* im Vergleich zur Normaldiät.

Die mRNA-Expressionsuntersuchungen von *Oat1* (Abbildung 8) zeigen eine erhöhte Expression im Nierengewebe von *Gcdh*^{-/-} im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen unter Normaldiät. Dieses Ergebnis konnte durch Expressionsuntersuchungen auf Proteinebene im Western Blot bestätigt werden (Abbildung 9). Während der induzierten encephalopathischen Krise vermindert sich die *Oat1*-mRNA-Expression im Vergleich zu *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Normaldiät. Auf Proteinebene zeigte sich jedoch am 4. Tag der Hochproteindiät eine eindeutig erhöhte Konzentration des 68-kDa-Oat1-Transporters bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen sowohl unter HPD als auch unter Normaldiät. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz zwischen mRNA- und Protein-Expressionsraten bei *Gcdh*^{-/-} Tieren könnte in einer Herabregulation der *Oat1*-mRNA während der ersten Tage der HPD sein, die durch eine unveränderte Stabilität des Oat1-Proteins begleitet wird. Über die Halblebenszeit des murinen Oat1 oder über andere Mitglieder der Oat-Familie liegen keine Angaben vor. Weiterführende Analysen sollten daher auf eine zeitlich engere Bestimmung der mRNA- und Proteinspiegel von Oat1 im Verlauf der induzierten encephalopathischen Krise gerichtet sein.

In der Western Blot-Untersuchung reagierte der verwendete anti-Oat1-Antikörper mit Polypeptiden von 64 und 68 kDa (Abbildung 9). Western Blot-Analysen anderer Autoren beschrieben Oat1-spezifische reaktive Banden von 57, 77 und 90 kDa (Tanaka et al. 2004; Kwak et al. 2005; Schneider et al. 2007). Daher wurde ein Oat1-spezifischer Western Blot mit Extrakten verschiedener Organe durchgeführt (Abbildung 10). Es ist beschrieben, dass bei Mäusen die Genexpression von *Oat1* im Leber- im Vergleich zu Nierengewebe um mehr als 100-fach reduziert ist (Buist et al. 2002). In der hier gezeigten Western Blot-Analyse war die 68 kDa Oat1-immunreaktive Bande in Leberextrakt nicht vorhanden (Abbildung 10) und stellt so höchstwahrscheinlich in der Niere das Oat1-Polypeptid dar.

Zusammenfassend lassen die vorliegenden Ergebnisse vermuten, dass es über die vermehrte Expression der basolateral lokalisierten Transporter *NaC3* und *Oat1* bei

Gcdh^{-/-} Mäusen zu einer gesteigerten Aufnahmekapazität von 3OHGA und GA aus renalen Blutgefäßen in die proximale Tubuluszelle kommt.

Ein potentieller Kandidat, um die zytotoxischen Metabolite auch endgültig über die apikale Membran dem Urin zuzuführen, ist *Oat2*. *Oat2* ist bei Mäusen, im Gegensatz zum Menschen, an der apikalen Membran der proximalen Tubuluszellen lokalisiert (Koepsell und Endou 2004). Es liegen keine Daten über die Transportfähigkeit von *Oat2* bezüglich 3OHGA vor. Es wird spekuliert, dass *Oat2* das murine Homolog des bei Mäusen nicht exprimierten (Ekaratanawong et al. 2004) humanen OAT4 darstellt (G. Burckhardt, Göttingen, persönliche Mitteilung). Da hOAT4 3OHGA translozieren kann (Hagos et al. 2008), kann auch eine Beteiligung von m*Oat2* am Transport von 3OHGA angenommen werden.

Oat2 zeigt im Nierengewebe eine signifikant erhöhte mRNA-Expression bei Wildtyp-Tieren unter Hochproteindiät im Vergleich zur Normaldiät (Abbildung 11). Bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen ist jedoch eine deutliche Verminderung der *Oat2*-mRNA-Expression in der HPD-induzierten metabolischen Krise im Vergleich zu *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Normaldiät zu beobachten. Im Experiment zu mRNA-Dysregulationen zu Beginn der Hochproteindiät ergab sich nach 36 Stunden HPD bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen noch keine verminderte Genexpression im Vergleich zur Normaldiät (Abbildung 18). Die Runterregulation stellt sich also erst im Verlauf der induzierten metabolischen Krise ein. Wenn sich die erniedrigte mRNA-Expression bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Hochproteindiät auch auf Proteinebene widerspiegeln würde, könnte das zu einer verminderten Kapazität führen, die toxischen Metabolite 3OHGA und GA über die apikale Sekretion ins Lumen abzugeben und damit aus dem Körper auszuschleiden. Diese Hypothese deckt sich mit Untersuchungen, bei denen es bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen in der encephalopathischen Krise zu einer stark vermehrten Anreicherung von 3OHGA im Nierenparenchym kommt (Keyser et al. 2008).

In Abbildung 27 sind die hier gewonnenen Daten mit Ergebnissen früherer Untersuchungen (Stellmer et al. 2007; Hagos et al. 2008; Keyser et al. 2008) zusammengetragen, um die veränderten Transportvorgänge der Metabolite 3OHGA und GA bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen und in der induzierten metabolischen Krise zu beschreiben.

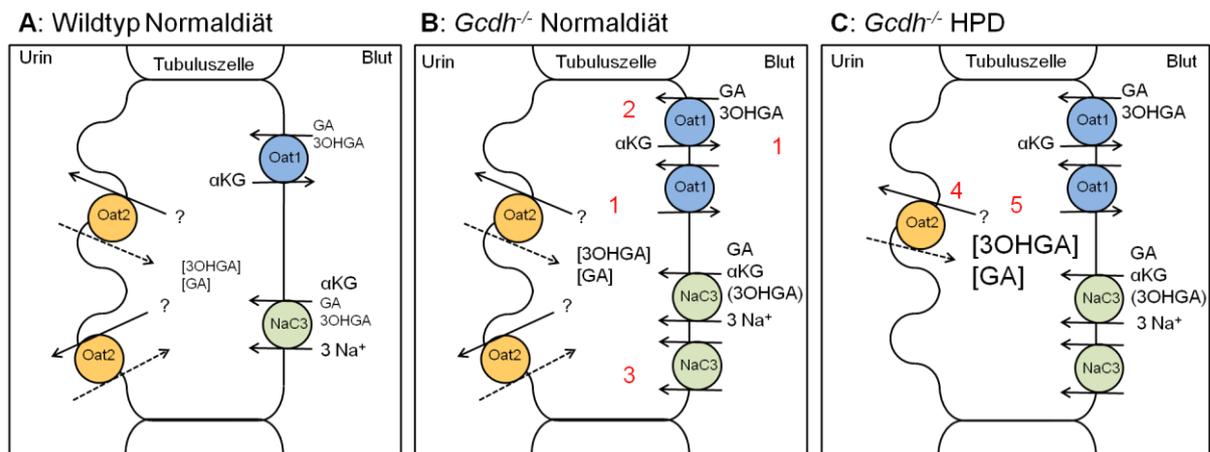


Abbildung 27: Schematisierter Transport von Glutarsäure (GA)- und 3-Hydroxyglutarsäure (3OHGA) durch die proximale Tubuluszelle. In **A** ist die Verteilung der untersuchten Transporter in der proximalen Tubuluszelle unter Standard-Bedingungen (Wildtyp-Maus unter Normaldiät) dargestellt. Glutarsäure (GA) und 3-Hydroxyglutarsäure (3OHGA) liegen im Gewebe und Körperflüssigkeiten nur in geringen Konzentrationen vor (Zinnanti et al. 2006). In **B** ist der Transport von 3OHGA und GA bei $Gcdh^{-/-}$ Mäusen unter basalen Bedingungen dargestellt. Die Konzentration der GA- und 3OHGA-Metabolite ist erhöht (1). Die basolateralen Transporter Oat1 (2) und NaC3 (3) werden vermehrt exprimiert und können entsprechend der Metabolit-Konzentration im Blut 3OHGA und GA in die Zelle aufnehmen. Da sich 3OHGA bei $Gcdh^{-/-}$ Mäusen unter Normaldiät nicht in der Nierenzelle anreichert (Keyser et al. 2008), kann davon ausgegangen werden, dass 3OHGA – möglicherweise über Oat2 – wieder ausgeschleust werden kann. In **C** ist der Transport von 3OHGA und GA bei $Gcdh^{-/-}$ Mäusen in der HPD-induzierten encephalopathischen Krise dargestellt. Die Expression von Oat1 und NaC3 ist auf Protein- bzw. mRNA-Ebene gleichbleibend im Vergleich zu $Gcdh^{-/-}$ Mäusen unter basalen Bedingungen. Gleichzeitig nimmt die Konzentration des an der apikalen Membran lokalisierten Oat2 ab (4), der möglicherweise für die Sekretion der toxischen Metabolite in das Lumen verantwortlich ist. Als Folge der vermehrten Aufnahme der Metabolite über die basolaterale Membran und verminderte apikale Abgabe in das Lumen, kommt es zum intrazellulären Anstieg der organischen Säuren (5) (Keyser et al. 2008).

Auch die Genexpression von *Oatp1a6* ist im Nierengewebe bei $Gcdh^{-/-}$ Mäusen unter Hochproteindiät im Vergleich zur Normaldiät signifikant vermindert (Abbildung 12). Über die intrazelluläre Lokalisation, das Substratspektrum und die Rolle von *Oatp1a6* beim Transport von GA und 3OHGA liegen keine Informationen vor. Da die *Oatp1a6*-mRNA bei $Gcdh^{-/-}$ Mäusen bereits nach 36 Stunden Hochproteindiät im Vergleich zu $Gcdh^{-/-}$ Mäusen unter Normaldiät deutlich erniedrigt ist (Abbildung 18), ist es möglich, dass *Oatp1a6* an der Pathogenese der GA1 beteiligt ist und die veränderte mRNA-Expression nicht nur Folge einer anderen pathologischen Veränderung z.B. eines Nierenparenchymschadens ist. Weitere Untersuchungen, vor allem zur Ex-

pression und Lokalisation des Oatp1a6-Proteins, müssen jedoch folgen, um diese Vermutung zu untermauern.

5.2 *Aqp2*- und *Ut-A*-mRNA-Expression im Nierengewebe

Die relative Genexpression von *Aqp2* im Nierengewebe ist bei 42 Tage alten Wildtyp- und *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Hochproteindiät im Vergleich zur Normaldiät erhöht (Abbildung 14). Ebenso erhöht sich die mRNA-Expression des Harnstofftransporters *Ut-A* bei Wildtyp- und *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter HPD (Abbildung 13). Bei beiden Transportern zeigte sich in der ANOVA-Analyse ein signifikanter Haupteffekt der Diät.

Die Expression des *Aqp2*, als auch des *Ut-A* wird im Nierengewebe durch das Antidiuretische Hormon (ADH) gesteigert (Gallardo et al. 2001; Fenton et al. 2006). ADH wird innerhalb des Hypothalamus im Nucleus supraopticus und im Nucleus paraventricularis gebildet und im Hypophysenhinterlappen in den Axonendigungen gespeichert (Robertson 2001). Es gibt verschiedene physiologische Stimuli für die ADH-Sekretion, z.B. eine erhöhte Osmolarität des Blutes, die von Rezeptoren des Hypothalamus registriert wird oder ein verminderter intravasaler Druck im linken Vorhof (Robertson 2001). Der ADH-Serumspiegel bzw. dessen Effekt ist jedoch z.B. auch von ernährungsbedingten Faktoren, wie einer Hochproteindiät, abhängig (Goldstein und Plaga 2002). Es bleibt weiteren Untersuchungen an *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter HPD vorbehalten, die Osmolarität und ADH-Spiegel zu bestimmen, um die Dysregulation von *Aqp2* und *Ut-A* zu klären

Unter basalen Bedingungen zeigt sich bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine signifikant stark erniedrigte *Ut-A*-mRNA-Konzentration. Diese Expressionsveränderungen sind nicht durch den oben beschriebenen Mechanismus einer erhöhten ADH-Wirkung erklärbar und lassen unterschiedliche Interpretationen zu. Für eine fundierte Beurteilung sind deshalb weitere Untersuchungen notwendig.

5.3 Hämaturie

Die beobachtete Hämaturie ist ein reproduzierbar auftretender Befund in der Entwicklung der HPD-induzierten metabolischen Krise bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen (Abbildung 25). Da sie weder bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen mit Normaldiät noch bei Wildtyp-Tieren unter Hochproteindiät auftritt, muss sie weder als ein HPD-bedingtes Artefakt noch als ein chronischer Prozess, der allein durch die *Gcdh*-Defizienz begründet wäre, angese-

hen werden. Die Hämaturie tritt mit einem konstanten Abstand von 1-2 Tagen vor dem Beginn der encephalopathischen Krise ein. Es scheint sich also weniger um ein sekundäres Phänomen infolge einer schwerwiegenden systemischen Veränderung (z.B. Dehydratation, Herz-Kreislauf-Versagen, Koma), als vielmehr um einen primären Prozess in der Entwicklung der metabolischen Krise zu handeln. Der mikroskopische Nachweis von Erythrozytenzylindern im Urinsediment (Abbildung 26) untermauert hierbei den Verdacht auf eine Glomerulusschädigung (Yadin 1994), die bisher weder im Tiermodell der GA1 oder bei GA1-Patienten beschrieben wurde.

Zur Zeit ist unklar, welche Symptome der metabolischen Krise bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen auch durch die renalen Veränderungen wie die Hämaturie, Expressionsveränderungen von Transportern oder eine verminderte Urinausscheidung (Stellmer 2007) verursacht sein können.

Die Beobachtung von glomerulären Veränderungen einerseits und subarachnoidalen Blutungen andererseits sprechen für eine Beteiligung endothelialer Dysfunktion. Es konnte eine beeinträchtigte Funktion des Endothels in *in vivo*-Experimenten nach 3OHGA-Applikation gezeigt werden, die diesen Zusammenhang stützt (Mühlhausen et al. 2004; Mühlhausen et al. 2006). Parallelen diesbezüglich finden sich beispielsweise beim hämolytischen urämischen Syndrom (HUS), das auch mit einer systemischen, endothelialen Dysfunktion einhergeht.

Ob die Glomerulusschädigung aus dem Tiermodell der GA1 auf Patienten übertragbar ist, ist noch völlig unklar. Zum Einen liegen keine publizierten Daten über eine Hämaturie bei Patienten vor. Zum Anderen scheint die Hämaturie zeitlich an den Krisenbeginn gebunden zu sein und so würde man bei GA1-Patienten vor dem Ausbruch der metabolischen Krise noch kein Blut im Urin nachweisen können. Alternativ wäre eine altersabhängige Schädigung der Niere beim Menschen möglich. Langzeitkontrollen bis ins Erwachsenenalter einschließlich einer differenzierten Nierenfunktionsdiagnostik im Rahmen von kontrollierten klinischen Studien bei GA1-Patienten wären für eine weitere Abklärung der Übertragbarkeit der beobachteten Ergebnisse auf den Menschen wichtig.

5.4 Kataboler Metabolismus der *Gcdh*^{-/-} Mäuse unter Hochproteindiät

Die hier durchgeführten Experimente weisen auf das Vorliegen einer katabolen Stoffwechsellage bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Hochproteindiät hin. Die Kombination aus der verminderten Futteraufnahme (Stellmer 2007) und der beobachteten Gewichtsabnahme bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter HPD (Abbildung 5) ergibt das Bild eines ausgeprägten Hungerzustandes. Die erhöhte mRNA-Expression von *Pepck* wird als Indiz einer kompensatorisch gesteigerten Glukoneogenese bei kataboler Stoffwechsellage betrachtet (Lavery et al. 2007).

Weshalb könnte die Nahrungsaufnahme bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter HPD vermindert sein? Eine Ablehnung des Futters aus gustatorischen Aspekten ist unwahrscheinlich, da die Wildtyp-Mäuse das angebotene Hochproteinfutter in gleichen Mengen wie herkömmliche Tiernahrung zu sich nehmen. Der Auslöser für die verminderte Nahrungsaufnahme scheint sich recht weit am Anfang des pathogenetischen Ablaufs der induzierten Krise zu befinden. Dies zeigt sich an einer verminderten Nahrungsaufnahme schon am ersten Tag der Diät (Stellmer 2007). In den ersten drei Tagen der HPD bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen scheint die reduzierte Nahrungsaufnahme noch reversibel. Bietet man *Gcdh*^{-/-} Mäusen, die drei Tage eine Hochproteindiät bekamen, im Anschluss wieder Normaldiät an, so kommt es zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme und zum Überleben der *Gcdh*^{-/-} Mäuse (Abbildung 6). Eine irreversible Schädigung scheint also erst an Tag 4 der HPD einzusetzen. Der Mechanismus der verminderten Aufnahme des für die *Gcdh*^{-/-} Mäusen toxischen Futters ist unklar.

5.5 Induktion einer metabolischen Azidose

Ein mRNA-Expressionsanstieg der *Pepck* im Nierengewebe – wie bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter HPD – wird bei Ratten auch im Zustand einer metabolischen Azidose beobachtet (Drewnowsk et al. 2002). Aufgrund der katabolen Stoffwechsellage und der konsekutiv ansteigenden Ketonkörper-Produktion konnte auch bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Hochproteindiät eine Azidose vermutet werden. Es sollte deshalb im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob eine Azidose die direkte Ursache für die Symptome der *Gcdh*^{-/-} Mäuse unter Hochproteindiät sein kann und nicht die Folge dieser Diät. Hierfür wurde bei einer *Gcdh*^{-/-} Maus, mit der etablierten Methode einer NH₄Cl-

Beimengung zum Trinkwasser (Bento et al. 2005), eine metabolische Azidose induziert.

Im Gegensatz zur Hochproteindiät-induzierten encephalopathischen Krise traten in der induzierten Azidose jedoch keine wahrnehmbaren Beeinträchtigungen, wie verminderte Nahrungsaufnahme, Gewichtsabnahme oder motorische Defizite, über einen Zeitraum von 14 Tagen auf. Weiterhin zeigte keines der untersuchten Gene die gleiche Tendenz in der Expression wie in der HPD-induzierten encephalopathischen Krise (Abbildung 23). Daher ist es unwahrscheinlich, dass ein erniedrigter pH-Wert des Blutes der entscheidende Auslöser oder Mediator der encephalopathischen Krise bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Hochproteindiät ist.

5.6 Aminosäuren- und Ammoniak-Konzentrationen im Blut

Bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen liegen in der induzierten encephalopathischen Krise erhöhte Werte der verzweigtkettigen Aminosäuren (BCAA = Valin, Leucin, Isoleucin), Alanin, Ornithin, Citrullin und Glycin im Vollblut vor (Tabelle 9).

Bei 75 % von 4 Wochen alten *Gcdh*^{-/-} Mäusen, die anstelle der Hochproteindiät nur ein Lysin-angereichertes Futter bekamen, entwickelte sich eine metabolische Krise. Bei den übrigen 25 % traten keine Symptome einer metabolischen Krise auf (Zinnanti et al. 2006). Bei den symptomatischen Tieren waren auch erhöhte Konzentrationen der BCAA im Blut nachweisbar, während bei den *Gcdh*^{-/-} Mäusen ohne metabolische Krise unter Lysin-angereicherter Diät keine erhöhten Spiegel der verzweigtkettigen Aminosäuren im Blut nachgewiesen wurden (Zinnanti et al. 2006). Die Gründe für die verschiedenen Verläufe sind unklar, es scheint jedoch eine Parallele zwischen den erhöhten BCAA und der Induktion der encephalopathischen Krise zu geben.

Die Ursache für den beobachteten Anstiegs von BCAA bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Hochproteindiät ist unklar. *In vitro*-Studien zeigten eine Inhibierung des α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes (KGDHc) durch – das bei GA1 in erhöhten Konzentrationen vorkommenden – Glutaryl-CoA. Eine Untereinheit des KGDHc ist identisch mit der Untereinheit des Verzweigtkettigen- α -Ketosäure-Dehydrogenase-Komplexes (Sauer et al. 2005). Möglicherweise führt eine Inhibition dieser Untereinheit in der induzierten encephalopathischen Krise sekundär zu einer erhöhten Konzentration von BCAA bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen.

Erhöhte Konzentrationen der BCAA sind auch ein typischer Befund der Ahornsirupkrankheit (MSUD), einem Defekt des Verzweigtkettigen- α -Ketosäure-Dehydrogenase-Komplex (Chuang et al. 2006). MSUD weist auch klinische Ähnlichkeiten zur Glutarazidurie Typ 1 auf. So kann es bei der MSUD zu krisenhaften Verschlechterungen kommen, in deren Rahmen neurologische Symptome, Somnolenz, ein Hirnödem und irreversible Bewegungsstörungen auftreten können (Morton et al. 2002).

Bei Ratten und auch bei Menschen, die für drei Tage kein Essen bekamen, wurden erhöhte Konzentrationen der BCAA im Blut gemessen. Bei Ratten zeigten sich hierunter jedoch auch ein erniedrigter Alanin-Spiegel (Holecek et al. 2001; Holecek 2002). Bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Hochproteindiät – bei denen auch eine erniedrigte Nahrungsaufnahme vorliegt – fanden sich jedoch erhöhte Alanin-Spiegel im Blut. Damit ist die verminderte Nahrungsaufnahme bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Hochproteindiät nicht als Ursache der erhöhten BCAA-Konzentrationen im Blut anzunehmen.

Die erhöhten Aminosäure-Konzentrationen von BCAA, Glycin, Citrullin, Ornithin und Alanin bei den *Gcdh*^{-/-} Mäusen in der induzierten metabolischen Krise könnten ihre Ursache auch in einer Schädigung der Mitochondrien haben. Der Verzweigtkettigen- α -Ketosäure-Dehydrogenase-Komplex, das Glycin Cleavage System, die Pyruvat Carboxylase und die Ornithin Aminotransferase sind im Mitochondrium lokalisierte Enzyme, die am Aminosäurenmetabolismus beteiligt sind. Funktionseinschränkungen dieser Enzyme können zu erhöhten Konzentrationen von BCAA, Glycin, Citrullin und Onithin im Blut führen (Blau et al. 2004). Ein möglicher Pathomechanismus könnte hierbei die intrazelluläre Anreicherung der toxischen Metabolite GA/3OHGA sein.

Mitochondriopathien gehen regelhaft mit einer Erhöhung des Serum-Lactats einher. Da Lactat mit Alanin im Gleichgewicht steht, könnte der erhöhte Alanin-Spiegel der *Gcdh*^{-/-} Mäuse unter HPD hierdurch erklärt werden. Hinweise auf eine gestörte mitochondriale Funktion ergab auch eine cerebrale Spektroskopie bei einem GA1-Patienten, die eine erhöhte Lactat-Konzentration in den Basalganglien nachgewiesen hat (Oguz et al. 2005).

5.7 Aqp4- und Snat5-Expression im Hirnstammgewebe

In der vorliegenden Arbeit wurden auch Expressionsanalysen mittels Microarray und Realtime-PCR am Hirnstamm von Wildtyp- und *Gcdh*^{-/-} Mäusen durchgeführt. Der Hirnstamm der Mäuse beinhaltet präparationsbedingt auch das Striatum, welches bei GA1-Patienten in der encephalopathischen Krise weitestgehend zerstört wird (Goodman und Frerman 2001).

In der Microarray-Analyse des Hirnstammes waren die Spiegel von *Aqp4*-Transkripten bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter HPD um 50 % erniedrigt im Vergleich zu *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Normaldiät. Dieses Ergebnis konnte mittels Realtime-PCR bestätigt werden. In der Microarray-Analyse des Hirnstammgewebes wurde außerdem eine 15-fach verminderte mRNA-Konzentration von *Snat5* bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Hochproteindiät im Vergleich zu *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Normaldiät nachgewiesen. Obgleich eine Verifizierung auf Proteinebene nicht gelang, kann dieses deutliche Ergebnis als Hinweis auf eine beeinflusste Expression – zumindest auf mRNA-Ebene – interpretiert werden.

Bei der Pathogenese der GA1, insbesondere bei der Zerstörung des Striatums, ist (wie in 1.1 diskutiert) eine Beteiligung der Exzitotoxizität – eine Übererregung von Neuronen über glutamaterge NMDA-Rezeptoren – nicht auszuschließen. Es kann vermutet werden, dass bei einer Störung der glutamatergen Transmission auch der Glutamat-Glutamin-Zyklus beeinträchtigt ist.

In der Literatur ist ein Zusammenhang zwischen der *Aqp4*-Expression und der Expression des Glutamattransporters 1 (Glt-1) beschrieben, der zusammen mit dem Glutamat/Aspartat-Transporter (Glast) für die Wiederaufnahme des Neurotransmitters Glutamat aus dem synaptischen Spalt verantwortlich ist (McKenna 2007). So wird bei *Aqp4*^{-/-} Mäusen eine deutlich reduzierte Expression von Glt-1, bei unveränderter Glast-Expression, beobachtet. Bei kultivierten Astrozyten dieser *Aqp4*^{-/-} Mäuse zeigt sich eine verminderte Zytotoxizität nach Applikation von Glutamat, also eine verminderte Ansprechbarkeit auf Exzitotoxizität (Zeng et al. 2007). Ob die reduzierte *Aqp4*-Expression bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen in der induzierten encephalopathischen Krise eine Reaktion auf Änderungen in der Glutamat-Neurotransmission ist, bedarf weiterführender Untersuchungen.

Die Glt-1-Expression könnte experimentell z.B. über Realtime PCR oder mittels Western Blot bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Hochproteindiät im Vergleich zu *Gcdh*^{-/-} Mäuse unter Normaldiät und Wildtyp-Tieren im Hirnstammgewebe überprüft werden.

Snat5 ist ein in Astrozyten exprimierter Transporter, der wahrscheinlich für den Efflux von Glutamin zur anschließenden Aufnahme in Neurone verantwortlich ist (Cubelos et al. 2005). Eine Herabregulation von *Snat5*-mRNA bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter HPD kann als reduzierte Kapazität des Glutamat-Glutamin-Zyklus interpretiert werden.

Neuere Untersuchungen ergaben weitere Hinweise auf Veränderungen des Glutamat-Haushaltes: So wurde eine verminderte Konzentration von Glutamin und Glutamat im Hirnhomogenat als auch verminderte Glutamat-Konzentrationen in der cerebralen H1-Spektroskopie von vier Wochen alten *Gcdh*^{-/-} Mäusen gemessen, die unter einer Lysin-angereicherten Diät standen (Zinnanti et al. 2007). Einschränkungen in der Neurotransmitter-Synthese bei GA1 werden auch durch eine GA/3OHGA-vermittelte Störung der anaplerotischen Reaktion diskutiert. Durch die erhöhten Spiegel der Dicarboxylate GA und 3OHGA im Hirn von *Gcdh*^{-/-} Mäusen kann es zur Inhibierung von Dicarboxylat-Transportern (NaC2, NaC3) in Astrozyten und Neuronen kommen. Dadurch kommt es zu einer reduzierten Bereitstellung von Dicarboxylat-Intermediaten des Citratzyklus in den Neuronen, die wie α -Ketoglutarat oder Succinat unter anderem für die Synthese von GABA und Glutamat benötigt werden (Lamp et al. 2011).

Darüber hinaus wurde bei verschiedenen *in vitro*-Experimenten eine verminderte Glutamat-Aufnahme in Gegenwart von Glutarsäure beobachtet (Rosa et al. 2007; Magni et al. 2009).

Es gibt also zusammenfassend mehrfache Hinweise auf Störungen bzw. veränderte Abläufe an glutamatergen Synapsen bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Hochproteindiät, die in Abbildung 28 zusammengefasst sind.

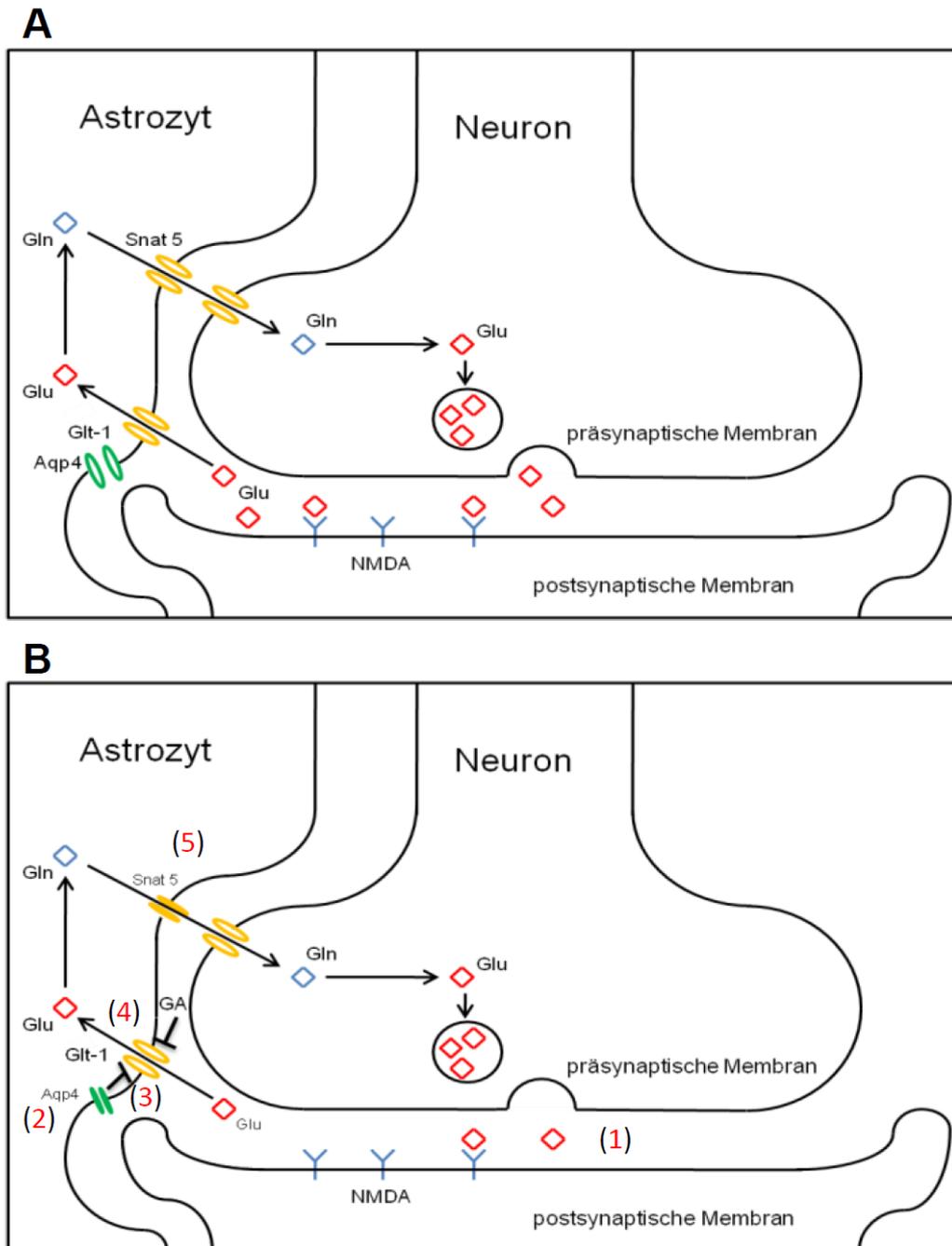


Abbildung 28: **A** Glutamat-Glutamin-Kreislauf mit einigen ausgewählten beteiligten Transportern. Glutamin-Transporter 1 (Glt-1) und der Natrium-abhängige neutrale Aminosäure-Transporter 5 (Snat5) sind nicht alleinig für die Glutamat-Aufnahme bzw. Glutamin-Abgabe verantwortlich, sondern Teil eines Systems von Transportern. Das Bild ist stark vereinfacht und im Wesentlichen auf Strukturen beschränkt, die unmittelbar bei $Gcdh^{-/-}$ Mäusen verändert bzw. für die Veränderungen relevant sind. **B** Beeinträchtigungen des Glutamat-Glutamin-Kreislaufes bei $Gcdh^{-/-}$ Mäusen unter Hochproteindiät, bzw. hoher Lysin-Zufuhr: verminderte Konzentration von Glutamat im Hirngewebe (1), verminderte Expression von Aquaporin 4 (Aqp4) (2) ggf. mit konsekutiv verminderter Expression von Glt-1 (3), verminderte Glutamat-Aufnahme aus dem synaptischen Spalt über Inibierung durch Glutarsäure (GA) (4) und verminderte Expression von Snat5 (5).

5.8 *Hmgcs2*-Expression im Hirnstammgewebe

HMGCS2 scheint nicht nur in der Leber sondern darüber hinaus auch im zentralen Nervensystem funktionaler Bestandteil der Ketonkörpersynthese zu sein (Cullingford et al. 1998; Morris 2005). *Hmgcs2* wird jedoch nur in geringen Mengen im ZNS exprimiert und dabei auch nur in bestimmten Regionen, wie dem Kleinhirn und in Teilen des Hirnstammes (Cullingford et al. 1998; Camarero et al. 2006). Die Regulation von HMGCS2 wird partiell über Hormone reguliert. So kommt es unter Insulin-Applikation auf Leberzellen zu einer Herabregulation der *Hmgcs2*-Expression (Nadal et al. 2002) und über den Gegenspieler Glukagon zu einer Aktivitätszunahme des Enzyms (Quant et al. 1989; Quant et al. 1990).

In der ANOVA-Analyse der mRNA-Expression von *Hmgcs2* im Hirnstamm zeigte sich ein signifikanter Haupteffekt des Genotypes, mit einer verminderten Expression bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen und ein hochsignifikanter Haupteffekt der Diät, mit einer verminderten Expression unter Hochproteindiät. Da der Hormonstatus der *Gcdh*^{-/-} Mäuse unter Normal- und Hochproteindiät gegenüber Wildtypen-Mäusen bisher nicht untersucht wurde, erscheinen Spekulationen über die hormonelle Regulation der *Hmgcs2*-Expression im Hirn verfrüht.

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die genauere Analyse von dysregulierten Genen bei *Glutaryl-CoA Dehydrogenase*-defizienten Mäusen (*Gcdh*^{-/-}), die als Modell für die menschliche, neurodegenerative Glutaracidurie Typ 1 dienen, insbesondere während einer durch Hochproteindiät (HPD)-induzierten metabolischen Krise.

Auf der Basis vergleichender DNA-Microarray-Analysen an Niere und Hirngewebe von *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter einer Normal- und Hochproteindiät lag der Schwerpunkt der anschließenden Untersuchungen auf Expressionsanalysen von renal und cerebral lokalisierten Transportern.

1. Realtime-PCR und Western Blot-Analysen zeigten, dass die Expression von Transportern, die für den Transfer von Glutarsäure (GA) und 3-Hydroxyglutarsäure (3OHGA) verantwortlich sind, wie die organischen Anionentransporter Oat1 und Oat2 und der Natrium-abhängige Dicarboxylat-Transporter Typ 3 (NaC3), in der HPD-induzierten Krise im Nierengewebe dysreguliert sind und zu einer veränderten Verteilung in der Zelle führen. Aus den gewonnenen Daten wurde ein Modell für die proximale Tubuluszelle erstellt, bei dem bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen die Mengen von NaC3 und Oat1 an der basolateralen Membran erhöht sind, während die Zahl der apikal lokalisierten Oat2 in der HPD-induzierten encephalopathischen Krise reduziert ist. Unter pathophysiologischen Bedingungen würde es hierbei zu einer vermehrten Aufnahme von GA/3OHGA aus dem Blut in proximale Tubuluszellen kommen aber zu einer verminderten Abgabe ins Lumen.
2. Während der Entwicklung der HPD-induzierten metabolischen Krise kommt es regelhaft bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen zu der Ausbildung einer Hämaturie. Durch die Darstellung von Erythrozytenzylindern in den mikroskopischen Harnsediment-Untersuchungen kann eine glomeruläre Schädigung bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen als sicher angenommen werden.
3. Eine metabolische Azidose als Auslöser der Expressionsveränderungen renaler Transporter in der HPD-induzierten metabolischen Krise bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen konnte ausgeschlossen werden.

4. Trotz eingeschränkter Harnstoffausscheidung und vermehrter Expression des renalen *Harnstofftransporters-A (Ut-A)* in der HPD-induzierten metabolischen Krise bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen kommt es zu keiner Akkumulation von Ammoniak.
5. Eine vermehrte Expression von *Aquaporin 2 (Aqp2)* und *Ut-A* in der HPD-induzierten metabolischen Krise bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen kann als ADH-vermittelter Effekt der Hochproteindiät interpretiert werden. Diese Hypothese wird durch Daten zur verminderten Urinausscheidung bei *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter HPD unterstützt.
6. Die hier gefundenen Veränderungen in der Expression von *Aquaporin 4 (Aqp4)* und des *Natrium-abhängigen neutralen Aminosäure-Transporters 5 (Snat5)* unterstützen die Daten anderer Autoren, die auf eine Beeinflussung der glutamatergen Neuronen in der encephalopathischen Krise hinweisen.

Aus den hier erhobenen Resultaten ergeben sich neue Informationen über die Ausschleusungsmechanismen von 3OHGA/GA über die proximale Tubuluszelle. Oat1 und Oat2 stellen sich hierbei als aussichtsreiche Drug-Targets für pharmokologische Experimente dar, um die Exkretion der toxischen Metabolite zu steigern.

7 Literatur

- Anzai N, Kanai Y and Endou H (2006) Organic anion transporter family: current knowledge. *J Pharmacol Sci* 100: 411-426.
- Ayte J, Gil-Gomez G and Hegardt FG (1993) Methylation of the regulatory region of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene leads to its transcriptional inactivation. *Biochem J* 295: 807-812.
- Bagnasco SM (2005) Role and regulation of urea transporters. *Pflugers Arch* 450: 217-226.
- Bahn A, Ljubojevic M, Lorenz H, Schultz C, Ghebremedhin E, Ugele B, Sabolic I, Burckhardt G and Hagos Y (2005) Murine renal organic anion transporters mOAT1 and mOAT3 facilitate the transport of neuroactive tryptophan metabolites. *Am J Physiol Cell Physiol* 289: C1075-1084.
- Baird FE, Pinilla-Tenas JJ, Ogilvie WL, Ganapathy V, Hundal HS and Taylor PM (2006) Evidence for allosteric regulation of pH-sensitive System A (SNAT2) and System N (SNAT5) amino acid transporter activity involving a conserved histidine residue. *Biochem J* 397: 369-375.
- Bak LK, Schousboe A and Waagepetersen HS (2006) The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J Neurochem* 98: 641-653.
- Bankir LT and Trinh-Trang-Tan MM (2000) Renal urea transporters. Direct and indirect regulation by vasopressin. *Exp Physiol* 85: 243S-252S.
- Baric I, Wagner L, Feyh P, Liesert M, Buckel W and Hoffmann GF (1999) Sensitivity and specificity of free and total glutaric acid and 3-hydroxyglutaric acid measurements by stable-isotope dilution assays for the diagnosis of glutaric aciduria type I. *J Inher Metab Dis* 22: 867-881.
- Baron F (2002) *Medical Physiology*. Saunders, New York.
- Bento LM, Carvalheira JB, Menegon LF, Saad MJ and Gontijo JA (2005) Effects of NH₄Cl intake on renal growth in rats: role of MAPK signalling pathway. *Nephrol Dial Transplant* 20: 2654-2660.
- Blau N, Duran M, Blaskovics ME and Gibson KM (2004) *Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases*. Heidelberg, Springer.
- Bonilla-Felix M (2004) Development of water transport in the collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 287: F1093-1101.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Buist SC, Cherrington NJ, Choudhuri S, Hartley DP and Klaassen CD (2002) Gender-specific and developmental influences on the expression of rat organic anion transporters. *J Pharmacol Exp Ther* 301: 145-151.
- Burckhardt BC and Burckhardt G (2003) Transport of organic anions across the basolateral membrane of proximal tubule cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 146: 95-158.

- Burgess SC, He T, Yan Z, Lindner J, Sherry AD, Malloy CR, Browning JD and Magnuson MA (2007) Cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase does not solely control the rate of hepatic gluconeogenesis in the intact mouse liver. *Cell Metab* 5: 313-320.
- Camarero N, Mascaro C, Mayordomo C, Vilardell F, Haro D and Marrero PF (2006) Ketogenic HMGCS2 Is a c-Myc target gene expressed in differentiated cells of human colonic epithelium and down-regulated in colon cancer. *Mol Cancer Res* 4: 645-653.
- Chaudhry FA, Reimer RJ and Edwards RH (2002) The glutamine commute: take the N line and transfer to the A. *J Cell Biol* 157: 349-355.
- Cheng X, Maher J, Chen C and Klaassen CD (2005) Tissue distribution and ontogeny of mouse organic anion transporting polypeptides (Oatps). *Drug Metab Dispos* 33: 1062-1073.
- Chou CL, Ma T, Yang B, Knepper MA and Verkman AS (1998) Fourfold reduction of water permeability in inner medullary collecting duct of aquaporin-4 knockout mice. *Am J Physiol* 274: C549-554.
- Choudhuri S, Cherrington NJ, Li N and Klaassen CD (2003) Constitutive expression of various xenobiotic and endobiotic transporter mRNAs in the choroid plexus of rats. *Drug Metab Dispos* 31: 1337-1345.
- Choudhuri S, Ogura K and Klaassen CD (2001) Cloning, expression, and ontogeny of mouse organic anion-transporting polypeptide-5, a kidney-specific organic anion transporter. *Biochem Biophys Res Commun* 280: 92-98.
- Christensen E, Ribes A, Merinero B and Zschocke J (2004) Correlation of genotype and phenotype in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 27: 861-868.
- Chuang DT, Chuang JL and Wynn RM (2006) Lessons from genetic disorders of branched-chain amino acid metabolism. *J Nutr* 136: 243S-249S.
- Cubelos B, Gonzalez-Gonzalez IM, Gimenez C and Zafra F (2005) Amino acid transporter SNAT5 localizes to glial cells in the rat brain. *Glia* 49: 230-244.
- Cullingford TE, Dolphin CT, Bhakoo KK, Peuchen S, Canevari L and Clark JB (1998) Molecular cloning of rat mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase and detection of the corresponding mRNA and of those encoding the remaining enzymes comprising the ketogenic 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA cycle in central nervous system of suckling rat. *Biochem J* 329: 373-381.
- Danilczyk U and Penninger JM (2006) Angiotensin-converting enzyme II in the heart and the kidney. *Circ Res* 98: 463-471.
- Das AM, Lucke T and Ullrich K (2003) Glutaric aciduria I: creatine supplementation restores creatinephosphate levels in mixed cortex cells from rat incubated with 3-hydroxyglutarate. *Mol Genet Metab* 78: 108-111.
- Dean SA, Tan J, O'Brien ER and Leenen FH (2005) 17beta-estradiol downregulates tissue angiotensin-converting enzyme and ANG II type 1 receptor in female rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: R759-766.

- Ding JH, Sha LL, Chang J, Zhou XQ, Fan Y and Hu G (2007) Alterations of striatal neurotransmitter release in aquaporin-4 deficient mice: An in vivo microdialysis study. *Neurosci Lett* 422: 175-180.
- Drewnowsk KD, Craig MR, Digiovanni SR, McCarty JM, Moorman AF, Lamers WH and Schoolwerth AC (2002) PEPCK mRNA localization in proximal tubule and gene regulation during metabolic acidosis. *J Physiol Pharmacol* 53: 3-20.
- Ekaratanawong S, Anzai N, Jutabha P, Miyazaki H, Noshiro R, Takeda M, Kanai Y, Sophasan S and Endou H (2004) Human organic anion transporter 4 is a renal apical organic anion/dicarboxylate exchanger in the proximal tubules. *J Pharmacol Sci* 94: 297-304.
- Enomoto A, Takeda M, Shimoda M, Narikawa S, Kobayashi Y, Kobayashi Y, Yamamoto T, Sekine T, Cha SH, Niwa T and Endou H (2002) Interaction of human organic anion transporters 2 and 4 with organic anion transport inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 301: 797-802.
- Eraly SA, Vallon V, Vaughn DA, Gangoiti JA, Richter K, Nagle M, Monte JC, Rieg T, Truong DM, Long JM, Barshop BA, Kaler G and Nigam SK (2006) Decreased renal organic anion secretion and plasma accumulation of endogenous organic anions in OAT1 knock-out mice. *J Biol Chem* 281: 5072-5083.
- Esther CR, Jr., Howard TE, Marino EM, Goddard JM, Capecchi MR and Bernstein KE (1996) Mice lacking angiotensin-converting enzyme have low blood pressure, renal pathology, and reduced male fertility. *Lab Invest* 74: 953-965.
- Fenton RA, Chou CL, Stewart GS, Smith CP and Knepper MA (2004) Urinary concentrating defect in mice with selective deletion of phloretin-sensitive urea transporters in the renal collecting duct. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 7469-7474.
- Fenton RA, Smith CP and Knepper MA (2006) Role of collecting duct urea transporters in the kidney--insights from mouse models. *J Membr Biol* 212: 119-131.
- Fenton RA, Stewart GS, Carpenter B, Howorth A, Potter EA, Cooper GJ and Smith CP (2002) Characterization of mouse urea transporters UT-A1 and UT-A2. *Am J Physiol Renal Physiol* 283: F817-825.
- Forstner R, Hoffmann GF, Gassner I, Heideman P, De Klerk JB, Lawrenz-Wolf B, Doring E, Weiss-Wichert P, Troger J, Colombo JP and Plochl E (1999) Glutaric aciduria type I: ultrasonographic demonstration of early signs. *Pediatr Radiol* 29: 138-143.
- Freudenberg F, Lukacs Z and Ullrich K (2004) 3-Hydroxyglutaric acid fails to affect the viability of primary neuronal rat cells. *Neurobiol Dis* 16: 581-584.
- Fujita T, Katsukawa H, Yodoya E, Wada M, Shimada A, Okada N, Yamamoto A and Ganapathy V (2005) Transport characteristics of N-acetyl-L-aspartate in rat astrocytes: involvement of sodium-coupled high-affinity carboxylate transporter NaC3/NaDC3-mediated transport system. *J Neurochem* 93: 706-714.
- Gallardo P, Cid LP, Vio CP and Sepulveda FV (2001) Aquaporin-2, a regulated water channel, is expressed in apical membranes of rat distal colon epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281: G856-863.
- Gerstner B, Gratopp A, Marcinkowski M, Sifringer M, Obladen M and Buhner C (2005) Glutaric acid and its metabolites cause apoptosis in immature oligodendro-

- cytes: a novel mechanism of white matter degeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatr Res* 57: 771-776.
- Goldstein DL and Plaga K (2002) Effect of short-term vs. long-term elevation of dietary protein intake on responsiveness of rat thick ascending limbs to peptide hormones. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 133: 359-366.
- Goodman SI and Frerman E (2001) Organic Acidemias Due to Defects in Lysine Oxidation: 2-Ketoadipic Acidemia and Glutaric Acidemia. *The Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. D. Valle, A. L. Beaudet, B. Vogelstein et al. The McGraw-Hill Companies, New York. Chapter 95.
- Goodman SI, Markey SP, Moe PG, Miles BS and Teng CC (1975) Glutaric aciduria; a "new" disorder of amino acid metabolism. *Biochem Med* 12: 12-21.
- Hagenbuch B and Meier PJ (2004) Organic anion transporting polypeptides of the OATP/ SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/ SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch* 447: 653-665.
- Hagos Y, Krick W, Braulke T, Mühlhausen C, Burckhardt G and Burckhardt BC (2008) Organic anion transporters OAT1 and OAT4 mediate the high affinity transport of glutarate derivatives accumulating in patients with glutaric acidurias. *Pflugers Arch* 457: 223-231.
- Herold G (2005) *Innere Medizin*. Herold, Köln.
- Hoffmann GF, Gibson KM, Trefz FK, Nyhan WL, Bremer HJ and Rating D (1994) Neurological manifestations of organic acid disorders. *Eur J Pediatr* 153: S94-100.
- Holecek M (2002) Relation between glutamine, branched-chain amino acids, and protein metabolism. *Nutrition* 18: 130-133.
- Holecek M, Sprongl L and Tilser I (2001) Metabolism of branched-chain amino acids in starved rats: the role of hepatic tissue. *Physiol Res* 50: 25-33.
- Ishibashi K (2009) New members of mammalian aquaporins: AQP10-AQP12. *Handb Exp Pharmacol*: 251-262.
- Karow T and Lang-Roth R (2005) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Pulheim, Thomas Karow Verlag.
- Keyser B, Glatzel M, Stellmer F, Kortmann B, Lukacs Z, Kolker S, Sauer SW, Muschol N, Herdering W, Thiem J, Goodman SI, Koeller DM, Ullrich K, Braulke T and Mühlhausen C (2008) Transport and distribution of 3-hydroxyglutaric acid before and during induced encephalopathic crises in a mouse model of glutaric aciduria type 1. *Biochim Biophys Acta* 6: 385-390.
- Klinke K and Silbernagel S (2003) *Lehrbuch der Physiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Kobayashi Y, Ohshiro N, Sakai R, Ohbayashi M, Kohyama N and Yamamoto T (2005) Transport mechanism and substrate specificity of human organic anion transporter 2 (hOat2 [SLC22A7]). *J Pharm Pharmacol* 57: 573-578.
- Koeller DM, Woontner M, Crnic LS, Kleinschmidt-DeMasters B, Stephens J, Hunt EL and Goodman SI (2002) Biochemical, pathologic and behavioral analysis of a mouse model of glutaric acidemia type I. *Hum Mol Genet* 11: 347-357.

- Koepsell H and Endou H (2004) The SLC22 drug transporter family. *Pflügers Arch* 447: 666-676.
- Kojima R, Sekine T, Kawachi M, Cha SH, Suzuki Y and Endou H (2002) Immunolocalization of multispecific organic anion transporters, OAT1, OAT2, and OAT3, in rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 13: 848-857.
- Kölker S, Ahlemeyer B, Krieglstein J and Hoffmann GF (2000) Maturation-dependent neurotoxicity of 3-hydroxyglutaric and glutaric acids in vitro: a new pathophysiologic approach to glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatr Res* 47: 495-503.
- Kölker S, Ahlemeyer B, Krieglstein J and Hoffmann GF (2001) Contribution of reactive oxygen species to 3-hydroxyglutarate neurotoxicity in primary neuronal cultures from chick embryo telencephalons. *Pediatr Res* 50: 76-82.
- Kölker S, Christensen E, Leonard JV, Greenberg CR, Burlina AB, Burlina AP, Dixon M, Duran M, Goodman SI, Koeller DM, Muller E, Naughten ER, Neumaier-Probst E, Okun JG, Kyllerman M, Surtees RA, Wilcken B, Hoffmann GF and Burgard P (2007) Guideline for the diagnosis and management of glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency (glutaric aciduria type I). *J Inher Metab Dis* 30: 5-22.
- 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 and Hoffmann GF (2006) Natural history, outcome, and treatment efficacy in children and adults with glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatr Res* 59: 840-847.
- Kölker S, Koeller DM, Okun JG and Hoffmann GF (2004) Pathomechanisms of neurodegeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Ann Neurol* 55: 7-12.
- Kong H, Fan Y, Xie J, Ding J, Sha L, Shi X, Sun X and Hu G (2008) AQP4 knockout impairs proliferation, migration and neuronal differentiation of adult neural stem cells. *J Cell Sci* 121: 4029-4036.
- Kulkens S, Harting I, Sauer S, Zschocke J, Hoffmann GF, Gruber S, Bodamer OA and Kolker S (2005) Late-onset neurologic disease in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Neurology* 64: 2142-2144.
- Kwak JO, Kim HW, Oh KJ, Kim DS, Han KO and Cha SH (2005) Co-localization and interaction of organic anion transporter 1 with caveolin-2 in rat kidney. *Exp Mol Med* 37: 204-212.
- Lamp J, Keyser B, Koeller DM, Ullrich K, Braulke T and Muhlhausen C (2011) Glutaric aciduria type 1 metabolites impair the succinate transport from astrocytic to neuronal cells. *J Biol Chem* 286: 17777-17784.
- Lavery GG, Hauton D, Hewitt KN, Brice SM, Sherlock M, Walker EA and Stewart PM (2007) Hypoglycemia with enhanced hepatic glycogen synthesis in recombinant mice lacking hexose-6-phosphate dehydrogenase. *Endocrinology* 148: 6100-6106.
- Liao J, Barthel A, Nakatani K and Roth RA (1998) Activation of protein kinase B/Akt is sufficient to repress the glucocorticoid and cAMP induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *J Biol Chem* 273: 27320-27324.

- Livak KJ and Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408.
- Ljubojevic M, Balen D, Breljak D, Kusan M, Anzai N, Bahn A, Burckhardt G and Sabolic I (2007) Renal expression of organic anion transporter OAT2 in rats and mice is regulated by sex hormones. *Am J Physiol Renal Physiol* 292: F361-372.
- Lund TM, Christensen E, Kristensen AS, Schousboe A and Lund AM (2004) On the neurotoxicity of glutaric, 3-hydroxyglutaric, and trans-glutaconic acids in glutaric acidemia type 1. *J Neurosci Res* 77: 143-147.
- Lungkaphin A, Lewchalermwongse B and Chatsudthipong V (2006) Relative contribution of OAT1 and OAT3 transport activities in isolated perfused rabbit renal proximal tubules. *Biochim Biophys Acta* 1758: 789-795.
- Maciver B, Smith CP, Hill WG and Zeidel ML (2008) Functional characterization of mouse urea transporters UT-A2 and UT-A3 expressed in purified *Xenopus laevis* oocyte plasma membranes. *Am J Physiol Renal Physiol* 294: F956-964.
- Mackenzie B and Erickson JD (2004) Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family. *Pflügers Arch* 447: 784-795.
- Magni DV, Furian AF, Oliveira MS, Souza MA, Lunardi F, Ferreira J, Mello CF, Royes LF and Figuera MR (2009) Kinetic characterization of I-[(3)H]glutamate uptake inhibition and increase oxidative damage induced by glutaric acid in striatal synaptosomes of rats. *Int J Dev Neurosci* 27: 65-72.
- Markovich D and Murer H (2004) The SLC13 gene family of sodium sulphate/carboxylate cotransporters. *Pflügers Arch* 447: 594-602.
- Mascaro C, Buesa C, Ortiz JA, Haro D and Hegardt FG (1995) Molecular cloning and tissue expression of human mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase. *Arch Biochem Biophys* 317: 385-390.
- McKenna MC (2007) The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain. *J Neurosci Res* 85: 3347-3358.
- Moe SE, Sorbo JG, Sogaard R, Zeuthen T, Petter Ottersen O and Holen T (2008) New isoforms of rat Aquaporin-4. *Genomics* 91: 367-377.
- Monteil C, Fillastre JP and Morin JP (1995) Expression and subcellular distribution of phosphoenolpyruvate carboxykinase in primary cultures of rabbit kidney proximal tubule cells: comparative study with renal and hepatic PEPCK in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1243: 437-445.
- Moret C, Dave MH, Schulz N, Jiang JX, Verrey F and Wagner CA (2007) Regulation of renal amino acid transporters during metabolic acidosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 292: F555-566.
- Morris AA (2005) Cerebral ketone body metabolism. *J Inherit Metab Dis* 28: 109-121.
- Morris AA, Lascelles CV, Olpin SE, Lake BD, Leonard JV and Quant PA (1998) Hepatic mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a synthase deficiency. *Pediatr Res* 44: 392-396.
- Morton DH, Strauss KA, Robinson DL, Puffenberger EG and Kelley RI (2002) Diagnosis and treatment of maple syrup disease: a study of 36 patients. *Pediatrics* 109: 999-1008.

- Mühlhausen C, Burckhardt BC, Hagos Y, Burckhardt G, Keyser B, Lukacs Z, Ullrich K and Braulke T (2008) Membrane translocation of glutaric acid and its derivatives. *J Inherit Metab Dis* 31: 188-193.
- Mühlhausen C, Ergün S, Strauss KA, Koeller DM, Crnic L, Woontner M, Goodman SI, Ullrich K and Braulke T (2004) Vascular dysfunction as an additional pathomechanism in glutaric aciduria type I. *J Inherit Metab Dis* 27: 829-834.
- Mühlhausen C, Ott N, Chalajour F, Tilki D, Freudenberg F, Shahhossini M, Thiem J, Ullrich K, Braulke T and Ergün S (2006) Endothelial effects of 3-hydroxyglutaric acid: implications for glutaric aciduria type I. *Pediatr Res* 59: 196-202.
- Nadal A, Marrero PF and Haro D (2002) Down-regulation of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene by insulin: the role of the forkhead transcription factor FKHL1. *Biochem J* 366: 289-297.
- Oguz KK, Ozturk A and Cila A (2005) Diffusion-weighted MR imaging and MR spectroscopy in glutaric aciduria type 1. *Neuroradiology* 47: 229-234.
- Ohtsuki S (2004) New aspects of the blood-brain barrier transporters; its physiological roles in the central nervous system. *Biol Pharm Bull* 27: 1489-1496.
- Pajor AM, Gangula R and Yao X (2001) Cloning and functional characterization of a high-affinity Na(+)/dicarboxylate cotransporter from mouse brain. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: C1215-1223.
- Papadopoulos MC and Verkman AS (2007) Aquaporin-4 and brain edema. *Pediatr Nephrol* 22: 778-784.
- Quant PA, Tubbs PK and Brand MD (1989) Treatment of rats with glucagon or mannoheptulose increases mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase activity and decreases succinyl-CoA content in liver. *Biochem J* 262: 159-164.
- Quant PA, Tubbs PK and Brand MD (1990) Glucagon activates mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase in vivo by decreasing the extent of succinylation of the enzyme. *Eur J Biochem* 187: 169-174.
- Renz-Polster H, Krauzig, S., Braun, J. (2004) *Basislehrbuch Innere Medizin*. Urban & Fischer, München.
- Robertson GL (2001) Antidiuretic hormone. Normal and disordered function. *Endocrinol Metab Clin North Am* 30: 671-694, vii.
- Rojek A, Fuchtbauer EM, Kwon TH, Frokiaer J and Nielsen S (2006) Severe urinary concentrating defect in renal collecting duct-selective AQP2 conditional-knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 6037-6042.
- Rosa RB, Dalcin KB, Schmidt AL, Gerhardt D, Ribeiro CA, Ferreira GC, Schuck PF, Wyse AT, Porciuncula LO, Wofchuk S, Salbego CG, Souza DO and Wajner M (2007) Evidence that glutaric acid reduces glutamate uptake by cerebral cortex of infant rats. *Life Sci* 81: 1668-1676.
- Sai Y (2005) Biochemical and molecular pharmacological aspects of transporters as determinants of drug disposition. *Drug Metab Pharmacokinet* 20: 91-99.
- Sauer SW, Okun JG, Schwab MA, Crnic LR, Hoffmann GF, Goodman SI, Koeller DM and Kölker S (2005) Bioenergetics in glutaryl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: a role for glutaryl-coenzyme A. *J Biol Chem* 280: 21830-21836.

- Schneider R, Sauvant C, Betz B, Otremba M, Fischer D, Holzinger H, Wanner C, Galle J and Gekle M (2007) Downregulation of organic anion transporters OAT1 and OAT3 correlates with impaired secretion of para-aminohippurate after ischemic acute renal failure in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 292: F1599-1605.
- Sekine T, Miyazaki H and Endou H (2006) Molecular physiology of renal organic anion transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F251-261.
- Shamir R, Maron-Katz A, Tanay A, Linhart C, Steinfeld I, Sharan R, Shiloh Y and Elkouf R (2005) EXPANDER--an integrative program suite for microarray data analysis. *BMC Bioinformatics* 6: 232.
- Shayakul C and Hediger MA (2004) The SLC14 gene family of urea transporters. *Pflügers Arch* 447: 603-609.
- Stellmer F (2007) Identifizierung von 3-Hydroxyglutarsäure-Transportern und Analyse pathologischer Nierenveränderungen am Mausmodell der Glutarazidurie Typ 1. Med. Dissertation. Universität Hamburg.
- 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 and Mühlhausen C (2007) 3-Hydroxyglutaric acid is transported via the sodium-dependent dicarboxylate transporter NaDC3. *J Mol Med* 85: 763-770.
- Stewart GS, King SL, Potter EA and Smith CP (2007) Acute regulation of mUT-A3 urea transporter expressed in a MDCK cell line. *Am J Physiol Renal Physiol* 292: F1157-1163.
- Strauss KA and 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.
- Strauss KA, Puffenberger EG, Robinson DL and Morton DH (2003) Type I glutaric aciduria, part 1: natural history of 77 patients. *Am J Med Genet* 121: 38-52.
- Takata K, Matsuzaki T, Tajika Y, Ablimit A and Hasegawa T (2008) Localization and trafficking of aquaporin 2 in the kidney. *Histochem Cell Biol* 130: 197-209.
- Tanaka K, Xu W, Zhou F and You G (2004) Role of glycosylation in the organic anion transporter OAT1. *J Biol Chem* 279: 14961-14966.
- Terada T and Inui K (2007) Gene expression and regulation of drug transporters in the intestine and kidney. *Biochem Pharmacol* 73: 440-449.
- Uchida S, Sohara E, Rai T, Ikawa M, Okabe M and Sasaki S (2005) Impaired urea accumulation in the inner medulla of mice lacking the urea transporter UT-A2. *Mol Cell Biol* 25: 7357-7363.
- Ullrich K, Flott-Rahmel B, Schluff P, Musshoff U, Das A, Lucke T, Steinfeld R, Christensen E, Jakobs C, Ludolph A, Neu A and Roper R (1999) Glutaric aciduria type I: pathomechanisms of neurodegeneration. *J Inher Metab Dis* 22: 392-403.
- Verkman AS, Binder DK, Bloch O, Auguste K and Papadopoulos MC (2006) Three distinct roles of aquaporin-4 in brain function revealed by knockout mice. *Biochim Biophys Acta* 1758: 1085-1093.
- Verkman AS and Mitra AK (2000) Structure and function of aquaporin water channels. *Am J Physiol Renal Physiol* 278: F13-28.

- Wada M, Shimada A and Fujita T (2006) Functional characterization of Na⁺-coupled citrate transporter NaC2/NaCT expressed in primary cultures of neurons from mouse cerebral cortex. *Brain Res* 1081: 92-100.
- Wade JB, Lee AJ, Liu J, Ecelbarger CA, Mitchell C, Bradford AD, Terris J, Kim GH and Knepper MA (2000) UT-A2: a 55-kDa urea transporter in thin descending limb whose abundance is regulated by vasopressin. *Am J Physiol Renal Physiol* 278: F52-62.
- Widdop RE, Vinh A, Henrion D and Jones ES (2008) Vascular angiotensin AT2 receptors in hypertension and ageing. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 35: 386-390.
- Yadin O (1994) Hematuria in children. *Pediatr Ann* 23: 474-478, 481-475.
- Yodoya E, Wada M, Shimada A, Katsukawa H, Okada N, Yamamoto A, Ganapathy V and Fujita T (2006) Functional and molecular identification of sodium-coupled dicarboxylate transporters in rat primary cultured cerebrocortical astrocytes and neurons. *J Neurochem* 97: 162-173.
- You G (2004) Towards an understanding of organic anion transporters: structure-function relationships. *Med Res Rev* 24: 762-774.
- Zeng XN, Sun XL, Gao L, Fan Y, Ding JH and Hu G (2007) Aquaporin-4 deficiency down-regulates glutamate uptake and GLT-1 expression in astrocytes. *Mol Cell Neurosci* 34: 34-39.
- Zimmer DB and Magnuson MA (1990) Immunohistochemical localization of phosphoenolpyruvate carboxykinase in adult and developing mouse tissues. *J Histochem Cytochem* 38: 171-178.
- Zinnanti WJ, Lazovic J, Housman C, LaNoue K, O'Callaghan JP, Simpson I, Woontner M, Goodman SI, Connor JR, Jacobs RE and Cheng KC (2007) Mechanism of age-dependent susceptibility and novel treatment strategy in glutaric acidemia type I. *J Clin Invest* 117: 3258-3270.
- Zinnanti WJ, Lazovic J, Wolpert EB, Antonetti DA, Smith MB, Connor JR, Woontner M, Goodman SI and Cheng KC (2006) A diet-induced mouse model for glutaric aciduria type I. *Brain* 129: 899-910.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin converting enzyme
ADH	Antidiuretisches Hormon (= Vasopressin)
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AQP	Aquaporin
AS	Aminosäure
Bp	Basenpaare
BSA	Rinder-Serumalbumin
C5DC	Glutaryl carnitin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary-DNA (zur mRNA komplementäre DNA)
CoA	Coenzym A
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GA	Glutarsäure
GA1	Glutarazidurie Typ 1
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

GCDH	Glutaryl-CoA-Dehydrogenase
GLAST	Glutamat-Aspartat Transporter
GLT	Glutamat Transporter
HMG	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl
HPD	Hochproteindiät
HRP	Horseradish Peroxidase
kDa	kilo Dalton
<i>Gcdh</i> ^{-/-}	<i>Gcdh</i> -defiziente Mäus
<i>Gcdh</i> ^{-/-} HPD	<i>Gcdh</i> -defiziente Mäuse, die eine Hochproteindiät bekommen
<i>Gcdh</i> ^{-/-} ND	<i>Gcdh</i> -defiziente Mäuse, die normales Futter bekommen
MnSOD	Mangan-Superoxiddismutase
mRNA	messenger RNA
NaC	Natrium-abhängiger Dicarboxylat Transporter
ND	Normaldiät
OAT	Organische Anionen Transporter
OATP	Organische Anionen transportierendes Peptid
3OHGA	3-Hydroxyglutarsäure
PAH	para-Aminohippursäure
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PGE2	Prostaglandin E2
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLC	Solute Carrier
SNAT5	Natrium-abhängiger neutraler Aminosäure-Transporter 5
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TX-100	Triton X-100
UT	Harnstoff (Urea)-Transporter
WT	Wildtyp
WT HPD	Wildtyp-Mäuse, die eine Hochproteindiät bekommen
WT ND	Wildtyp-Mäuse, die normales Futter bekommen
ZNS	zentrales Nervensystem
-/-	Gen-defizient

8.2 Microarray aus Hirnstammgewebe

Tabelle 10: Gruppen von dysregulierten Genen (Regulation ≥ 2 -fach) im Microarray des Hirnstammes von 42 Tage alten *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Hochproteindiät im Vergleich zu *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Normaldiät. Auswertung erfolgte mit GeneOntology (GO)-Software EXPANDER aus dem Weizmann Institut (Shamir et al. 2005).

„Molecular Function“

GeneOntology Term	Betroffene Gene / Gensymbol
enzyme inhibitor activity - GO:0004857	Agt, Phactr3, Pttg1, Angptl4, Cdkn1a, Txnip, Ppp1r2, Spink8
nucleotide binding - GO:0000166	Abcg1, Pdk4, Cry2, Abca1, Gna13, Rasd2, Sgk, Abcc4, Map3k6, Trio, Rhou, Pdxk, Sgk3, Pex6, Tlk2, Camk1g, Sult1a1, Arl4a
transferase activity - GO:0016740	Pdk4, Cdkn1a, Sgk, Agxt2l1, Map3k6, Trio, Pdxk, Sgk3, Tlk2, Sult1a1, Chst2, Camk1g, Ugt1a2, Stk17b, Pak7, Epha7, Gatm, Ccnd1, Tst, Fdps, Ddr1, Fut9, Etnk1, Col4a3bp, Tyrobp, Elovl6, Acvr1c, Ugt8a, Fastkd2, Tek, Bmp2k
signal transducer activity - GO:0004871	Gng11, Epha7, Pvr13, Itga6, Plxnb3, Cx3cr1, Ddr1, Grm3, Gabra2, Thbd, P2ry12, Edg3, Tek, Gpr17, Nrp1, Vldlr, Rgs2, Gpr12, Rgs5, Gpr34, Cd93, Gpr37, Adcyap1, Msr2, Npy5r, Acvr1c, Il10rb
calcium ion binding - GO:0005509	Vldlr, Pcdh20, Sulf1, Itga6, Cd93, Cbara1, S100a16, Calml4, Aif1, Thbd, Chordc1, Cdh11, Rasgrp3
enzyme regulator activity - GO:0030234	Cav1, Rgs2, Serpinb1a, Rgs5, Ccnd1, Sos1, Ppp1r14a, Lxn, Rasgrp3, Bmp2k

„Cellular Localization“

GeneOntology Term	Betroffene Gene / Gensymbol
plasma membrane - GO:0005886	Gng11, Epha7, Pvr13, Mbp, Gja12, Kcna4, Itga6, Cx3cr1, Ddr1, Grm3, Gabra2, Aif1, Thbd, P2ry12, Aqp4, Cdh11, Edg3, Tek, Gpr17, Nrp1, Pcdh20, Gpr12, Phkb, Gpr34, Cd93, Slc40a1, Rp2h, Gjb1, Nexn, Gpr37, Cryab, Tmem10, Cav1, Abca8a, Npy5r, Slc38a5, Gbp2

„Biological Process“

GeneOntology Term	Betroffene Gene / Gensymbol
response to stimulus - GO:0050896	Nfkbia, Trp53inp1, Cry2, Cdkn1a, Gna13, Rasd2, Sgk, Abcc4, Sh2b2, Agt, Errfi1, Mt1, Pttg1, Angptl4, Adipor1, Dlg4, Hif3a, Tlk2, Tsc22d3, Pmaip1, Chst2, Txnip
response to stress - GO:0006950	Trp53inp1, Cry2, Cdkn1a, Gna13, Sgk, Agt, Errfi1, Pttg1, Angptl4, Hif3a, Tlk2, Pmaip1, Chst2, Tsc22d3, Txnip
negative regulation of biological process - GO:0048519	Nfkbia, Htra1, Robo4, Cdkn1a, Sh2b2, Pnpla2, Ifi30, Agt, Sgk3, Angptl4, Pmaip1, Tsc22d3, Txnip
intracellular signaling cascade - GO:0007242	Net1, Errfi1, Mt1, Elmo1, Adipor1, Rasd2, Gna13, Sh2b2, Rhou, Arl4a, Trio
regulation of apoptosis - GO:0042981	Agt, Trp53inp1, Sgk3, Angptl4, Cdkn1a, Pmaip1, Tsc22d3
regulation of developmental process - GO:0050793	Agt, Nfkbia, Sgk3, Angptl4, Cdkn1a, Tsc22d3, Gna13, Rhou
localization - GO:0051179	Pltp, Epha7, Slco1c1, Fabp7, Itga6, Kcna4, Nup35, Cx3cr1, Gabra2, Rffl, Trf, Col4a3bp, Aqp4, Stard4, Ube3a, Nrp1, Vldlr, Tst, Slc40a1, Pllp, Rlbp1, Cav1, Sfxn4, Abca8a, Synj2bp, Acvr1c
lipid localization - GO:0010876	Pltp, Cav1, Vldlr, Col4a3bp, Stard4, Acvr1c
sterol biosynthetic process - GO:0016126	Sc5d, Fdps, Idi1, Cyp51
anatomical structure development - GO:0048856	Epha7, Nrp1, Mbp, Sema3e, Ccnd1, Pvrl3, Col3a1, Fabp7, Itga6, Cx3cr1, Ddr1, Cav1, Cryab, Gmpr2, Sostdc1, Col4a3bp, Ube3a, Acvr1c, Ugt8a, Spp1
response to external stimulus - GO:0009605	Thbd, P2ry12, Ly86, Fabp7, Itga6, Cx3cr1, Edg3, Lxn, Cmtm5, Tek
cell surface receptor linked signal transduction - GO:0007166	Gpr17, Gng11, Epha7, Nrp1, Rgs2, Gpr12, Rgs5, Ccnd1, Gpr34, Itga6, Cx3cr1, Ddr1, Grm3, Gpr37, Gabra2, Adcyap1, Sostdc1, P2ry12, Edg3, Npy5r, Tek
regulation of anatomical structure morphogenesis - GO:0022603	Nrp1, Cav1, Cdc42ep2, Ccnd1, Cx3cr1, Tek

Tabelle 11: Dysregulierte Gene (Regulation ≥ 2 -fach) aus der Hauptgruppe „Cellular Localization“ und der Untergruppe „plasma membrane“ im Microarray des Hirnstammes von 42 Tage alten *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Hochproteindiät im Vergleich zu *Gcdh*^{-/-} Mäusen unter Normaldiät.

Gensymbol	Genname	Relative Expression
Slc38a5	solute carrier family 38, member 5	-14,7
Gpr34	G protein-coupled receptor 34	-8,6
Cx3cr1	chemokine (C-X3-C) receptor 1	-7,5
P2ry12	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled 12	-5,6
Gbp2	guanylate nucleotide binding protein 2	-3,7
Aif1	allograft inflammatory factor 1	-3,5
Gjb1	gap junction membrane channel protein beta 1	-3,3
Slc40a1	solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member 1	-3,2
Tmem10	transmembrane protein 10	-3,2
Gja12	gap junction membrane channel protein alpha 12	-2,9
Abca8a	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 8a	-2,8
Gng11	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 11	-2,7
Tek	endothelial-specific receptor tyrosine kinase	-2,6
Aqp4	aquaporin 4	-2,6
Gpr12	G-protein coupled receptor 12	-2,4
Thbd	thrombomodulin	-2,4
Gpr17	G protein-coupled receptor 17	-2,3
Gabra2	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, subunit alpha 2	-2,3
Cdh11	cadherin 11	-2,3
Rp2h	retinitis pigmentosa 2 homolog (human)	-2,3
Npy5r	neuropeptide Y receptor Y5	-2,3
Pcdh20	protocadherin 20	-2,3
Cd93	CD93 antigen	-2,3
Kcna4	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 4	-2,2
Nrp1	neuropilin 1	-2,2
Ddr1	discoidin domain receptor family, member 1	-2,1
Cryab	crystallin, alpha B	-2,1
Pvrl3	poliovirus receptor-related 3	-2,1
Grm3	glutamate receptor, metabotropic 3	-2,1
Edg3	endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 3	-2,1

Gensymbol	Genname	Relative Expression
Nexn	nexilin	-2,1
Phkb	phosphorylase kinase beta	-2,0
Gpr37	G protein-coupled receptor 37	-2,0
Epha7	Eph receptor A7	-2,0
Mbp	myelin basic protein	-2,0
Itga6	integrin alpha 6	-2,0
Cav1	caveolin, caveolae protein 1	-2,0

Mit Rot sind die Gene gekennzeichnet, auf die in dieser Arbeit weiter eingegangen wird.

8.3 Primer & Sonden

8.3.1 Gene Expression Assays

Firma: Applied Biosystems, System: TaqMan®

Proteinabkürzung	Assay ID
ACE	Mm00802048_m1
AQP2	Mm00437575_m1
AQP4	Mm00802131_m1
GAPDH	Mm99999915_g1
HMGCS2	Mm00550050_m1
NaC3	Mm00475280_m1
OAT1	Mm00456258_m1
OAT2	Mm00460672_m1
Oatp1a6	Mm00452379_m1
PEPCK	Mm00440636_m1
UT-A	Mm00453117_m1

8.3.2 Primer

Protein-abkürzung	Sequenz	Annealing-Temperatur
GCDH	R21 AGC TCT CGG GTC AGA AGC CCA TAG G	62 °C
	F13 CTT CCG TAA CTA CTG GCA GGA GCG G	

8.4 Publikationen und Kongressbeiträge

Publikationen

Keyser B, Glatzel M, Stellmer F, **Kortmann B**, Lukacs Z, Kölker S, Sauer SW, Muschol N, Herdering W, Thiem J, Goodman SI, Koeller DM, Ullrich K, Braulke T, Mühlhausen C (2008): Transport and distribution of 3-hydroxyglutaric acid before and during induced encephalopathic crises in a mouse model of glutaric aciduria type 1. *Biochim Biophys Acta* 1782:385-390

Kortmann B, Sperling K, Härter M, Schwarz-Eywill M (2008): Der besondere Fall: Heißhunger auf Chips und immer gebräunt. *Hamburger Ärzteblatt* 6/2008:22-23

Kongressbeiträge

Keyser B, Stellmer F, **Kortmann B**, Ullrich K, Braulke T, Mühlhausen C (2007): 3-Hydroxyglutaric acid impairs the supply of succinate from astrocytes to neurons. *J Inherited Dis* 30 Suppl. 1:37 (Poster). *Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism, Hamburg, 4. – 7.9.2007.*

Mühlhausen C, Hagos Y, Keyser B, **Kortmann B**, Stellmer S, Burckhardt BC, Burckhardt G, Ullrich K, and Braulke T (2008): Identification of the transport mechanisms responsible for the renal secretion of 3-hydroxyglutaric acid (abstract). *Eur J Pediatr* 167:367 (Vortrag). *44. Arbeitstagung für Pädiatrische Forschung, Göttingen, 21. – 22.2.2008.*

Thies B, Poorthuis BJ, Hollak CEM, Braulke T, Pohl S. (2011): Langjährig fehldiagnostizierte Bewegungseinschränkung - Diagnosestrategien für Mukopolidose Typ III. *Monatsschr Kinderheilkd.* 159: p293 (Poster). *25. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Stoffwechselstörungen, Fulda, 9. – 11.03.2011*

8.5 Lebenslauf

Name: Bastian Jan Eugen Thies, geb. Kortmann

Wohnhaft: Timmermannstr. 17

22299 Hamburg

Geburtstag: 18.02.1980 in Aachen

Familienstand verheiratet

Schulbildung:

1986 - 1990 Grundschule in Oldenburg.

1990 - 1999 Helene-Lange-Schule in Oldenburg,
Abitur im Juni 1999.

Hochschulausbildung:

2001 - 2003 Studium an der Universität Hamburg für das Lehramt an der Grund- und Mittelstufe mit den Fächern Mathematik und Sport.

2003 - 2005 Grundstudium der Medizin an der Ludwig-Maximillian-Universität in München.

2005 - 2009 Hauptstudium der Medizin an der Universität Hamburg.

12/2010 Approbation als Arzt

Beruf/Forschung:

Ab 01/2010 Arzt in der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Ab 10/2010 Gerok-Stelle des SFB 877 - Proteolysis as a Regulatory Event in Pathophysiology

8.6 Eidesstaatliche 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.

.....

Danksagung

Meinen Betreuern Chris Mühlhausen und Thomas Braulke für Ideen und Unterstützung

Kurt Ullrich für die klinische Betreuung

Britta für Hilfe, Einarbeitung und ein immer offenes Ohr

Sabrina für Hilfe bei einigen Realtime-PCR

Den Leuten im Labor für das nette Arbeiten

Hans und Benjamin für statistische Unterstützung

Meiner wunderbaren Frau Lexi und unserer süßen Tochter Marla für Kraft und Liebe