

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Aus dem Arbeitsbereich Molekularbiologie

Leiter: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Braulke

Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin

Direktorin: Prof. Dr. med. Ania C. Muntau

Untersuchungen zur Expression mitochondrialer Transporter im Mausmodell der Glutarazidurie Typ 1 in der induzierten metabolischen Krise

Dissertation

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

vorgelegt von:

Brit Hofmann
aus Aschaffenburg

Hamburg 2014

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 01.06.2015

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:	PD Dr. C. Mühlhausen
---	----------------------

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:	Prof. Dr. K. Kutsche
---	----------------------

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in:	Prof. Dr. R. Santer
---	---------------------

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Glutarazidurie Typ 1	1
1.2	Pathomechanismen der Glutarazidurie Typ 1	5
1.3	Mausmodell der Glutarazidurie Typ 1	6
1.4	Die Rolle von bislang identifizierten Transportproteinen bei GA1	7
1.5	Die mitochondrialen Transporter: die SLC25-Familie	9
1.5.1	Der mitochondriale Dicarboxylat-Transporter (DIC, <i>SLC25A10</i>)	13
1.5.2	Der mitochondriale Oxoglutarat-Transporter (OGC, <i>SLC25A11</i>)	14
1.5.3	Der mitochondriale Ornithin-Transporter 1 (ORC1, <i>SLC25A15</i>)	16
1.5.4	Der mitochondriale Carnitin-/Acylcarnitin-Transporter (CAC, <i>SLC25A20</i>)	17
1.5.5	Der mitochondriale Oxodicarboxylat-Transporter (ODC, <i>SLC25A21</i>)	19
1.6	Zielsetzung	21
2	MATERIAL UND METHODEN	22
2.1	Material	22
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien	22
2.1.2	Kits und Assays	23
2.1.3	TaqMan®-Primer	23
2.1.4	Humane Primer	24
2.1.5	DNA-Standards	24
2.1.6	Enzyme und Nukleotide	24
2.1.7	Proteine und Proteinstandards	24
2.1.8	Zelllinie	25
2.1.9	Medien und Medienzusätze für die Zellkultur	25
2.1.10	Antikörper	25
2.1.11	Verbrauchsmaterialien	26
2.1.12	Geräte	27
2.2	Tierexperimentelle Arbeiten	28
2.2.1	Mauslinien und Tierversuchsanträge	28
2.2.2	Tierhaltung	29
2.2.3	Hochproteindiät	29
2.2.4	Organentnahme	29
2.3	Molekularbiologische Methoden	29
2.3.1	Isolierung genomischer DNA aus Schwanzspitzen für die Genotypisierung	29
2.3.2	Photometrische DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung	30
2.3.3	Auftrennung von DNA im Agarosegel	30
2.3.4	Polymerase-Kettenreaktion	30
2.3.5	RNA-Isolierung aus Gewebe und Zellen	31
2.3.6	Synthese von cDNA	32
2.3.7	Quantitative <i>Real-time</i> -PCR	32

2.4	Biochemische Methoden	33
2.4.1	Isolierung von Mitochondrien aus Gewebe	33
2.4.2	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	35
2.4.3	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	35
2.4.4	Western-Blot-Analyse	36
2.5	Zellbiologische Methoden	38
2.5.1	Kultivierung von Zelllinien	38
2.5.2	Trypsinieren von Zellen	38
2.5.3	Lipofektion von HeLa-Zellen mit GCDH-spezifischer siRNA	38
2.5.4	Immunfluoreszenz-Mikroskopie	39
2.6	Statistik	40
2.6.1	Beispielhafte statistische Auswertung einer <i>Real-time</i> -PCR anhand der Genexpression von <i>Slc25a10</i> im Lebergewebe von Mäusen	40
2.6.2	Statistische Auswertung der mittels <i>Real-time</i> -PCR ermittelten Expression verschiedener Transporter in HeLa-Zellen nach verminderter GCDH-spezifischer Knock down Expression	45
3	ERGEBNISSE	47
3.1	Untersuchungen zur Expression und Funktion mitochondrialer Transporter bei <i>Gcdh</i> -Defizienz	47
3.1.1	Expression des Dicarboxylat-Transporters (<i>Dic</i> , <i>Slc25a10</i>)	48
3.1.2	Expression des Oxoglutarat-Transporters (<i>Ogc</i> , <i>Slc25a11</i>)	51
3.1.3	Expression des Ornithin-Transporters 1 (<i>Orc1</i> , <i>Slc25a15</i>)	55
3.1.4	Expression des Carnitin/Acylcarnitin-Transporters (<i>Cac</i> , <i>Slc25a20</i>)	58
3.1.5	Expression des Oxodicarboxylat-Transporters (<i>Odc</i> , <i>Slc25a21</i>)	61
3.2	Untersuchungen an HeLa-Zellen zu den Auswirkungen einer verminderten GCDH-Expression	64
3.2.1	Herabregulation der GCDH-Expression durch siRNA-Transfektion in HeLa-Zellen ...	64
3.2.2	Darstellung der Lokalisation und Expression der GCDH in HeLa-Zellen vor und nach siRNA-Expression	66
3.2.3	Untersuchung verschiedener Transporter in HeLa-Zellen nach <i>GCDH</i> -siRNA-Herabregulation	67
4	DISKUSSION	69
4.1	Expression mitochondrialer Transporter in Wildtyp- und <i>Gcdh</i> ^{-/-} -Mäusen	69
4.1.1	Expression des Dicarboxylat-Transporters (<i>Dic</i> , <i>Slc25a10</i>)	70
4.1.2	Expression des Oxoglutarat-Transportes (<i>Ogc</i> , <i>Slc25a11</i>)	71
4.1.3	Expression des Ornithin-Transporters 1 (<i>Orc1</i> , <i>Slc25a15</i>)	72
4.1.4	Expression des Carnitin/Acylcarnitin-Transporters (<i>Cac</i> , <i>Slc25a20</i>)	73
4.1.5	Expression des Oxodicarboxylat-Transporters (<i>Odc</i> , <i>Slc25a21</i>)	74
4.1.6	Zusammenfassung der Befunde der Expressionsveränderungen und Ausblick	74
4.2	Das HeLa-Zellsystem als Alternative zum <i>Gcdh</i> ^{-/-} -Mausmodell	77
5	ZUSAMMENFASSUNG	80

6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	82
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	85
8	DANKSAGUNG.....	95
9	LEBENS LAUF.....	96
10	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	97

1 Einleitung

1.1 Glutarazidurie Typ 1

Die Glutarazidurie Typ 1 (GA1) – erstmals 1975 von S. I. Goodman beschrieben – ist eine hereditäre autosomal-rezessive neurometabolische Erkrankung, die durch einen Defekt des Enzyms Glutaryl-CoA-Dehydrogenase (GCDH) verursacht wird (Goodman et al., 1975; Goodman und Frerman, 2001). Dieses Enzym ist am Abbau der Aminosäuren Lysin, Hydroxylysin und Tryptophan beteiligt (Lenich und Goodman, 1986). Durch den Defekt der GCDH kommt es zu einer Akkumulation der pathologischen Metaboliten Glutarsäure (GA) und 3-Hydroxyglutarsäure (3OHGA) in Geweben und Körperflüssigkeiten der GA1-Patienten. Bei betroffenen Kindern besteht innerhalb eines vulnerablen Zeitfensters von Geburt bis etwa zum vierten Lebensjahr das Risiko für die Entwicklung encephalopathischer Krisen, meist getriggert durch katabole Stoffwechselsituationen wie Fieber, Infekte, Diarrhoen oder Erbrechen. Hierbei kommt es zu einem irreversiblen Untergang von Neuronen im Corpus striatum mit einer konsekutiven dyston-dyskinetischen Bewegungsstörung (Goodman und Frerman, 2001).

Die Inzidenz der GA1 wurde auf 1:100.000 Neugeborene geschätzt (Lindner et al., 2004). Darüber hinaus ist bekannt, dass die GA1 in genetisch homogenen Populationen, wie beispielsweise den *Old Order Amish* in Pennsylvania (Inzidenz von 1:400) oder den *Island Lake* Indianern in Kanada (Inzidenz von 1:225) deutlich häufiger auftritt (Greenberg et al., 1995; Strauss et al., 2003b).

Die autosomal-rezessiv vererbte Glutarazidurie Typ 1 ist bedingt durch Mutationen im *GCDH*-Gen, das auf dem Chromosom 19p13.2 lokalisiert ist (Greenberg et al., 1994; Goodman et al., 1998). Bisher wurden etwa 150 verschiedene pathogene Mutationen im *GCDH*-Gen beschrieben. Bei den meisten handelt es sich um *missense*-Mutationen, es sind aber auch intronische Mutationen beschrieben worden, die das Spleißen der mRNA beeinflussen (Goodman et al., 1998; Greenberg et al., 1995; Busquets et al., 2000; Zschocke et al., 2000). Der überwiegende Anteil der bisher beschriebenen Mutationen führt zu einer GCDH-Enzymrestaktivität von 0–3 %, einzelne Mutanten weisen aber eine Restaktivität von bis zu 30 % auf (Goodman et al., 1998; Zschocke et al., 2000; Mühlhausen et al., 2003). Es wurde ein Zusammenhang zwischen Genotyp und Enzymrestaktivität beziehungsweise Enzymrestaktivität und Höhe der Ausscheidung der pathologischen Metaboliten GA und 3OHGA beschrieben. Eine Korrelation zwischen Genotyp beziehungsweise biochemischem Phänotyp einerseits und dem klinischen Verlauf andererseits konnte aber bisher nicht nachgewiesen werden (Christensen et al., 2004).

Die GCDH ist ein mitochondriales Matrixprotein, das in seiner aktiven Form als Homotetramer vorliegt. Im Abbauweg der Aminosäuren Lysin, Hydroxylysin und Tryptophan katalysiert die GCDH die oxidative Decarboxylierung und Dehydrogenierung von Glutaryl-CoA über

Glutaconyl-CoA zu Crotonyl-CoA (Abbildung 1). Crotonyl-CoA wird im Anschluss daran von weiteren Enzymen zu Acetyl-CoA abgebaut, das in den Citratzyklus einfließt (Goodman und Frerman, 2001; Westover et al., 2001). Bei GCDH-Defizienz kommt es zu einer Akkumulation von Glutaryl-CoA, das entweder als Carnitin-Ester im Blut angereichert und in den Urin ausgeschieden wird oder aus dem über alternative Abbauewege die pathologischen Metaboliten 3OHGA und in geringen Mengen Glutaconsäure entstehen. Diese Metaboliten akkumulieren in Körperflüssigkeiten und Geweben betroffener Patienten und werden in den Urin ausgeschieden (Goodman und Frerman, 2001).

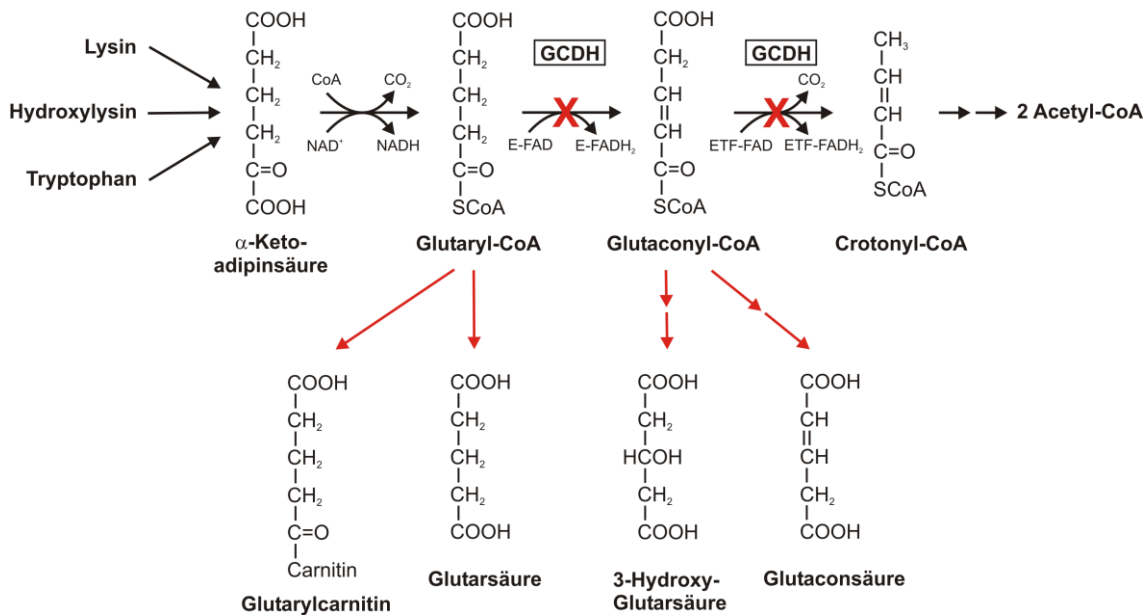


Abbildung 1: Schematisierte Darstellung des gemeinsamen Abbaupfades der Aminosäuren Lysin, Hydroxylysin und Tryptophan (Mühlhausen, 2008). GCDH katalysiert in zwei Schritten die oxidative Decarboxylierung von Glutaryl-CoA über Glutaconyl-CoA zu Crotonyl-CoA. Aus dem akkumulierenden Glutaryl-CoA entsteht Glutarylcarнитin beziehungsweise Glutarsäure. Die Entstehungsmechanismen für 3-Hydroxyglutarsäure und Glutaconsäure sind unbekannt, hinsichtlich 3-Hydroxyglutarsäure wird angenommen, dass sie aus Glutaconyl-CoA durch nicht-enzymatische Addition von Wasser entsteht.

Den akkumulierenden Metaboliten werden – wie weiter unten aufgeführt – cytotoxische Wirkungen zugeschrieben. Bei der Geburt sind die meisten Kinder mit GCDH-Defizienz unauffällig. Einige Patienten zeigen jedoch bereits eine Makrocephalie oder seltener eine Stammhypotonie (Hoffmann et al., 1996; Goodman, 2001; Kölker et al., 2006). In der cranialen Magnetresonanztomographie (cMRT) fällt bei einem Teil der von GA1 betroffenen Säuglinge, obwohl die Kinder klinisch-neurologisch unauffällig sind, eine frontotemporale Atrophie auf, außerdem können die äußeren Liquorräume diffus erweitert sein (Forstner et al., 1999; Harting et al., 2009). Subdurale Hämatoome und Hygrome können bereits pränatal entstehen oder sich im Verlauf der Erkrankung entwickeln (Strauss und Morton, 2003a; Mühlhausen et al., 2004b; Harting et al., 2009). Im Rahmen kataboler Stoffwechsellagen – bedingt zum Beispiel durch fieberhafte Infektionen oder nach Routineimpfungen – kann es bei Kindern mit GA1 zur Ausbildung einer sogenannten encephalopathischen Krise kommen (Abbildung 2). Die

Entwicklung dieser Krise ist an ein altersabhängiges Zeitfenster gebunden. Die Krisen treten von der Geburt bis etwa zum vierten Lebensjahr auf. Der Manifestationsgipfel dieser Krisen liegt zu 95 % innerhalb der ersten vierundzwanzig Lebensmonate. In der Literatur ist das Auftreten encephalopathischer Krisen bei älteren Kindern nicht beschrieben, so dass GA1-Patienten nach den ersten Lebensjahren durch einen bisher unbekannten Faktor vor der Ausbildung dieser Krisen geschützt erscheinen (Goodman, 2001; Strauss und Morton, 2003a; Kölker et al., 2006). In Folge einer encephalopathischen Krise kommt es zu einer irreversiblen striatalen Destruktion und konsekutiv zu einer dyston-dyskinetischen Bewegungsstörung variabler Ausprägung.



Abbildung 2: Encephalopathische Krise bei einer Patientin mit Glutarazidurie Typ 1. Nach zunächst unauffälliger psychomotorischer Entwicklung mit normalem neurologischen Befund im Alter von neun Monaten (A) weist die Patientin nach stattgehabter encephalopathischer Krise im Alter von zehn Monaten eine schwere dyston-dyskinetische Bewegungsstörung auf, die sich im Bild (B) an der dystonen Haltung der rechten Körperseite zeigt. Klinisch imponiert ein völliger Verlust der Willkürmotorik. Abdruck mit Einverständnis der betroffenen Eltern.

Während beziehungsweise kurz nach einer akuten encephalopathischen Krise zeigt sich in der cranialen Magnetresonanztomographie zunächst eine ödematöse Schwellung der Basalganglien, genauer des Corpus striatum (Nucleus caudatus und Putamen, Abbildung 3), im weiteren Verlauf zeigt sich dann ein narbiger Umbau und meist eine Atrophie des Striatums (Goodman, 2001; Harting et al., 2009; Heringer et al., 2010).

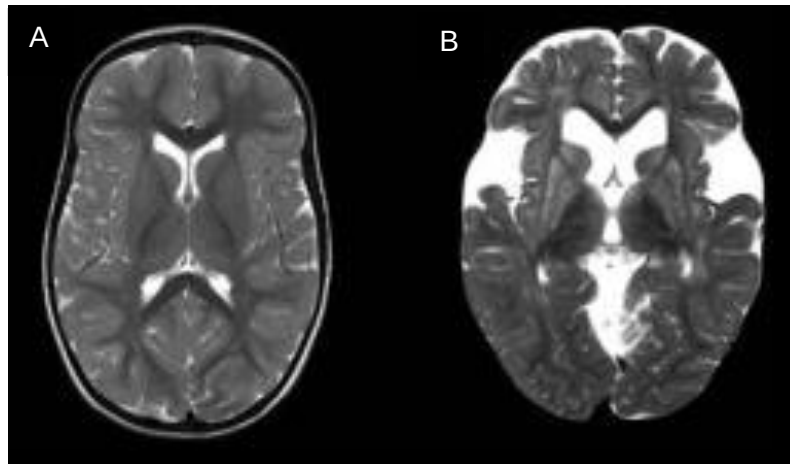


Abbildung 3: cMRT-Aufnahmen von zwei an Glutarazidurie Typ 1 erkrankten Kindern (Heringer et al., 2010). T2-gewichtete cMRT-Aufnahmen: **A:** Asymptomatischer, 25 Monate alter Patient mit unauffälligen Basalganglien und normaler Hirnreifung. Klinisch zeigt der Patient eine altersentsprechende Entwicklung. **B:** GA1-Patient mit schwerwiegender dystonodyskinetischer Bewegungsstörung in Folge einer Gastroenteritis und beginnender Notfall-Behandlung erst über 24 Stunden nach Einsetzen der Infektion. Es zeigen sich T2-Hyperintensitäten im Bereich des Striatums und Pallidums als Hinweis auf eine stattgehabte Basalgangliennekrose. Des Weiteren zeigt sich eine globale Hirnatrophie mit konsekutiver Erweiterung der Seitenventrikel und einer frontotemporalen Hypoplasie, die vermutlich bereits vor der encephalopathischen Krise bestand.

Durch das erweiterte Neugeborenencreening, in Deutschland flächendeckend 2005 eingeführt, ist es möglich, das Vorliegen einer GA1 vor dem Ausbruch der Symptome bereits kurz nach Geburt zu erkennen. Dabei wird beim Screening die Konzentration von Glutarylcaritin im Trockenblut mittels Tandem-Massenspektrometrie bestimmt (Lindner et al., 2004). Zur Diagnostik und Therapie der Glutarazidurie Typ 1 existiert seit Kurzem eine S3-Leitlinie (Kölker et al., 2011; AWMF-Leitlinie Nr. 027/018). Die empfohlene Behandlung der GA1 nach präsymptomatischer Diagnosestellung im Neugeborenenalter besteht aus drei Punkten: 1. Durch Applikation einer Lysin-bilanzierten eiweißarmen Spezialdiät soll die Konzentration der Substrate der GCDH reduziert und die Bildung pathologischer Metaboliten vermindert werden. 2. Durch eine Carnitin-Supplementierung soll ein Carnitinmangel behoben und die Ausscheidung der cytotoxischen Metaboliten durch Kopplung von Glutarsäure an Carnitin und anschließender Exkretion von Glutarylcaritin in den Urin gefördert werden. 3. Essentiell ist vor allem aber ein aggressives Notfallmanagement in Situationen, in denen GA1-Patienten von einer Katabolie bedroht sind. Erkrankten die Kinder an fieberhaften Infekten, sollte sofort eine intensive Notfallversorgung (hochkalorische Versorgung, intravenöse Carnitingabe, Karenz von natürlichem Protein) eingeleitet werden (Mühlhausen et al., 2004a; Kölker et al., 2011). Bei unbehandelten GA1-Patienten kommt es in 90 % der Fälle zur Entwicklung einer encephalopathischen Krise. Bei präsymptomatischer Diagnosestellung, idealerweise kurz nach Geburt mittels Neugeborenencreening, und frühem Beginn einer leitliniengerechten Therapie gelingt es bei 65–95 % der GA1-Patienten, den Ausbruch einer encephalopathischen Krise zu verhindern und damit den Kindern eine normale Entwicklung zu ermöglichen (Strauss et al., 2003b; Kölker et al., 2006; Kölker et al., 2007; Heringer et al., 2010). Im Falle einer erlittenen

encephalopatischen Krise und einer daraus resultierenden dystonen Bewegungsstörung bestimmen, abhängig von der Schwere der Behinderung, sekundäre Komplikationen die Prognose (Kölker et al., 2006; Kölker et al., 2007; Heringer et al., 2010).

1.2 Pathomechanismen der Glutarazidurie Typ 1

Bis heute ist nicht vollständig geklärt, welche Pathomechanismen für die Ausbildung der bei der GA1 beschriebenen Symptome verantwortlich sind. 3-Hydroxyglutarsäure wird als der für die GA1 spezifische Metabolit beschrieben, da erhöhte Konzentrationen von Glutarsäure auch bei anderen Erkrankungen wie Glutarazidurie Typ 2 oder Typ 3 beschrieben wurden. Daher wurde vermutet, dass die cytotoxischen Effekte bei der GA1 auch vornehmlich durch 3OHGA verursacht seien (Ullrich et al., 1999; Kölker et al., 2004b). Mit Hilfe verschiedener *In-vitro*-Modelle wurde eine Reihe direkter cytotoxischer Wirkungen der bei GA1 akkumulierenden Metaboliten aufgezeigt. So zeigten sich Hinweise auf eine durch GA und 3OHGA über Glutamat-Rezeptoren vermittelte Excitotoxizität: In *In-vitro*-Experimenten an kultivierten primären Neuronen aus Ratten und Hühnern zeigte sich nach Zugabe von 3OHGA ein Absterben von Neuronen. Durch Applikation von MK-801, einem NMDA-Rezeptor-Antagonisten, konnte die Absterberate der Neuronen gesenkt werden (Ullrich et al., 1999; Das et al., 2003; Kölker et al., 2004b). Andere Arbeitsgruppen konnten diese Befunde in ähnlichen *In-vitro*-Modellen nicht reproduzieren (Freudenberg et al., 2004; Lund et al., 2004). Des Weiteren zeigte sich *in vitro* und *in vivo* eine reduzierte Synthese des inhibitorischen Neurotransmitters γ -Aminobuttersäure (GABA) sowie eine Beeinträchtigung des mitochondrialen Energiestoffwechsels durch Inhibition des α -Oxoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes und Depletion von Kreatinphosphat (Stokke et al., 1976; Ullrich et al., 1999; Das et al., 2003; Kölker et al., 2004a; Sauer et al., 2005; Zinnanti et al., 2007). Insgesamt bleibt die physiologische Signifikanz dieser Befunde unklar, da sie überwiegend an Zellmodellen mit intakter endogener GCDH-Aktivität durchgeführt worden sind.

Neben den oben beschriebenen Befunden wurde diskutiert, dass die cerebralen Veränderungen bei der GA1 die Folge eines primären Endothelschadens sein könnten, der zu einer Beeinträchtigung der Blut-Hirn-Schranke und dadurch zum Einstrom großer Mengen der Metaboliten GA und 3OHGA aus der Zirkulation in das Hirngewebe führt (Strauss und Morton, 2003a; Mühlhausen et al., 2004b). Für die Beteiligung endothelialer Effekte spricht unter anderem die klinische Beobachtung chronisch subduraler Hämatome und die Beschreibung retinaler Blutungen bei GA1-Patienten (Hartley et al., 2001; Strauss und Morton, 2003a; Twomey et al., 2003). In experimentellen Untersuchungen zu endothelialen Wirkungen von GA und 3OHGA wurde gezeigt, dass 3OHGA die Integrität von Endothelzellen *in vivo* gebildeter Kapillaren beeinträchtigt, es zu einer Erweiterung der Gefäße und zu Einblutungen kommt (Mühlhausen et al., 2006). Diese Befunde zur GA- beziehungsweise 3OHGA-vermittelten Endothelschädigung könnten allerdings lediglich eine Erklärung für die extracerebralen Gefäßveränderungen bei der GA1 sein, also für die subduralen und retinalen Blutungen, nicht

aber für die intracerebrale Cytotoxizität (Mühlhausen, 2008). Untersuchungen an unterschiedlichen Mausmodellen zeigten, dass die Blut-Hirn-Schranke *Gcdh*-defizienter Mäuse intakt bleibt und nur ein minimaler Transport von GA und 3OHGA aus beziehungsweise in das Hirnkompartiment stattfindet (Sauer et al., 2006; Zinnanti et al., 2006; Keyser et al., 2008). Da während der induzierten metabolischen Krise die Aufnahme radioaktiv markierter GA und 3OHGA ins Hirngewebe im Experiment messbar abnimmt (Keyser et al., 2008), ist anzunehmen, dass der geringe Transport von GA und 3OHGA spezifisch ist. Zudem erfolgt dieser geringe Transport entgegen eines Konzentrationsgradienten von Plasma zu Hirngewebe im Verhältnis 1:10 bis 1:10⁴ (Mühlhausen, 2008), so dass davon auszugehen ist, dass an der Blut-Hirn-Schranke spezifische aktive Transporter vorliegen. Zusammenfassend wurde aufgrund dieser Befunde postuliert, dass der Transport der pathologischen Metaboliten GA und 3OHGA aus dem Hirnkompartiment hinaus nur sehr gering ist und dieser Transport unter basalen Bedingungen einem labilen Gleichgewicht unterliegt. Während einer metabolischen Krise scheint dieses Gleichgewicht dann zu dekompensieren, die niedrige Transportkapazität der Blut-Hirn-Schranke reicht nicht mehr aus und es kommt zu einer kritischen Akkumulation von GA und 3OHGA im Hirnkompartiment mit nachfolgenden cytotoxischen Wirkungen (Mühlhausen, 2008).

1.3 Mausmodell der Glutarazidurie Typ 1

Im Jahr 2002 wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. S. I. Goodman (Denver, USA) durch Deletion der ersten sieben Exons des *Gcdh*-Gens durch homologe Rekombination ein *Gcdh*-defizientes *Knock-out*-Mausmodell generiert (Koeller et al., 2002). Der biochemische Phänotyp dieses Mausmodells entspricht dem von GA1-Patienten mit erhöhten GA- und 3OHGA-Spiegeln in Gehirn, Blut und Urin. Bei *Gcdh*-defizienten Mäusen liegt die Konzentration von GA und 3OHGA im Plasma bei 255 µM bzw. 7 µM (Keyser et al., 2008). Bei GA1-Patienten finden sich ebenfalls erhöhte Werte im Plasma von 45 µM (GA) bzw. 26 µM (3OHGA), im Vergleich finden sich in einer gesunden menschlichen Kontrollgruppe Plasmawerte um 2–9 µM (GA) bzw. um 0,3 µM (3OHGA) (Baric et al., 1999). Die Tiere zeigen äußerlich keine Auffälligkeiten. Es findet sich jedoch eine signifikante Hypertrophie der Nieren sowie im Gehirn eine Spongiose des Cortex (Koeller et al., 2002). Der klinische Phänotyp der Mäuse unterscheidet sich von dem der GA1-Patienten, da die Mäuse unter basalen Bedingungen keine akute encephalopathische Krise entwickeln. Auch durch Stress, erzeugt in Form von Hunger und Kälte, oder nach Injektion von Lipopolysacchariden zur Imitation einer bakteriellen Infektion, ließ sich eine solche Krise nicht provozieren (Koeller et al., 2002). 2006 gelang erstmals die Induzierung einer metabolischen Krise bei *Gcdh*-defizienten Mäusen durch Gabe einer Hochproteindiät (HPD) (Zinnanti et al., 2006). 28 und 56 Tage alte *Gcdh*-defiziente Mäuse verstarben unter dieser Diät innerhalb von zwei bis acht Tagen. Die *Gcdh*-defizienten Tiere unter HPD entwickelten sukzessive eine Hypothermie, eine zunehmende Dehydrierung, Hypoaktivität, zunehmende Bewegungsstörungen, epileptische Anfälle und starben schließlich. Die pathologische Untersuchung zeigte ausgedehnte Einblutungen im Gehirn und einen ausgeprägten

Neuronenverlust und eine Vakuolisierung des Cortex und des Striatums (Zinnanti et al., 2006; Keyser et al., 2008).

1.4 Die Rolle von bislang identifizierten Transportproteinen bei GA1

Insgesamt erklärt keiner der oben aufgeführten pathophysiologischen Befunde die Komplexität der Pathogenese der GA1. Insbesondere ist über die Transportmechanismen der Metabolite GA und 3OHGA innerhalb der Zelle und aus der Zelle hinaus bislang wenig bekannt. Diese Transportmechanismen sind aber gerade im Hinblick auf die Blut-Hirn-Schranke pathomechanistisch von besonderer Bedeutung. Eine passive Diffusion dieser polaren Dicarboxylsäuren über Membranen ist ausgeschlossen, so dass aktive Transportmoleküle an der Translokation beteiligt sein müssen. Im Hinblick auf eine mögliche pharmakologische Beeinflussbarkeit aktiver Transporter erschien die Aufklärung der an der Translokation von GA und 3OHGA beteiligten Transporter besonders wichtig.

Zur Identifizierung von Molekülen, die GA und 3OHGA über Membranen transportieren, wurde aufgrund der hohen Ausscheidungsraten von GA und 3OHGA in den Urin in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe als Modell zunächst Nierengewebe ausgewählt. In der Tat zeigte sich unter Berücksichtigung der Literaturdaten zu Serum- und Urinkonzentrationen eine fraktionelle Exkretion von GA und 3OHGA > 1 , was auf aktive Transportmechanismen hindeutete. Bezüglich anderer Transporter war in der Literatur zudem zu lesen, dass Veränderungen der Konzentration von Substraten die Expression ihrer jeweiligen Transporter auf transkriptioneller Ebene regulieren (Sai, 2005; Terada und Inui, 2007). Daher wurden zur Identifizierung beteiligter Transporter vergleichende *Microarray*-Analysen an Nierengewebe von Wildtyp- und *Gcdh*-defizienten Mäusen durchgeführt (Stellmer, 2007). Etwa ein Viertel der in ihrer Expression veränderten Gene in dieser *Microarray*-Analyse betraf Transporter aus der *Solute-carrier*-Familie (SLC-Familie) (Stellmer, 2007). Über Expressionsanalysen und funktionelle Studien dieser Transporter gelang die Identifizierung des Natrium-abhängigen Dicarboxylat-Cotransporters 3 (NaC3, Gensymbol *SLC13A3*) als erstes GA- und 3OHGA-translozierendes Molekül (Stellmer et al., 2007). NaC3 ist vorwiegend in der Niere, aber auch in Leber, Pankreas, Gehirn (hier primär in Astrozyten, aber auch Neuronen) und Plazenta exprimiert (Stellmer et al., 2007). Neben GA und 3OHGA transportiert er unter anderem α -Oxoglutarat, Succinat, 2,3-Dimethylsuccinat und 2,3-Dimercaptosuccinat (Burckhardt und Burckhardt, 2003).

Aufgrund ihrer bekannten Substrate wurden aus der Literatur weitere Transporter ausgewählt, die mögliche Kandidaten für die Translokation von GA und 3OHGA darstellten, insbesondere die Familie der organischen Anionentransporter (OAT). Über nachfolgende funktionelle Studien an OAT-exprimierenden heterologen Zellsystemen gelang es, OAT1 (*SLC22A6*) und OAT4 (*SLC22A11*) als GA- und 3OHGA-transportierende Moleküle zu identifizieren (Hagos et al., 2008). OAT1 wird überwiegend in proximalen Tubuluszellen der Niere basolateral exprimiert sowie im Gehirn (hier jedoch nur in den Neuronen, nicht in Astrozyten), in der Plazenta sowie

im Skelettmuskel (Buist et al., 2002). Er gilt als hochaffiner Transporter für 3OHGA, transportiert aber auch andere Dicarboxylate wie beispielsweise α -Ketoglutarat und GA (Hagos et al., 2008). Als weiterer hochaffiner Transporter für GA und 3OHGA wurde OAT4 identifiziert (Hagos et al., 2008). Wie OAT1 wird auch OAT4 an proximalen renalen Tubuluszellen exprimiert, allerdings nicht basolateral, sondern apikal (Anzai et al., 2006). Anhand der bekannten Lokalisationen von NaC3, OAT1 und OAT4 und ihrer bisher bekannten Substrate konnte ein Modell für die renale Exkretion von GA und 3OHGA über proximale Tubuluszellen abgeleitet werden: Aufgrund der unterschiedlichen Affinitäten für 3OHGA und α -Ketoglutarat (α -KG) wird über NaC3 an der basolateralen Membran hauptsächlich α -KG im Symport mit Natrium aus dem Blut in die Tubuluszellen aufgenommen und dadurch ein auswärts gerichteter α -KG-Gradient aufgebaut. Die NaC3-Funktion ist dabei abhängig von einem einwärts gerichteten Natrium-Gradienten, der von der basolateral gelegenen $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ aufrechterhalten wird. Der basolateral lokalisierte OAT1 vermittelt dann unter Ausnutzung des auswärts gerichteten α -KG-Gradienten die hochaffine Aufnahme von GA und 3OHGA in die Tubuluszelle im Antiport gegen α -KG. An der apikalen Seite erfolgt die Sekretion der Metaboliten in den Urin über OAT4 entlang des durch OAT1 generierten auswärts gerichteten Konzentrationsgradienten von GA und 3OHGA (Mühlhausen, 2008; Mühlhausen et al., 2008).

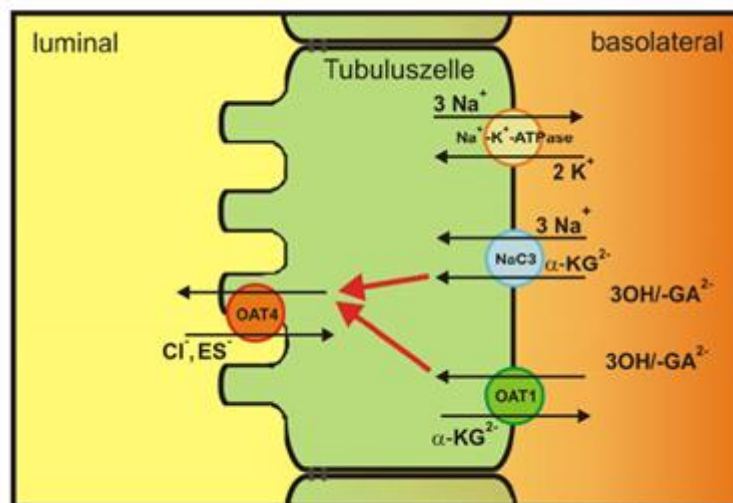


Abbildung 4: Transport pathologischer Dicarboxylate in proximalen Nierentubuluszellen. Über OAT1 an der basolateralen Membran werden die Metaboliten im Antiport gegen α -KG aus dem Blut in proximale Nierentubuluszellen aufgenommen. Die hierfür benötigte hohe Konzentration an intrazellulärem α -KG wird durch NaC3 generiert, Natrium-abhängig wird α -KG aus dem Blut in die Tubuluszelle transportiert. Damit wiederum ist der NaC3-Transporter abhängig von einem einwärts gerichteten Natrium-Konzentrationsgradienten, der durch die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ erzeugt wird. An der apikalen Membran erfolgt die Sekretion von GA und GA-Derivaten durch OAT4, der diese im Antiport mit Chlorid oder Estronsulfat transportiert (Mühlhausen et al., 2008).

Neben den Daten zur geringen Transportrate von GA und 3OHGA über die Blut-Hirn-Schranke gibt es keine weiteren Daten über deren Transport im Gehirn. Für NaC3 und OAT1 ist aus der Literatur bekannt, dass beide Transporter neben der Niere auch im Plexus choroideus exprimiert werden (Pajor et al., 2001; Alebouyeh et al., 2003). Basierend auf der Beobachtung, dass NaC3 und OAT1 die Metaboliten GA und 3OHGA über Membranen translozieren können,

wurden im Labor des Arbeitsbereiches Molekularbiologie der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin des UKE Hamburg Untersuchungen zur Expression dieser Transporter sowie funktionelle Studien zum Transport von GA und 3OHGA an primären neuronalen und astrozytären Zellen aus Wildtyp- und *Gcdh*^{-/-}-Mäusen durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass sowohl in primären neuronalen als auch astrozytären Zellen aus Wildtyp- und *Gcdh*^{-/-}-Mäusen NaC3, nicht jedoch OAT1, exprimiert wird. Sowohl primäre astrozytäre als auch neuronale Mauszellen nehmen das [¹⁴C]-markierte NaC3-Substrat Succinat auf, wobei dieser Transport in Gegenwart von GA und 3OHGA konzentrationsabhängig inhibierbar ist. Nach Vorbeladung astrozytärer *Gcdh*^{-/-}-Zellen mit [¹⁴C]-Succinat zeigte sich in diesen im Vergleich zum Wildtyp ein verzögerter Ausstrom des markierten Succinats. Aus diesen Befunden wurde abgeleitet, dass NaC3 im Gehirn eine wichtige Rolle beim anaplerotischen Transport von Citratzyklusintermediaten (unter anderem Succinat) von Astrozyten zu Neuronen spielt und dass dieser anaplerotische Mechanismus in Gegenwart von GA und 3OHGA beeinträchtigt ist. Diese Befunde stellten einen neuen Mechanismus dar, wie die bei GA1 akkumulierenden Metaboliten über einen gestörten Transport zum intramitochondrialen Energiemangel beitragen könnten (Lamp et al., 2011).

1.5 Die mitochondrialen Transporter: die SLC25-Familie

Durch die oben dargestellten Arbeiten gelang erstmals die Identifizierung von GA-beziehungsweise 3OHGA-Transportern an der Plasmamembran verschiedener Zelltypen. Völlig unklar war weiterhin, wie GA und 3OHGA innerhalb der Zelle transportiert werden. Da GCDH in der mitochondrialen Matrix lokalisiert ist, müssen GA und 3OHGA auch in der mitochondrialen Matrix entstehen. Beide Metaboliten lassen sich aber extrazellulär nachweisen, so dass sie über beide mitochondrialen Membranen gelangen müssen, bevor sie über die Plasmamembran in den Extrazellulärraum gelangen können. Alle Mitochondrien besitzen eine äußere und eine innere mitochondriale Membran, dazwischen liegt der Intermembranraum. Aufgrund der Polarität von GA und 3OHGA erscheint auch bezüglich der mitochondrialen Membranen ein passiver Transport ausgeschlossen. In der Innenmembran finden sich die Atmungskettenkomplexe 1–4, der Redoxüberträger Ubichinon, die mitochondriale ATP-Synthase sowie auf der Außenseite, an die Membran assoziiert, das Hämprotein Cytochrom c, das bei Freisetzung ins Cytosol die Apoptose auslöst. In der mitochondrialen Matrix befinden sich die Enzyme des Citratzyklus, des Harnstoffzyklus, der β -Oxidation der Fettsäuren, des Abbaus vieler Aminosäuren, eines Teiles der Hämbiosynthese, eines Teiles des Steroidstoffwechsels sowie der mitochondrialen Proteinbiosynthese (Löffler und Petrides, 2002). Für diese Vielzahl biochemischer Prozesse ist der aktive Transport vieler unterschiedlicher Metaboliten in die Mitochondrien und wieder heraus erforderlich. Die bisher an der äußeren und inneren mitochondrialen Membran identifizierten Transporter werden der SLC25-Familie zugeordnet. Diese umfassen die mitochondrialen Transporter für Anionen, Transportsysteme für Redoxäquivalente sowie Kationentransporter.

Die Gene der *SLC25*-Familie codieren mitochondriale Transporter, die als membrangebundene Proteine in der inneren Mitochondrienmembran sowie zu einem geringen Teil in anderen Zellorganellen lokalisiert sind (Palmieri, 2012). In der Datenbank des HGNC (HUGO *Gene Nomenclature Committee*) lassen sich aktuell 29 *SLC25*-Gene zählen, wovon 20 einen Transporter mit bekannter Funktion codieren. Die Hauptfunktion der *SLC25*-Transporter besteht darin, aktive Transportmechanismen zwischen mitochondrialer Matrix und Cytosol zu vermitteln. Die zu transportierenden Substanzen zeichnen sich durch große Variabilität in Struktur und Form aus, so werden sowohl kleine Protonen als auch komplexe Moleküle wie ATP transportiert. Die Expression der mitochondrialen Carrier ist unterschiedlich, einige Transporter kommen in nahezu allen Geweben vor, andere nur in bestimmten Geweben. Es handelt sich um kerncodierte Proteine, die nach ribosomaler Expression zunächst zum Mitochondrium transportiert und dann in die innere mitochondriale Membran „eingebaut“ werden (Palmieri, 2004; Palmieri, 2008).

Die Proteine der *SLC25*-Familie haben einen gemeinsamen Aufbau: Sie bestehen aus drei homologen Domänen mit je zwei hydrophoben, transmembranären α -Helices, die durch jeweils drei Schleifen auf der mitochondrialen und durch jeweils zwei Schleifen auf der cytoplasmatischen Seite miteinander verbunden sind (Palmieri, 2004; Palmieri und Pierri, 2010; Palmieri, 2013; Abbildung 5). Die Transporter funktionieren als Homodimere, wobei jedes Monomer mit sechs Transmembransegmenten in die Membran eingebettet ist und der N- und C-Terminus sich auf der cytosolischen Seite befinden (Palmieri, 2004; Palmieri und Pierri, 2010). Mit Ausnahme des DIC (*SLC25A10*) besitzen die *SLC25*-Transporter auf jeder Seite nur eine Bindungsstelle. Der Transporter befindet sich entweder in „C“- oder in „M“-Position, ist also entweder zur cytoplasmatischen oder zur mitochondrialen Seite geöffnet. Nach Bindung des Substrates auf der einen Seite schließt sich der Kanal, das Substrat gelangt durch den Kanal auf die Gegenseite, auf der sich der Kanal wieder öffnet. Dieser Substrat-induzierte Wechsel von der „C“- in die „M“-Konformation erfolgt durch Knick- beziehungsweise Rotationsbewegungen im Bereich konservierter Glycin- beziehungsweise Prolinreste innerhalb der Transmembrandomänen und dadurch bedingter Brückenbindungen zwischen geladenen Aminosäureresten verschiedener Transmembranhelices. Vom Lumen des Cytosols oder des Mitochondriums aus betrachtet imponiert diese Konformationsänderung als koordinierte gegenseitige Drehbewegung der Transmembrandomänen mit oder gegen den Uhrzeigersinn (Palmieri und Pierri, 2010; Palmieri, 2013).

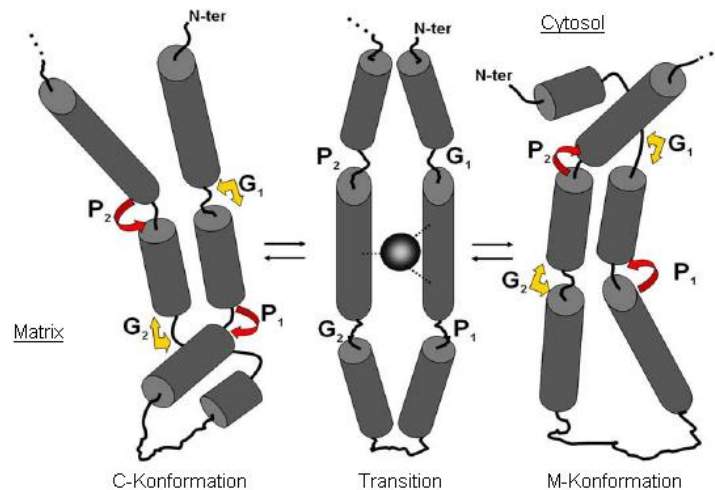


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Konformationsänderung eines SLC25-Transporters von der C-Konformation über die Transition bis zur M-Konformation während des Transportzykluses. P1 = Prolinrest der ungeraden Transmembranhelix, G1 = Glycinrest der ungeraden Transmembranhelix, P2 = Prolinrest der geraden Transmembranhelix, G2 = Glycinrest der geraden Transmembranhelix. Gelber Pfeil = Knickbewegung, roter Pfeil = Rotationsbewegung (Palmieri und Pierri, 2010).

Als Triebkraft für die durch sie vermittelte Transportprozesse dient den Transportern der SLC25-Familie entweder der Konzentrationsgradient der durch sie translozierten Substrate oder aber die elektrische oder chemische Komponente des durch die Atmungskette via H^+ generierten elektrochemischen Potentials über der inneren Mitochondrienmembran (Palmieri, 2013).

Aus der SLC25-Familie wurden fünf Transporter ausgewählt (Tabelle 1), die aufgrund ihrer Substratspezifität als wahrscheinlichste Kandidaten für die Translokation von GA und 3OHGA angesehen werden. Diese ausgewählten mitochondrialen Transporter wurden bezüglich ihrer Expression auf mRNA- und zum Teil auf Proteinebene in verschiedenen Geweben von Wildtyp- und *Gcdh*^{-/-}-Mäusen sowie in kultivierten Zellen untersucht.

Tabelle 1: Übersicht über die untersuchten mitochondrialen Transporter. Dargestellt sind das Gensymbol, der Proteinname, die Proteinabkürzung, die chromosomale Lokalisation, die von dem jeweiligen Transporter bevorzugt transportierten Substanzen, der Transport-Typ sowie das Gewebevorkommen des Transporters.

Gensymbol	Proteinname	Protein-abkürzung	Chromosomale Lokalisation	Bevorzugte Substanzen	Transport-Typ	Vorkommen	Referenz
<i>SLC25A10</i>	Dicarboxylat-Carrier	DIC	17q25.3	Malat, Phosphat, Succinat, Sulfat, Thiosulfat	Antiporter: Malat/Phosphat	Herz, Hirn, Leber, Lunge, Niere, Pankreas	Fiermonte et al., 1998; Palmieri, 2004; Palmieri, 2013
<i>SLC25A11</i>	Oxoglutarat-Carrier	OGC	17p13.3	Oxoglutarat, Malat	Antiporter: Oxoglutarat/ Malat	Herz, Hirn, Leber, Niere, Pankreas, Skelettmuskel	Palmieri, 2004; Palmieri, 2013; Monné et al., 2013
<i>SLC25A15</i>	Ornithin-Carrier	ORC1	13q14.11	Ornithin, Citrullin, Lysin, Arginin	Antiporter: Ornithin/Citrullin+H ⁺ bzw. Ornithin/H ⁺	Herz, Hirn, Hoden, Leber, Lunge, Milz, Niere, Pankreas	Camacho et al., 1999
<i>SLC25A20</i>	Carnitin/ Acylcarnitin-Carrier	CAC	3p21.31	Carnitin, Acylcarnitin	Antiporter: Carnitin/Acylcarnitin	Herz, Hirn, Leber, Lunge, Niere, Pankreas, Plazenta, Skelettmuskel,	Indiveri et al., 1998; Indiveri et al., 2011
<i>SLC25A21</i>	Oxoadipat-Carrier	ODC	14q11.2	Oxoadipat, Oxoglutarat	Antiporter: Oxoadipat/Oxoglutarat	Colon, Gallenblase, Herz, Hirn, Hoden, Leber, Lunge, Milz, Niere, Plazenta, Skelettmuskel	Fiermonte et al., 2001

1.5.1 Der mitochondriale Dicarboxylat-Transporter (DIC, *SLC25A10*)

Der DIC katalysiert den elektroneutralen Antiport von Dicarboxylaten. Prädominante Substanzen sind Malat und Succinat sowie anorganisches Phosphat, Sulfat und Thiosulfat. Er besitzt auf jeder Membranseite zwei getrennte Substratbindungsstellen, die eine für Phosphate, die andere für Dicarboxylate. Alle vier Bindungsstellen müssen mit Substraten desselben Transportweges assoziiert sein, wobei der sequentielle Transport sowohl als Phosphat-Malat-Heteroaustausch als auch als Malat-Malat- beziehungsweise Phosphat-Phosphat-Homoantiport erfolgen kann. Der DIC ist an zwei Stoffwechselwegen direkt beteiligt: Zum einen spielt er eine Rolle in der Gluconeogenese, wobei Pyruvat in der mitochondrialen Matrix durch die Pyruvat-Carboxylase in Oxalacetat und weiter durch die Malat-Dehydrogenase in Malat umgewandelt und dieses dann über den DIC ins Cytosol exportiert wird. Dort wird Malat durch die Malat-Dehydrogenase unter Reduktion von NADP^+ in $\text{NADPH} + \text{H}^+$ in Oxalacetat und anschließend durch die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase in Phosphoenolpyruvat umgewandelt und mündet so in die cytosolische Gluconeogenese ein. Zum anderen übernimmt der DIC Substrate aus dem Harnstoffzyklus. Im Harnstoffzyklus wird durch das cytosolische Enzym Argininosuccinat-Lyase Fumarat produziert, das in Malat umgewandelt, schließlich über den DIC in die mitochondriale Matrix geschleust wird und dort als Substrat für den Citratzyklus zur Verfügung steht. Die Bereitstellung der für beide Stoffwechselwege benötigten Substrate kann bei Bedarf auch in die umgekehrte Richtung erfolgen (Fiermonte et al., 1998; Palmieri, 2004; Palmieri, 2013).

Der DIC hat auf diese Weise eine wichtige anaplerotische Funktion, schleust also notwendige Substrate für die Aufrechterhaltung des Citratzyklus in die mitochondriale Matrix ein. Im Vergleich zur Beteiligung an der Gluconeogenese scheint die anaplerotische Funktion des DIC von größerer physiologischer Bedeutung zu sein (Palmieri et al., 1999). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der prädominanten DIC-Substrate Malat und Succinat mit Glutarsäure wurde der DIC als möglicher Kandidat für die Translokation von GA für die weiteren Analysen ausgewählt.

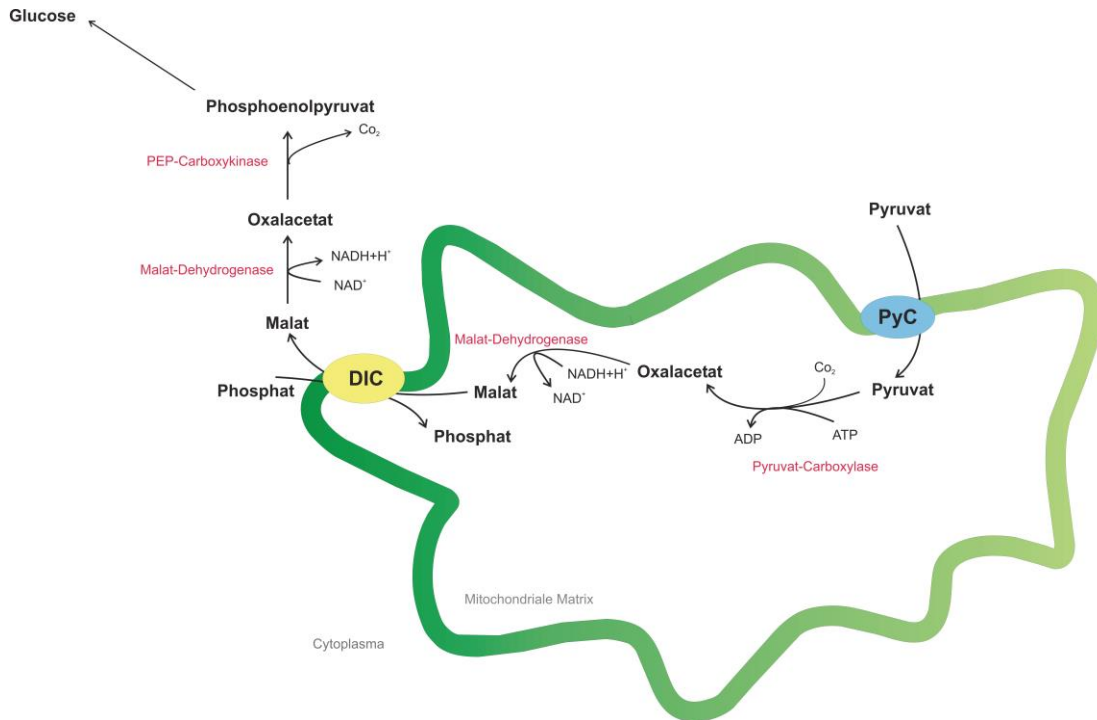


Abbildung 6: Funktionen des DIC (SLC25A10): Bedeutung des DIC für die Gluconeogenese, den Harnstoffzyklus und den Citratzyklus. Über den DIC wird Malat aus dem Mitochondrium ins Cytoplasma transportiert und dient dort über Oxalacetat als Substrat für die Gluconeogenese oder vermittelt umgekehrt den anaplerotischen Transport von Malat als Substrat für den intramitochondrialen Citratzyklus. Eigene Darstellung in Anlehnung an Palmieri, 2004.

1.5.2 Der mitochondriale Oxoglutarat-Transporter (OGC, SLC25A11)

Der OGC, auch als Oxoglutarat-Malat-Antiporter bezeichnet, vermittelt den elektroneutralen Austausch zwischen Oxoglutarat und anderen Dicarboxylaten, wobei er zu Malat die höchste Affinität besitzt.

Im Rahmen dieses Transportzykluses wird cytosolisches Oxalacetat mit NADH+H⁺ durch die Malat-Dehydrogenase zu Malat reduziert. Nach Translokation von Malat ins Mitochondrium mit Hilfe des OGC wird Malat unter Bildung von NADH+H⁺ in der Matrix zu Oxalacetat reoxidiert. Da kein Carrier für Oxalacetat existiert, muss vor dem Rücktransport des Kohlenstoffgerüsts zunächst Oxalacetat mit Glutamat zu Aspartat und α-Oxoglutarat transaminiert werden. Daran beteiligt ist die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase. Der AGC ermöglicht nun den Rücktransport des Aspartats ins Cytosol. Die Umkehrung des Transaminierungsschrittes vervollständigt den Zyklus.

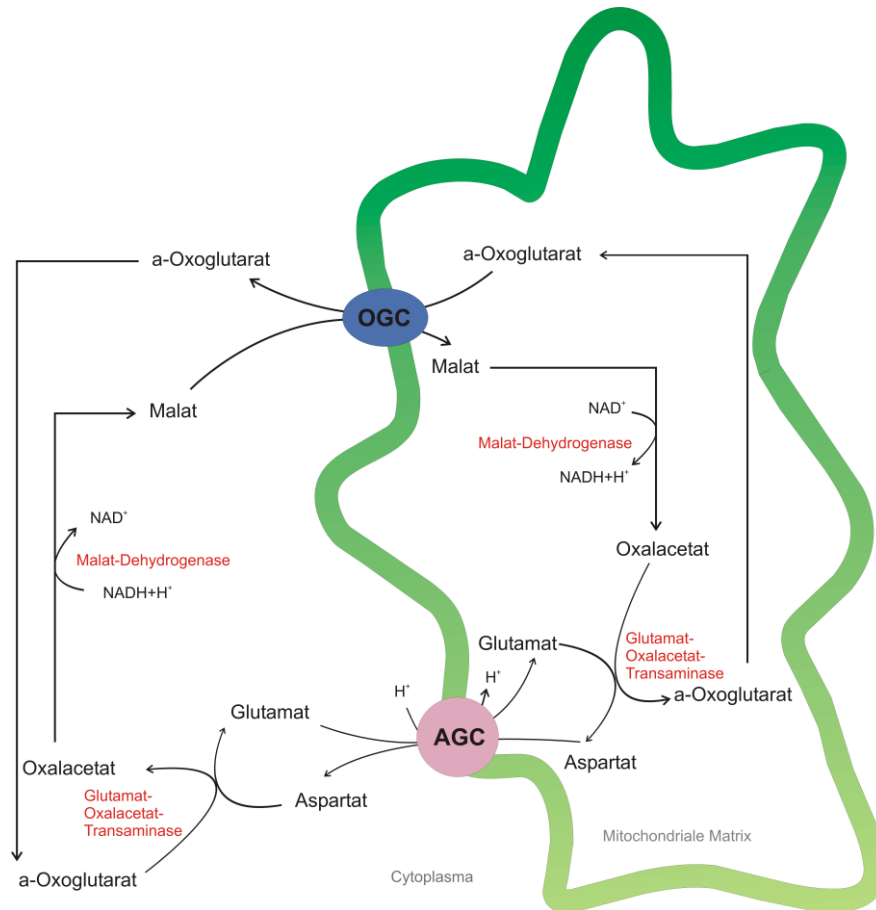


Abbildung 7: Funktion des OGC (SLC25A11). Dargestellt ist die Funktion des OGC im Malat-Aspartat-Shuttle: Oxalacetat wird im Cytoplasma durch die cytosolische Malat-Dehydrogenase zu Malat umgewandelt, dabei wird NADH+H⁺ zu NAD⁺ reduziert. Malat wird über den OGC in das Mitochondrium aufgenommen und dort durch die mitochondriale Malat-Dehydrogenase wiederum zu Oxalacetat umgebaut. Dabei wird NADH+H⁺ freigesetzt und kann der Atmungskette zugeführt werden. Oxalacetat wird über die mitochondriale Glutamat-Oxalacetat-Transaminase zu Aspartat transaminiert und über den Aspartat-Glutamat-Transporter (AGC) wieder ins Cytoplasma transportiert. Aspartat wird nun über die cytosolische Glutamat-Oxalacetat-Transaminase wieder in Oxalacetat überführt, wobei das durch den OGC ins Cytoplasma transportierte Oxoglutarat als Akzeptor für die Aminogruppe dient und dadurch Glutamat entsteht. Eigene Darstellung in Anlehnung an Palmieri, 2004.

Beim Oxoglutarat-Isocitrat-Austausch wird Oxoglutarat in der mitochondrialen Matrix durch die Isocitrat-Dehydrogenase zu Isocitrat oxidiert und carboxyliert, das dann im Antiport mit Malat über den Citrat-Transporter ins Cytoplasma exportiert wird. Malat gelangt dann über den OGC im Austausch mit Oxoglutarat wieder aus dem Mitochondrium heraus. Mit Hilfe dieser Transportzyklen werden die Reduktionsäquivalente von NADH+H⁺ aus dem Cytoplasma ins Mitochondrium transferiert und stehen dort für die Elektronenübertragung auf die Atmungskette und damit die ATP-Synthese zur Verfügung (Palmieri, 2004; Palmieri und Pierri, 2010; Palmieri, 2013). Der OGC wurde aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten seiner Substrate, der Dicarboxylsäuren Malat und Oxoglutarat mit GA beziehungsweise 3OHGA als möglicher Kandidat für einen Transport von GA und 3OHGA für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ausgewählt.

1.5.3 Der mitochondriale Ornithin-Transporter 1 (ORC1, *SLC25A15*)

Der Ornithin-Transporter, auch bezeichnet als Ornithin-Citrullin-Transporter, besitzt zwei Isoformen, ORC1 (= *SLC25A15*) und ORC2 (= *SLC25A2*). Beide Isoformen transportieren Ornithin, Lysin, Arginin und Citrullin. Dennoch unterscheiden sie sich in einigen Punkten (Tabelle 2).

Tabelle 2: Vergleich zwischen den zwei Isoformen des Ornithin-Transporters ORC1 (*SLC25A15*) und ORC2 (*SLC25A2*) (Palmieri, 2004).

	ORC1 = <i>SLC25A15</i>	ORC2 = <i>SLC25A2</i>
Transport von Histidin	-	++
Transport von L-Stereoisomeren der oben genannten Aminosäuren	+++	++
Transport von D-Stereoisomeren der oben genannten Aminosäuren	+	++
Affinität zu Lysin & Arginin	++	+++
Affinität zu Ornithin & Citrullin	+++	++
Spezifische Aktivität	+++	+

Für die vorgesehenen Expressionsanalysen wurde der ORC1 ausgewählt, da er im Hirn exprimiert wird und aufgrund seiner Affinität zu Lysin am Transport der Vorläuferaminosäure der pathologischen Metaboliten GA und 3OHGA beteiligt ist. Der ORC1 vermittelt den elektroneutralen Austausch zwischen cytosolischem Ornithin und intramitochondrialem Citrullin und H^+ und ist damit eine wichtige Komponente im Harnstoffzyklus, da er dessen im Cytosol und im Mitochondrium ablaufenden Enzymaktivitäten miteinander verbindet (Indiveri et al., 1997; Fiermonte et al., 2003).

Mutationen im *SLC25A15*-Gen sind mit dem Hyperornithinämie-Hyperammonämie-Homocitrullinurie-(HHH-)Syndrom assoziiert, einer Erkrankung, die damit den Harnstoffzyklusstörungen zugerechnet wird (Camacho et al., 1999). Bislang wurden mehr als 50 Patienten mit dieser autosomal-rezessiven Störung beschrieben. Bei dieser Erkrankung zeigt sich eine variable Encephalopathie, Gedeih- und Gerinnungsstörungen, aber auch neonatale Hyperammonämien sind beschrieben (Salvi et al., 2001; Häberle et al., 2012).

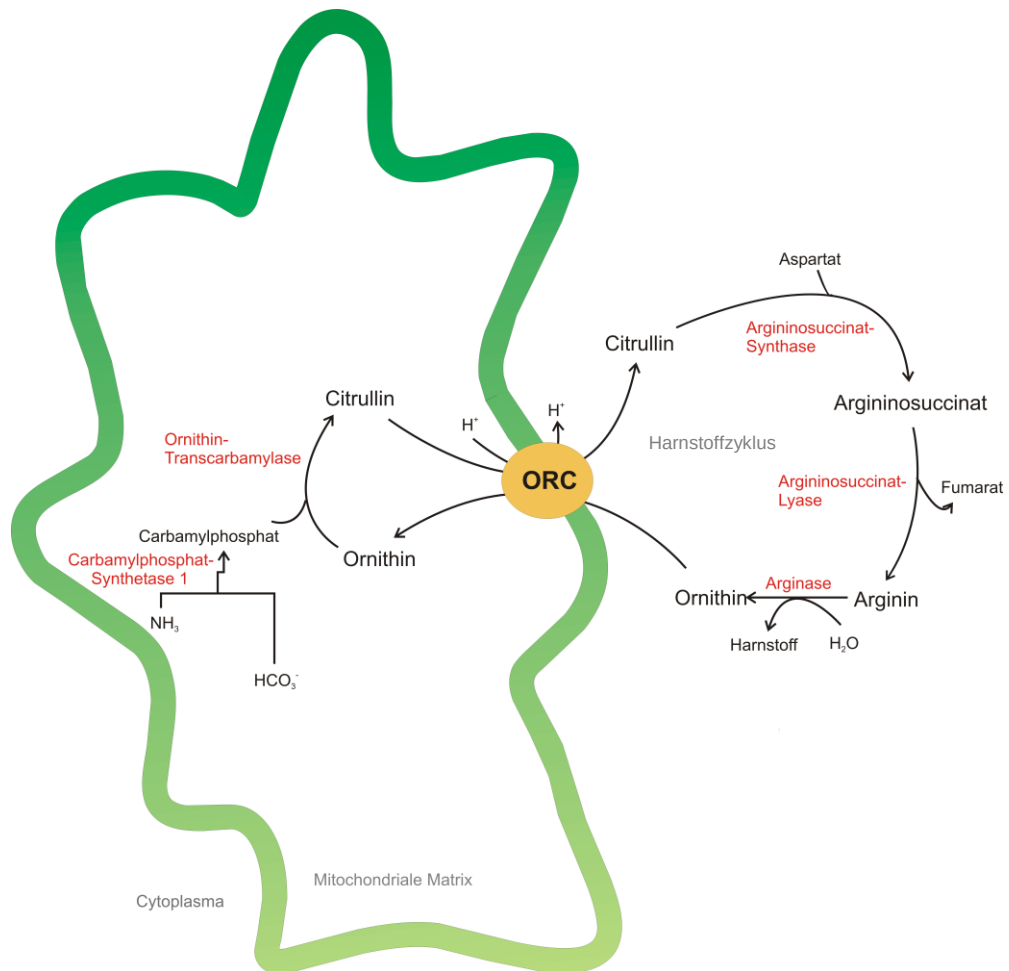


Abbildung 8: Funktion des ORC1 (SLC25A15). Dargestellt ist die Beteiligung des ORC1 am Harnstoffzyklus. Dort vermittelt er den Austausch zwischen cytosolischem Ornithin und intramitochondrialem Citrullin. Nur dank dieses Austausches ist der reibungslose Ablauf des Harnstoffzyklus möglich. Nach Abspaltung von Harnstoff im Cytosol wird Ornithin über den ORC in die mitochondriale Matrix geschleust und hier durch die Ornithin-Transcarbamylase zu Citrullin umgewandelt. Dieses wird dann über den ORC aus dem Mitochondrium transportiert und steht dann der Ureogenese erneut zur Verfügung. Eigene Darstellung in Anlehnung an Palmieri, 2004.

1.5.4 Der mitochondriale Carnitin-/Acylcarnitin-Transporter (CAC, SLC25A20)

Der CAC stellt die Schlüsselkomponente im Carnitin-Zyklus dar, durch den langkettige Fettsäurereste vom Cytosol ins Mitochondrium transportiert werden. Dies geschieht in drei Schritten: Zunächst erfolgt an der äußeren mitochondrialen Membran der Transfer von Acyl-Gruppen von Acyl-Coenzym A zu Carnitin durch die Carnitin-Palmitoyl-Transferase 1 (CPT 1). Daran schließt sich die Translokation des Acylcarnitins über die innere mitochondriale Membran durch den CAC im Austausch mit freiem Carnitin an. Abschließend werden in der mitochondrialen Matrix die Acylreste vom Carnitinester wieder auf Coenzym A übertragen, vermittelt durch CPT 2. Der CAC katalysiert also den elektroneutralen Austausch von cytosolischem Acylcarnitin und mitochondrialem freiem Carnitin, die eingeschleusten Acylreste

werden dann im Mitochondrium über die β -Oxidation verstoffwechselt. Der CAC-vermittelte Transport ist damit ein essentieller Schritt im Abbau langkettiger Fettsäuren, womit der Hauptenergiebedarf während Hungerphasen gedeckt wird.

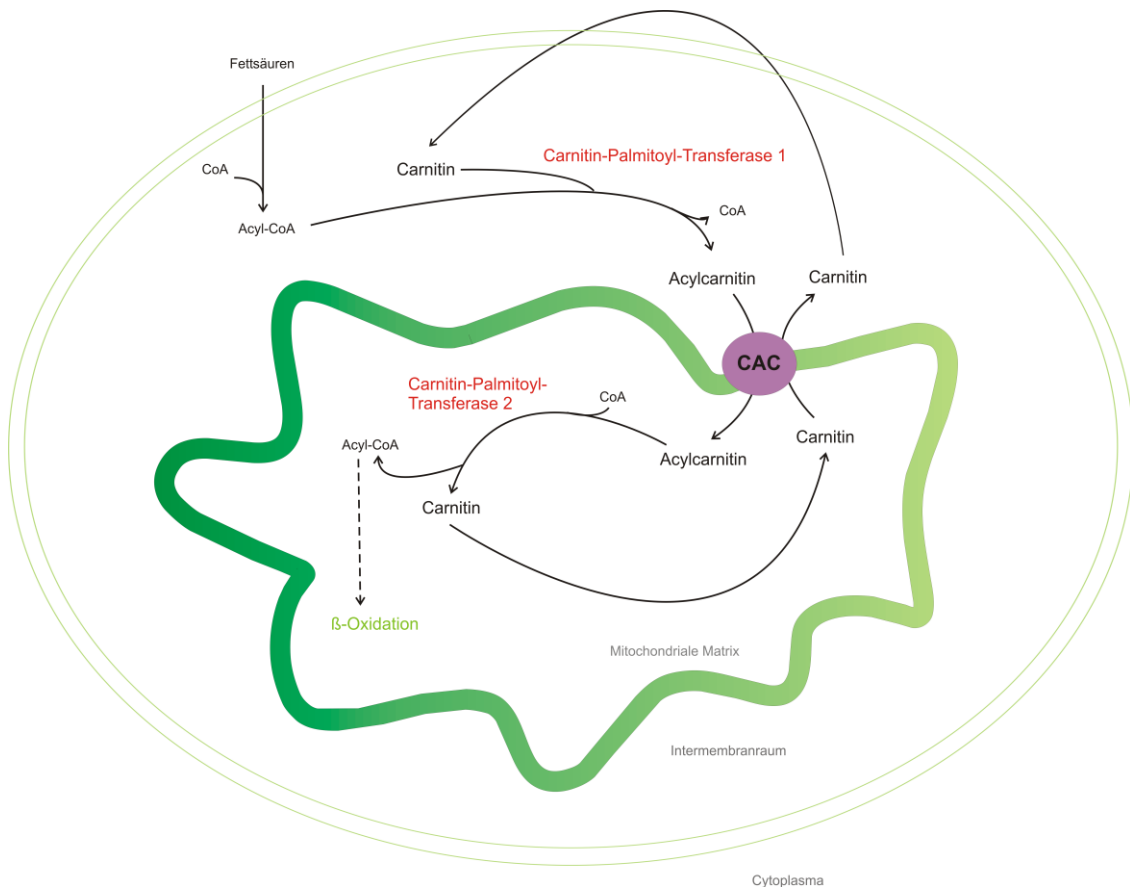


Abbildung 9: Funktion des CAC (SLC25A20). Dargestellt ist der Transport langkettiger Fettsäurereste vom Cytosol ins Mitochondrium: An der äußeren mitochondrialen Membran erfolgt die Übertragung von Acyl-Gruppen von Acyl-Coenzym A zu Carnitin durch die Carnitin-Palmitoyl-Transferase 1. Das gebildete Acylcarnitin wird durch den CAC im Austausch mit freiem Carnitin in die mitochondriale Matrix geschleust. In der mitochondrialen Matrix werden dann die Acylgruppen durch die Carnitin-Palmitoyl-Transferase 2 wieder auf das Coenzym A transferiert. Die Acylreste werden dann über die β -Oxidation verstoffwechselt. Eigene Darstellung in Anlehnung an Palmieri, 2004.

Bisher wurden etwa dreißig Patienten mit Defizienz des CAC-Transporters identifiziert (Huizing et al., 1997; Iacobazzi et al., 1998; Stanley et al., 1992). Bei dieser autosomal-rezessiven Erkrankung sind zwei Phänotypen beschrieben: die schwer verlaufende frühkindliche Form mit Kardiomyopathie sowie eine milder verlaufende Form ohne Kardiomyopathie. Anderen Fettsäureoxidationsstörungen ähnlich sind die Hauptsymptome dieser Erkrankung: Lebensbedrohliche komatöse Zustände ausgelöst durch Nahrungskarenz, Hypoketose, Hypoglykämie, Hyperammonämie, Dicarboxylat-bedingte Azidurie, Hepatomegalie mit eingeschränkter Leberfunktion, kardiale Symptome und Muskelschwäche. Hypoglykämien während einer Nahrungskarenz deuten auf eine zu schnelle Depletion des hepatischen Glycogens und eine erschwerte Gluconeogenese hin. Die Hypoketose resultiert aus dem

unzureichenden Fettsäuretransport und der dadurch bedingten geringen Produktion an Acetyl-CoA. Die Hyperammonämie kommt durch die limitierte Verfügbarkeit von N-Acetylglutamat zustande, das normalerweise aus Acetyl-CoA abgeleitet wird und essentiell für die Carbamoylphosphat-Synthetase ist, ein Enzym des Harnstoffzykluses. Die Hepatomegalie und die Kardiomyopathie werden durch die pathologische Akkumulation langkettiger Acylcarnitiner erklärt (Indiveri et al., 2011; Palmieri, 2013).

Für die hier geplanten Expressionsstudien wurde der CAC ausgewählt, da er unter anderem auch Glutaryl-CoA transportiert und damit an der Translokation pathologischer, bei der GA1 akkumulierender Metaboliten, beteiligt sein könnte.

1.5.5 Der mitochondriale Oxodicarboxylat-Transporter (ODC, *SLC25A21*)

Der ODC spielt eine wichtige Rolle im Abbau von Lysin, das mitochondrial über den sogenannten Saccharopin-Weg oder peroxisomal über den Pipecolinsäure-Weg metabolisiert werden kann. Beide Abbauwege münden in der gemeinsamen Endstrecke cytosolischer 2-Aminoadipinsäure, aus der durch Transaminierung unmittelbar 2-Oxadipat entsteht (Cox, 2001). Dieses stellt nun das Substrat des ODC dar und wird im elektroneutralen Antiport gegen 2-Oxoglutarat ins Mitochondrium aufgenommen (Palmieri, 2004). Der weitere Abbau des 2-Oxadipats erfolgt über den Oxoglutarat-Dehydrogenase-Komplex (OGDHc), dessen Substrat auch 2-Oxoglutarat ist. Angenommen wird ein sequentieller Abbau von 2-Oxadipat durch die E1- und nachfolgend die E2-Untereinheit dieses Komplexes. Endprodukt ist Glutaryl-CoA, das Substrat der GCDH (Cox, 2001, Abbildung 10 und 11).

Ursprünglich wurde vermutet, dass Mutationen im *SLC25A21*-Gen, also ein Defekt des ODC, für die Stoffwechselerkrankung Oxoadipat-Azidurie verantwortlich sind (Palmieri, 2004), die durch Akkumulation und Exkretion großer Mengen von 2-Oxadipat, 2-Aminoadipat und 2-Hydroxyadipat in den Urin gekennzeichnet ist (Fiermonte et al., 2001; Goodman und Frerman, 2001). Klinisch sind eine mentale Retardierung, muskuläre Hypotonie, Entwicklungsverzögerung, eine Ataxie und epileptische Anfälle beschrieben. Bei betroffenen biochemisch diagnostizierten Patienten konnten aber nie Mutationen im *SLC25A21*-Gen nachgewiesen werden. Mittlerweile wurde gezeigt, dass der genetische Defekt bei diesen Patienten nicht im *SLC25A21*-Gen, sondern im *DHDKD1*-Gen lokalisiert ist, das eine Isoform der E1-Untereinheit des OGDH-Komplexes codiert (Danhauser et al., 2012).

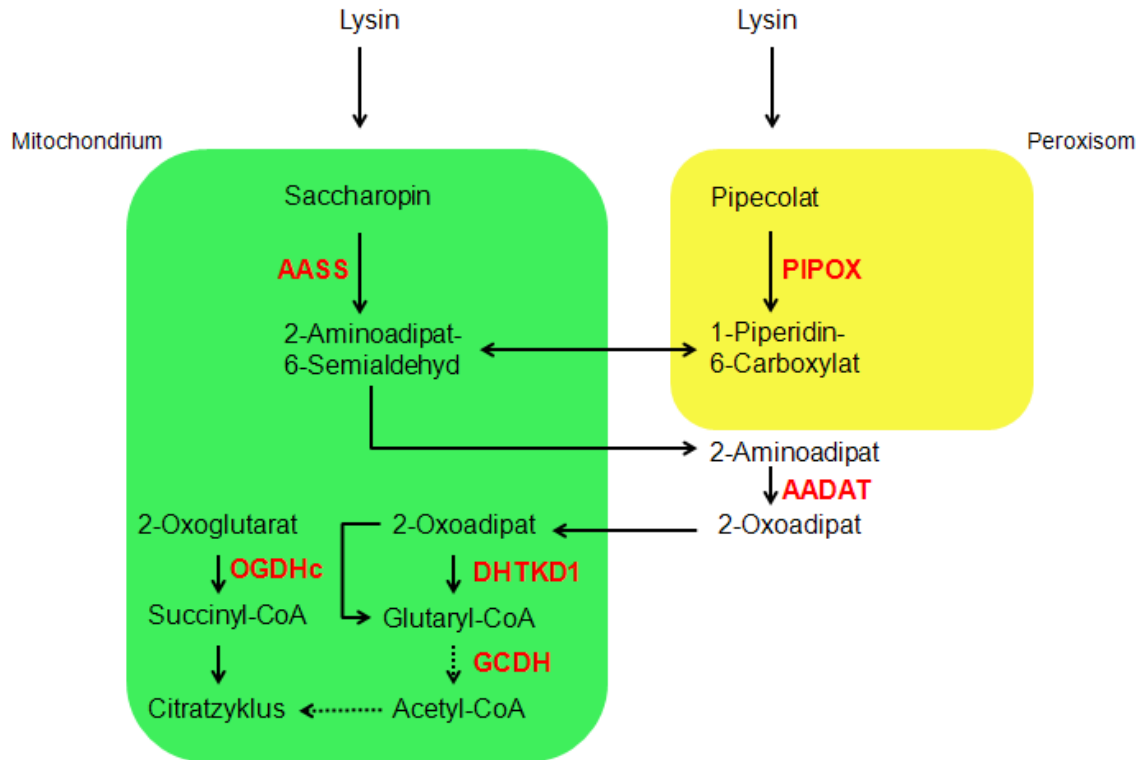


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Lysin-Abbaus. Lysin wird entweder direkt mitochondrial über den sogenannten Saccharopin-Weg abgebaut oder alternativ beginnend peroxisomal über den Pipecolinsäure-Weg. Beide Wege münden in der cytosolischen 2-Amino adipinsäure, die dann, wie im Text beschrieben, weiter abgebaut wird. PIPOX = Pipecolat-Oxidase. AADAT = 2-Amino adipat-Transaminase. AASS = 2-Amino adipat-6-Semialdehyd-Dehydrogenase. OGDHc = 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase-Komplex. DHTKD1 = E1-Untereinheit des OGDH-Komplexes. GCDH = Glutaryl-CoA-Dehydrogenase. Eigene Darstellung in Anlehnung an Cox, 2001.

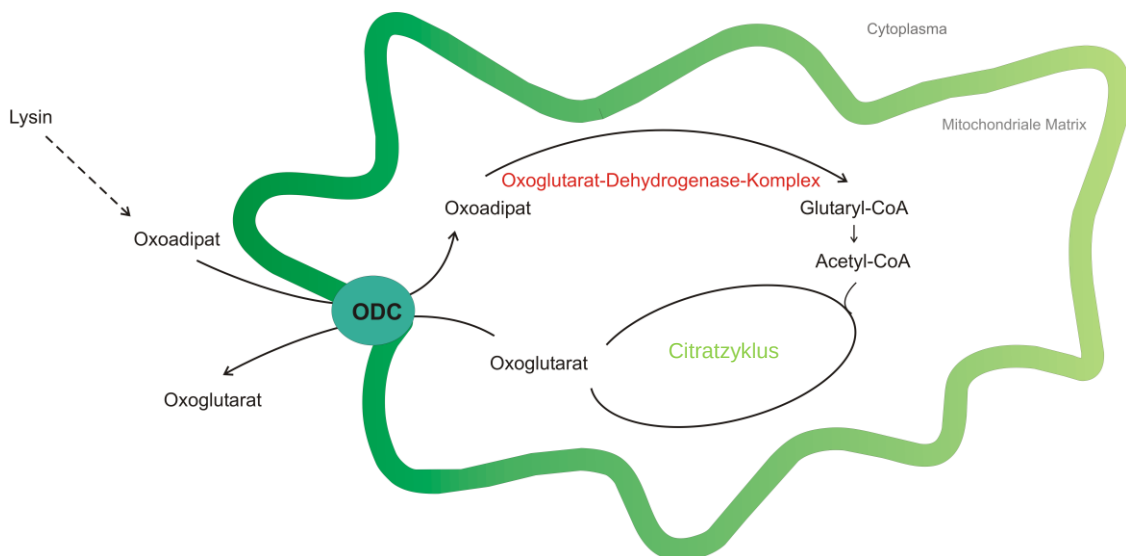


Abbildung 11: Funktion des ODC (SLC25A21). Dargestellt ist die durch ODC vermittelte Aufnahme von 2-Oxo adipat in die Mitochondrien, ein wichtiger Schritt innerhalb des Lysinabbaus. Durch den OGDH-Komplex erfolgt der Abbau von 2-Oxo adipat zu Glutaryl-CoA. Im Antiport zu 2-Oxo adipat wird 2-Oxoglutarat aus dem Mitochondrium ins Cytoplasma geschleust. Eigene Darstellung in Anlehnung an Palmieri, 2004.

1.6 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse der Expression mitochondrialer Transporter im Mausmodell der neurometabolischen Erkrankung Glutarazidurie Typ 1. Durch möglicherweise veränderte Expressionen einzelner Transporter auf mRNA- oder Proteinebene sollten Hinweise für die direkte oder indirekte Beteiligung dieser Transportmoleküle beim Transport pathologischer, bei der GA1 akkumulierender Metaboliten erlangt werden. Dies erfolgte insbesondere unter der Annahme, dass erhöhte Substratkonzentrationen zu einer erhöhten mRNA- oder Proteinexpression der beteiligten Transporter führen und so die Identifikation mitochondrialer Transporter für GA und 3OHGA möglich ist. Diese Untersuchungen sollten an unterschiedlichen Geweben (Leber, Niere, Hirnstamm und Hirncortex) von Mäusen mit und ohne induzierte metabolische Krise durchgeführt werden. Es wurden aus den bisher bekannten mitochondrialen Transportern fünf Transporter ausgewählt, die aufgrund ihrer bisher bekannten Substratspezifität oder Einbindung in GA1-assoziierte Stoffwechselwege als wahrscheinlichste Kandidaten für den Transport von GA und 3OHGA oder eine andere Beteiligung an der Pathogenese der GA1 in Betracht kamen. Die Expression dieser fünf Transporter sollte auf mRNA- und Proteinebene *Gcdh*-defizienter Mäuse und Wildtyp-Mäuse unter basalen Bedingungen und in der induzierten metabolischen Krise untersucht werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte ein neues Zellsystem für zukünftige *In-vitro*-Studien zur GCDH-Defizienz als Ergänzung zu *In-vivo*-Modellen generiert werden. Dazu sollte in immortalisierten humanen Zellen (HeLa-Zelllinie) durch Behandlung mit spezifischer siRNA die GCDH-Expression inhibiert und zunächst auf mRNA- und Proteinebene der Effekt der siRNA-Behandlung auf die GCDH-Expression überprüft werden. Anschließend sollten die Auswirkungen der siRNA-GCDH-Herabregulation auf die Expression ausgewählter Transporter untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Alle Chemikalien und Reagenzien wurden von den folgenden Firmen bezogen:

Chemikalie	Firma
3-Hydroxyglutarsäure	synthetisiert und zur Verfügung gestellt von Prof. J. Thiem, Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agar	Sigma-Aldrich, München
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Bio-Rad, München
Bradford-Lösung	Bio-Rad, München
BSA	Serva, Heidelberg
Chloroform	Sigma-Aldrich, München
Coomassie® Blue G	Serva, Heidelberg
DAPI	Roth, Karlsruhe
DEPC	Sigma-Aldrich, München
DMSO	Roth, Karlsruhe
EDTA	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München
Ethylacetat	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Glutarsäure	Sigma-Aldrich, München
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Sigma-Aldrich, München
HEPES	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	J.T. Baker, Griesheim
Luminol	Roth, Karlsruhe
Mannitol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Milchpulver	Natura Flor

Chemikalie	Firma
Mowiol®	Hochst, Frankfurt a. M.
Natrium-EDTA	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
p-Cumarinsäure	Sigma-Aldrich, München
PDA-Standard	Sigma-Aldrich, München
PFBH	Sigma-Aldrich, München
Saccharose	J.T. Baker, Griesheim
Salicylsäure	Merck, Darmstadt
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
SDS	Sigma-Aldrich, München
TEMED	Bio-Rad, München
Tissue-Solubilizer (Solvable™)	Perkin-Elmer, USA
Tri-Reagent	Sigma-Aldrich, München
Tris	Sigma-Aldrich, München
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München
Tween-20	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck, Darmstadt

2.1.2 Kits und Assays

Kit/Assay	Firma
<i>High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit</i>	Applied Biosystems, Darmstadt
<i>TaqMan® Gene Expression Assay</i>	Applied Biosystems, Darmstadt

2.1.3 TaqMan®-Primer

Gen	Protein	<i>TaqMan®-Gene Expression Assay</i>
<i>Gapdh</i>	Gapdh	Mm999999915_g1
<i>Slc25a10</i>	Dic	Mm00600198_m1
<i>Slc25a11</i>	Ogc	Mm00452509_m1
<i>Slc25a15</i>	Orc1	Mm00487854_m1
<i>Slc25a20</i>	Cac	Mm00451571_m1
<i>Slc25a21</i>	Odc	Mm00553525_m1
<i>Slc13a3</i>	NaC3	Mm00475280_m1

Gen	Protein	<i>TaqMan®-Gene Expression Assay</i>
<i>Slc22a6</i>	Oat1	Mm00456258_m1

2.1.4 Humane Primer

Spezifische siRNA	Assay-ID-Nummer	Firma
GCDH	GCDHHSS142163	Applied Biosystems, Darmstadt

2.1.5 DNA-Standards

Standard	Firma
DNA-Ladder, 100 Bp	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.6 Enzyme und Nukleotide

Enzyme	Firma
dNTP-Set	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich, München
Proteinase K	Merck, Darmstadt
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Trypsin (0,05% Trypsin/EDTA-Lösung)	GIBCO/BRL, Eggenstein

2.1.7 Proteine und Proteinstandards

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

2.1.8 Zelllinie

Zelllinie	Firma
Menschliche Cervixkarzinomzelllinie (HeLa-Zellen)	ATCC, Rockville, USA

2.1.9 Medien und Medienzusätze für die Zellkultur

Medien/Zusätze	Firma
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	GIBCO/BRL, Eggenstein
FKS (Fökales Kälberserum)	PAA, Österreich
GlutaMax™	GIBCO/BRL, Eggenstein
Lipofectamin™2000	Invitrogen, Karlsruhe
Optimem®-1 + GlutaMax™	GIBCO/BRL, Eggenstein
PBS (10x) (Phosphate-buffered saline)	GIBCO/BRL, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin 1%	GIBCO/BRL, Eggenstein
Pferdeserum	GIBCO/BRL, Eggenstein

2.1.10 Antikörper

2.1.10.1 Primäre Antikörper

Antigen (Spezies)	Referenz/Firma	Verdünnung im WB	Verdünnung in der IF
α <i>Slc25a10</i> (aus Kaninchen)	Abcam, Cambridge, UK	1:500	-
α <i>Slc25a11</i> (aus Kaninchen)	zur Verfügung gestellt von Prof. F. Palmieri, Università degli studi di Bari, Dipartimento di Bioscienze, Biotecnologie e Biofarmaceutica, Italien	1:5000	-
α <i>Slc2521</i> (aus Kaninchen)	Atlas Antibodies, Stockholm, Schweden	1:500	-

Antigen (Spezies)	Referenz/Firma	Verdünnung im WB	Verdünnung in der IF
α Gcdh (aus Maus)	zur Verfügung gestellt von Dr. M. Wootner und Prof. S. I. Goodman, University of Colorado, Health Sciences Center, Denver, USA	1:10000	1:50
α MnSOD (aus Kaninchen)	Millipore, Massachusetts, USA	1:1000	1:200
α Mab (aus Maus)	Millipore, Massachusetts, UK	-	1:50

WB: Western Blot, IF: Immunfluoreszenz

2.1.10.2 Sekundäre Antikörper

Sekundärantikörper	Firma	Verdünnung im WB
Ziege-anti-Kaninchen-IgG, HRP-gekoppelt	Dianova, Hamburg	1:5000
Ziege-anti-Maus-IgG, HRP- gekoppelt	Dianova, Hamburg	1:5000

2.1.11 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Firma
Cellophanfolie	Pütz Folien, Taunusstein
Deckgläser	Glaswarenfabrik Karl Heckt, Sondheim
Einmalküvetten	Plastibrand, Wertheim
Einwegmaterial für die Zellkultur	BD Falcon, Heidelberg Sarstedt, Nümbrecht Nunc, Wiesbaden
Einweg-Schaber	Sarstedt, Nürnberg
Filmkassetten	Rego, Augsburg
Filterschwämme	Amersham
Gel-Glasplatten	Amersham
Immersionsöl 518 C	Zeiss, Oberkochen

Verbrauchsmaterial	Firma
Kanülen	Becton Dickinson, Heidelberg
Nitrocellulosemembran	Schleicher & Schuell, Daßel
Nylon Net Filters	Millipore, UK
Objektträger	Engelbrecht, Kassel
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht Eppendorf, Hamburg Greiner, Essen
Röntgenfilme	Kodak, Stuttgart
Skalpelle	BBraun, Melsungen
Spritzen	BBraun, Melsungen
Stripes/Deckel für Real-Time-PCR	Applied Biosystems, Darmstadt
UV-Küvetten	Eppendorf, Hamburg
Whatman-Papier	Whatman, Daßel

2.1.12 Geräte

Gerät	Typ	Firma
Absaugpumpe	Miniport	SMT
Autoklav	3850 EL	Systec, Wettenberg
Blockthermostate	Rotilabo H250 TM 130-6	Roth, Karlsruhe HCL, Bovenden
Douncer	5 ml Volumen	Wheaton, USA
Eismaschine	AF 10	Scotsman, Herborn
Elektrophoresekammern	Agagel Midi Wide SE600	Biometra, Göttingen Hoefer, USA
Entwicklermaschine	Curix 60	Agfa, Leverkusen
Horizontalschüttler	Rocky	Labortechnik Fröbel, Wasserburg
Inkubationsschrank	CO ₂ -Inkubator Gasboy C20A	Sanyo Labotec, Wiesbaden
Inkubationsschüttler	Innova 4230	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Magnetrührer	MSH-basic	IKA-Werke, Staufen
Mikroskop	Fluoreszenzmikroskop: Axiovert 100	Zeiss, Oberkochen
Mikrowelle	Promicro	Whirlpool, Stuttgart
pH-Meter	MP220	Mettler Toledo, Gießen
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg

Gerät	Typ	Firma
Pipetten/Multipette		Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschmann, Eberstadt
Sterilbank	Herasafe Gelaire	Heraeus, Hanau Flow Laboratories, USA
Stickstoff-Einfriertank	Airpege 55	Air Liquide, Düsseldorf
Thermocycler	Mastercycler, Gradient Real-Time MX3000PTM Tpersonal	Eppendorf, Hamburg Stratagene, USA Biometra, Göttingen
Transferkammer	TE 50X	Hoefer, USA
Vortex	Genie 2	Scientific Industries, USA
Waagen	AC100 BP2100 S	Mettler, Toledo, Giessen Sartorius, Göttingen
Wasserbad	C 10	Schütt Labortechnik, Göttingen
Zentrifugen	Eppendorf Tischzentrifuge 5415 D Eppendorf Kühlzentrifuge, Modell 5417 Ultrazentrifuge Sorvall Discovery M 120, Rotoren: S55S, SS-34	Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Kendro Laboratory Products, Newton, Connecticut, USA

2.2 Tierexperimentelle Arbeiten

2.2.1 Mauslinien und Tierversuchsanträge

Gcdh-Knock-out-Mauslinien wurden von Prof. S. I. Goodman (University of Colorado, Denver, USA) zur Verfügung gestellt. Die Zucht erfolgte in zwei unabhängigen Hintergrundlinien (C57BL6, 129SVJ). Für die vorliegenden Experimente wurden Tiere der F₁-Generation (intern „GA exp“ genannt) aus einer Kreuzung zwischen einem C57BL6- und einem 129SVJ-Tier verwendet (*Hybrid-vigour*-Verfahren). Alle Mauslinien wurden in der zentralen Tierhaltung des Universitätsklinikums Eppendorf (UKE) in Hamburg gezüchtet. Die Genehmigungen der Behörde für Arbeit, Gesundheit und Soziales der Freien und Hansestadt Hamburg für die Tierhaltung und Tötung der Tiere zwecks Organentnahme gemäß §4 Absatz 3 TierSchG (AZ G21132/591-00.33 vom 26.09.2011) sowie zur Durchführung der in diesem Antrag beschriebenen Tierversuche (AZ 26/05 mit Genehmigung vom 02.06.2005 und Ergänzungsgenehmigung vom 01.06.2006) liegen vor.

2.2.2 Tierhaltung

Für die nachfolgend beschriebenen Experimente wurden 42 Tage alte Tiere verwendet. Bei der Tierhaltung wurde auf die Einhaltung eines Tag-/Nachtzyklus von jeweils zwölf Stunden geachtet, außerdem war den Tieren Nahrung und Flüssigkeit *ad libitum* zugänglich. Durch die Haltung im metabolischen Käfig war es möglich, die tägliche Trink- und Futtermenge zu bestimmen.

2.2.3 Hochproteindiät

Durch Gabe einer Hochproteindiät lässt sich bei *Gcdh*-defizienten Mäusen eine akute encephalopathische Krise induzieren (Keyser et al., 2008; Zinnanti et al., 2006). Die Mäuse erhielten als Futter eine Hochproteindiät mit einem Gesamtproteingehalt von 62 %, im Gegensatz zur Standardernährung mit 18% Gesamtproteingehalt (bestellt bei der Firma Harland Teklad, Indianapolis, IN, USA, Produktnummer: TD.03637).

2.2.4 Organentnahme

Für die Entnahme von Organen zur Gewinnung von RNA, Proteinen und Mitochondrien wurden die Mäuse über eine tiefe CO₂-Narkose auf Trockeneis in einem geschlossenen Gefäß betäubt und durch zervikale Dislokation getötet. Im Anschluss wurde der Thorax der Maus eröffnet und Blut mittels Herzpunktion gewonnen. Nieren, Leber und Hirn wurden unmittelbar danach herauspräpariert, in auf 4 °C gekühltem NaCl 0,9 % gewaschen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Isolierung genomischer DNA aus Schwanzspitzen für die Genotypisierung

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

Zur Genotypisierung der Mäuse wurde genomische DNA aus den Schwanzspitzen isoliert. Zunächst wurden die Schwanzspitzen über Nacht in je 500 µl Lysispuffer, 15 µl SDS-Lösung und 20 µl Proteinase-K-Lösung unter Schütteln bei 56 °C inkubiert. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 16.000 rpm und 4 °C (in der Eppendorf-Kühlzentrifuge, Modell 5417) wurde

DNA aus dem Überstand durch Zugabe von 500 µl Isopropanol präzipitiert. Nach mehrmaligem Invertieren erfolgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 20.000 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, das DNA-haltige Präzipitat mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend bei 37 °C für etwa 30 Minuten getrocknet. Das Pellet wurde in 100 µl Aqua bidest. resuspendiert und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt. Die DNA-Lösung wurde anschließend zur Genotypisierung eingesetzt.

2.3.2 Photometrische DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung

Die photometrische Messung der DNA- und RNA-Konzentration erfolgte bei 260 nm in einer UV-Küvette gegen Aqua bidest. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 31 µg/ml Oligonukleotiden.

2.3.3 Auftrennung von DNA im Agarosegel

TAE-Puffer	40 mM Tris/HCl pH 8.5 20 mM Essigsäure 2 mM EDTA
DNA-Ladepuffer	40 % Saccharose 1 mM EDTA 0,25 % Bromphenolblau

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe wurden 1–2%ige (w/v) Agarosegele verwendet. Die dazu nötige Agarosemenge wurde in Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) im Mikrowellenherd aufgekocht und nach dem Abkühlen auf 55 °C mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration: 0,5 µg/ml). Nach Gießen und Abkühlen des Geles wurden die Proben mit DNA-Ladepuffer versehen und aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 3–4 V/cm durchgeführt. Durch das in die DNA eingelagerte Ethidiumbromid konnten die DNA-Fragmente durch UV-Licht als Bande visualisiert werden. Zur Dokumentation wurde das Agarosegel auf dem UV-Transilluminator mit einer Digitalkamera aufgenommen.

2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) handelt es sich um eine Methode, mit der sich definierte DNA-Fragmente mit Hilfe der thermostabilen DNA-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermophilus aquaticus* (Taq) amplifizieren lassen. Die Amplifikation umfasst 30 Zyklen, wobei sich ein Zyklus aus einer Denaturierung über 15 Sekunden bei 94°C, einer Primerhybridisierung über 1 Minute bei 63°C und einer Elongation über 1 Minute bei 72°C zusammensetzt.

Als Template wurde DNA verwendet, die aus Schwanzspitzen aufgereinigt worden war. Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte in einem Thermocycler:

DNA-Template	<i>Gcdh</i> -Primer 3' und 5' (Stocklösung: 10 pmol/μl)	dNTP (Stocklösung: 10 mM je Nukleotid)	10 × PCR- Puffer	<i>Taq</i> - Polymerase (Stocklösung: 5 U/μl)	H ₂ O
50 ng	je 2,5 μl	2 μl	5 μl	1 μl	ad 50 μl

Bei jeder PCR wurde eine H₂O-Kontrolle ohne DNA-Template mitgeführt.

Zur Genotypisierung von *Gcdh*-defizienten Mäusen mittels PCR wurden folgende Primer von der Firma MWG Biotech synthetisiert:

Primer	Sequenz
GA1-wt-for	5' – CTT CCG TAA CTA CTG GCA GGA GCG G – 3'
GA1-wt-rev	5' – AGC TCT CGG GTC AGA AGC CCA TAG G – 3'
GA1-ko-wt	5' – TTA GGC CTA GTG TGC TGG TCC CGG A – 3'
GA1-ko-rev	5' – TCT GGT GCC GGA AAC CAG GCA AAG C – 3'

2.3.5 RNA-Isolierung aus Gewebe und Zellen

Für die Isolierung von RNA aus Gewebe (Niere, Leber, Hirncortex oder Hirnstamm) wurde das Gewebe zunächst mit einem Skalpell zerkleinert. Nach Zugabe von 1 ml TRI-Reagent pro 100 mg Gewebe wurde das Gewebe mit dem *Dounce-Homogenizer* homogenisiert und das Homogenat 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 μl Chloroform pro 1 ml TRI-Reagent musste das Homogenat 15 Sekunden auf dem Vortexer vermischt und anschließend 15 Minuten erneut bei Raumtemperatur inkubiert werden. Nun erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 12.000 g. Danach wurde die oberste der drei Phasen – in der sich die RNA befindet – abpipettiert und RNA durch Zugabe von 500 μl Isopropanol pro 1 ml TRI-Reagent präzipitiert. Das Gemisch wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach 10 Minuten bei 4 °C und 12.000 g zentrifugiert, wodurch die RNA pelletiert werden konnte. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen, das RNA-haltige Pellet in 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und erneut 10 Minuten bei 4 °C und 12.000 g abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet erneut wie beschrieben gewaschen: Überstand abnehmen, Ethanol-Zugabe und Zentrifugation. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet an der Luft getrocknet. Anschließend erfolgte die Zugabe von 30 μl DEPC-H₂O, die Resuspension der RNA-Pellets und die photometrische Messung der RNA-Konzentration bei 260 nm. Die isolierte RNA wurde bei -80 °C aufbewahrt.

2.3.6 Synthese von cDNA

RNA kann im Rahmen einer PCR nicht amplifiziert werden, da sie keine geeignete Matrize für die Polymerase darstellt. Daher ist es nötig, in einem Zwischenschritt zunächst eine zur RNA komplementäre cDNA zu synthetisieren. Dies geschieht mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase. Die entstehende cDNA dient als Ausgangsmatrize für die Amplifikation mittels PCR.

Die cDNA wurde mit Hilfe des *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* nach Angaben des Herstellers synthetisiert.

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

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

2.3.7 Quantitative *Real-time*-PCR

Bei der *Real-time*-PCR handelt es sich um eine PCR-Methode, bei der während der exponentiellen Phase der PCR die Menge der amplifizierten cDNA-Produkte in Echtzeit gemessen werden kann. Dabei erfolgt die Messung der Produktzunahme anhand von Fluoreszenzsignalen. Für die quantitative Analyse der RNA-Expression in den verschiedenen Geweben (Niere, Leber, Hirncortex und Hirnstamm) wurden *TaqMan® Gene Expression Assays* der Firma *Applied Biosystems* als Primer verwendet. Es wurden 7 µl H₂O mit 10 µl Universal-PCR-Mastermix und 1 µl der Gen-spezifischen Primerlösung (*TaqMan Assays*) vermischt. Anschließend wurden 2 µl der synthetisierten cDNA beigemischt und der Reaktionsansatz (jeweils Triplikate) für 40 Zyklen in den Mx3000P-*Thermocycler* gegeben. Pro Zyklus – bestehend aus einer 30sekündigen Denaturierung bei 95 °C und einer 60-sekündigen Primerhybridisierung und Elongation bei 60 °C – wird jede Matrize einmal repliziert. Die verwendeten Oligonukleotide sind 5'-terminal mit einem Reporterfluorophor und 3'-terminal mit einem Quencher markiert. In der Phase der Verlängerung eines Primers trifft die Taq-DNA-Polymerase auf die Sonde, die dann durch die endonukleolytische Aktivität des Enzyms hydrolysiert wird. Dadurch wird der Reporterfluorophor räumlich vom Quencher getrennt und kann nach Anregung fluorometrisch gemessen werden. Während der ersten Zyklen einer *Real-time*-PCR bleibt die gemessene Fluoreszenz aufgrund der zu gering amplifizierten Produktmengen unverändert, in der exponentiellen Phase jedoch wird dann der *cycle of threshold*, der CT-Wert, ermittelt. Der CT-Wert definiert den Zyklus, in dem erstmals ein exponentieller Anstieg des PCR-Produktes auftritt. Zur weiteren Auswertung der relativen RNA-

Quantifizierung dient dann die $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001), bei der die Differenz zwischen dem CT-Wert des sogenannten *gene of interest* und des Kontrollgens (*Gapdh*) gebildet wird. Die relative Expression $2^{-\Delta\Delta CT}$ wurde aus dem Vergleich von Wildtyp-Tieren und *Gcdh*-defizienten-Tieren ermittelt. Die relative Expression der Kontrolltiere (Wildtyp-Tiere unter Normaldiät oder Hochproteindiät) wurde gleich 1 gesetzt.

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Isolierung von Mitochondrien aus Gewebe

Zur Analyse mitochondrialer Transportproteine mittels Western Blot wurden die Mitochondrien über verschiedene Methoden zur subzellulären Fraktionierung angereichert.

2.4.1.1 Isolierung von Mitochondrien mittels sequentieller Zentrifugation

(nach Graham, 2001a)

Isolationspuffer:	zu 250 ml H ₂ O hinzufügen:	} einstellen auf pH 7.4, auffüllen mit H ₂ O auf 500 ml
	18,2 g Mannitol (0,2 M)	
	8,55 g Sucrose (50 mM)	
	0,37 g KCl (10 mM)	
	5,0 ml 100 mM Na ₂ EDTA (1 mM)	
	50 ml 100 mM HEPES (10 mM)	

Zur Herstellung eines Homogenats wurde das Gewebe, das entweder frisch entnommen wurde oder bei -80°C eingefroren war, zunächst zur Säuberung in 3 ml 4 °C kalten Isolationspuffer (etwa 1 ml pro 100 mg Gewebe) aufgenommen. Anschließend wurde der Puffer abgegossen und das Gewebe mit einer Schere zerkleinert. Es erfolgte die erneute Aufnahme in 3 ml Isolationspuffer, in dem dann die Gewebestückchen absanken. Das Medium wurde abpipettiert, es wurden wieder 3 ml Isolationspuffer hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Homogenisierung des Gewebes im *Dounce-Homogenizer* mittels 5 Hüben mit dem „loose“- und 10 Hüben mit dem „tight“-Pistill. Um aus diesem Homogenat die Zellkerne zu entfernen, folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 1000 × g und 4 °C. Der Überstand wurde aspiriert, in neue *Falcon-Tubes* übertragen und 10 Minuten bei 3000 × g und 4 °C zentrifugiert, um die Zellorganellen inklusive der Mitochondrien abzuzentrifugieren. Der Überstand dieser Zentrifugation (entsprechend dem Cytoplasma) wurde abpipettiert und verworfen. Es erfolgte eine Resuspension des Pellets mit 3 ml Isolationspuffer. Anschließend erfolgte eine erneute Homogenisierung mit dem *Dounce-Homogenizer* mittels 4 Hüben mit dem „tight“-Pistill sowie eine erneute Zentrifugation für 10 Minuten bei 3000 × g und 4 °C. Diese sequentielle Homogenisierung und anschließende Abzentrifugation bei 3000 × g wurde zwei Mal wiederholt. Das Pellet mit den angereicherten Mitochondrien wurde in 200 µl Isolationspuffer aufgenommen. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels

Bradford-Assay. Die frisch isolierten Mitochondrien wurden nun direkt zur Western-Blot-Analyse weiterverwendet.

2.4.1.2 Isolierung von Mitochondrien mittels diskontinuierlichen Percoll Gradienten

(nach Graham, 2001b)

Isolationspuffer:	zu 100 ml H ₂ O hinzufügen:	} einstellen auf pH 7.4, auffüllen mit H ₂ O auf 200 ml
	7,64 g Mannitol (0,21 M)	
	4,1 g Sucrose (60 mM)	
	0,15 g KCl (10 mM)	
	2,0 ml 1M HEPES-KOH (10 mM)	

Für diese Methode wurde ebenfalls frisches oder tiefgefrorenes Gewebe verwendet, das zunächst in 4 °C kaltem Isolationspuffer gesäubert wurde. Um ein 10–20%iges Homogenat zu erhalten, wurde das entsprechende Organ gewogen und die jeweils erforderliche Puffermenge berechnet. Das Gewebe wurde mit einer Schere zerkleinert und die Gewebestückchen in der berechneten Menge an Isolationspuffer aufgenommen und erneut gewaschen. Anschließend wurde die Flüssigkeit abpipettiert und das Gewebe erneut in Puffer aufgenommen. Nun erfolgte die Homogenisierung des Gewebes im *Dounce-Homogenizer* mittels 5 Hüben mit dem „loose“- und 10 Hüben mit dem „tight“-Pistill. Zum Abtrennen der Zellkerne wurde das Homogenat zunächst 5 Minuten bei 1000 g und 4 °C zentrifugiert. Der postnukleare Überstand wurde anschließend abgenommen und weiterverwendet, das Pellet konnte verworfen werden. In 12-ml-*Tubes* wurden nun nacheinander folgende Lösungen vorsichtig übereinanderpipettiert: 3 ml 52%-Percoll-Lösung (Mischung aus einer Percoll-Stock-Lösung und dem Isolationspuffer), 2 ml 42%-Percoll-Lösung, 2 ml 31%-Percoll-Lösung, 2 ml 19%-Percoll-Lösung und 2 ml des postnuklearen Überstandes. Anschließend wurde dieser aufpipettierte diskontinuierliche Gradient 30 Sekunden bei 36000 × g und 4 °C zentrifugiert. Während dieser Zentrifugation bildeten sich verschiedene Fraktionen, wobei die Mitochondrien-haltige Fraktion der niedrigsten Interphase entsprach. Die darüber befindlichen Fraktionen wurden vorsichtig abgenommen, um dann die reine Mitochondrien-Phase zu gewinnen. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay wurde die Mitochondrien-Fraktion im Verhältnis 1:5 mit dem Aufnahmepuffer verdünnt und die Mitochondrien bei 17000 g und 4 °C über 10 Minuten abzentrifugiert, um sie von der Percoll-Lösung zu trennen. Nach Verwerfen des Überstandes wurde die Proteinkonzentration im Mitochondrien-haltigen Pellet bestimmt. Die Zielproteinkonzentration lag bei 2,5 µg/µl. Abhängig von der mittels Bradford-Assay ermittelten Proteinkonzentration erfolgte eine entsprechende Verdünnung des finalen Pellets mit Isolationspuffer. Die frisch isolierten Mitochondrien wurden dann direkt zur Western-Blot-Analyse weiterverwendet.

Nach dem Testen der verschiedenen Isolationsmethoden zeigte sich hinsichtlich der Mitochondrien-Aufreinigung die beste Ausbeute mit dem in 2.4.1.1 beschriebenen Verfahren, so

dass für die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse ausschließlich diese Isolationsmethode angewendet wurde.

2.4.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte nach dem Verfahren von Bradford (1976), bei dem die Verschiebung des Adsorptionsmaximums von Coomassie-Blue bei einer Wellenlänge von 595 nm genutzt wird. Um eine Eichgerade zu erstellen, wurden jeweils 1, 2, 4, 8, 12 und 15 µl einer Standardlösung von BSA mit einer Konzentration von 1 mg/ml mit H₂O auf 800 µl verdünnt. Von den Proben mit unbekannter Konzentration wurden für die Verdünnung 1–20 µl eingesetzt, wobei stets Doppelwerte angefertigt wurden. Dann wurden die Proben mit Bradford-Reagenz (BioRad Protein Assay) auf 1 ml aufgefüllt, gevortext und nach 15 Minuten die Adsorption bei 595 nm gemessen. Anhand der gemessenen Adsorptionswerte wurde eine Eichgerade erstellt, an der schließlich die Bestimmung der unbekannten Proteinkonzentrationen erfolgte.

2.4.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach der modifizierten Methode von Laemmli (1970). Die Auftrennung in großen Gelen erfolgte bei Raumtemperatur und 55 mA/Gel für etwa zwei Stunden.

Sammelgel	4 % Acrylamid 0,1 M Tris/HCl pH 6.8 0,1 % SDS 0,1 % APS 0,1 % TEMED
Trenngel	10 % Acrylamid 0,375 M Tris/HCl pH 8.8 0,1 % SDS 0,016 % APS 0,08 % TEMED
Solubilisierungspuffer (2×)	250 mM Tris/HCl pH 6.8 2 % SDS 20 % Glycerin Coomassie® Blue G
Anodenpuffer	25 mM Tris/HCl pH 8.6 192 mM Glycin
Kathodenpuffer	25 mM Tris/HCl pH 8.6 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS

2.4.4 Western-Blot-Analyse

Zur spezifischen Detektion nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurde ein Western Blot durchgeführt. Dazu wurden die Proteine zunächst auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert.

2.4.4.1 Proteintransfer auf Nitrocellulosemembran

Transferpuffer:	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % Methanol
Blockpuffer:	1 × PBS 0,2 % Tween 20 5 % Milchpulver
Waschpuffer:	1 × PBS 0,2 % Tween 20

Zu Beginn wurden Whatman-Filter und eine Nitrocellulosemembran in der Größe des Gels ausgeschnitten und für 15 Minuten in Transferpuffer vorinkubiert. Das Naß-Blot-Modul wurde dann gemäß der Herstellerangaben zusammengebaut und in die mit Transferpuffer gefüllte Blotkammer eingesetzt. Die Proteine wurden dann für 90 Minuten bei einer Stromstärke von 900 mA vom Polyacrylamidgel auf die Nitrocellulosemembran transferiert. Im Anschluss erfolgte die Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen auf dem Blot durch Inkubation mit Blockpuffer für 60 Minuten bei Raumtemperatur.

2.4.4.2 Antikörperinkubationen

Nach dem Blockieren wurden die Blots zunächst dreimalig mit dem oben dargestellten Waschpuffer gewaschen und anschließend bei 4 °C über Nacht mit dem Primärantikörper (verdünnt in Blockpuffer) inkubiert. Im Anschluss erfolgten ein erneuter Waschgang und schließlich die Inkubation bei Raumtemperatur für 60 Minuten mit dem Sekundärantikörper (ebenfalls in Blockpuffer verdünnt). Vor der Detektion mittels ECL erfolgte ein erneuter Waschgang.

Tabelle 3: Primärantikörper und ihre Inkubations- und Waschbedingungen

Antikörper	Spezies	Inkubation	Waschen
α Slc25a10	Kaninchen	1:500 in Blockpuffer bei 4 °C über Nacht	3 × 10 Minuten mit Waschpuffer
α Slc25a11	Kaninchen	1:5000 in Blockpuffer bei 4 °C über Nacht	3 × 10 Minuten mit Waschpuffer
α Slc25a21	Kaninchen	1:500 in Blockpuffer bei 4 °C über Nacht	3 × 10 Minuten mit Waschpuffer
α Gcdh	Maus	1:10000 in Blockpuffer bei 4 °C über Nacht	3 × 10 Minuten mit Waschpuffer
α MnSOD	Kaninchen	1:1000 in Blockpuffer bei 4 °C über Nacht	3 × 10 Minuten mit Waschpuffer

Tabelle 4: Sekundärantikörper und ihre Inkubations- und Waschbedingungen

Antikörper	Spezies	Inkubation	Waschen
Anti-Kaninchen-HRP	Ziege	1:5000 in Blockpuffer für 1 h bei Raumtemperatur	3 × 10 Minuten mit Waschpuffer
Anti-Maus-HRP	Ziege	1:5000 in Blockpuffer für 1 h bei Raumtemperatur	3 × 10 Minuten mit Waschpuffer

2.4.4.3 Detektion mittels ECL

Die spezifischen Banden wurden durch Umsetzung des ECL-Reagenzes in einen fluoreszierenden Farbstoff mittels der an die Sekundärantikörper gekoppelten Meerrettichperoxidase sichtbar gemacht. Das Fluoreszenzsignal wurde entweder analog durch Auflegen eines Filmes oder digital mit einer *ChemIDoc*-Kamera erfasst.

Lösung 1
 2,7 mM Luminol
 0,44 mM p-Cumarinsäure
 111 mM Tris/HCl pH 8.5
 ad 10 ml H₂O

Lösung 2
 6 μ l 30 % H₂O₂
 0,1 mM Tris/HCl pH 8.5
 ad 10 ml H₂O

Zum Entwickeln der Blots mit Detektion der Banden wurden Lösung 1 und 2 frisch angesetzt und unmittelbar vor dem Entwickeln in einem Verhältnis von 1:1 gemischt. Der zu entwickelnde Blot wurde drei Minuten darin inkubiert. Anschließend wurde die Membran zwischen zwei Klarsichtfolien positioniert und ein Röntgenfilm aufgelegt. Dieser Film wurde nach geeigneter

Expositionszeit entwickelt. Alternativ wurden die Signale mit einer *Chemi-Doc*-Kamera aufgenommen und gespeichert.

Jeder Western Blot ($n = 3$) wurde zwei Mal wiederholt. Es erfolgte die densitometrische Auswertung der einzelnen Banden, im Anschluss daran wurden die Mittelwerte der Fluoreszenzsignale ermittelt. Es wurde festgelegt, dass bei gemessenen Werten der densitometrischen Auswertung $> 130 \%$ eine Steigerung auf Proteinebene vorliegt, bei Werten $< 70\%$ eine Reduktion.

2.5 Zellbiologische Methoden

2.5.1 Kultivierung von Zelllinien

Die Kultivierung erfolgte bei 37°C , 85% Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2 . HeLa-Zellen wurden in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) + GlutaMax™ + 10% FKS (fötales Kälberserum) und 1% Pen-Strep-Mix (Penicillin-Streptomycin-Mix) kultiviert. Die Zellen wurden zwei Mal pro Woche passagiert, um ein Absterben durch eine zu hohe Zelldichte zu verhindern.

2.5.2 Trypsinieren von Zellen

Um adhärente Zellen vom Boden der Kulturschalen zu lösen und um die Zellen zu vereinzeln, wurden diese trypsinisiert. Um Trypsininhibitoren aus dem FKS zu entfernen, wurden die Zellen zunächst mit PBS gespült. Anschließend wurde das PBS abgesaugt und die Zellen zwei bis fünf Minuten mit Trypsin bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von FKS-haltigem Medium wurde die Trypsin-Reaktion gestoppt und die Zellen konnten nun durch Aspiration mit einer Pipette neu ausgesät werden. HeLa-Zellen wurden in Kulturschalen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von etwa 80% kultiviert.

2.5.3 Lipofektion von HeLa-Zellen mit GCDH-spezifischer siRNA

Die Lipofektion der HeLa-Zellen zur gezielten GCDH-spezifischen siRNA-Herabregulation erfolgte mit dem Reagenz Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, Karlsruhe) über vier Tage:

Tag 1: Am ersten Tag wurden 5×10^5 Zellen/ml in 6-cm-Kulturschalen ausgesät und transfiziert, sobald eine Konfluenz von $50\text{--}80 \%$ erreicht war. Zwischenzeitlich wurde ein Transfektionsansatz erstellt: $8 \mu\text{l}$ siRNA (GCDH-spezifische siRNA, Assay-ID-Nr. GCDHHSS142163, Applied Biosystems, Darmstadt) wurden in $500 \mu\text{l}$ Opti-MEM und $8 \mu\text{l}$ Lipofectamine-Reagenz in ebenfalls $500 \mu\text{l}$ Opti-MEM pipettiert, die beiden Ansätze vereinigt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Erreichen der oben beschriebenen Konfluenz wurden die Zellen mit PBS gewaschen und pro 6-cm-Kulturschale 4 ml DMEM-

Medium (ohne Penicillin-Streptomycin-Mix) hinzugefügt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe des Transfektionsansatzes.

Tag 2: 24 Stunden nach der ersten Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel, wobei das alte Medium gegen DMEM-Medium mit Penicillin-Streptomycin-Mix ausgetauscht wurde.

Tag 3: Weitere 24 Stunden später erfolgte die zweite Transfektion, die wie an Tag 1 durchgeführt wurde.

Tag 4: Nach abermals 24 Stunden wurden die Zellen geerntet, die Gesamt-RNA isoliert und für weitere Versuche verwendet.

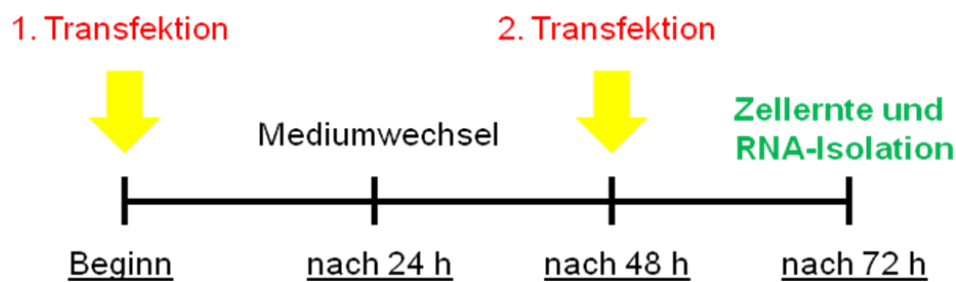


Abbildung 12: Zeitlicher Ablauf der Lipofektion von HeLa-Zellen mit GCDH-spezifischer siRNA.

2.5.4 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Zunächst wurde eine 12-Well-Gewebekulturschale mit sterilen Deckgläschen ausgelegt. Dann wurden die HeLa-Zellen wie in 2.5.1 dargestellt ausgesät. Am darauffolgenden Tag erfolgte die erste Transfektion, 48 Stunden später die zweite. 96 Stunden nach der ersten Transfektion wurde die Immunfluoreszenz-Analyse durchgeführt: Dazu wurden die Zellen für 10 Minuten bei Raumtemperatur in 4 % Paraformaldehyd fixiert und anschließend mit PBS gewaschen. Die Plasmamembranen der Zellen wurde mit einer 0,1%igen Triton-X-100-Lösung für 5 Minuten permeabilisiert und zur Absättigung von unspezifischen Proteinbindungsstellen für 30 Minuten in 2 % FKS geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit dem jeweiligen Primärantikörper für eine Stunde. Daraufhin wurden die Proben dreimal 5 Minuten mit PBS gewaschen und für weitere 60 Minuten mit den entsprechenden Sekundärantikörpern inkubiert.

Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen zur Anfärbung der Zellkerne für 5 Minuten in einer DAPI-Lösung (Verdünnung 1:1000 in PBS) inkubiert und danach erneut zweimal mit PBS gewaschen. Ein nachfolgender kurzer Waschgang mit Wasser wurde durchgeführt, um eventuelle Salze zu entfernen. Mittels eines Tropfens Mowiol wurden die Deckgläser auf den Objektträgern fixiert und über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln getrocknet.

Am nächsten Tag erfolgte die Untersuchung mit dem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop. Bei Doppel-Immunfluoreszenzanalysen erfolgte nach Einzelaufnahme der Fluoreszenz-Signale eine Überlagerung der digitalen Bilder mit Hilfe der Software Adobe Photoshop.

2.6 Statistik

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der Software SPSS 18.0. Die Signifikanz von Haupteffekten (und deren Interaktionen) wurde anhand eines allgemeinen linearen Modells überprüft. Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen (beispielsweise bei Expressionsuntersuchungen mit der *Real-time*-PCR) wurden mit dem *Least-Significant-Difference*-Test mit den geschätzten Mittelwerten und Standardfehlern der dCT-Werte (deltaCT-Werte) überprüft. Eine Signifikanz wurde ab einem p-Wert $\leq 0,05$ angenommen, ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde in den Abbildungen mit zwei, ein p-Wert $\leq 0,01$ mit drei Sternen gekennzeichnet.

2.6.1 Beispielhafte statistische Auswertung einer *Real-time*-PCR anhand der Genexpression von *Slc25a10* im Lebergewebe von Mäusen

Die beispielhafte Auswertung einer *Real-time*-PCR-Analyse ist im Folgenden anhand der Genexpression von *Slc25a10* im Maus-Lebergewebe dargestellt, alle weiteren untersuchten Gene wurden gleichermaßen analysiert. Mittels *Real-time*-PCR wurde für jede Versuchsbedingung (Wildtyp unter Normaldiät, WT-ND; Wildtyp unter Hochproteindiät, WT-HPD; *Gcdh*^{-/-} unter Normaldiät, *Gcdh*^{-/-}-ND; *Gcdh*^{-/-} unter Hochproteindiät, *Gcdh*^{-/-}-HPD) bei jeweils drei Tieren die Genexpression im Lebergewebe untersucht. Es wurden Dreifach-Bestimmungen der CT-Werte (*cycle threshold*) des „*gene of interest*“ (in diesem Fall: *Slc25a10*) sowie des sogenannten „*housekeeping*“-Gens (in diesem Fall: *Gapdh*) durchgeführt. Im Anschluss wurden die Differenzen der CT-Werte gebildet (CT-Wert des „*gene of interest*“ minus CT-Wert des „*housekeeping*“-Gens = Delta-CT-Wert (dCT-Wert)) und diese dann arithmetisch gemittelt.

Tabelle 5: dCT-Werte von *Slc25a10* („gene of interest“) und *Gapdh* („housekeeping“-Gen) im Lebergewebe von Mäusen

	dCT-Wert
Wildtyp Normaldiät Tier Nr. 1	3,21
Wildtyp Normaldiät Tier Nr. 2	2,75
Wildtyp Normaldiät Tier Nr. 3	3,35
Wildtyp Hochproteindiät Tier Nr. 1	2,29
Wildtyp Hochproteindiät Tier Nr. 2	2,34
Wildtyp Hochproteindiät Tier Nr. 3	2,78
<i>Gcdh</i> ^{-/-} Normaldiät Tier Nr. 1	2,79
<i>Gcdh</i> ^{-/-} Normaldiät Tier Nr. 2	3,57
<i>Gcdh</i> ^{-/-} Normaldiät Tier Nr. 3	1,79
<i>Gcdh</i> ^{-/-} Hochproteindiät Tier Nr. 1	2,29
<i>Gcdh</i> ^{-/-} Hochproteindiät Tier Nr. 2	2,37
<i>Gcdh</i> ^{-/-} Hochproteindiät Tier Nr. 3	2,03

Die dCT-Werte wurden mit SPSS 18.0 mittels eines allgemeinen linearen Modells analysiert. Die nachfolgenden Tabellen listen die Schätzungen der Mittelwerte von den dCT-Werten auf. Geschätzte Mittel werden dabei für die ausgewählten Faktoren (Genotyp und Diät) und Wechselwirkungen zwischen den Faktoren (Genotyp × Diät) berechnet. Die Prüfung der Mittelwertdifferenzen der Gruppen erfolgt auf Basis der Schätzung der geringsten signifikanten Differenz mittels des Least-Significant-Difference-Tests. Die Konfidenzintervalle stellen geschätzte Wahrscheinlichkeitsbereiche dar, wonach mit 95%iger Wahrscheinlichkeit die möglichen Mittelwerte innerhalb der Unter- und Obergrenzen liegen.

1. Genotyp:

Tabelle 6: Mittelwerte, Standardfehler und 95 % Konfidenzintervalle der dCT-Werte.

Genotyp	Mittelwert der dCT-Werte	Standardfehler	95 %-Konfidenzintervall	
			Untergrenze	Obergrenze
Wildtyp	2,787	0,132	2,532	3,070
<i>Gcdh</i> ^{-/-}	2,474	0,128	2,212	2,734

Tabelle 7: Paarweise Vergleiche (abhängige Variable: dCT) mittels LSD (Least-Significant-Difference)-Test zwischen Wildtyp und *Gcdh* (unabhängig von der Diät).

Genotyp (I)	Genotyp (J)	Mittlere Differenz (I - J)	Standardfehler	Signifikanz	95 %-Konfidenzintervall für die Differenz	
					Untergrenze	Obergrenze
Wildtyp	<i>Gcdh</i> ^{-/-}	0,328	0,184	0,084	-0,047	0,703
<i>Gcdh</i> ^{-/-}	Wildtyp	-0,328	0,184	0,084	-0,703	0,047

2. Diät:

Tabelle 8: Mittelwerte, Standardfehler und 95 % Konfidenzintervalle der dCT-Werte.

Diät	Mittelwert der dCT-Werte	Standardfehler	95 %-Konfidenzintervall	
			Untergrenze	Obergrenze
Normaldiät	2,910	0,132	2,642	3,180
Hochproteindiät	2,350	0,128	2,102	2,624

Tabelle 9: Paarweise Vergleiche (abhängige Variable: dCT) mittels LSD (Least-Significant-Difference)-Test zwischen Normaldiät und Hochproteindiät (unabhängig vom Genotyp), ND = Normaldiät, HPD = Hochproteindiät.

Diät (I)	Diät (J)	Mittlere Differenz (I - J)	Standardfehler	Signifikanz	95 %-Konfidenzintervall für die Differenz	
					Untergrenze	Obergrenze
ND	HPD	0,548	0,184	0,006	0,173	0,923
HPD	ND	-0,548	0,184	0,006	-0,923	-0,173

3. Genotyp × Diät:

Tabelle 10: Mittelwerte, Standardfehler und 95 % Konfidenzintervalle der dCT-Werte.

Genotyp	Diät	Mittelwert der dCT-Werte	Standardfehler	95 %-Konfidenzintervall	
				Untergrenze	Obergrenze
Wildtyp	Normaldiät	3,103	0,192	2,712	3,496
	Hochprotein-diät	2,470	0,181	2,128	2,867
<i>Gcdh</i> ^{-/-}	Normaldiät	2,717	0,181	2,348	3,087
	Hochprotein-diät	2,230	0,181	1,858	2,597

Im Folgenden wurden dann die Gruppen Wildtyp Hochproteindiät gegen Wildtyp Normaldiät, *Gcdh*^{-/-} Normaldiät gegen Wildtyp Normaldiät sowie *Gcdh*^{-/-} Hochproteindiät gegen *Gcdh*^{-/-} Normaldiät untersucht und die relativen Expressionen dieser Vergleiche berechnet. Für die Berechnung der relativen Expressionen wurden die geschätzten Mittelwerte und die Standardfehler der dCT-Werte mit Hilfe der ddCT-Methode (Livak und Schmittgen, 2001) umgerechnet, die Ermittlung der Unter- und Obergrenzen erfolgte anhand der unten dargestellten Formel.

Tabelle 11: Berechnung der relativen Expressionen und der 95 % Konfidenzintervalle mit der ddCT^{}-Methode.**

Versuchsbedingung	versus	Relative Expression	Standardfehler	95 %-Konfidenzintervall	
				Untergrenze*	Obergrenze*
Wildtyp Hochproteindiät	Wildtyp Normaldiät	1,621	0,150	1,277	1,965
<i>Gcdh</i> ^{-/-} Normaldiät	Wildtyp Normaldiät	1,500	0,357	0,654	2,345
<i>Gcdh</i> ^{-/-} Hochproteindiät	<i>Gcdh</i> ^{-/-} Normaldiät	1,569	0,251	0,990	2,147

* Die Unter- und Obergrenze wurde anhand der folgenden Formel ermittelt:

$$2^{(-ddCT \pm 1,96 \sqrt{\text{Standardabweichung 1}^2 + \text{Standardabweichung 2}^2})}$$

** ddCT-Werte = Differenzen der geschätzten dCT-Mittelwerte der zu vergleichenden Gruppen.

Gemäß Tabelle 12 zeigten sich signifikante Expressionsunterschiede zwischen Wildtyp-Mäusen unter Normaldiät und unter Hochproteindiät (Signifikanz 0,029) und zwischen Wildtyp-Mäusen unter Normaldiät und *Gcdh*^{-/-}-Mäusen unter Hochproteindiät (Signifikanz 0,002) mit einem p-Wert < 0,05.

Tabelle 12: Paarweise Vergleiche mit LSD-Test zwischen Wildtyp unter Normaldiät und Wildtyp unter Hochproteindiät, Wildtyp unter Normaldiät und *Gcdh*^{-/-} unter Normaldiät, Wildtyp unter Normaldiät und *Gcdh*^{-/-} unter Hochproteindiät, Wildtyp unter Hochproteindiät und *Gcdh*^{-/-} unter Normaldiät, Wildtyp unter Hochproteindiät und *Gcdh*^{-/-} unter Hochproteindiät.

Genotyp und Diät (I)	Genotyp und Diät (J)	Mittlere Differenz (I - J)	Signifikanz	95 %- Konfidenzintervall für die Differenz	
				Unter- grenze	Ober- grenze
Wildtyp Normaldiät	Wildtyp Hochproteindiät	0,633	0,029	0,068	1,144
Wildtyp Normaldiät	<i>Gcdh</i> ^{-/-} Normaldiät	0,386	0,154	-0,152	0,924
Wildtyp Normaldiät	<i>Gcdh</i> ^{-/-} Hochproteindiät	0,873	0,002	0,338	1,414
Wildtyp Hochproteindiät	<i>Gcdh</i> ^{-/-} Normaldiät	-0,247	0,397	-0,742	0,302
Wildtyp Hochproteindiät	<i>Gcdh</i> ^{-/-} Hochproteindiät	0,240	0,300	-0,252	0,792
<i>Gcdh</i> ^{-/-} Normaldiät	<i>Gcdh</i> ^{-/-} Hochproteindiät	0,487	0,065	-0,032	1,012

Die errechneten relativen Expressionen wurden graphisch mit einem Balkendiagramm dargestellt.

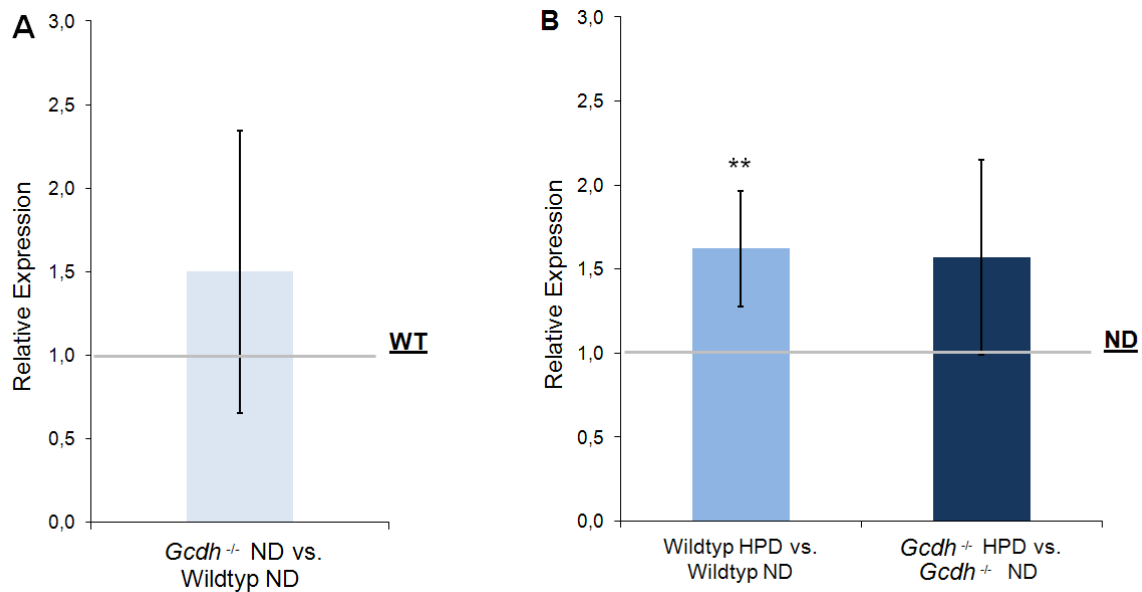


Abbildung 13: Relative *Slc25a10*-mRNA-Expression im **Lebergewebe**. Dargestellt ist die relative Expression im Vergleich zur angegebenen Vergleichsgruppe, die Fehlerbalken markieren das 95%-Konfidenzintervall. Grauer Querbalken: Expression in der Vergleichsgruppe, definiert als 1. **A** Expression bei *Gcdh*^{-/-}-Mäusen unter ND im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen unter ND (jeweils n = 3). **B** Expression bei Wildtyp- und *Gcdh*^{-/-}-Mäusen unter HPD im Vergleich zu ND (jeweils n = 3). ** p < 0,05.

Als erhöhte Genexpression wurde eine relative Expression von > 1,4 definiert, für eine erniedrigte Genexpression wurde eine relative Expression < 0,6 gefordert. Die anderen untersuchten Gene – es wurden die Gene *Slc25a10*, *Slc25a11*, *Slc25a15*, *Slc25a20* und *Slc25a21* im Nierengewebe, Lebergewebe, Hirncortex-Gewebe und Hirnstamm-Gewebe untersucht – wurden in identische Art und Weise analysiert.

2.6.2 Statistische Auswertung der mittels *Real-time*-PCR ermittelten Expression verschiedener Transporter in HeLa-Zellen nach verminderter GCDH-spezifischer Knock down Expression

Auch die statistische Auswertung der *Real-time*-PCR zur Untersuchung verschiedener Transporterexpressionen in HeLa-Zellen mit herabregulierter GCDH-Expression erfolgte mit SPSS 18.0. Hier lautete die Fragestellung, wie stark die Expression von Transportergenen in Zellen nach GCDH-siRNA-Herabregulation verändert wird. Die nach dem oben beschriebenen Verfahren siRNA-behandelnden Zellen wurden nach 96 Stunden geerntet und eine *Real-time*-PCR mit den Primern der unterschiedlichen Transporter gemacht (n = 3, unabhängige Zellpräparationen). Als Transporter wurden aufgrund der Substratspektren der Transporter DIC (*SLC25A10*) und ODC (*SLC25A21*) ausgewählt, außerdem NaC3 (*SLC13A3*) und OAT1 (*SLC22A6*). Die mRNA-Expression in der Kontrolle (unbehandelter Zellen) wurden jeweils gleich 1 gesetzt und die Expressionswerte der siRNA-behandelten Zellen hierzu jeweils in Relation gesetzt. In der *Real-time*-PCR ließ sich auch nach zweimaliger Wiederholung kein Signal für den NaC3 (*SLC13A3*) nachweisen.

Tabelle 13: Mittelwerte, Standardfehler und 95 %-Konfidenzintervalle der dCT-Werte.

Transporter	Mittelwert	Standardfehler	95 %-Konfidenzintervall	
			Untergrenze	Obergrenze
SLC25A10	0,9308	0,01010	0,9049	0,9568
SLC25A21	0,9675	0,00798	0,9545	0,9897
SLC22A6	1,0070	0,03856	0,9380	1,1031

Die Darstellung erfolgte wie für die anderen oben dargestellten Expressionen mittels eines Balkendiagramms.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur Expression und Funktion mitochondrialer Transporter bei Gcdh-Defizienz

Ausgangspunkt für die im Folgenden dargestellten experimentellen Ansätze war die Annahme, dass die Expression von Transportern durch ihre korrespondierenden Substrate reguliert werden kann, also ein erhöhter Anfall an Metaboliten auch zu einer erhöhten Expression des jeweiligen Transporters führen kann. Dies ist für andere Transporter der SLC-Familie bereits beschrieben worden (Sai, 2005; Terada und Inui, 2007) und konnte in Voruntersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe bestätigt werden, in denen es mittels vergleichenden Expressionsanalysen zwischen Wildtyp- und *Gcdh*^{-/-}-Gewebe gelang, Transporter zu identifizieren, die die Translokation von GA und 3OHGA an der Plasmamembran vermitteln (Stellmer, 2007; Hagos et al., 2008).

Nach der Identifizierung von GA- und 3OHGA-Transportern an der Plasmamembran sollte nun gezielt nach den Transportern gesucht werden, die die Translokation von GA und 3OHGA über die mitochondrialen Membranen vermitteln. Aus den bisher beschriebenen mitochondrialen Transportern wurden die folgenden fünf Membranproteine ausgewählt, da sie aufgrund ihrer bisher bekannten Substratspezifität (Palmieri, 2004; Palmieri, 2008) als mögliche Kandidaten für den Transport von GA und 3OHGA in Betracht kamen: DIC (*SLC25A10*), OGC (*SLC25A11*), ORC1 (*SLC25A15*), CAC (*SLC25A20*), ODC (*SLC25A21*).

Die Expression der ausgewählten Transporter wurde zunächst auf mRNA-Ebene mittels *Real-time*-PCR durchgeführt. Anschließend wurde die Proteinexpression der drei Transporter, für die Antikörper zur Verfügung standen (DIC, OGC und ODC) mittels Western-Blot-Analysen von aufgereinigten Mitochondrien untersucht. Die Experimente wurden an Nieren-, Leber- und Hirngewebe von 42 Tage alten *Gcdh*-defizienten-Mäusen und Kontrollmäusen unter basalen Bedingungen und in der induzierten metabolischen Krise durchgeführt.

3.1.1 Expression des Dicarboxylat-Transporters (Dic, *Slc25a10*)

Mittels *Real-time*-PCR konnten signifikant veränderte Genexpressionen in **Leber-** und **Nierengewebe** bestätigt werden. Im Hirncortex sowie im Hirnstamm ließen sich keine relevanten Veränderungen nachweisen.

In der Untersuchung der mRNA-Expression im **Lebergewebe** (Abbildung 14) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen *Gcdh*^{-/-}- und Wildtyp-Tieren unter Normaldiät (ND) sowie zwischen *Gcdh*^{-/-}-Mäusen in der durch Gabe einer Hochproteindiät (HPD) induzierten Krise verglichen mit *Gcdh*^{-/-}-Tieren unter ND. Es zeigte sich hierbei lediglich ein Trend zu einer leichten Heraufregulation (*Gcdh*^{-/-}- vs. Wildtyp-Tiere unter ND Heraufregulation um das 1,5-fache bzw. *Gcdh*^{-/-}-Tiere unter HPD vs. *Gcdh*^{-/-}-Tiere unter ND Heraufregulation um das 1,57-fache). Die mRNA-Expression im Lebergewebe von Wildtyp-Tieren unter HPD war im Vergleich zu Wildtyp-Tieren unter ND um das 1,62-fache signifikant heraufreguliert ($p = 0,029$).

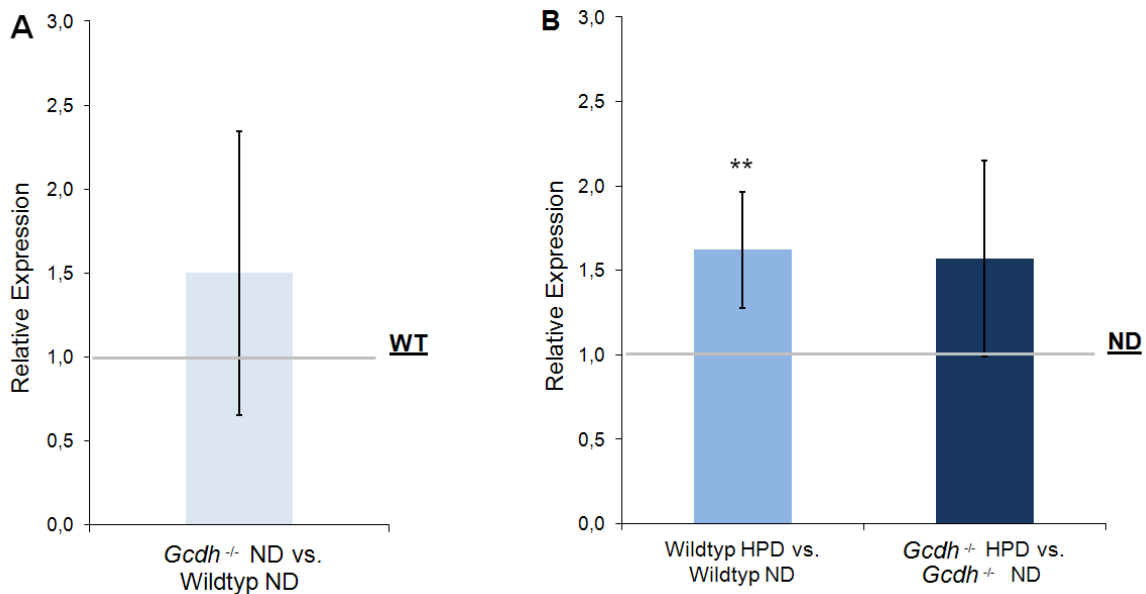


Abbildung 14: Relative *Slc25A10*-mRNA-Expression im **Lebergewebe**. Dargestellt ist die relative Expression im Vergleich zur angegebenen Vergleichsgruppe, die Fehlerbalken markieren das 95%-Konfidenzintervall. Grauer Querbalken: Expression in der Vergleichsgruppe, definiert als 1. **A** Expression bei *Gcdh*^{-/-}-Mäusen unter ND im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen unter ND (jeweils $n = 3$). **B** Expression bei Wildtyp- und *Gcdh*^{-/-}-Mäusen unter HPD im Vergleich zu ND (jeweils $n = 3$). ** $p < 0,05$.

Im **Nierengewebe** (Abbildung 15) stellte sich bei den *Gcdh*-defizienten Tieren unter ND im Vergleich zu Wildtyp-Tieren unter ND eine deutliche und signifikant ($p = 0,007$) gesteigerte *Dic*-mRNA-Expression um das 3,43-fache dar. Wurde in *Gcdh*^{-/-}-Mäusen durch HPD-Applikation eine metabolische Krise induziert, zeigte sich hingegen im Vergleich zu *Gcdh*-defizienten Tieren unter ND wieder eine Herabregulation auf das 0,68-fache ($p = 0,002$). Die Applikation der HPD bei Wildtyp-Tieren führte im Vergleich zur ND zu keiner signifikanten Veränderung der *Dic*-

mRNA-Expression im Nierengewebe und lediglich zu einer leichten Heraufregulation auf das 1,66-fache.

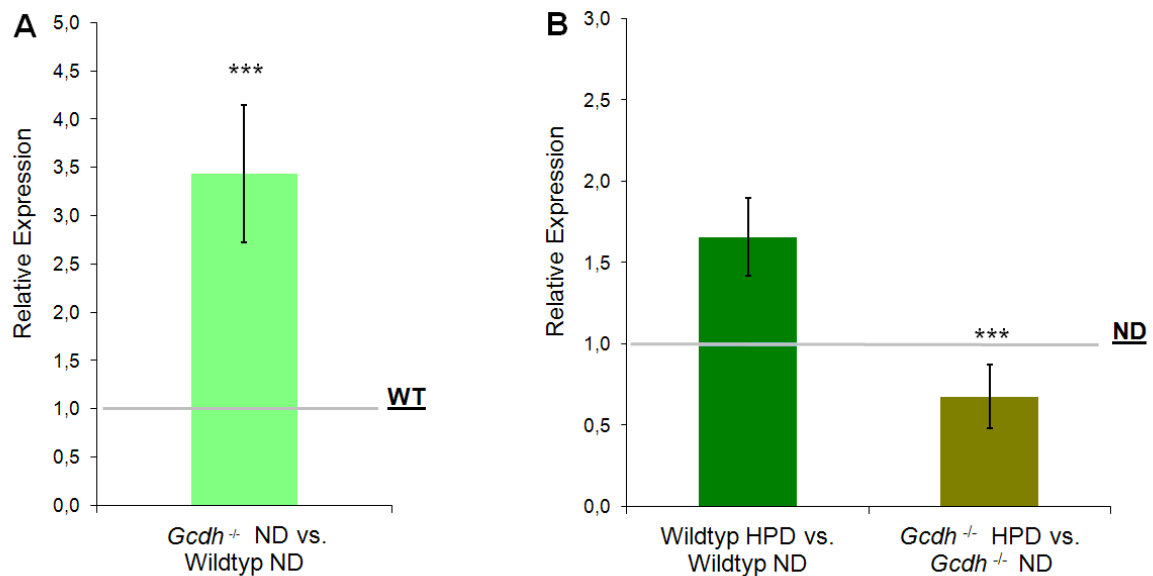


Abbildung 15: Relative *SLC25A10*-mRNA-Expression im **Nierengewebe**. Dargestellt ist die relative Expression im Vergleich zur angegebenen Vergleichsgruppe, die Fehlerbalken markieren das 95%-Konfidenzintervall. Grauer Querbalken: Expression in der Vergleichsgruppe, definiert als 1. **A** Expression bei *Gcdh*^{-/-}-Mäusen unter ND im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen unter ND (jeweils n = 3). **B** Expression bei Wildtyp- und *Gcdh*^{-/-}-Mäusen unter HPD im Vergleich zu ND (jeweils n = 3). *** p < 0,01.

Zur Analyse der Dic-Proteinexpression wurden Mitochondrienextrakte aus den verschiedenen Geweben extrahiert, über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Dic-spezifischem Western Blot untersucht. Weder in Mitochondrienextrakten aus der **Leber** (Abbildung 16) noch aus der **Niere** (Abbildung 17) zeigten sich zwischen den untersuchten Bedingungen Unterschiede in der Dic-Proteinexpression.

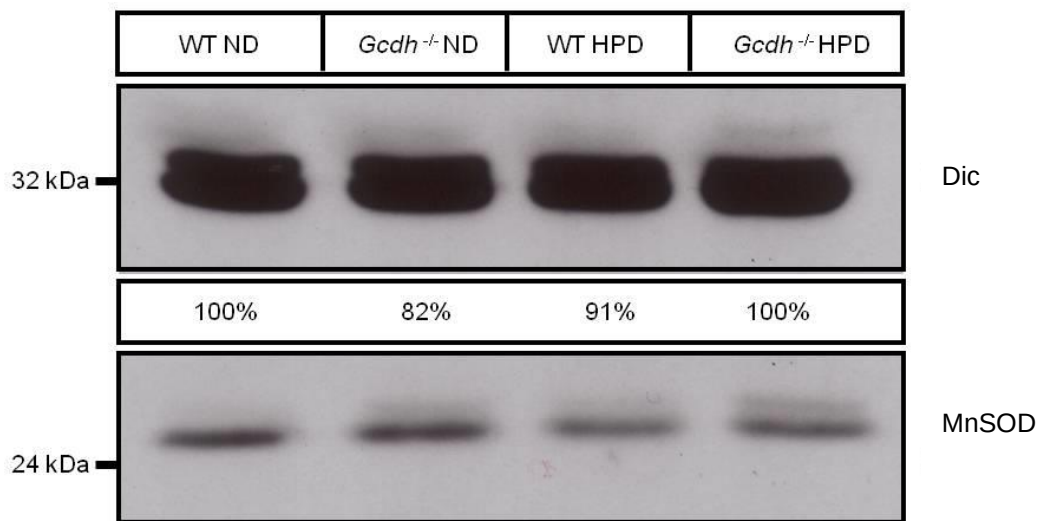


Abbildung 16: Dic-spezifischer Western Blot von Mitochondrienextrakten aus **Lebergewebe**. 42 Tage alte Wildtyp (WT)- beziehungsweise *Gcdh*^{-/-}-Mäuse nach vier Tagen unter ND oder HPD. Als Ladekontrolle diente das mitochondriale Protein MnSOD. Die Signalintensitäten wurden densitometrisch bestimmt, auf die Ladekontrolle normiert und bezogen auf das Signal von WT ND in Prozent dargestellt. Die molekularen Massen definierter Markerproteine sind in kDa angegeben. n = 3.

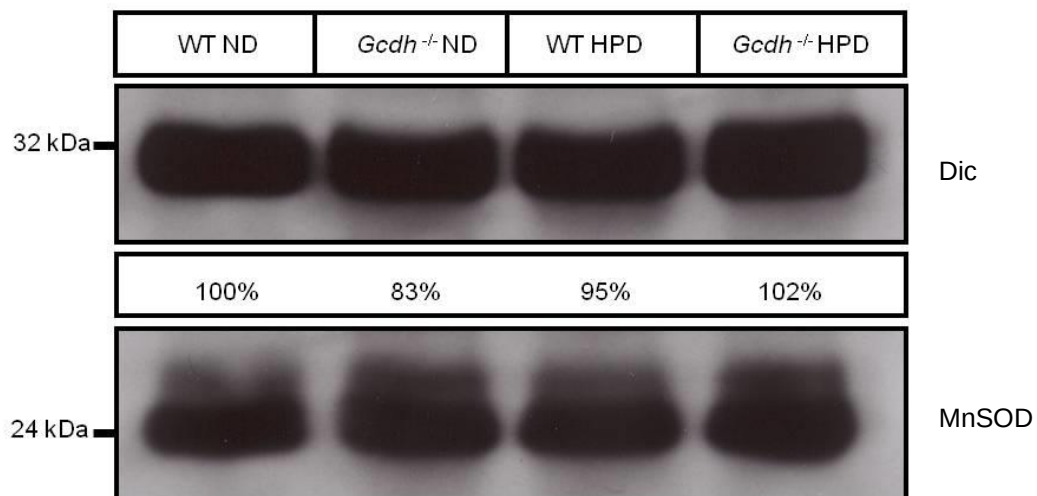


Abbildung 17: Dic-spezifischer Western Blot von Mitochondrienextrakten aus **Nierengewebe**. 42 Tage alte Wildtyp (WT)- beziehungsweise *Gcdh*^{-/-}-Mäuse nach vier Tagen unter ND oder HPD. Als Ladekontrolle diente das mitochondriale Protein MnSOD. Die Signalintensitäten wurden densitometrisch bestimmt, auf die Ladekontrolle normiert und bezogen auf das Signal von WT ND in Prozent dargestellt. Die molekularen Massen definierter Markerproteine sind in kDa angegeben. n = 3.

3.1.2 Expression des Oxoglutarat-Transporters (*Ogc*, *Slc25a11*)

Der Oxoglutarat-Malat-Antiporter (OGC) vollzieht den elektroneutralen Austausch zwischen Oxoglutarat und einigen anderen Dicarboxylaten, wobei Malat die höchste Affinität besitzt.

Im **Lebergewebe** (Abbildung 18) *Gcdh*-defizienter Mäuse unter ND zeigte sich im Vergleich zu Wildtyp-Tieren keine Änderung der *Ogc*-mRNA-Expression. Bei *Gcdh*-defizienten Mäusen unter HPD ließ sich, verglichen mit *Gcdh*-defizienten Tieren unter ND, ein Trend zu einer erhöhten Expression des *Ogc* auf mRNA-Ebene um das 1,63-fache nachweisen, der jedoch nicht signifikant war. Nach Applikation einer HPD an Wildtyp-Mäusen zeigte sich, verglichen mit Mäusen gleichen Genotyps unter ND, eine um das 1,77-Fach signifikant ($p = 0,042$) erhöhte Expression der *Ogc*-mRNA.

Die Untersuchung der *Ogc*-mRNA-Expression in Maus-**Nierengeweben** ergab keinerlei Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen (Wildtyp ND und HPD, *Gcdh*^{-/-}-Mäuse ND und HPD; Daten nicht gezeigt).

Zur Untersuchung der *Ogc*-Expression im Hirn wurde das Hirngewebe in zwei Fraktionen geteilt, Hirncortex sowie „Hirnstamm“ (entsprechend Hirnstamm mit Basalganglien, ohne Cortex und ohne Kleinhirn). Wie auch im Nierengewebe zeigten sich sowohl im **Hirncortex**- als auch im **Hirnstammgewebe** keine signifikanten *Ogc*-mRNA-Expressionsunterschiede zwischen den untersuchten Gruppen (Abbildung 19 und 20).

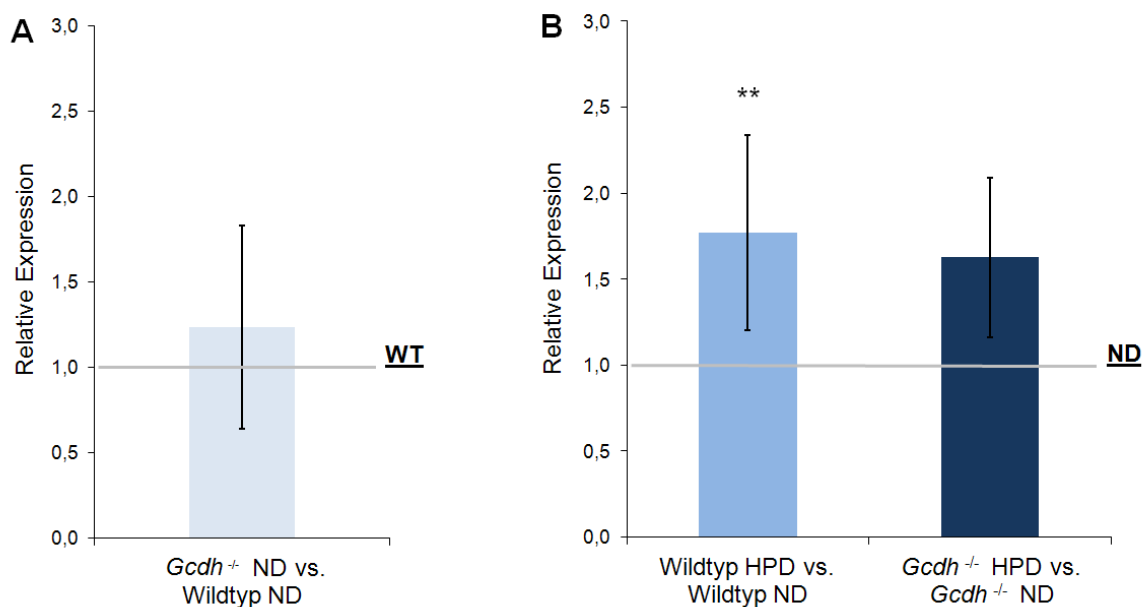


Abbildung 18: Relative *Ogc*-mRNA-Expression im **Lebergewebe**. Dargestellt ist die relative Expression im Vergleich zur angegebenen Vergleichsgruppe, die Fehlerbalken markieren das 95%-Konfidenzintervall. Grauer Querbalken: Expression in der Vergleichsgruppe, definiert als 1. **A** Expression bei *Gcdh*^{-/-}-Mäusen unter ND im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen unter ND (jeweils $n = 3$). **B** Expression bei Wildtyp- und *Gcdh*^{-/-}-Mäusen unter HPD im Vergleich zu ND (jeweils $n = 3$). ** $p < 0,05$.

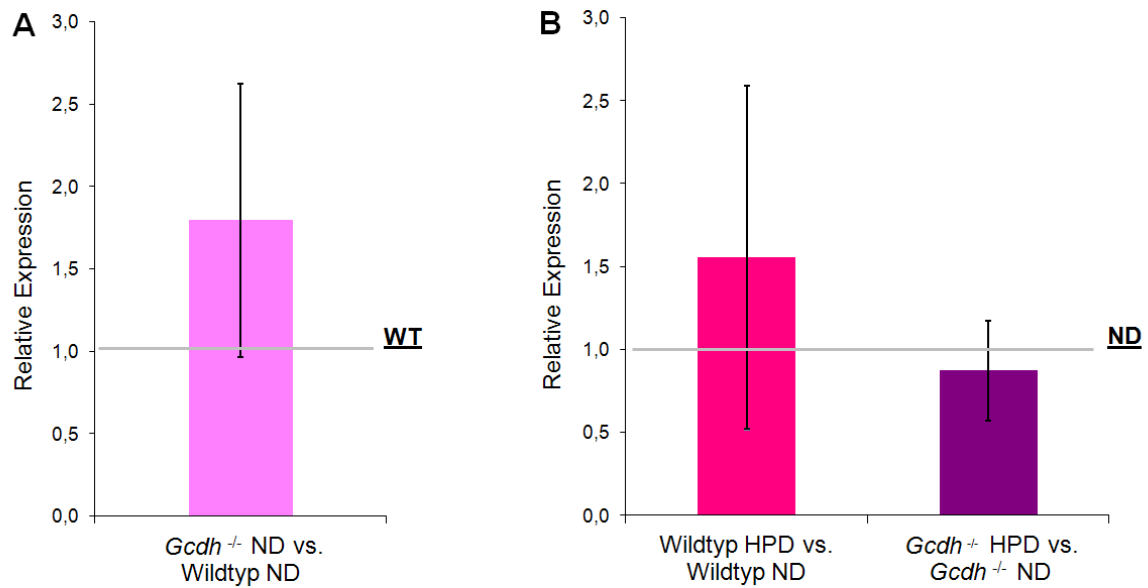


Abbildung 19: Relative *Ogc*-mRNA-Expression im **Hirncortexgewebe**. Dargestellt ist die relative Expression im Vergleich zur angegebenen Vergleichsgruppe, die Fehlerbalken markieren das 95%-Konfidenzintervall. Grauer Querbalken: Expression in der Vergleichsgruppe, definiert als 1. **A** Expression bei *Gcdh*^{-/-}-Mäusen unter ND im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen unter ND (jeweils n = 3). **B** Expression bei Wildtyp- und *Gcdh*^{-/-}-Mäusen unter HPD im Vergleich zu ND (jeweils n = 3).

Allerdings ergab sich im **Hirnstammgewebe** (Abbildung 20) eine tendenziell erhöhte mRNA-Expression von *Ogc* bei *Gcdh*^{-/-}-Mäusen unter ND im Vergleich zu mit ND behandelten Wildtyp-Mäusen um das 3,07-fache, auch wenn diese Heraufregulation aufgrund des hohen Konfidenzintervalles nicht signifikant war.

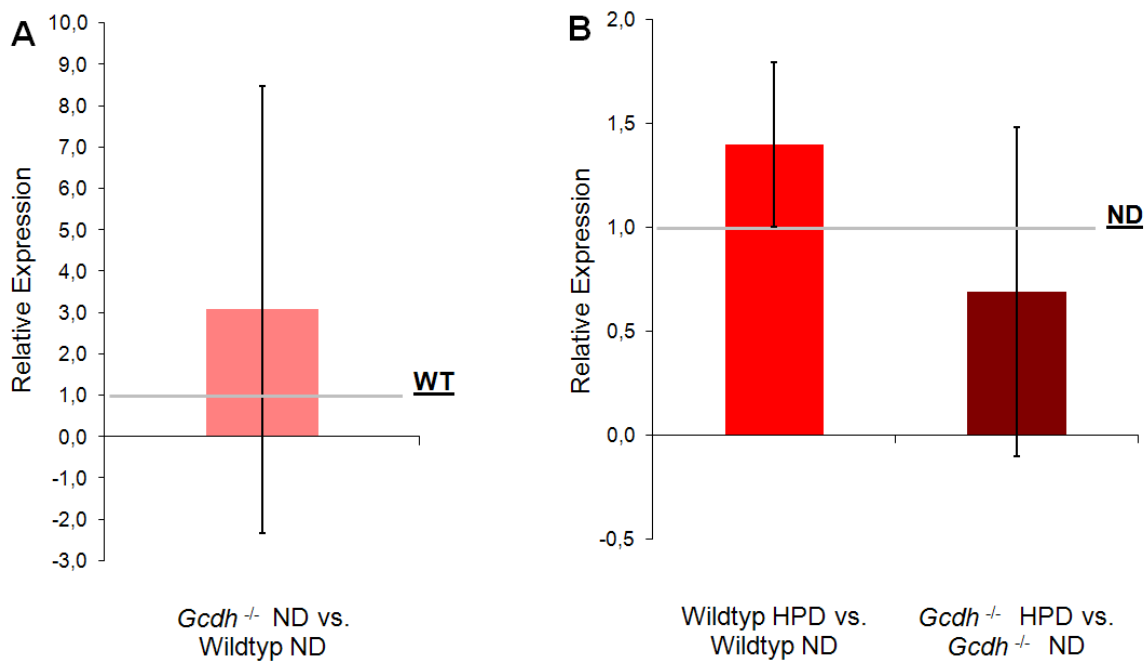


Abbildung 20: Relative *Ogc*-mRNA-Expression im **Hirnstammgewebe**. Dargestellt ist die relative Expression im Vergleich zur angegebenen Vergleichsgruppe, die Fehlerbalken markieren das 95%-Konfidenzintervall. Grauer Querbalken: Expression in der Vergleichsgruppe, definiert als 1. **A** Expression bei *Gcdh*^{-/-}-Mäusen unter ND im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen unter ND (jeweils n = 3). **B** Expression bei Wildtyp- und *Gcdh*^{-/-}-Mäusen unter HPD im Vergleich zu ND (jeweils n = 3).

Zur Analyse der *Ogc*-Expression auf Proteinebene wurden *Ogc*-spezifische Western Blots aus Mitochondrienextrakten aus Gewebe 42 Tage alter Mäuse durchgeführt, die Banden desitometrisch ausgewertet und die Signalintensitäten auf das mitochondriale Kontrollprotein MnSOD normalisiert. Im untersuchten **Lebergewebe** (Abbildung 21) zeigte sich analog zu den Ergebnissen der *Real-time*-PCR ein Trend zu einer auf 132 % leicht erhöhten *Ogc*-Expression in *Gcdh*^{-/-}-Tieren unter HPD im Vergleich zu Wildtyp- und *Gcdh*-defizienten Tieren unter ND. Die *Ogc*-Expression im Wildtyp-Lebergewebe nach HPD-Behandlung war dagegen leicht auf 65 % reduziert, bezogen auf Wildtyp-Tiere unter ND. Beide Veränderungen waren nicht signifikant.

Bei der Analyse der Proteinexpression in **Nieren** wurde korrespondierend zu den Befunden auf RNA-Ebene eine unter allen getesteten Bedingungen gleichbleibende Expression von *Ogc* bestätigt (Abbildung 22).

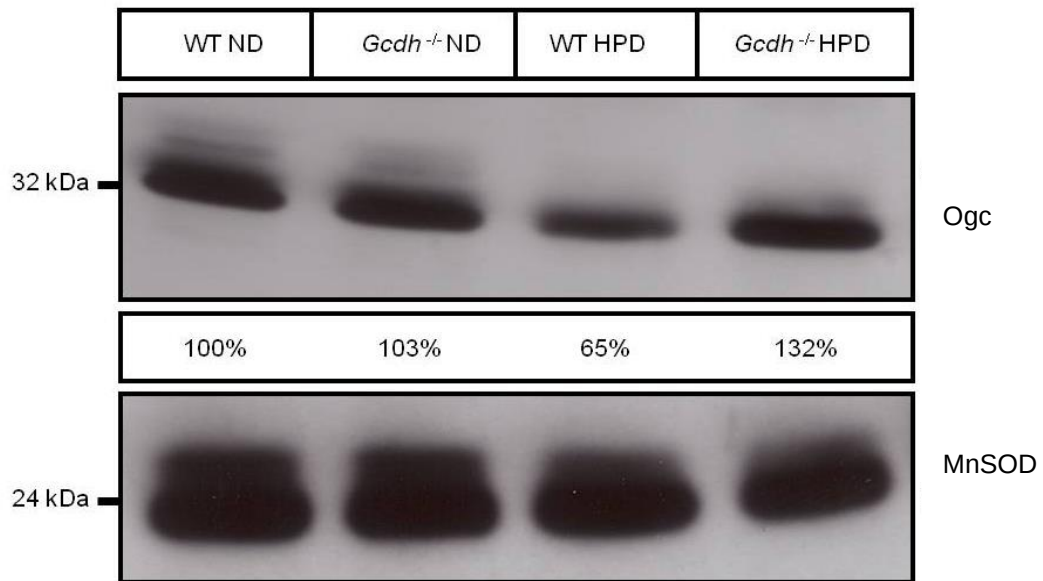


Abbildung 21: Ogc-spezifischer Western Blot von Mitochondrienextrakten aus Lebergewebe. 42 Tage alte Wildtyp (WT)- beziehungsweise *Gcdh*^{-/-}-Mäuse nach vier Tagen unter ND oder HPD. Als Ladekontrolle diente das mitochondriale Protein MnSOD. Die Signalintensitäten wurden densitometrisch bestimmt, auf die Ladekontrolle normiert und bezogen auf das Signal von WT ND in Prozent dargestellt. Die molekularen Massen definierter Markerproteine sind in kDa angegeben. n = 3.

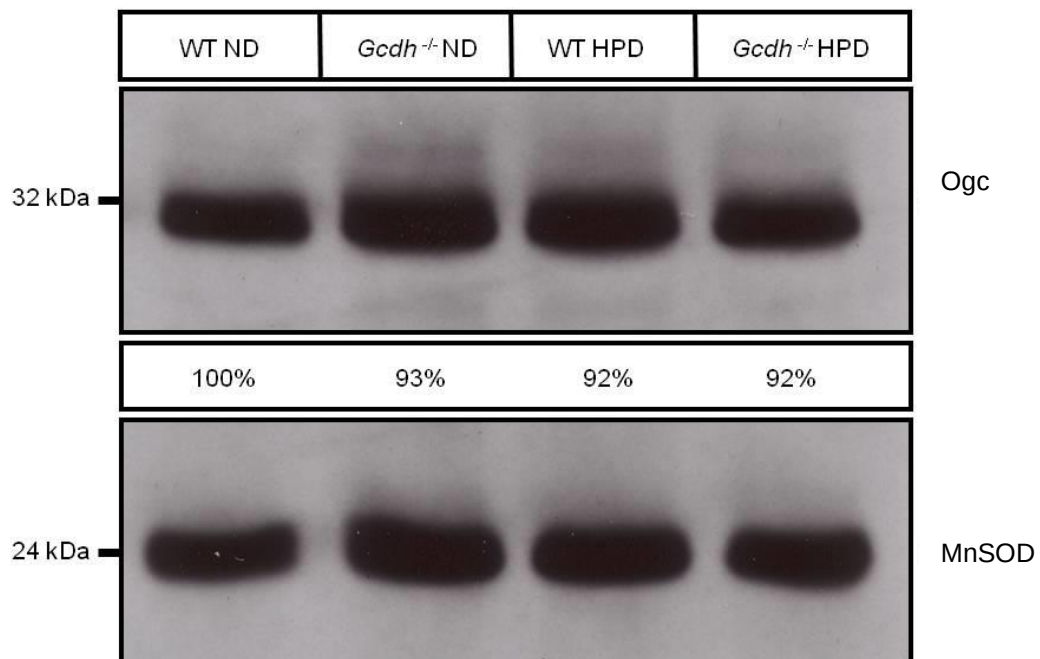


Abbildung 22: Ogc-spezifischer Western Blot von Mitochondrienextrakten aus Nierengewebe. 42 Tage alte Wildtyp (WT)- beziehungsweise *Gcdh*^{-/-}-Mäuse nach vier Tagen unter ND oder HPD. Als Ladekontrolle diente das mitochondriale Protein MnSOD. Die Signalintensitäten wurden densitometrisch bestimmt, auf die Ladekontrolle normiert und bezogen auf das Signal bei WT ND in Prozent dargestellt. Die molekularen Massen definierter Markerproteine sind in kDa angegeben. n = 3.

3.1.3 Expression des Ornithin-Transporters 1 (*Orc1*, *Slc25a15*)

Der Ornithin-Transporter, auch bekannt unter der Bezeichnung Ornithin-Citrullin-Transporter, besitzt zwei Isoformen, ORC1 (= *SLC25A15*) und ORC2 (= *SLC25A2*). Beide Isoformen transportieren Ornithin, Lysin, Arginin und Citrullin.

Bei der Untersuchung der *Orc1*-mRNA-Expression im Mausmodell mittels *Real-time*-PCR ließen sich Veränderungen in Leber, Niere und Hirnstammgewebe erkennen, im Hirncortexgewebe ließen sich keine Veränderungen nachweisen.

Im **Lebergewebe** (Abbildung 23) zeigte sich bei allen drei untersuchten Gruppen eine erhöhte *Orc1*-mRNA-Expression: In der Leber der *Gcdh*^{-/-}-Tiere unter ND war die *Orc1*-mRNA im Vergleich zu Wildtyp-Tieren unter ND um den Faktor 1,44 erhöht (Abbildung 23A). Dieser Trend war nicht signifikant. Sowohl bei *Gcdh*^{-/-}- als auch bei Wildtyp-Mäusen unter HPD zeigte sich im Vergleich zu Tieren gleichen Genotyps unter ND eine signifikante Heraufregulation der *Orc1*-mRNA-Expression um den Faktor 1,85 ($p = 0,04$) beziehungsweise 1,95 ($p = 0,039$; Abbildung 23B).

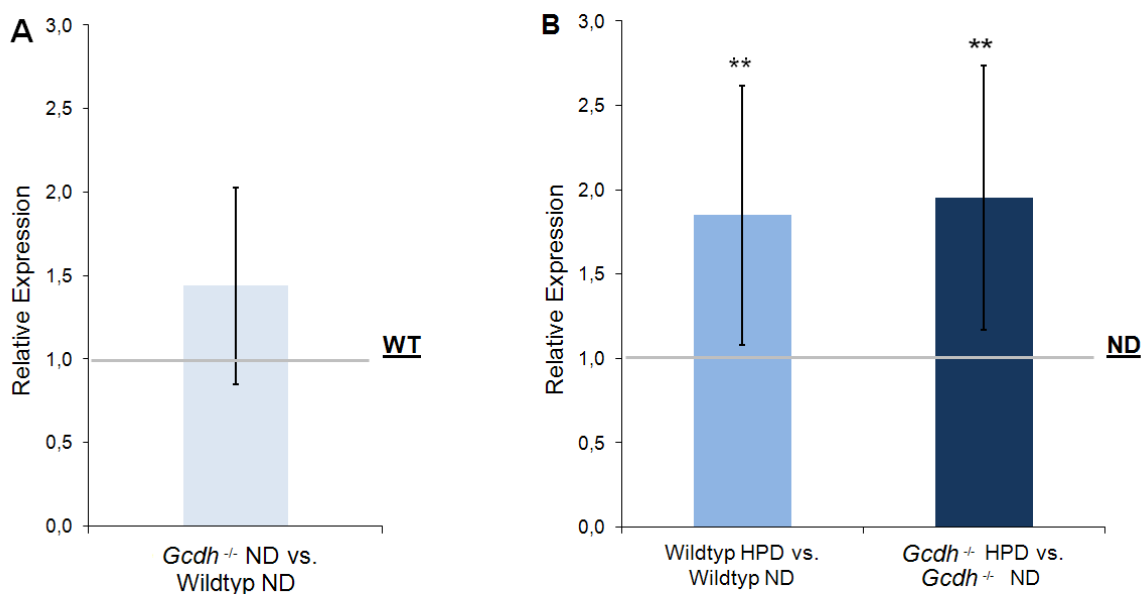


Abbildung 23: Relative *Orc1*-mRNA-Expression im **Lebergewebe**. Dargestellt ist die relative Expression im Vergleich zur angegebenen Vergleichsgruppe, die Fehlerbalken markieren das 95%-Konfidenzintervall. Grauer Querbalken: Expression in der Vergleichsgruppe, definiert als 1. **A** Expression bei *Gcdh*^{-/-}-Mäusen unter ND im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen unter ND (jeweils $n = 3$). **B** Expression bei Wildtyp- und *Gcdh*^{-/-}-Mäusen unter HPD im Vergleich zu ND (jeweils $n = 3$). ** $p < 0,05$.

Die *Orc1*-mRNA-Expression in **Nierengewebe** (Abbildung 24) war bei *Gcdh*^{-/-}-Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Tieren, beide unter ND, um das 1,45-fache signifikant ($p = 0,00$) erhöht (Abbildung 24A). Während die *Orc1*-mRNA-Expression in Wildtyp-Mausnieren nach HPD-Behandlung nicht verändert war (Abbildung 24B), ergab sich bei HPD-behandelten *Gcdh*^{-/-}-

Mäusen, im Vergleich zu ND-behandelten *Gcdh*^{-/-}-Tieren, ein – wenngleich nicht signifikanter – Trend zu einer *Orc1*-Herabregulation.

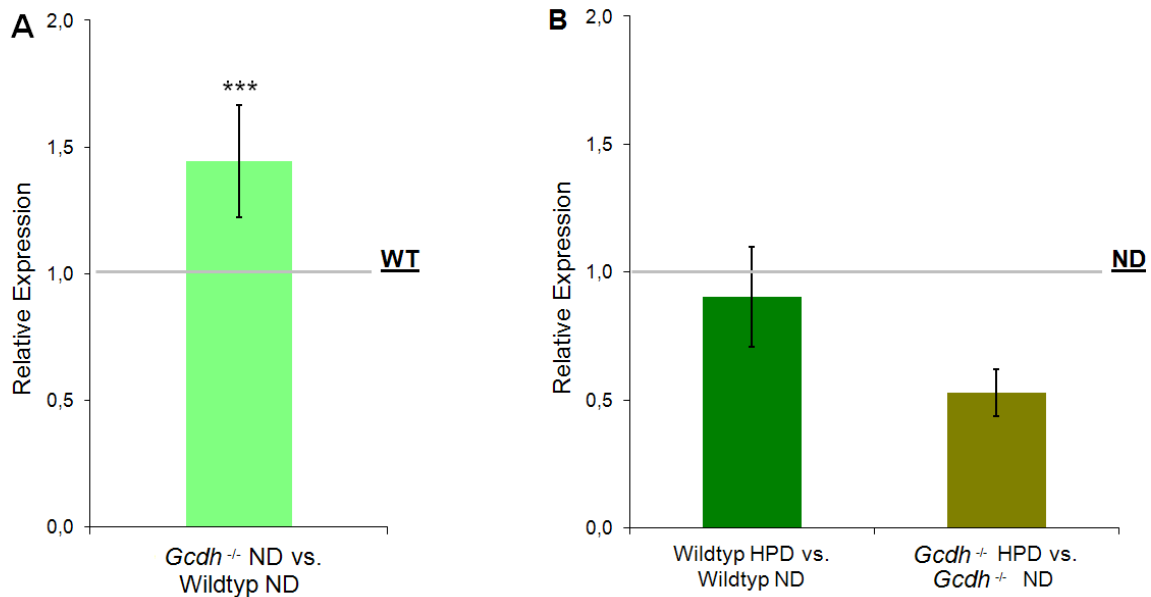


Abbildung 24: Relative *Orc1*-mRNA-Expression im **Nierengewebe**. Dargestellt ist die relative Expression im Vergleich zur angegebenen Vergleichsgruppe, die Fehlerbalken markieren das 95%-Konfidenzintervall. Grauer Querbalken: Expression in der Vergleichsgruppe, definiert als 1. **A** Expression bei *Gcdh*^{-/-}-Mäusen unter ND im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen unter ND (jeweils n = 3). **B** Expression bei Wildtyp- und *Gcdh*^{-/-}-Mäusen unter HPD im Vergleich zu ND (jeweils n = 3). *** p < 0,001.

Die Untersuchung von **Hirnstammgewebe** (Abbildung 25) ergab bei ND-behandelten Mäusen eine bei *Gcdh*^{-/-}-Tieren im Vergleich zum Wildtyp um den Faktor 3,1 heraufregulierte *Orc1*-mRNA-Expression (p = 0,049, Abbildung 25A). Bei den Wildtyp- und *Gcdh*-defizienten Tieren nach HPD-Behandlung ließ sich keine signifikante Expressionsänderung nachweisen (Abbildung 25B).

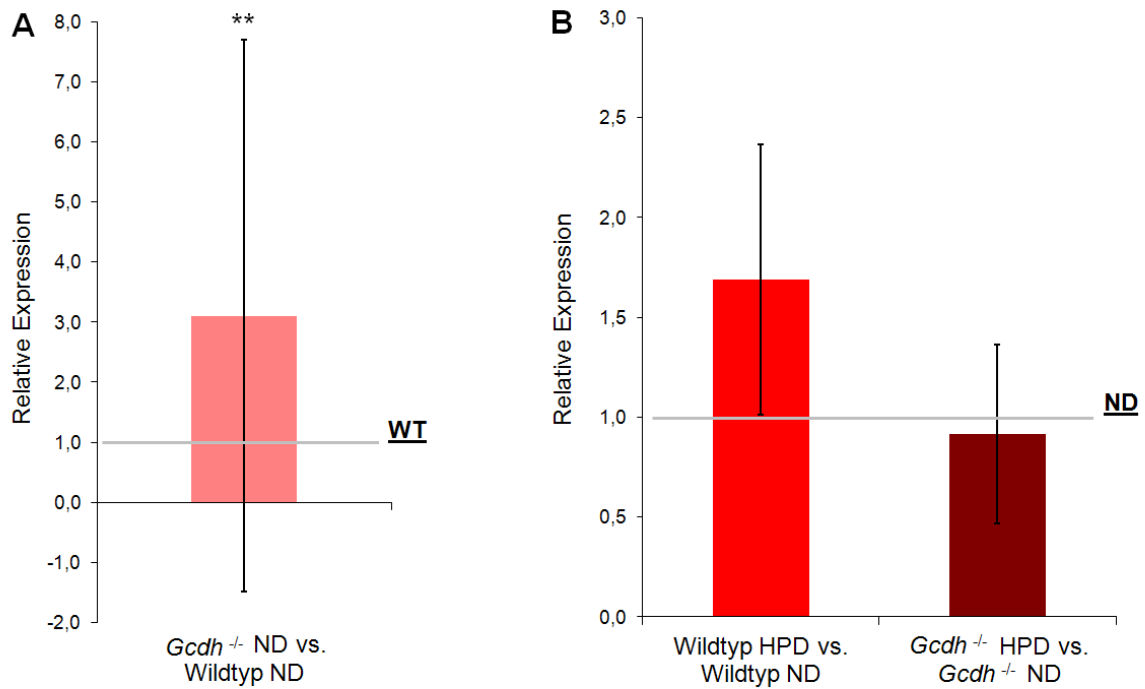


Abbildung 25: Relative *Orc1*-mRNA-Expression im **Hirnstammgewebe**. Dargestellt ist die relative Expression im Vergleich zur angegebenen Vergleichsgruppe, die Fehlerbalken markieren das 95%-Konfidenzintervall. Grauer Querbalken: Expression in der Vergleichsgruppe, definiert als 1. **A** Expression bei *Gcdh*^{-/-}-Mäusen unter ND im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen unter ND (jeweils n = 3). **B** Expression bei Wildtyp- und *Gcdh*^{-/-}-Mäusen unter HPD im Vergleich zu ND (jeweils n = 3). ** p < 0,05.

Die *Orc1*-spezifischen *Real-time*-PCR-Analysen aus cortikalem Hirngewebe ergaben für keine der untersuchten Bedingungen signifikante Expressionsänderungen (Daten nicht gezeigt).

Untersuchungen zur Expression von *Orc1* auf Proteinebene wurden aufgrund im Labor nicht vorliegender Antikörper nicht durchgeführt.

3.1.4 Expression des Carnitin/Acylcarnitin-Transporters (*Cac*, *Slc25a20*)

Der Carnitin/Acylcarnitin-Transporter (CAC) katalysiert den elektroneutralen Austausch von cytosolischen Acylcarnitinen und mitochondrialem freiem Carnitin, die eingeschleusten Acylreste werden dann im Mitochondrium über die β -Oxidation verstoffwechselt. Der CAC-vermittelte Transport ist damit ein essentieller Schritt im Abbau langkettiger Fettsäuren. Bei der Untersuchung der *Cac*-mRNA-Expression zeigten sich in den vier untersuchten Organen (Leber, Niere, Hirncortex, Hirnstamm) folgende Befunde:

Im **Lebergewebe** (Abbildung 26) zeigten sich zwischen den untersuchten Gruppen keine signifikanten Änderungen in der *Cac*-mRNA-Expression.

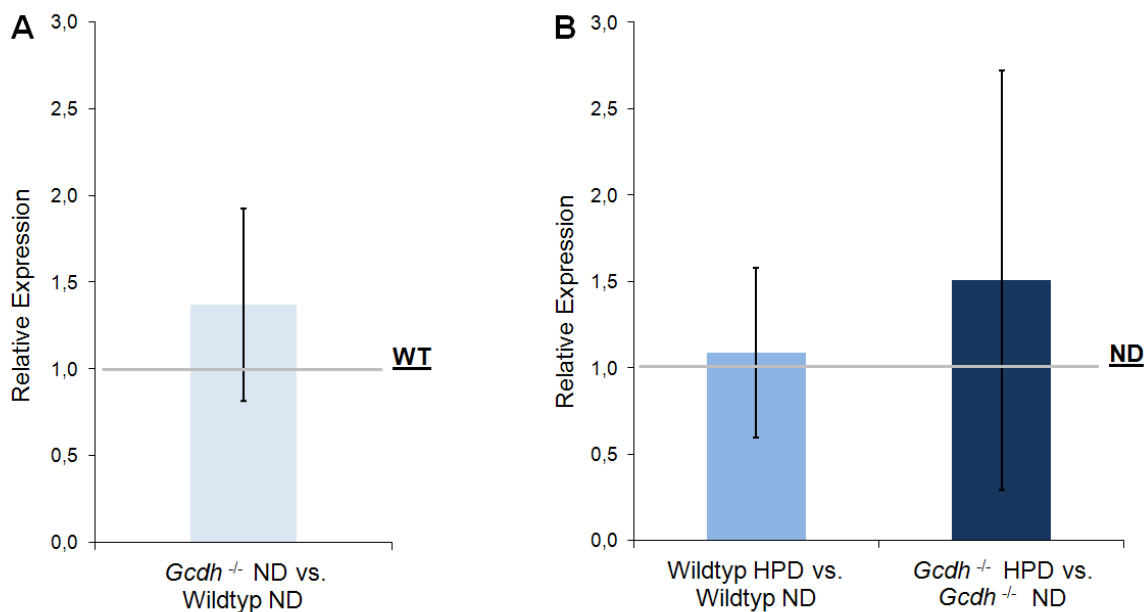


Abbildung 26: Relative *Cac*-mRNA-Expression im **Lebergewebe**. Dargestellt ist die relative Expression im Vergleich zur angegebenen Vergleichsgruppe, die Fehlerbalken markieren das 95%-Konfidenzintervall. Grauer Querbalken: Expression in der Vergleichsgruppe, definiert als 1. **A** Expression bei *Gcdh*^{-/-}-Mäusen unter ND im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen unter ND (jeweils n = 3). **B** Expression bei Wildtyp- und *Gcdh*^{-/-}-Mäusen unter HPD im Vergleich zu ND (jeweils n = 3).

Im **Nierengewebe** (Abbildung 27) war die mRNA-Expression des *Cac* unter basalen Bedingungen in *Gcdh*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren signifikant erhöht (relative Expression: 1,9, p = 0,002; Abbildung 27A), während die *Cac*-Expression auf RNA-Ebene nach HPD-Applikation weder bei Wildtyp- noch bei *Gcdh*^{-/-}-Mäusen verändert war (Abbildung 27B).

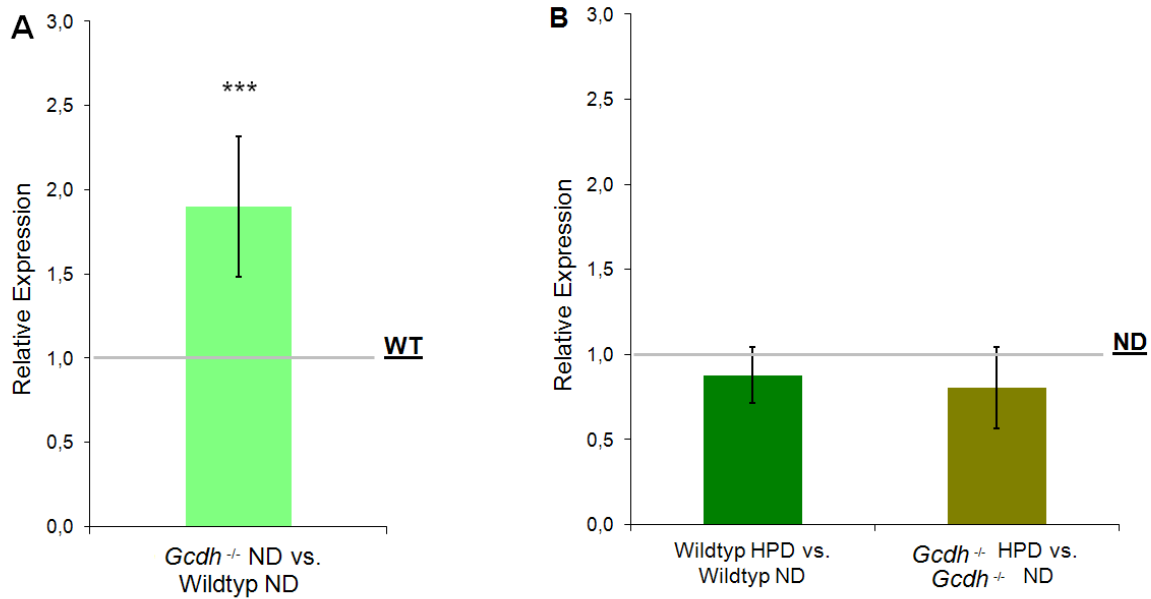


Abbildung 27: Relative *Cac*-mRNA-Expression im **Nierengewebe**. Dargestellt ist die relative Expression im Vergleich zur angegebenen Vergleichsgruppe, die Fehlerbalken markieren das 95%-Konfidenzintervall. Grauer Querbalken: Expression in der Vergleichsgruppe, definiert als 1. **A** Expression bei *Gcdh*^{-/-}-Mäusen unter ND im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen unter ND (jeweils n = 3). **B** Expression bei Wildtyp- und *Gcdh*^{-/-}-Mäusen unter HPD im Vergleich zu ND (jeweils n = 3). *** p < 0,01.

Im **Hirngewebe** zeigte sich insgesamt ein Trend zu einer erhöhten *Cac*-Expression bei *Gcdh*^{-/-}-Mäusen unter ND verglichen mit normal ernährten Wildtyp-Mäusen (Abbildung 28 und 29): Im kortikalen Gewebe war die *Cac*-Expression dabei 1,44-fach erhöht (Abbildung 28A), im Hirnstamm 2,64-fach (Abbildung 29A). Die beobachteten Heraufregulationen der *Cac*-mRNA waren jedoch nicht signifikant, sondern stellten lediglich einen Trend dar. Unter den Bedingungen der HPD-Applikation war die *Cac*-mRNA-Expression im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle weder bei Wildtyp- noch bei *Gcdh*^{-/-}-Tieren verändert (Abbildung 28B und 29B).

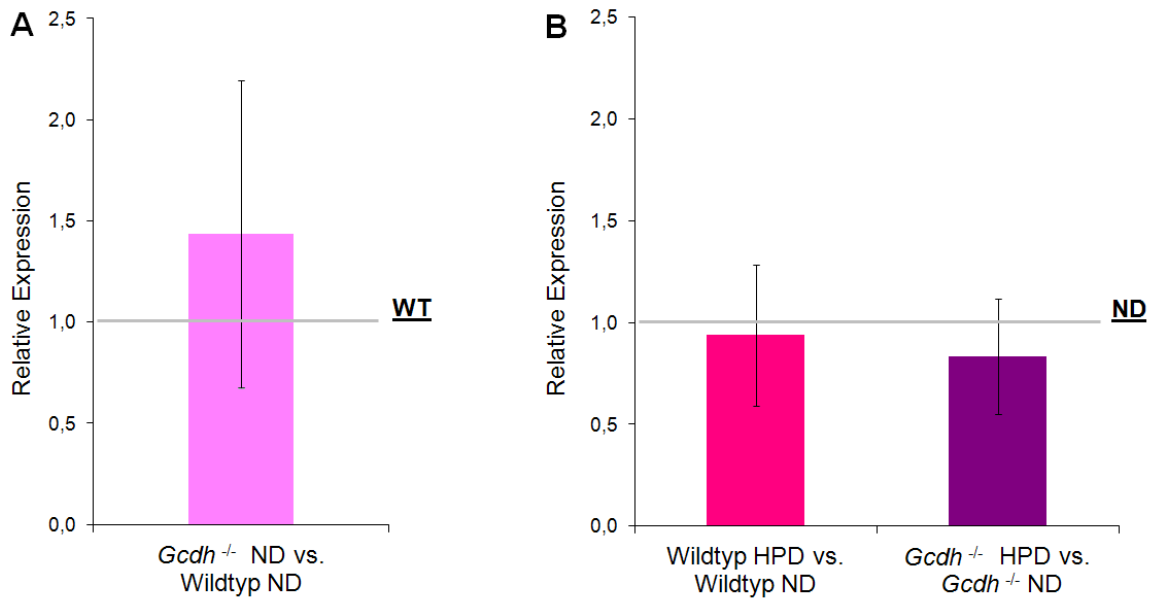


Abbildung 28: Relative *Cac*-mRNA-Expression im **Hirncortexgewebe**. Dargestellt ist die relative Expression im Vergleich zur angegebenen Vergleichsgruppe, die Fehlerbalken markieren das 95%-Konfidenzintervall. Grauer Querbalken: Expression in der Vergleichsgruppe, definiert als 1. **A** Expression bei *Gcdh*^{-/-}-Mäusen unter ND im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen unter ND (jeweils n = 3). **B** Expression bei Wildtyp- und *Gcdh*^{-/-}-Mäusen unter HPD im Vergleich zu ND (jeweils n = 3).

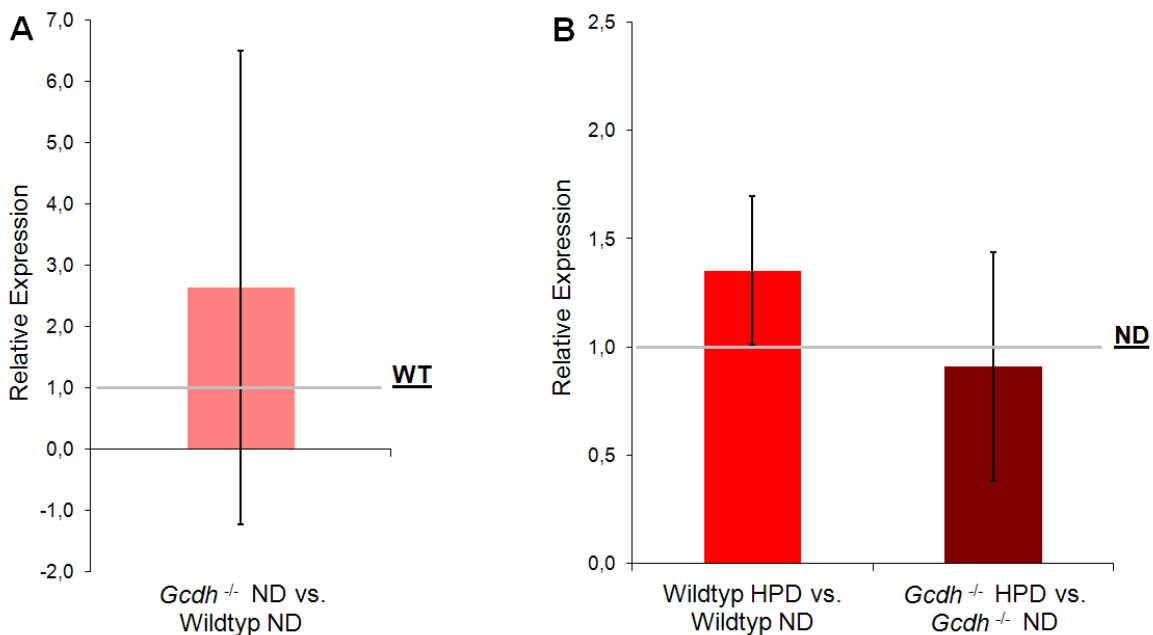


Abbildung 29: Relative *Cac*-mRNA-Expression im **Hirnstammgewebe**. Dargestellt ist die relative Expression im Vergleich zur angegebenen Vergleichsgruppe, die Fehlerbalken markieren das 95%-Konfidenzintervall. Grauer Querbalken: Expression in der Vergleichsgruppe, definiert als 1. **A** Expression bei *Gcdh*^{-/-}-Mäusen unter ND im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen unter ND (jeweils n = 3). **B** Expression bei Wildtyp- und *Gcdh*^{-/-}-Mäusen unter HPD im Vergleich zu ND (jeweils n = 3).

Untersuchungen zur Expression von *Cac* auf Proteinebene wurden aufgrund im Labor nicht vorhandener Antikörper nicht durchgeführt.

3.1.5 Expression des Oxodicarboxylat-Transporters (*Odc*, *Slc25a21*)

Die Hauptfunktion des Oxodicarboxylat-Transporters besteht in der Aufnahme von 2-Oxoadipat in die Mitochondrien, in denen die Oxoadipat-Dehydrogenase lokalisiert ist.

Bei Untersuchung der Genexpression zeigte sich in Leber und Niere eine Heraufregulation, im Hirncortex sowie im Hirnstamm ließen sich keine Expressionsveränderungen nachweisen.

Im **Lebergewebe** (Abbildung 30) stellte sich bei *Gcdh*-defizienten Tieren unter ND verglichen mit Wildtyp-Tieren unter ND eine signifikant ($p = 0,011$) gesteigerte *Odc*-mRNA-Expression um den Faktor 1,63 dar (Abbildung 30A). Die *Odc*-Expression bei HPD-behandelten Tieren war sowohl bei Wildtyp- als auch bei *Gcdh*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe unverändert (Abbildung 30B).

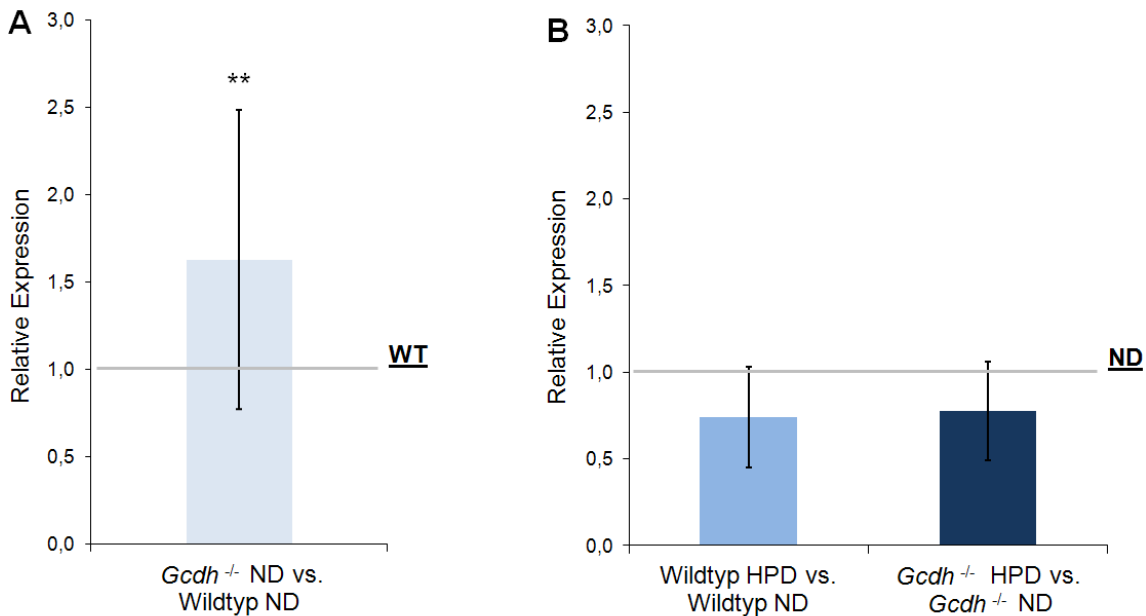


Abbildung 30: Relative *Odc*-mRNA-Expression im **Lebergewebe**. Dargestellt ist die relative Expression im Vergleich zur angegebenen Vergleichsgruppe, die Fehlerbalken markieren das 95%-Konfidenzintervall. Grauer Querbalken: Expression in der Vergleichsgruppe, definiert als 1. **A** Expression bei *Gcdh*^{-/-}-Mäusen unter ND im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen unter ND (jeweils $n = 3$). **B** Expression bei Wildtyp- und *Gcdh*^{-/-}-Mäusen unter HPD im Vergleich zu ND (jeweils $n = 3$). ** $p < 0,05$.

Im **Nierengewebe** (Abbildung 31) zeigte sich sowohl bei *Gcdh*^{-/-}-Mäusen unter ND verglichen mit ND-behandelten Wildtyp-Mäusen als auch bei Wildtyp-Mäusen unter HPD verglichen mit Wildtyp-Mäusen unter ND ein Trend zu einer *Odc*-mRNA-Heraufregulation um das 1,95-fache (Abbildung 31A) beziehungsweise 1,92-fache (Abbildung 31B). Diese Heraufregulationen waren nicht signifikant.

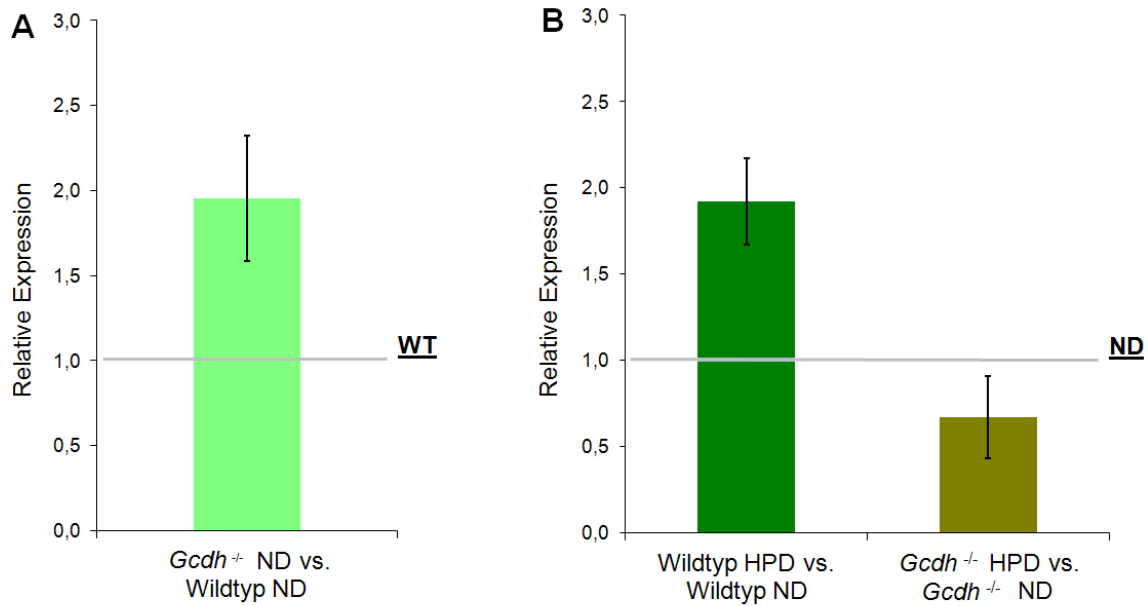


Abbildung 31: Relative *Odc*-mRNA-Expression im **Nierengewebe**. Dargestellt ist die relative Expression im Vergleich zur angegebenen Vergleichsgruppe, die Fehlerbalken markieren das 95%-Konfidenzintervall. Grauer Querbalken: Expression in der Vergleichsgruppe, definiert als 1. **A** Expression bei *Gcdh*^{-/-}-Mäusen unter ND im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen unter ND (jeweils n = 3). **B** Expression bei Wildtyp- und *Gcdh*^{-/-}-Mäusen unter HPD im Vergleich zu ND (jeweils n = 3).

In den untersuchten Hirngeweben (Cortex und Hirnstamm) zeigte sich in keiner der untersuchten Gruppen eine veränderte Expression der *Odc*-mRNA (Daten nicht gezeigt).

Zur Überprüfung der *Odc*-Expression auf Proteinebene wurden aus Leber und Niere Mitochondrien isoliert, die extrahierten Proteine über SDS-PAGE getrennt und der Transporter mittels *Odc*-spezifischen Antikörpern detektiert. Die Analysen wurden an Geweben aus 42 Tage alten Wildtyp- und *Gcdh*-defizienten Tieren nach ND- oder HPD-Applikation durchgeführt. Die quantitative Analyse der *Odc*-Proteinexpression mittels Densitometrie und Normierung auf die Ladekontrolle ergab für keine der untersuchten Bedingungen eine signifikant veränderte *Odc*-Expression (Abbildung 32 und 33).

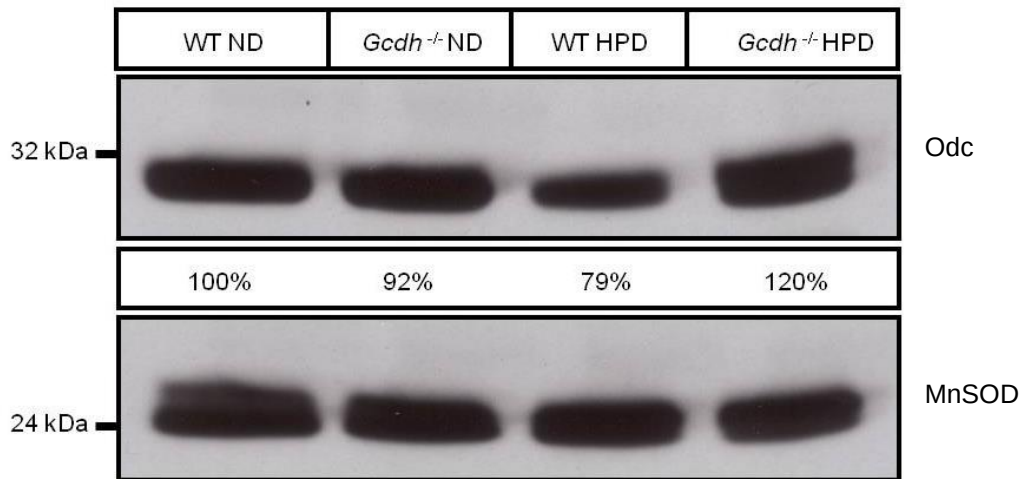


Abbildung 32: Odc-spezifischer Western Blot von Mitochondrienextrakten aus Lebergewebe. 42 Tage alte Wildtyp (WT)- beziehungsweise *Gcdh*^{-/-}-Mäuse nach vier Tagen unter ND oder HPD. Als Ladekontrolle diente das mitochondriale Protein MnSOD. Die Signalintensitäten wurden densitometrisch bestimmt, auf die Ladekontrolle normiert und bezogen auf das Signal von WT ND in Prozent dargestellt. Die molekularen Massen definierter Markerproteine sind in kDa angegeben. n = 3.

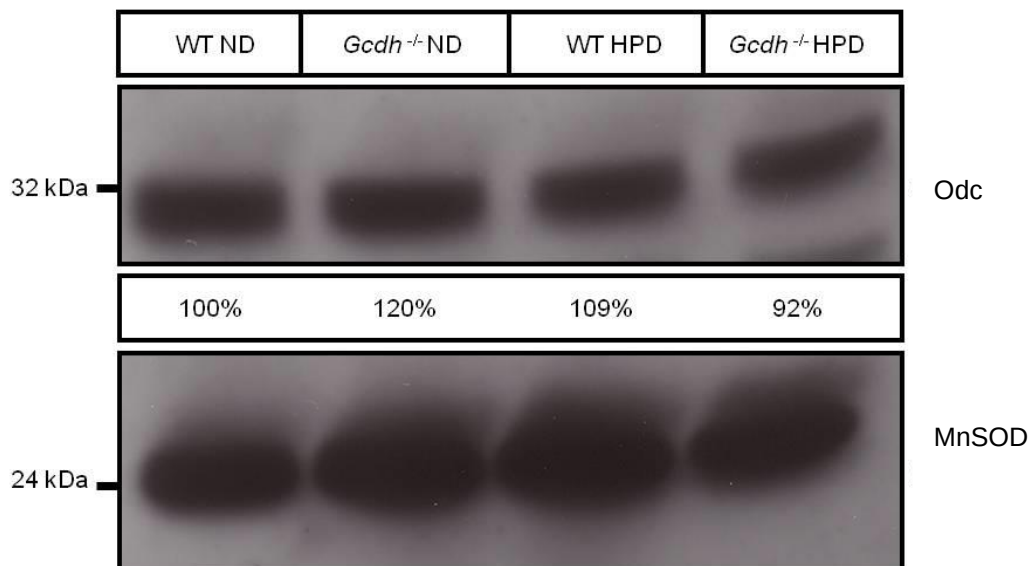


Abbildung 33: Odc-spezifischer Western Blot von Mitochondrienextrakten aus Nierengewebe. 42 Tage alte Wildtyp (WT)- beziehungsweise *Gcdh*^{-/-}-Mäuse nach vier Tagen unter ND oder HPD. Als Ladekontrolle diente das mitochondriale Protein MnSOD. Die Signalintensitäten wurden densitometrisch bestimmt, auf die Ladekontrolle normiert und bezogen auf das Signal von WT ND in Prozent dargestellt. Die molekularen Massen definierter Markerproteine sind in kDa angegeben. n = 3.

3.2 Untersuchungen an HeLa-Zellen zu den Auswirkungen einer verminderten GCDH-Expression

Die bei GA1-Patienten beschriebenen GCDH-Restaktivitäten entsprechen 0 % bis 30 % der Aktivität gesunder Patienten. Während ein Zusammenhang zwischen Genotyp einerseits und Enzymrestaktivität und Höhe der Metabolitenausscheidung andererseits beschrieben ist, konnte bislang kein Zusammenhang zwischen Genotyp sowie biochemischem Phänotyp und dem klinischen Verlauf hergestellt werden (Goodman et al., 1998; Mühlhausen et al., 2003; Christensen et al., 2004). Um die Regulation des GCDH-Enzyms und die Auswirkungen einer verminderten GCDH-Aktivität besser untersuchen zu können, war es ein Ziel der vorliegenden Arbeit – ergänzend zum bestehenden Mausmodell – ein zelluläres System für Untersuchungen der GCDH-Defizienz zu generieren. Als Modell wurden HeLa-Zellen ausgewählt, in denen die GCDH-Expression durch siRNA-Transfektion herabreguliert werden sollte. Anschließend sollte die Effektivität der Herabregulation durch Expressionsanalysen überprüft werden.

3.2.1 Herabregulation der GCDH-Expression durch siRNA-Transfektion in HeLa-Zellen

Zunächst sollten die experimentellen Bedingungen erfasst werden, die zu einer möglichst effektiven GCDH-Herabregulation führten. Dazu wurden HeLa-Zellen in Kulturschalen ausgesät, zu verschiedenen Zeitpunkten mit *GCDH*-spezifischer siRNA transfiziert und unterschiedlich lang kultiviert. Nach jeweils 24, 48, 72 und 96 Stunden wurden die Zellen geerntet. Die erste Transfektion mit der *GCDH*-spezifischen siRNA erfolgte jeweils zu Beginn des Experiments, eine zweite erneute Transfektion der Zellen, die länger kultiviert wurden, nach 48 Stunden (siehe Abbildung 12). Um die Herabregulation der GCDH auf mRNA-Ebene zu überprüfen, wurde nach Zellernte und RNA-Isolation eine *Real-time*-PCR durchgeführt. Hier zeigte sich, dass 72 Stunden nach der ersten Transfektion der siRNA (und damit 24 Stunden nach der zweiten Transfektion) die Expression der GCDH am weitesten herabreguliert war. Außerdem wurde eine sehr starke Herabregulation auf mRNA-Ebene im Expositionszeitraum 24 bis 48 Stunden deutlich (Abbildung 34).

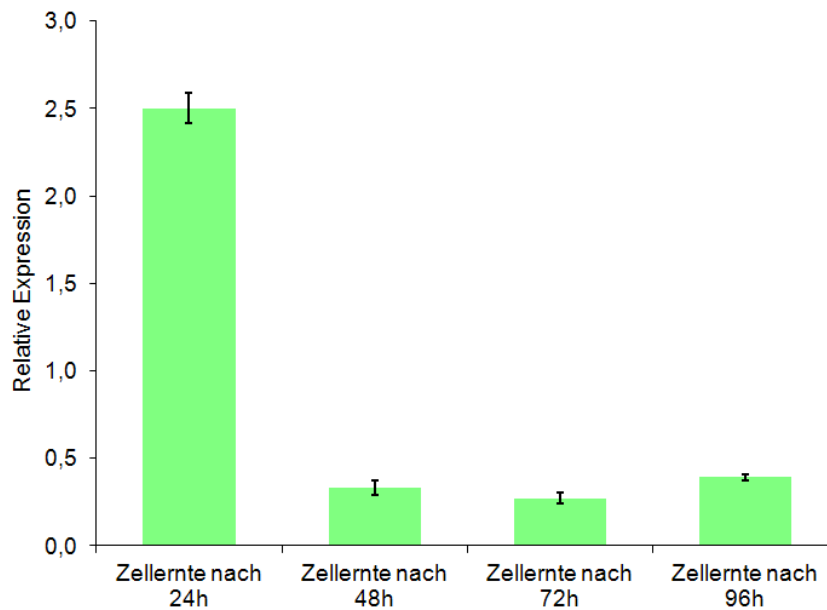


Abbildung 34: mRNA-Expression nach *GCDH*-siRNA-Herabregulation.

HeLa-Zellen wurden wie oben beschrieben mit nicht-reaktiver Kontroll-RNA oder *GCDH*-spezifischer siRNA transfiziert und nach 24, 48, 72 oder 96 Stunden geerntet. Die extrahierte RNA wurde anschließend für eine quantitative Real-time-PCR zur Untersuchung der Herabregulation der *GCDH* auf mRNA-Ebene verwendet. Dargestellt sind die relativen mRNA-Expressionen in *GCDH*-siRNA-behandelten Zellen bezogen auf HeLa-Zellen, die mit Kontroll-RNA behandelt worden waren, nach unterschiedlicher Expositionsdauer. $n = 3$.

Mit proteinchemischen Analysen sollte nun untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß die Transfektion mit *GCDH*-spezifischer siRNA in einer verminderten GCDH-Protein-Expression resultiert. Für die hierzu verwendete Western-Blot-Analyse wurden die Zellen nach entsprechender Expositionszeit geerntet, mitochondriale Extrakte durch differentielle Zentrifugation hergestellt, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und das Protein schließlich durch einen GCDH-spezifischen Antikörper detektiert. Anschließend wurden die Signale densitometrisch quantifiziert, auf die Ladekontrolle normiert und in Beziehung zur Kontrolle (Behandlung mit nicht-reaktiver siRNA = scrambled-siRNA, die nicht zu einer spezifischen Herabregulation führt) gesetzt. Die Analyse zeigte einen zeitabhängigen Rückgang der GCDH-Proteinmenge mit einer noch vorhandenen Restmenge von 18 % nach 96 Stunden (Abbildung 35).

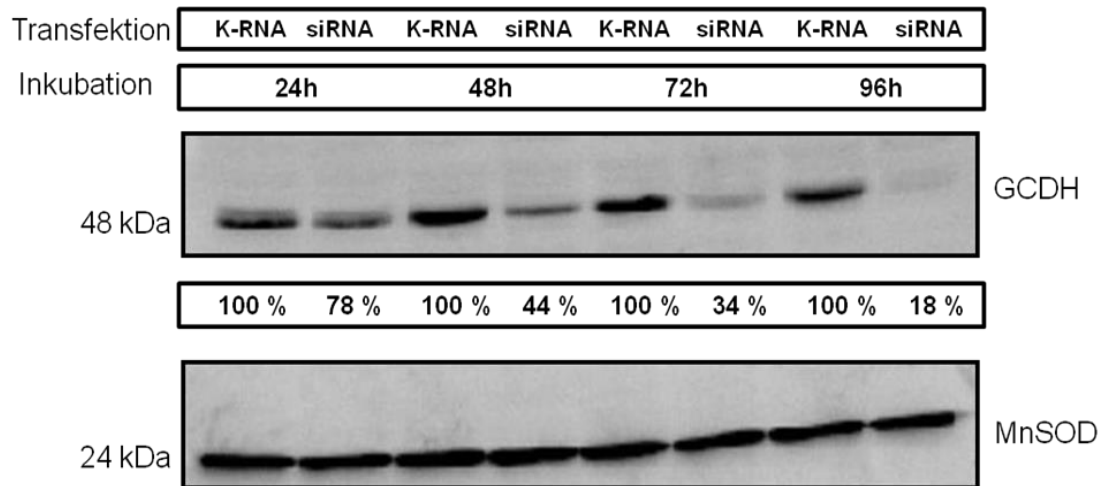


Abbildung 35: Western Blot von Mitochondrienextrakten aus HeLa-Zellen nach siRNA-Transfektion. GCDH-spezifische Signale von Extrakten aus HeLa-Zellen nach Transfektion mit nicht-reaktiver Kontroll-siRNA (K-RNA) oder *GCDH*-spezifischer siRNA (siRNA) zu Beginn sowie nach 48 Stunden und Inkubation der Zellen für die dargestellten Zeiten. Als Ladekontrolle dient das mitochondriale Matrixprotein Mangan-abhängige Superoxid-Dismutase (MnSOD). Die densitometrisch quantifizierten Western-Blot-Signale wurden anschließend auf die Ladekontrolle normiert und sind relativ zur jeweiligen Kontrollgruppe angegeben. $n = 3$.

3.2.2 Darstellung der Lokalisation und Expression der GCDH in HeLa-Zellen vor und nach siRNA-Expression

Zur Überprüfung der Lokalisation der GCDH und zur Darstellung der reduzierten GCDH-Proteinexpression nach siRNA-Behandlung wurden ergänzend zur Western-Blot-Analyse Doppel-Immunfluoreszenz-Untersuchungen durchgeführt. In HeLa-Zellen, die mit nicht-reaktiver Kontroll-siRNA transfiziert worden waren, colokalisierte GCDH vollständig mit dem mitochondrialen Marker MnSOD (Abbildung 36A). HeLa-Zellen, die mit GCDH-spezifischer siRNA transfiziert worden waren, zeigten eine deutliche Reduktion des GCDH-spezifischen Signales in der Immunfluoreszenz (Abbildung 36B). Damit bestätigten sich die Resultate der *Real-time*-PCR und des Western Blots.

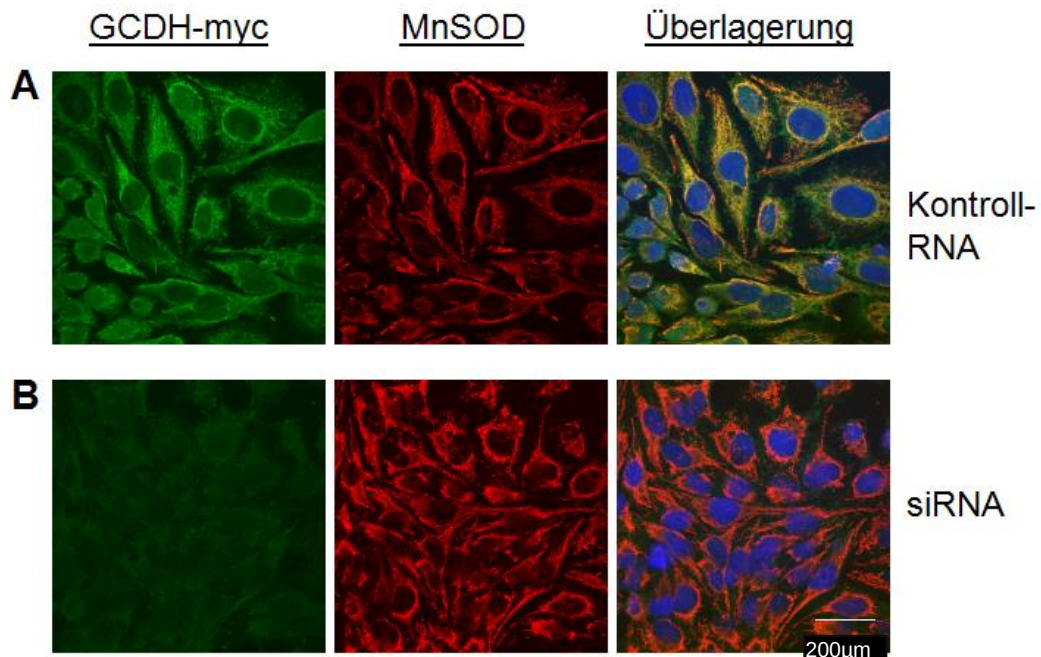


Abbildung 36: Lokalisation des GCDH-Proteins im Mitochondrium.

HeLa-Zellen nach Transfektion mit nicht-reaktiver Kontroll-RNA (A) und nach Transfektion mit *GCDH*-spezifischer siRNA (B) wurden fixiert und das GCDH-Protein mittels eines myc-Antikörpers (grün) visualisiert. Zur Darstellung der Mitochondrien wurde das mitochondriale Protein MnSOD mit einem spezifischen Antikörper (rot) angefärbt. Die Überlagerung der Aufnahmen des GCDH-myc-Signales (links) und des MnSOD-Signals (Mitte) ist in der rechten Bildleiste dargestellt. Die Gelbfärbung in der Überlagerung weist auf eine Co-lokalisierung von GCDH und MnSOD hin. Das GCDH-spezifische Signal nach *GCDH*-siRNA-Herabregulation ist deutlich abgeschwächt (B, linkes Bild), dementsprechend ist auch kein gelbes Signal in der Überlagerung (B, rechtes Bild) sichtbar.

3.2.3 Untersuchung verschiedener Transporter in HeLa-Zellen nach *GCDH*-siRNA-Herabregulation

Nachdem gezeigt worden war, dass durch Transfektion mit *GCDH*-spezifischer siRNA eine effektive Herabregulation von GCDH auf mRNA- und Proteinebene erzielt werden konnte, sollten beispielhaft zelluläre Effekte einer verminderten GCDH-Expression überprüft werden. Als Marker für diese Effekte wurde die Analyse der mRNA-Expression von zwei Transportern ausgewählt, für die bereits zuvor beschrieben war, dass ihre Expression bei GCDH-Defizienz verändert ist: Für den Natrium-abhängigen Dicarboxylat-Transporter 3 (NaC3, *SLC13A3*) war in den vorangegangenen DNA-Microarray-Analysen im Nierengewebe 42 Tage alter *Gcdh*-defizienter Mäuse eine erhöhte mRNA-Expression nachgewiesen worden (Stellmer et al., 2007). Unter gleichen Bedingungen war auch eine erhöhte mRNA-Expression des organischen Anionen-Transporters 1 (OAT1, *SLC22A6*) beschrieben worden (Thies, 2010; Thies et al., 2013). Darüber hinaus wurden die mitochondrialen Transporter, zum einen der Dicarboxylat-Transporter (DIC, *SLC25A10*), zum anderen der Oxodicarboxylat-Transporter (ODC, *SLC25A21*), untersucht. *GCDH*-siRNA-transfizierte HeLa-Zellen wurden wie oben beschrieben

nach 96 Stunden geerntet und die quantitative *Real-time*-PCR mit den Transporter-spezifischen Primern durchgeführt.

In der Auswertung zeigten sich keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen Kontroll- und siRNA-behandelten Zellen. Eine Expression von NaC3 (*SLC13A3*) ließ sich in HeLa-Zellen nicht nachweisen (Abbildung 37).

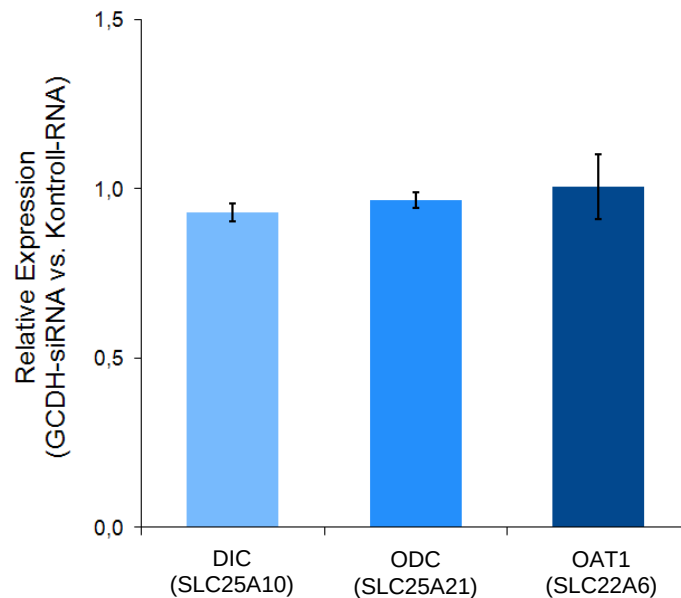


Abbildung 37: mRNA-Expression verschiedener Transporter nach *GCDH*-siRNA-Herabregulation.

HeLa-Zellen wurden wie oben beschrieben mit nicht-reaktiver Kontroll-RNA oder *GCDH*-spezifischer siRNA transfiziert und nach 96 Stunden geerntet. Die extrahierte RNA wurde anschließend für eine quantitative *Real-time*-PCR zur Untersuchung der mRNA-Expression verschiedener Transporter verwendet. Dargestellt sind die relativen mRNA-Expressionen des DIC, ODC und des OAT1 in *GCDH*-siRNA-behandelten Zellen bezogen auf HeLa-Zellen, die mit Kontroll-RNA behandelt worden waren.

4 Diskussion

4.1 Expression mitochondrialer Transporter in Wildtyp- und *Gcdh*^{-/-}-Mäusen

Bei der Glutarazidurie Typ 1 akkumulieren aufgrund des Defektes der GCDH die pathologischen Metaboliten Glutaryl-CoA, GA und 3OHGA. Diese lassen sich im Blut, Liquor, Urin und sämtlichen Körpergeweben und Körperflüssigkeiten nachweisen. Aufgrund der niedrigen Transportrate über die Blut-Hirn-Schranke kommt es zur Akkumulation endogen gebildeter GA und 3OHGA im Hirngewebe (Goodman et al., 1977; Kulkens et al., 2005; Sauer et al., 2006; Keyser et al., 2008). GA und 3OHGA werden in großen Mengen im Urin ausgeschieden (Goodman und Frerman, 2001). Daher müssen spezifische Transportmechanismen vorliegen, durch die GA und 3OHGA über die innere und die äußere Mitochondrienmembran, über die Plasmamembran, über Gefäßendothelien sowie über die basolaterale und apikale Nierentubuluszellmembran transloziert werden.

Wie in der Einleitung dargestellt, führten umfangreiche Vorarbeiten zur Identifizierung der ersten GA/3OHGA-Transporter an der Plasmamembran unterschiedlicher Zelltypen (renale proximale Tubuluszellen, neuronale und astrozytäre Zellen). Daraus konnten sowohl hinsichtlich der Exkretion von GA und 3OHGA in den Urin als auch hinsichtlich des Einflusses von GA und 3OHGA auf den anaplerotischen Transfer von Citratzyklusintermediaten von Astrozyten zu Neuronen, physiologische und pathophysiologische Bedeutungen dieser Transporter abgeleitet werden. Unbeantwortet blieb bislang die Frage, welche Transporter intrazellulär für die Translokation von GA und 3OHGA verantwortlich sind, insbesondere über die innere und äußere Mitochondrienmembran. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Expression von mitochondrialen Transportern zu analysieren, um Hinweise für die Identifizierung von GA-/3OHGA-Transportproteinen an beiden Mitochondrienmembranen zu erlangen. Grundlage war auch hier ein möglicher Einfluss der (erhöhten) Konzentrationen von Substraten wie GA und 3OHGA auf die Expression ihrer korrespondierenden Transporter, wie für andere Substrate bereits beschrieben (Sai, 2005; Terada und Inui, 2007). Anhand der in der Einleitung dargelegten Kriterien wurden mitochondriale Transporter aus der SLC25-Familie, die als Kandidaten für die Translokation von GA und 3OHGA möglich erschienen, ausgewählt und hinsichtlich ihrer mRNA- und Proteinexpression in verschiedenen Geweben (Hirn, Leber, Niere) von Wildtyp- und *Gcdh*^{-/-}-Mäusen untersucht. Diese Untersuchungen wurden einerseits unter basalen Bedingungen durchgeführt, andererseits während der durch Gabe einer Hochproteindiät induzierten metabolischen Krise, da es im Rahmen der metabolischen Krise zu einem weiteren Anstieg der pathologischen Metaboliten kommt (Keyser et al., 2008) und so eine Verstärkung etwaiger Expressions-regulierender Effekte möglich erschien. Über eine Detektion veränderter Expressionen mitochondrialer Transporter sollten solche Kandidaten eingegrenzt werden, die für anschließende funktionelle Analysen zum Transport von GA und 3OHGA in Frage kamen.

4.1.1 Expression des Dicarboxylat-Transporters (Dic, *Slc25a10*)

Der Dic war aufgrund seiner breiten Substratspezifität und seiner ubiquitären Expression als möglicher GA/3OHGA-Transporterkandidat ausgewählt worden.

Bei der Untersuchung der *Dic*-mRNA-Expression in **Lebergewebe** zeigte sich eine leichte, aber signifikante ($p = 0,029$) Heraufregulation um den Faktor 1,62 in der Gruppe WT-HPD versus WT-ND. Die Expression unter allen anderen untersuchten Bedingungen war nicht signifikant verändert. Daher ist dieser Effekt am ehesten der Applikation der Hochproteindiät zuzuordnen und nicht als GA- oder 3OHGA-spezifischer Effekt anzusehen. Eine mögliche Erklärung dieses HPD-Effektes wäre ein durch den erhöhten Proteinabbau vermehrter Anfall von Acetyl-CoA. Dieses würde dann im Citratzyklus weiter verwertet werden, was dazu führen würde, dass – durch das vermehrt anfallende Acetyl-CoA – der Citratzyklus häufiger durchlaufen und somit auch mehr Dicarboxylate, wie beispielsweise Malat und Succinat, hergestellt werden würden. Diese würden dann über den Dic-Transporter aus der mitochondrialen Matrix ins Cytoplasma geschleust werden, was zu einer gesteigerten Genexpression dieses Transporters führen könnte. Am Beispiel der Rolle des Dic im Fettstoffwechsel konnte nachgewiesen werden, dass eine Suppression des Transporters – wie sie beispielsweise in fastenden Mäusen zu finden ist – zu einer verminderten Produktion von Acetyl-CoA und Malonyl-CoA und somit zu einer Herabregulation der Fettsäuresynthese führt (Mizuarai et al., 2005). Eine weitere Möglichkeit, die gesteigerte Expression des Dic in der Leber unter HPD zu erklären, berücksichtigt die Bedeutung des Transporters in der Urogenese. Die Harnstoffbildung läuft zum größten Teil in den Hepatozyten ab, zu einem kleineren Teil in den Nierenzellen. Im Cytosol wird enzymatisch Fumarat gebildet, das in Malat umgewandelt und schließlich über den Dic in die mitochondriale Matrix eingeschleust wird. Die vermehrte Akkumulation von Dicarboxylaten könnte eine Steigerung des Harnstoffzyklus zur Folge haben, was die Expressionserhöhung des Dic-Transporters zur Folge haben könnte. Auf Proteinebene wirkte sich die beobachtete Steigerung der *Dic*-mRNA-Expression nicht aus, da unter allen untersuchten Bedingungen die Proteinexpression des Dic-Transporters im Lebergewebe gleich blieb. Dies wäre entweder dadurch erklärbar, dass der erhöhten hepatischen *Dic*-mRNA-Expression auch eine gesteigerte Degradation gegenübersteht, oder aber auch durch eine veränderte Halblebenszeit des Dic-Proteins, also durch einen erhöhten Abbau des vermehrt gebildeten Proteins.

In der **Niere** zeigte sich bei *Gcdh*-defizienten Tieren unter ND im Vergleich zu Wildtyp-Tieren unter ND eine deutlich und signifikant gesteigerte *Dic*-mRNA-Expression um das 3,43-fache. Demgegenüber war die *Dic*-mRNA in *Gcdh*^{-/-}-Mäusen unter HPD im Vergleich zur ND wieder um das 0,6-fache reduziert. Zusammengefasst ergibt dies immer noch eine höhere Expression als beim Wildtyp unter ND. Bei Wildtyp-Tieren zeigte sich unter HPD im Vergleich zur ND keine veränderte Expression. Damit ist es möglich, dass die gesteigerte mRNA-Expression mit der *Gcdh*-Defizienz und mit erhöhten GA- und 3OHGA-Spiegeln im Zusammenhang steht, entweder direkt (dann wäre Dic ein Kandidat als GA/3OHGA-Transporter) oder indirekt über

andere Mechanismen. Den Befunden der mRNA-Expressionsanalyse stehen Ergebnisse des Western Blots gegenüber, hier zeigte sich bei keiner der untersuchten Bedingungen eine Veränderung der Dic-Proteinexpression. Warum die über dreifach erhöhte *Dic*-mRNA-Expression keine Steigerung der Proteinexpression zur Folge hat, bleibt unklar. Möglich wäre, dass auch der mRNA-Abbau erhöht ist oder ein erhöhter Dic-Proteinabbau vorliegt und damit ein vermehrt gebildeter Transporter wieder degradiert wird. Überdies könnte die Beobachtungszeit nach Applikation der HPD für die Umsetzung der erhöhten mRNA-Menge im Dic-Protein zu kurz gewesen sein. Um dem nachzugehen, wären Untersuchungen zur Bestimmung der Halblebenszeit des Dic-Proteins unter verschiedenen Bedingungen sinnvoll, beispielsweise durch *Pulse-chase*-Experimente. Eine Arbeitsgruppe aus Bethesda (um M. A. Knepper, Epithelial Systems Biology Laboratory, helixweb.nih.gov, Stand 14.12.2014) eruierte in Untersuchungen mittels Massenspektrometrie Protein-Halblebenszeiten in mpkCCD-Zellen, wobei die Halblebenszeit von *SLC25A10* mit 53,35 Stunden angegeben ist (Sandoval et al., 2013).

Zusammenfassend ist in den Untersuchungen zur Expression des Dic die renale Heraufregulation bei *Gcdh*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren unter ND hervorzuheben. DIC ist damit ein Kandidat, der in funktionellen Untersuchungen auf seine Fähigkeit zum Transport von GA und 3OHGA hin untersucht werden sollte.

4.1.2 Expression des Oxoglutarat-Transportes (*Ogc*, *Slc25a11*)

Der OGC, auch bekannt als Oxoglutarat-Malat-Antiporter, vollzieht den elektroneutralen Austausch zwischen Oxoglutarat und anderen Dicarboxylaten, wobei er für Malat die höchste Affinität besitzt. Dieser Transporter gewährleistet den Transport von Reduktionsäquivalenten über die innere Mitochondrienmembran. Da der OGC Dicarboxylsäuren wie Oxoglutarat und Malat als Substrate akzeptiert, kam er auch als Kandidat für den Transport von GA in Frage.

In der **Leber** zeigte sich bei Wildtyp-Mäusen, die HPD erhielten, im Vergleich zu ND-behandelten Wildtyp-Mäusen, eine mRNA-Heraufregulation um den Faktor 1,77. Diese Heraufregulation war signifikant, bestätigte sich aber nicht auf Proteinebene. Die *Ogc*-mRNA- und Proteinexpression bei *Gcdh*^{-/-}-Mäusen war unter HPD im Vergleich zu ND ebenfalls erhöht, wenn auch nicht signifikant. Da die Expression von *Ogc* bei *Gcdh*-defizienten Mäusen unter ND im Vergleich zu gleich behandelten Wildtyp-Tieren nicht verändert war, ist dieser Effekt insgesamt am ehesten als unspezifischer Effekt der HPD-Applikation einzuordnen.

Im **Nierengewebe** konnte unter den untersuchten Bedingungen weder auf mRNA-Ebene noch auf Proteinebene eine relevante Expressionsveränderung des *Ogc* nachgewiesen werden. Der *Ogc* scheint daher auf renaler Ebene im Zusammenhang mit den GA1-typischen Metaboliten keine Relevanz zu besitzen.

Die Expression des Ogc wurde im **Hirngewebe** in zwei unterschiedlichen Fraktionen untersucht, einerseits am Material aus Hirncortex sowie an dem verbliebenen Hirngewebe nach Abpräparation des Cortex (Hirngewebe ohne Cortex und ohne Kleinhirn, mit Basalganglien), hier als Hirnstamm bezeichnet. Im Cortex gab es auf mRNA-Ebene keinerlei Expressionsveränderungen. Während im Hirnstamm die *Ogc*-mRNA-Expression bei Wildtyp- und *Gcdh*^{-/-}-Mäusen, jeweils im Vergleich HPD- gegen ND-behandelter Tiere, unverändert waren, zeigte sich bei *Gcdh*^{-/-}-Tieren unter ND im Vergleich zu Wildtyp-Tieren unter ND ein Trend zu einer etwa dreifach erhöhten mRNA, wenn auch nicht signifikant. Die Proteinexpression wurde hierbei (aus Zeitgründen) nicht untersucht. Diese Heraufregulation könnte dabei als spezifischer Effekt gewertet werden, da er unter den übrigen Versuchsbedingungen beziehungsweise Gruppenvergleichen nicht beobachtet worden ist. Wenngleich es sich um einen Trend handelt, wäre damit denkbar, dass die *Ogc*-mRNA-Heraufregulation ein direkter oder indirekter Effekt der erhöhten Metabolitenkonzentrationen ist und damit OGC ein Kandidat für einen GA/3OHGA-Transporter wäre.

4.1.3 Expression des Ornithin-Transporters 1 (*Orc1*, *Slc25a15*)

Der Ornithin-Transporter (= Ornithin-Citrullin-Transporter) besitzt zwei Isoformen, ORC1 (= *SLC25A15*) und ORC2 (= *SLC25A2*), die beide Ornithin, Lysin, Arginin und Citrullin transportieren. Er vollzieht den Austausch zwischen cytosolischem Ornithin und intramitochondrialem Citrullin und stellt eine wichtige Komponente des Harnstoffzyklus dar, indem er die im Cytosol und im Mitochondrium ablaufenden Enzymaktivitäten miteinander verbindet. Der Defekt des *SLC25a15* führt zu einer Harnstoffzyklusstörung, dem Hyperornithinämie-Hyperammonämie-Homocitrullinurie-(HHH-)Syndrom (Camacho et al., 1999).

In der *Real-time*-PCR wies der *Orc1* eine erhöhte mRNA-Expression in **Lebergewebe** auf und zwar sowohl bei Wildtyp- als auch bei *Gcdh*^{-/-}-Mäusen unter HPD im Vergleich zu ND-behandelten Tieren. Da diese Heraufregulation bei *Gcdh*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Tieren gleichen Genotyps unter ND nicht vorhanden war, ist am ehesten davon auszugehen, dass es sich dabei um einen GA1-unabhängigen Effekt der HPD-Applikation handelt.

Des Weiteren wurde in **Niere** und **Hirnstamm** eine Steigerung der mRNA-Expression *Gcdh*-defizienter Tiere unter ND im Vergleich zu Wildtyp-Tieren unter ND festgestellt, und zwar signifikant um den Faktor 1,45 beziehungsweise 3,1. Diese Heraufregulation war bei den übrigen Vergleichen nicht zu beobachten. Dies lässt darauf schließen, dass es sich um einen für die GCDH-Defizienz spezifischen Effekt handelt. Die Proteinkonzentration des ORC1 wurde (aus Zeitgründen) nicht untersucht.

Da ORC1 nach bisheriger Literaturlage Arginin, Citrullin, Lysin und Ornithin und keine Dicarboxylate transportiert (Palmieri, 2004), kommt ORC1 eher nicht als direkter Transporter für

GA oder 3OHGA in Frage. Die beobachteten Effekte müssen daher sekundärer Natur sein. Die Beobachtungen sind im Einklang mit aktuellen Befunden, bei denen die Applikation von GA oder 3OHGA in einem primären dreidimensionalen neuronalen Kulturmodell zu einer Erhöhung des Ammoniaks führt. Als Mechanismus wird vermutet, dass GA und 3OHGA vorwiegend auf Astrozyten toxisch wirken und es in der Folge zu einer funktionellen Defizienz der Glutaminsynthase kommt (Jafari et al., 2013). Letztere ist in Hirngewebe der Hauptmechanismus zur Ammoniakentgiftung, da die Enzyme des Harnstoffzyklus vorwiegend hepatisch exprimiert werden. Es wäre zu überprüfen, ob neben dem ORC1 als Folge der Ammoniakerrhöhung auch andere Enzyme des Harnstoffzyklus in den hier untersuchten Geweben heraufreguliert sind und damit eine Erhöhung des Ammoniaks zu einer Erhöhung der Expression der am Harnstoffzyklus beteiligten Proteine einschließlich des ORC1 führt.

4.1.4 Expression des Carnitin/Acylcarnitin-Transporters (*Cac*, *Slc25a20*)

Der CAC nimmt den Austausch von cytosolischem Acylcarnitin und mitochondrialem Carnitin vor und spielt damit eine wichtige Rolle im Carnitinzyklus und damit beim Abbau von CoA-Verbindungen wie beispielsweise Glutaryl-CoA (Palmieri, 2004).

Die Expressionsuntersuchungen an **Lebergewebe** ergaben bei keinem der durchgeführten Vergleiche Expressionsunterschiede auf mRNA- oder Proteinebene. Allerdings zeigte sowohl **Nieren-** als auch **Hirnstammgewebe** eine Heraufregulation der *Cac*-mRNA bei *Gcdh*^{-/-} im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen unter ND. Bei den anderen Vergleichen, also HPD- versus ND-behandelte Tiere mit oder ohne *Gcdh*-Defizienz, zeigten sich keine Veränderungen. Die genannte Heraufregulation war in Nierengewebe signifikant mit dem Faktor 1,9, während die Heraufregulation im Hirnstammgewebe nicht signifikant war, aber mit dem Faktor 2,6 einem deutlichen Trend entsprach. Die *Cac*-mRNA-Heraufregulation ist als spezifisch anzusehen und ist im Einklang mit dem erhöhten Anfall von Glutaryl-CoA bei *Gcdh*-Defizienz und damit mit dem vermehrten Transportbedarf für diesen Metaboliten. Unklar bleibt, warum der *Cac* in seiner Expression nicht im Lebergewebe heraufreguliert ist, dem Ort der höchsten Expression von GCDH und damit des vermutlich quantitativ bedeutsamsten Anfalls von Glutaryl-CoA (Goodman und Ferman, 2001; Kölker et al., 2003). Auch ist nicht erklärt, warum es bei *Gcdh*^{-/-}-Mäusen unter HPD, bei denen die Konzentration von GA und 3OHGA weiter ansteigt (Keyser et al., 2008), nicht zu einer weiteren Expressionserhöhung von *Cac* kommt. Insgesamt müssen also noch weitere indirekte Faktoren für die Regulation der *Cac*-Expression eine Rolle spielen, insbesondere im Nieren- und Hirngewebe.

Die Proteinkonzentration des *Cac* wurde (aus Zeitgründen) nicht untersucht.

4.1.5 Expression des Oxodicarboxylat-Transporters (Odc, *Slc25a21*)

Die Hauptfunktion des ODC besteht in der Aufnahme von cytosolischem Oxoadipat in die mitochondriale Matrix und stellt damit einen wichtigen Schritt im Abbau von Lysin dar (Cox, 2001).

In der **Leber** fand sich bei *Gcdh*-defizienten Mäusen mit ND im Vergleich zu Wildtyp-Tieren mit ND eine 1,63-fach signifikant gesteigerte *Odc*-mRNA-Expression. Diese Heraufregulation stimmt überein mit der einerseits großen Bedeutung der *Odc*-Funktion im Rahmen des Lysinabbaus (Cox, 2001), als auch der hohen GCDH-Expression im Lebergewebe (Kölker et al., 2003). Wie auch beim *Cac* bleibt allerdings unklar, warum die *Odc*-Expression bei Anfall noch höherer Metabolitkonzentrationen, also bei *Gcdh*^{-/-}-Mäusen unter HPD, im Vergleich zu ND-behandelten Tieren, nicht noch weiter ansteigt. Die Heraufregulation des *Odc* bei *Gcdh*-Defizienz entspräche dabei dem Versuch der Zellen, durch eine Heraufregulation des *Odc* den Defekt im übernächst nachgeschalteten enzymatischen Abbauschritt (GCDH) zu kompensieren. Da *Odc* vornehmlich längerkettige Dicarboxylate über die mitochondrialen Membranen transloziert, erscheint eine direkte Beteiligung am Transport von GA und 3OHGA unwahrscheinlich.

Im **Nierengewebe** fanden sich im Vergleich der verschiedenen Gruppen keine signifikant veränderten *Odc*-Expressionen. Allerdings besteht auf mRNA-Ebene ein Trend zu einer erhöhten *Odc*-Expression bei *Gcdh*-defizienten Mäusen verglichen mit Wildtyp-Mäusen, beide unter ND. Damit ist dieser Trend am ehesten als nicht GA1-spezifisch einzustufen.

4.1.6 Zusammenfassung der Befunde der Expressionsveränderungen und Ausblick

Auf der nachfolgenden Seite ist eine Übersicht über die Ergebnisse der Expressionsanalysen der einzelnen Transporter dargestellt.

Tabelle 14 (auf der nachfolgenden Seite): Übersicht über die Ergebnisse der Expressionsanalysen der einzelnen Transporter. WT = Wildtyp, ND = Normaldiät, HPD = Hochproteindiät. n.s. = keine signifikanten Expressionsänderungen. Rote Schriftfarbe: Effekte, die auf eine direkte Beteiligung des Transporters an der Translokation GA1-spezifischer pathologischer Metaboliten über mitochondriale Membranen hinweisen könnten. Blaue Schriftfarbe: Effekte, die am ehesten auf einen indirekten Zusammenhang mit GCDH-Defizienz hinweisen.

Diskussion

<u>Transporter</u> <u>(Gensymbol)</u>	<u>Vergleich</u>	<u>Leber</u>	<u>Niere</u>	<u>Hirn</u>	<u>Haupteffekt</u>	<u>Erklärung</u>
DIC (SLC25A10)	<i>Gcdh</i> ^{-/-} -ND vs. WT-ND	mRNA: n.s. Protein: n.s.	mRNA: 3,4-fach ↑ Protein: n.s.	mRNA: n.s.	Niere → mRNA-Heraufregulation	DIC-Kandidat in der Niere?
	WT-HPD vs. WT-ND	mRNA: 1,6-fach ↑ Protein: n.s.	mRNA: n.s. Protein: n.s.	mRNA: n.s.	Leber → mRNA-Heraufregulation	HPD-Effekt
	<i>Gcdh</i> ^{-/-} -HPD vs. <i>Gcdh</i> ^{-/-} -ND	mRNA: n.s. Protein: n.s.	mRNA: 0,6-fach ↓ Protein: n.s.	mRNA: n.s.	-	-
OGC (SLC25A11)	<i>Gcdh</i> ^{-/-} -ND vs. WT-ND	mRNA: n.s. Protein: n.s.	mRNA: n.s. Protein: n.s.	mRNA: n.s., Trend zu 3,1-fach ↑ im Hirnstamm	Hirnstamm → Trend zu mRNA Heraufregulation	OGC möglicher Kandidat im Hirn?
	WT-HPD vs. WT-ND	mRNA: 1,77-fach ↑ Protein: n.s.	mRNA: n.s. Protein: n.s.	mRNA: n.s.	Leber → mRNA-Heraufregulation	HPD-Effekt
	<i>Gcdh</i> ^{-/-} -HPD vs. <i>Gcdh</i> ^{-/-} -ND	mRNA: n.s., Trend zu 1,6-fach ↑ Protein: n.s., Trend zu 1,3-fach ↑	mRNA: n.s. Protein: n.s.	mRNA: n.s.	Leber → Trend zu mRNA- und Protein Heraufregulation	
ORC1 (SLC25A15)	<i>Gcdh</i> ^{-/-} -ND vs. WT-ND	mRNA: n.s.	mRNA: 1,45-fach ↑	mRNA: 3,1-fach ↑ im Hirnstamm	Niere & Hirnstamm → mRNA-Heraufregulation	ORC1 indirekt beteiligt in Niere & Hirn?
	WT-HPD vs. WT-ND	mRNA: 1,85-fach ↑	mRNA: n.s.	mRNA: n.s.	Leber → mRNA-Heraufregulation	HPD-Effekt
	<i>Gcdh</i> ^{-/-} -HPD vs. <i>Gcdh</i> ^{-/-} -ND	mRNA: 1,95-fach ↑	mRNA: n.s., Trend zu 0,5-fach ↓	mRNA: n.s.	Leber → mRNA-Heraufregulation	
CAC (SLC25A20)	<i>Gcdh</i> ^{-/-} -ND vs. WT-ND	mRNA: n.s.	mRNA: 1,9-fach ↑	mRNA: Trend zu 2,6-fach ↑ im Hirnstamm	Niere & Hirnstamm → mRNA-Heraufregulation	CAC indirekt beteiligt in Niere & Hirn?
	WT-HPD vs. WT-ND	mRNA: n.s.	mRNA: n.s.	mRNA: n.s.	-	-
	<i>Gcdh</i> ^{-/-} -HPD vs. <i>Gcdh</i> ^{-/-} -ND	mRNA: n.s.	mRNA: n.s.	mRNA: n.s.	-	-
ODC (SLC25A21)	<i>Gcdh</i> ^{-/-} -ND vs. WT-ND	mRNA: 1,6-fach ↑ Protein: n.s.	mRNA: Trend zu 1,95-fach ↑ Protein: n.s.	mRNA: n.s.	Leber → mRNA-Heraufregulation Niere → Trend zu mRNA Heraufregulation	große Bedeutung von ODC für den Lysinabbau
	WT-HPD vs. WT-ND	mRNA: n.s. Protein: n.s.	mRNA: Trend zu 1,92-fach ↑ Protein: n.s.	mRNA: n.s.	Niere → Trend zu mRNA Heraufregulation	unspezifischer Effekt
	<i>Gcdh</i> ^{-/-} -HPD vs. <i>Gcdh</i> ^{-/-} -ND	mRNA: n.s. Protein: n.s.	mRNA: n.s. Protein: n.s.	mRNA: n.s.	-	-

Zusammenfassend ergaben sich in den durchgeführten Expressionsanalysen bei *Gcdh*^{-/-}-Mäusen und Wildtyp-Mäusen unter HPD oder ND in den entsprechenden Vergleichen der Gruppen untereinander vor allem drei unterschiedliche Arten von Befunden:

1. Es zeigten sich Effekte, die am ehesten eine unspezifische Folge der Applikation der HPD sind und nicht in Zusammenhang mit dem jeweiligen Genotyp stehen. Dies betrifft die mRNA-Heraufregulation von *Dic*, *Ogc* und *Orc1* im Lebergewebe HPD-behandelter Tiere („*unspezifische HPD-Effekte*“).
2. Es zeigten sich spezifische, am ehesten mit *Gcdh*-Defizienz und der damit verbundenen Akkumulation pathologischer Metaboliten in Zusammenhang stehende Heraufregulationen von Transportern, die als direkte Kandidaten für die Translokation von GA und 3OHGA unwahrscheinlich sind (in Tabelle 14 in blauer Schriftfarbe unterlegt). Diese Effekte betreffen vielmehr sekundäre Veränderungen in unterschiedlichen Stoffwechselwegen. Hier sind die erhöhten renalen und cerebralen mRNA-Expressionen von *Orc1* (Rolle im Harnstoffzyklus, erhöhte Ammoniakkonzentrationen in Gegenwart von GA und 3OHGA) und *Cac* (Bedeutung des Carnitinzyklus beim Transport von Glutaryl-CoA) zu nennen, darüber hinaus die erhöhte Expression des *Odc* (wichtiger Transportschritt im Lysinabbau) in der Leber („*indirekt beteiligte Transporter*“).
3. Es fanden sich erhöhte Expressionen von Transportproteinen, die aufgrund ihrer Substratspezifität als direkte Transporter für GA und 3OHGA in Frage kommen (in Tabelle 14 in roter Schriftfarbe unterlegt). Dies betrifft die erhöhte Expression von *Dic* in der Niere und von *Ogc* im Hirngewebe („*direkt beteiligte Transporter*“).

Für die Festlegung einer direkten Beteiligung der genannten Transporter an der Translokation von GA und 3OHGA über die mitochondriale Membran reicht der Nachweis einer erhöhten Expression nicht aus. Die direkte Translokation von GA oder 3OHGA über Membranen kann nur über funktionelle Studien erfolgen. Im Rahmen der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Arbeit war als nächster Schritt versucht worden, die Aufnahme von [¹⁴C]-markierter GA und [³H]-markierter 3OHGA in Mitochondrienextrakte zu untersuchen. Diese Studien waren sowohl an Mitochondrienextrakten aus Lebergewebe und unbehandelten Zellen geplant, als auch an HeLa-Zellen, in denen die verschiedenen SLC25-Transporter durch siRNA-Behandlung herabreguliert waren. Diese Experimente sind in der vorliegenden Arbeit nicht dargestellt worden, da es unter keiner der geschilderten experimentellen Bedingungen gelang, eine Aufnahme von Radioaktivität in die Mitochondrienextrakte nachzuweisen. Dafür kommen mehrere Erklärungen in Frage: Entweder waren die aufgereinigten Mitochondrien nicht mehr vital und wiesen daher nicht mehr die erforderliche ATP-Menge beziehungsweise die Konzentrationsgradienten derjenigen Substrate auf, die für den Antiport notwendig sind. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Menge aufgereinigter Mitochondrien nicht ausreichte, um Radioaktivität oberhalb des Grundrauschens des Experimentes aufzunehmen, also die Nachweisgrenze des Experimentes zu niedrig war.

Anzustreben ist, das in der Literatur etablierte System rekombinant exprimierter, aufgereinigter und in Liposomen rekonstituierter SLC25-Transporter für die erforderlichen Studien anzuwenden (Palmieri, 2013). Diese Methode war zur Zeit des experimentellen Teils dieser Arbeit im Labor nicht etabliert und ein Aufbau der Methode in einem akzeptablen zeitlichen Rahmen nicht zu erreichen.

4.2 Das HeLa-Zellsystem als Alternative zum *Gcdh*^{-/-}-Mausmodell

Um die Auswirkungen einer verminderten *Gcdh*-Expression zu untersuchen und ein einfacheres System für zelluläre Untersuchungen der *Gcdh*-Defizienz zur Verfügung zu haben als das *Knock-out*-Mausmodell, sollte ein *in-vitro*-Zellmodell der GCDH-Defizienz erstellt werden. Dafür wurden HeLa-Zellen als Zelllinie ausgewählt, um dort durch den gezielten Einsatz *GCDH*-spezifischer siRNA eine Herabregulation der GCDH-Expression herbeizuführen. Zur Überprüfung, ob die Behandlung mit *GCDH*-siRNA tatsächlich zu einer reduzierten GCDH-Proteinexpression führt, wurden Expressionsanalysen mittels Western Blot durchgeführt. Im untersuchten Zeitraum (24–96 Stunden nach erster siRNA-Transfektion) zeigte sich ein stetiger Abfall der GCDH-Proteinmenge bis auf minimal 18 % der Ausgangsmenge nach 96 Stunden. In Ergänzung zur Kontrolle der GCDH-Proteinexpression im Western Blot wurden Immunfluoreszenz-Analysen durchgeführt. Auch hierbei bestätigte sich eine starke Reduktion des GCDH-spezifischen Signals bei gleichbleibender mitochondrialer Lokalisation des verbliebenen Proteins. Unklar bleibt, welcher GCDH-Restaktivität eine auf 18 % herabgesetzte Expression entspricht. Um dieser Frage nachzugehen, wären GCDH-Aktivitätsbestimmungen in den siRNA-behandelten Zellen notwendig. Zum Zeitpunkt der experimentellen Arbeiten stand im Labor kein GCDH-Aktivitätsassay zur Verfügung. Wenn eine auf 18 % der Ausgangsmenge reduzierte GCDH-Expression auch einer GCDH-Restaktivität von 18 % entspräche, wäre von einer relevanten Reduktion der GCDH-Aktivität auszugehen, da bei klinisch auffälligen Patienten GCDH-Restaktivitäten bis zu 30 % beschrieben worden sind (Busquets et al., 2000; Goodman et al., 1995; Mühlhausen et al., 2003; Pineda et al., 1998).

Das HeLa-Zellsystem stellt damit ein potentielles Zellkulturmodell dar, an dem die Beobachtung und Untersuchung reduzierter GCDH-Mengen auf verschiedene Stoffwechselfparameter der Zelle möglich wird.

Im Anschluss an die Generierung des Zellmodells sollte überprüft werden, ob sich die bei der Glutarazidurie Typ 1 entstehenden Metaboliten GA und 3OHGA in den Zellkulturmedien der GCDH-siRNA-behandelten HeLa-Zellen nachweisen lassen. Mittels Gaschromatographie und nachfolgender Massenspektrometrie (GC/MS) sollten die in den Medien und Zellextrakten enthaltenen Metaboliten GA und 3OHGA nachgewiesen und über mitgeführte Standards quantifiziert werden. Leider gelang es mit dieser Methode nicht, GA und 3OHGA in den Medien oder den Zellextrakten nachzuweisen. Daher sind diese Untersuchungen im Ergebnisteil nicht

mit aufgeführt. Für die mangelnde Nachweisbarkeit von GA und 3OHGA gibt es mehrere denkbare Erklärungen: Dies könnte zum einen darin begründet sein, dass eine Behandlung der Zellen mit siRNA über 96 Stunden bei einer bekannten Halblebenszeit des GCDH-Proteins von 34,5 Stunden (Keyser et al., 2008) nicht ausreichend ist, um die Menge an enzymatisch aktivem Protein so weit zu vermindern, dass es zu einem relevanten Anstieg an Metaboliten kommt. Eine zweite Möglichkeit wäre, dass das gewählte Verfahren nicht sensitiv genug war, um GA und 3OHGA in den vorliegenden Konzentrationen nachzuweisen.

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob sich in GCDH-siRNA-behandelten Zellen ähnliche Effekte auf die Expression von Transportern zeigten, wie sie sich im GA1-Mausmodell und anderen heterologen Expressionssystemen unter den Bedingungen der *Gcdh*-Defizienz gezeigt hatten. Daher schien es interessant, ob und auf welche Weise Transporter in den Zellen mit verminderter GCDH-Expression in ihrer Expression verändert sind. Ausgewählt wurden dafür vier Transporter:

1. Der Dic (*Slc2510*), der in vorangegangenen Untersuchungen eine erhöhte mRNA-Expression in der Niere von *Gcdh*^{-/-}-Tieren zeigte, so dass eine Beteiligung am Transport der toxischen Metaboliten Glutarsäure und 3-Hydroxyglutarsäure möglich erschien.
2. Der Odc (*Slc25a21*), der bei *Gcdh*^{-/-}-Tieren im Lebergewebe eine erhöhte mRNA-Expression aufwies, so dass ein indirekter Zusammenhang mit der Akkumulation von GA und 3OHGA vermutet werden kann.
3. Der NaC3 (*Slc13a3*), der als erster Transporter für 3OHGA beschrieben worden ist (Stellmer et al., 2007) und ebenfalls in Nierengewebe von *Gcdh*^{-/-}-Mäusen erhöht exprimiert wird.
4. Der Oat1 (*Slc22a6*), der ein großes Substratspektrum aufweist und ebenfalls am Transport der toxischen Metaboliten Glutarsäure und 3-Hydroxyglutarsäure beteiligt ist (Hagos et al., 2008).

Die Auswertung der mittels *Real-time*-PCR untersuchten mRNA-Expression der aufgeführten Transporter zeigte keine Expressionsunterschiede der untersuchten Transporter bei siRNA-behandelten Zellen im Vergleich zu Kontroll-Zellen. Eine Expression des NaC3 ließ sich nicht nachweisen. Für dieses im Vergleich zum Mausmodell unterschiedliche Verhalten der siRNA-behandelten HeLa-Zellen gibt es mehrere mögliche Ursachen. So kann, wie oben mit Bezug auf die Metabolitenmessungen, die Zeit nach siRNA-Transfektion zu kurz sein, als dass sich die Effekte abzeichnen könnten, zum Beispiel durch die Halblebenszeit des GCDH-Proteins von 34,5 Stunden. Ein weiterer wichtiger Faktor ist der prinzipielle Unterschied der Zellsysteme. Während die Expression der einzelnen Transporter in unterschiedlichen Organen im *Gcdh*-defizienten Mausmodell gemessen wurde, handelt es sich bei HeLa-Zellen um eine Tumorzelllinie. Die daraus resultierenden zelltypspezifischen Unterschiede hinsichtlich der exprimierten Proteine könnten die Unterschiede im Verhalten der Zellen nach siRNA-Herabregulation der GCDH erklären.

Zusammenfassend erscheint das generierte *in-vitro*-Modell als vielversprechende Ergänzung zu bereits vorhandenen *in-vivo*-Modellen. Vor einem größeren Einsatz dieses Modells wären aber noch Arbeiten notwendig, um die biochemischen und metabolischen Eigenschaften von Zellen nach *GDCH*-siRNA-Behandlung näher zu charakterisieren. Wie oben aufgeführt, sollten zum einen GCDH-Enzymaktivitätsmessungen von HeLa-Zellen mit und ohne GCDH-siRNA-Behandlung parallel zur Quantifizierung der GCDH-Proteinmenge durchgeführt werden, um die Proteinmenge mit der Enzymrestaktivität zu korrelieren. Zum anderen sollten die Metabolitenmessungen in siRNA-behandelten Zellen ausgeweitet werden, um mit höherer Sensitivität die Menge an GA und 3OHGA zu quantifizieren und gegebenenfalls die Messungen auf spätere Zeitpunkte nach siRNA-Transfektion auszuweiten. So könnte festgestellt werden, nach welcher Zeit ein maximaler Metabolitenanstieg zu erwarten ist.

5 Zusammenfassung

Die Glutarazidurie Typ 1 (GA1) ist eine angeborene neurometabolische Erkrankung, die durch den Defekt des mitochondrialen Matrixenzyms Glutaryl-CoA-Dehydrogenase (GCDH), einem Enzym im Abbau der Aminosäuren Lysin, Hydroxylysin und Tryptophan, bedingt ist. Durch den Enzymdefekt kommt es zur Akkumulation der pathologischen Metaboliten GA und 3OHGA in Körperflüssigkeiten und Geweben. Im Rahmen kataboler Zustände sind betroffene Patienten in einem Altersfenster von der Geburt und etwa bis zum vierten Lebensjahr der Gefahr sogenannter encephalopathischer Krisen ausgesetzt, die zum Untergang des Striatums mit nachfolgender irreversibler dyston-dyskinetischer Bewegungsstörung führen können. Es steht ein *Gcdh*-defizientes Mausmodell mit dem biochemischen Phänotyp der GA1 zur Verfügung, in dem durch Applikation einer Hochprotein-diät (HPD) metabolische Krisen ausgelöst werden können. Sowohl in diesem Tiermodell als auch in verschiedenen heterologen Expressionssystemen war in Vorarbeiten der Transport der akkumulierenden pathologischen Metaboliten untersucht worden. So gelang es, den Natrium-abhängigen Dicarboxylat-Cotransporter 3 (NaC3) und die organischen Anionen-Transporter 1 und 4 (OAT1 und OAT4) als GA- beziehungsweise 3OHGA-translozierende Proteine an der Plasmamembran zu identifizieren. Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit bestand darin, nach Hinweisen für Transporter zu suchen, die am *intrazellulären* Transport von GA und 3OHGA beteiligt sein könnten. Dazu sollte die mRNA- und Proteinexpression verschiedener mitochondrialer Transporter aus der Familie der SLC25-Proteine in unterschiedlichen Geweben im *Gcdh*^{-/-}-Mausmodell unter basalen Bedingungen und während der induzierten metabolischen Krise untersucht und mit den Daten aus Wildtyp-Tieren verglichen werden. Zunächst wurden aus den bisher beschriebenen SLC25-Transportern fünf ausgewählt, die aufgrund ihrer Substratspezifität als mögliche Kandidaten für eine direkte oder indirekte Beteiligung am Transport von GA und 3OHGA in Frage kamen. Die Expressionsanalysen der ausgewählten mitochondrialen Transporter erbrachten drei unterschiedliche Arten von Befunden:

- Die mRNA-Expressionen des Dicarboxylatcarriers (Dic), des Oxoglutaratcarriers (Ogc) und des Ornithincarriers 1 (Orc1) im Lebergewebe waren abhängig von der Applikation einer HPD, aber unabhängig vom Phänotyp (*Gcdh*^{-/-} versus Wildtyp). Daher wurden diese Befunde als unspezifische Effekte der HPD gewertet.
- Die renalen und cerebralen mRNA-Expressionen von Orc1, vom Carnitin-Acylcarnitincarrier (Cac) sowie die des Oxoadipatcarriers (Odc) in der Leber waren signifikant und spezifisch mit *Gcdh*-Defizienz assoziiert erhöht. Diese Transporter erscheinen aufgrund ihrer bekannten Substratspezifität als Kandidaten für die direkte Translokation von GA und 3OHGA unwahrscheinlich, sind aber an Stoffwechselwegen beteiligt, die mit der Pathogenese der GA1 assoziiert sein könnten (Orc1 → Rolle im Harnstoffzyklus bei bekannt erhöhten Ammoniakkonzentrationen in Gegenwart von GA und 3OHGA; Cac → Bedeutung des Carnitinzyklus beim Transport von Glutaryl-CoA;

Odc → wichtiger Transportschritt im Lysinabbau). Die Beteiligung dieser genannten Transporter an der Pathogenese der GA1 wurde daher als indirekt eingeordnet.

- Die Expressionen des Dic in der Niere und des Ogc im Hirngewebe waren bei *Gcdh*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren signifikant erhöht. Beide Transporter kommen – unterstützt durch die vorliegenden Daten – als Kandidaten für den direkten Transport von GA und 3OHGA in Frage.

Zusammenfassend konnten aus den ausgewählten Transportern der SLC25-Familie solche identifiziert werden, die als vielversprechende Ziele für anschließende funktionelle Studien angesehen werden: Dic und Ogc sollten in funktionellen Studien direkt auf ihre Fähigkeit, GA und 3OHGA zu translokieren, untersucht werden. Die Heraufregulation des Orc1 und des Cac weisen darauf hin, dass eine genauere Analyse des ihnen zugewiesenen Stoffwechselweges (Orc1 → Harnstoffzyklus, Cac → Carnitinzyklus) vielversprechend ist, um weitere Einblicke in die Pathogenese der GA1 zu erlangen. Zielführend könnten hier Expressionsuntersuchungen und Aktivitätsbestimmungen weiterer an den jeweiligen Stoffwechselwegen beteiligter Proteine sein.

Im zweiten Teil des Projektes wurden HeLa-Zellen mit *GCDH*-spezifischer siRNA behandelt. Es konnte nachgewiesen werden, dass die GCDH-Expression in diesem System bis auf 18 % und damit deutlich supprimiert werden konnte. Weitere funktionelle (Bestimmung der GCDH-Enzymrestaktivität) und metabolische (Quantifizierung der akkumulierenden Metaboliten GA und 3OHGA) Studien sind notwendig, um dieses *in-vitro*-System näher zu charakterisieren. Die hier vorgelegten Daten lassen das HeLa-*GCDH*-siRNA *knock-down*-System als vielversprechendes Modell erscheinen, das künftig ergänzend zu *in-vivo*-Modellen für die Analyse der Pathogenese der GA1 herangezogen werden kann.

6 Abkürzungsverzeichnis

3OHGA	3-Hydroxyglutarsäure
AADAT	2-Aminoadipat-Transaminase
AASS	2-Aminoadipat-6-Semialdehyd-Dehydrogenase
AGC	Aspartate/glutamate carrier
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinder-Serumalbumin
CAC	Carnitine/acylcarnitine carrier
cDNA	Complementary DNA
CIC	Citrate carrier
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A
CPT	Carnitin-Palmitoyl-Transferase
CT	Cycle of threshold
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHTKD1	E1-Untereinheit des OGDH-Komplexes
DIC	Dicarboxylate carrier
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinacid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ECL	Enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
FKS	Fökales Kälberserum
GA	Glutarsäure
GA1	Glutarazidurie Typ 1
GA2	Glutarazidurie Typ 2
GA3	Glutarazidurie Typ 3

Abkürzungsverzeichnis

GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GCDH	Glutaryl-Coenzym A Dehydrogenase
GCDH	Proteinsymbol des Menschen
Gcdh	Proteinsymbol der Maus
<i>GCDH</i>	Gensymbol des Menschen
<i>Gcdh</i>	Gensymbol der Maus
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HGNC	HUGO Gene Nomenclature Committee
HHH-Syndrom	Hyperornithinämie-Hyperammonämie-Homocitrullinurie
HPD	Hochproteindiät
HRP	Meerrettichperoxidase
Ig	Immunglobulin
KCl	Kaliumchlorid
KG	Ketoglutarat
KOH	Kaliumhydroxid
Mab	Monoclonal antibody
MnSOD	Mangan-abhängige Superoxiddismutase
mpk CCD-Zellen	Maus-Zelllinie
mRNA	Messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
NaC	Natrium-abhängiger Dicarboxylat-Cotransporter
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADP ⁺	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
ND	Normaldiät
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
O ₂	Sauerstoff
OAT	Organischer Anionen-Transporter

Abkürzungsverzeichnis

ODC	Oxodicarboxylate carrier
OGC	Oxoglutarate carrier
OGDHc	2-Oxoglutarat-Dehydrogenase-Komplex
ORC1	Ornithin carrier 1
ORC2	Ornithin carrier 2
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDA	p-Phenylendiamin
PFBH	Pentafluorobenzylhydroxylaminhydrochlorid
PIPOX	Pipecolat-Oxidase
PyC	Pyruvate carrier
RNA	Ribonucleinacid
SDS	Sodium Dodecyl sulfate
siRNA	Small interfering RNA
SLC	Solute carrier
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Thermophilus aquaticus
TEMED	N,N,N',N',-Tetra-methyl-ethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
WB	Western Blot
+/+	Wildtyp
-/-	Knock-out (Gen-defizient)

7 Literaturverzeichnis

- Alebouyeh M., Takeda M., Onozato M.L., Tojo A., Noshiro R., Hasannejad H., Inatomi J., Narikawa S., Huang X.L., Khamdang S., Anzai N., Endou H. (2003): Expression of human organic anion transporters in the choroid plexus and their interactions with neurotransmitter metabolites. *J Pharmacol Sci* 93: 430-436.
- Anzai N., Kanai Y., Endou H. (2006): Organic anion transporter family: current knowledge. *J Pharmacol Sci* 100: 411–426.
- AWMF-Register Nr. 027/018, Klasse S3, März 2011, Leitlinie der Arbeitsgemeinschaft für pädiatrische Stoffwechselstörungen der Deutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin, APS: Diagnostik, Therapie und Management der Glutarazidurie Typ 1.
- Baric I., Wagner L., Feyh P., Liesert M., Buckel W., Hoffmann G.F. (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.
- Bradford M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72:248-252.
- Buist S.C., Cherrington N.J., Choudhuri S., Hartley D.P., Klaassen C.D. (2002): Gender-specific and developmental influences on the expression of rat organic anion transporters. *J Pharmacol Exp Ther* 301: 145–151.
- Burckhardt B.C., Burckhardt G. (2003): Transport of organic anions across the basolateral membrane of proximal tubule cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 146: 95–158.
- Busquets C., Merinero B., Christensen E., Gelpi J.L., Campistol J., Pineda M., Fernandez-Alvarez E., Prats J.M., Sans A., Arteaga R., Marti M., Campos J., Martinez-Pardo M., Martinez-Bermejo A., Ruiz-Falco M.L., Vaquerizo J., Orozo M., Ugarte M., Coll M.J., Ribes A. (2000): Glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency in Spain: evidence of two groups of patients, genetically and biochemically distinct. *Pediatr Res* 48: 315–322.
- Camacho J.A., Obie C., Biery B., Goodman B.K., Hu C.A., Almashanu S., Steel G., Casey R., Lambert M., Mitchell G.A., Valle D. (1999): Hyperornithinaemia-hyperammonaemia-homocitrullinuria syndrome is caused by mutations in a gene encoding a mitochondrial ornithine transporter. *Nat Genet* 22: 151–158.

- Christensen E., Ribes A., Merinero B., Zschocke J. (2004): Correlation of genotype and phenotype in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inher Metab Dis* 27: 861–868.
- Cox R.P. (2001): Errors of lysine metabolism. In: Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D., Childs B., Kinzler K.W., Vogelstein B. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8 ed. McGraw-Hill Inc., New York, 1965–1970.
- Danhauser K., Sauer S.W., Haack T.B., Wieland T., Staufner C., Graf E., Zschocke J., Strom T.M., Traub T., Okun J.G., Meitinger T., Hoffmann G.F., Prokisch H., Kölker S. (2012): *DHTKD1* mutations cause 2-aminoadipic and 2-oxoadipic aciduria. *Am J Hum Genet* 91: 1082–1087.
- Das A.M., Lucke T., 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.
- Fiermonte G., Palmieri L., Dolce V., Lasorsa F.M., Palmieri F., Runswick M.J., Walker J.E. (1998): The Sequence, Bacterial Expression, and Functional Reconstitution of the Rat Mitochondrial Dicarboxylate Transporter Cloned via Distant Homologs in Yeast and *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 273: 24754–24759.
- Fiermonte G., Dolce V., Palmieri L., Ventura M., Runswick M.J., Palmieri F., Walker J.E. (2001) Identification of the human mitochondrial oxodicarboxylate carrier: bacterial expression, reconstitution, functional characterization, tissue distribution, and chromosomal location. *J Biol Chem* 276: 8225–8230.
- Fiermonte G., Dolce V., David L., Santorelli F.M., Dionisi-Vici C., Palmieri F., Walker J.E. (2003): The mitochondrial ornithine transporter. Bacterial expression, reconstitution, functional characterization, and tissue distribution of two human isoforms. *J Biol Chem* 278: 32778–32783.
- Forstner R., Hoffmann G.F., Gassner I., Heideman P., De Klerk J.B., Lawrenz-Wolf B., Doring E., Weiss-Wichert P., Troger J., Colombo J.P., Plochl E. (1999): Glutaric aciduria type I: ultrasonographic demonstration of early signs. *Pediatr Radiol* 29: 138–143.
- Fox T. D. (2012) Mitochondrial Protein Synthesis, Import, and Assembly. *Genetics* 192(4):1203-1234.
- Freudenberg F., Lukacs Z., Ullrich K. (2004): 3-Hydroxyglutaric acid fails to affect the viability of primary neuronal rat cells. *Neurobiol Dis* 16: 581–584.

- Goodman S.I., Markey S.P., Moe P.G., Miles B.S., Teng C.C. (1975): Glutaric aciduria; a „new“ disorder of amino acid metabolism. *Biochem Med* 12: 12–21.
- Goodman S.I., Norenberg M.D., Shikes R.H., Breslich D.J., Moe P.G. (1977): Glutaric aciduria: biochemical and morphologic considerations. *J Pediatr* 90: 746–750.
- Goodman S.I., Kratz L.E., DiGiulio K.A., Biery B.J., Goodman K.E., Isaya G., Frerman F.E. (1995): Cloning of glutaryl-CoA dehydrogenase cDNA, and expression of wild type and mutant enzymes in *Escherichia coli*. *Hum Mol Genet* 4: 1493–1498.
- Goodman S.I., Stein D.E., Schlesinger S., Christensen E., Schwartz M., Greenberg C.R., Elpeleg O.N. (1998): Glutaryl-CoA dehydrogenase mutations in glutaric acidemia (type I): review and report of thirty novel mutations. *Hum Mutat* 12: 141–144.
- Goodman S.I. (2001): Prenatal diagnosis of glutaric acidemias. *Prenat Diagn* 21: 1167–1168.
- Goodman S.I., Frerman F.E. (2001): Organic acidemias due to defects in lysine oxidation: 2-ketoadipic acidemia and glutaric acidemia. In: Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D., Childs B, Kinzler K.W., Vogelstein B. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8 ed. McGraw-Hill Inc., New York, USA, 2195–2204.
- Graham J. M. (2001a): Isolation of Mitochondria from Tissues and Cells by Differential Centrifugation. *Current Protocols in Cell Biology*.
- Graham J. M. (2001b): Purification of a Crude Mitochondrial Fraction by Density-Gradient Centrifugation. *Current Protocols in Cell Biology*.
- Greenberg C.R., Duncan A.M., Gregory C.A., Singal R., Goodman S.I. (1994): Assignment of human glutaryl-CoA dehydrogenase gene (GCDH) to the short arm of chromosome 19 (19p13.2) by in situ hybridization and somatic cell hybrid analysis. *Genomics* 21: 289–290.
- Greenberg C.R., Reimer D., Singal R., Triggs-Raine B., Chudley A.E., Dilling L.A., Philipps S., Haworth J.C., Seargeant L.E., Goodman S.I. (1995): A G-to-T transversion at the +5 position of intron 1 in the glutaryl CoA dehydrogenase gene is associated with the Island Lake variant of glutaric acidemia type I. *Hum Mol Genet* 4: 493–495.
- Häberle J., Boddaert N., Burlina A., Chakrapani A., Dixon M., Huemer M., Karall D., Martinelli D., Sanjurjo Crespo P., Santer R., Servais A., Valayannopoulos V., Lindner M., Rubio V., Dionisi-Vici C. (2012): Suggestes guidelines for the diagnosis and management of urea cycle disorders. *Orphanet J Rare Dis* 7: 32.

- Hagos Y., Krick W., Braulke T., Mühlhausen C., Burckhardt G., Burckhardt B.C. (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.
- Harting I., Neumaier-Probst E., Seitz A., Maier E.M., Assmann B., Baric I., Troncoso M., Mühlhausen C., Zschocke J., Boy N.P., Hoffmann G.F., Garbade S.F., Kölker S. (2009): Dynamic changes of striatal and extrastriatal abnormalities in glutaric aciduria type I. *Brain* 132: 1764–1782.
- Hartley L.M., Khwaja O.S., Verity C.M. (2001): Glutaric aciduria type 1 and nonaccidental head injury. *Pediatrics* 107: 174–175.
- Heringer J., Boy S.P., Ensenauer R., Assmann B., Zschocke J., Harting I., Lucke T., Maier E.M., Mühlhausen C., Haegi G., Hoffmann G.F., Burgard P., Kölker S. (2010): Use of guidelines improves the neurological outcome in glutaric aciduria type I. *Ann Neurol* 68: 743–752.
- Hoffmann G.F., Athanassopoulos S., Burlina A.B., Duran M., de Klerk J.B., Lehnert W., Leonard J.V., Monavari A.A., Muller E., Muntau A.C., Naughten E.R., Plecko-Starting B., Superti-Furga A., Zschocke J., Christensen E. (1996): Clinical course, early diagnosis, treatment, and prevention of disease in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Neuropediatrics* 27: 115–123.
- Huizing M., Iacobazzi V., Ijlst L., Savelkoul P., Ruitenbeek W., van den Heuvel L., Indiveri C., Smeitink J., Trijbels F., Wanders R., Palmieri F. (1997): Cloning of the human carnitine-acylcarnitine carrier cDNA and identification of the molecular defect in a patient. *Am J Hum Genet* 61: 1239–1245.
- Iacobazzi V., Naglieri M.A., Stanley C.A., Wanders R.J., Palmieri F. (1998) The structure and organization of the human carnitine/acylcarnitine translocase (CACT1) gene². *Biochem Biophys Res Commun* 252: 770–774.
- Indiveri C., Tonazzi A., Stipani I., Palmieri F. (1997): The purified and reconstituted ornithine/citrulline carrier from rat liver mitochondria: electrical nature and coupling of the exchange reaction with H⁺ translocation. *Biochem J* 327 (Pt 2): 349–355.
- Indiveri C., Iacobazzi V., Giangregorio N., Palmieri F. (1998): Bacterial overexpression, purification and reconstitution of the carnitine/acylcarnitine carrier from rat liver mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 249: 589–594.

- Indiveri C., Iacobazzi V., Tonazzi A., Giangregorio N., Infantino V., Convertini P., Console L., Palmieri F. (2011): The mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier: function, structure and physiopathology. *Mol Aspects Med* 32: 223–233.
- Jafari P., Braissant O., Zavadakova P., Henry H., Bonafé L., Ballhusen D. (2013): Ammonium Accumulation and Cell Death in a Rat 3D Brain Cell Model of Glutaric Aciduria Type 1. *PLoS ONE* 8(1): e53735. doi:10.1371/journal.pone.0053735.
- Keyser B., Glatzel M., Stellmer F., Kortmann B., Lukacs Z., Kölker S., Sauer S.W., Muschol N., Herdering W., Thiem J., Goodman S.I., Koeller D.M., Ullrich K., Bräulke 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.
- Knerr I., Zschocke J., Trautmann U., Dorland L., de Koning T.J., Müller P., Christensen E., Trefz F.K., Wundisch G.F., Rascher W., Hoffmann G.F. (2002): Glutaric aciduria type III: a distinctive non-disease? *J Inher Metab Dis* 25: 483–490.
- Koeller D.M., Woontner M., Crnic L.S., Kleinschmidt-DeMasters B., Stephens J., Hunt E.L., Goodman S.I. (2002): Biochemical, pathologic and behavioral analysis of a mouse model of glutaric acidemia type I. *Hum Mol Genet* 11: 347–357.
- Kölker S., Hoffmann G.F., Schor D.S., Feyh P., Wagner L., Jeffrey I., Pourfarzam M., Okun J.G., Zschocke J., Baric I., Brain M.D., Jakobs C., Chalmers R.A. (2003): Glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency: region-specific analysis of organic acids and acylcarnitines in post mortem brain predicts vulnerability of the putamen. *Neuropediatrics* 34(5):253–260.
- Kölker S., Koeller D.M., Okun J.G., Hoffmann G.F. (2004a): Pathomechanismen of neurodegeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Ann Neurol*. 55: 7–12.
- Kölker S., Koeller D.M., Sauer S., Horster F., Schwab M.A., Hoffmann G.F., Ullrich K., Okun J.G. (2004b): Excitotoxicity and bioenergetics in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inher Metab Dis* 27: 805–812.
- Kölker S., Garbade S.F., Greenberg C.R., Leonard J.V., Saudubray J.M., Ribes A., Kalkanoglu H.S., Lund A.M., Merinero B., Wajner M., Troncoso M., Williams M., Walter J.H., Campistol J., Martí-Herrero M., Caswill M., Burlina A.B., Lagler F., Maier E.M., Schwahn B., Tokatli A., Dursun A., Coskun T., Chalmers R.A., Koeller D.M., Zschocke J., Christensen E., Burgard P., Hoffmann G.F. (2006): Natural history, outcome, and

- treatment efficacy in children and adults with glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatr Res* 59: 840–847.
- Kölker S., Garbade S.F., Boy N., Maier E.M., Meissner T., Mühlhausen C., Hennermann J.B., Lücke T., Häberle J., Baumkötter J., Haller W., Müller E., Zschocke J., Burgard P., Hoffmann G.F. (2007) Decline of acute encephalopathic crisis in children with glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency identified by newborn screening in Germany. *Pediatr Res* 62: 357–363.
- Kölker S., Christensen E., Leonard J.V., Greenberg C.R., Boneh A., Burlina A.B., Burlina A.P., Dixon M., Duran M., Garcia Cazorla A., Goodman S.I., Koeller D.M., Kyllerman M., Mühlhausen C., Müller E., Okun J.G., Wilcken B., Hoffmann G.F., Burgard P. (2011): Diagnosis and management of glutaric aciduria type I - revised recommendations. *J Inherit Metab Dis* 34: 677–694.
- Külkens S., Harting I., Sauer S., Zschocke J., Hoffmann G.F., Gruber S., Bodamer O.A., Kölker S. (2005): Late-onset neurologic disease in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Neurology* 64: 2142–2144.
- Laemmli U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lamp J., Keyser B., Koeller D.M., Ullrich K., Bräulke T., Mühlhausen C. (2011): Glutaric aciduria type 1 metabolites impair the succinate transport from astrocytic to neuronal cells. *J. Biol. Chem.* 286: 17777–17784.
- Lenich A.C., Goodman S.I. (1986): The purification and characterization of glutaryl-coenzyme A dehydrogenase from porcine and human liver. *J Biol Chem* 261: 4090–4096.
- Lindner M., Kölker S., Schulze A., Christensen E., Greenberg C.R., Hoffmann G.F. (2004): Neonatal screening for glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 27: 851–859.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402–408.
- Löffler G., Petrides P.E. (2002): *Biochemie und Pathobiochemie*. 7. Auflage. Springer Verlag. Seite 195-197.

- Lund T.M., Christensen E., Kristensen A.S., Schousboe A., Lund A.M. (2004): On the neurotoxicity of glutaric, 3-hydroxyglutaric, and trans-glutaconic acids in glutaric acidemia type 1. *J Neurosci Res* 77: 143–147.
- Mizuarai S., Miki S., Araki H., Takahashi K., Kotani H. (2005): Identification of Dicarboxylate Carrier Slc25a10 as Malate Transporter in *de Novo* Fatty Acid Synthesis. *J Biol Chem* 280: 32434–32441.
- Monné M., Miniero D.V., Bisaccia F., Fiermonte G. (2013): The mitochondrial oxoglutarate carrier: from identification to mechanism. *J Bioenerg Biomembr* 45: 1–13.
- Mühlhausen C., Christensen E., Schwartz M., Muschol N., Ullrich K., Lukacs Z. (2003): Severe phenotype despite high residual glutaryl-CoA dehydrogenase activity: a novel mutation in a Turkish patient with glutaric aciduria type 1. *J Inherit Metab Dis* 26: 713–714.
- Mühlhausen C., Hoffmann G.F., Strauss K.A., Kölker S., Okun J.G., Greenberg C.R., Naughten E.R., Ullrich K. (2004a): Maintenance treatment of glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 27: 885–892.
- Mühlhausen C., Ergun S., Strauss K.A., Koeller D.M., Crnic L., Woontner M., Goodman S.I., Ullrich K., Braulke T. (2004b): 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., Ergun S. (2006): Endothelial effects of 3-hydroxyglutaric acid: implications for glutaric aciduria type I. *Pediatr Res* 59: 196–202.
- Mühlhausen C. (2008): Untersuchungen zur Pathophysiologie der Glutarazidurie Typ 1. Medizinische Habilitation, Universität Hamburg-Eppendorf.
- Mühlhausen C., Burckhardt B.C., Hagos Y., Burckhardt G., Keyser B., Lukacs Z., Ullrich K., Braulke T. (2008): Membrane translocation of glutaric acid and its derivatives. *J Inherit Metab Dis* 31: 188–193.
- Pajor A.M., Gangula R., Yao X (2001): Cloning and functional characterization on a high-affinity Na⁺/dicarboxylate cotransporter from mouse brain. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: C1215–C1223.
- Palmieri L., Voza A., Hönlinger A., Dietmeier K., Palmisano A., Zara V., Palmieri F. (1999): The mitochondrial dicarboxylate carrier is essential for the growth of *Saccharomyces cerevisiae* on ethanol or acetate as the sole carbon source. *Mol Microbiol* 31: 569–577.

- Palmieri F. (2004): The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. *Pflugers Arch* 447: 689–709.
- Palmieri F. (2008): Diseases caused by defects of mitochondrial carriers: a review. *Biochim Biophys Acta* 1777: 564–578.
- Palmieri F., Pierri C.L. (2010): Structure and function of mitochondrial carriers - Role of the transmembrane helix P and G residues in the gating and transport mechanism. *FEBS Letters* 584: 1931–1939.
- Palmieri F. (2012): The mitochondrial transporter family SLC25: Identification, properties and physiopathology. *Mol Aspects Med* 34: 465–484.
- Palmieri F. (2013): The mitochondrial transporter family SLC25: Identification, properties and physiopathology. *Mol Aspects Med* 34: 465–484.
- Palmisano A., Zara V., Hönlinger A., Voza A., Dekker P. J. T., Pfanner N., Palmieri F. (1998): Targeting and assembly of the oxoglutarate carrier: general principles for biogenesis of carrier proteins of the mitochondrial inner membrane. *Biochem J* 333: 151–158.
- Pineda M., Ribes A., Busquets C., Vilaseca M.A., Aracil A., Christensen E. (1998): Glutaric aciduria type I with high residual glutaryl-CoA dehydrogenase activity. *Dev Med Child Neurol* 40: 840–842.
- Sai Y. (2005): Biochemical and molecular pharmacological aspects of transporters as determinants of drug disposition. *Drug Metab Pharmacokinet* 20: 91–99.
- Salvi S., Santorelli F.M., Bertini E., Boldrini R., Meli C., Donati A., Burlina A.B., Rizzo C., Di Capua M., Fariello G., Dionisi-Vici C. (2001): Clinical and molecular findings in hyperornithinemia-hyperammonemia-homocitrullinuria syndrome. *Neurology* 57: 911–914.
- Sandoval P.C., Slentz D.H., Pisitkun T., Saeed F., Hoffert J.D. Knepper M.A. (2013): Proteome-wide measurement of protein half-lives and translation in vasopressin-sensitive collecting duct cells. *J Am Soc Nephrol* 11: 1793 - 1805.
- Sauer S.W., Okun J.G., Schwab M.A., Crnic L.S., Hoffmann G.F., Goodman S.I., Koeller D.M., Kölker S. (2005): Bioenergetics in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency: a role for glutaryl-coenzyme A. *J. Biol. Chem.* 280: 21830–21836.

- Sauer S.W., Okun J.G., Fricker G., Mahringer A., Müller I., Crnic L.S., Mühlhausen C., Hoffmann G.F., Hörster F., Goodman S.I., Harding C.O., Koeller D.M., Kölker S. (2006): Intracerebral Accumulation of glutaric and 3-hydroxyglutaric acids secondary to limited flux across the blood-brain barrier constitute a biochemical risk factor for neurodegeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Neurochem* 97: 899–910.
- Stanley C.A., Hale D.E., Berry G.T., Deleeuw S., Boxer J., Bonnefont J.P. (1992): Brief report: a deficiency of carnitine-acylcarnitine translocase in the inner mitochondrial membrane. *N Engl J Med* 327: 19–23.
- Stellmer F. (2007): Identifizierung von 3-Hydroxyglutarsäure-Transportern und Analyse pathologischer Nierenveränderungen am Mausmodell der Glutarazidurie Typ 1. Medizinische Dissertation. Universität Hamburg-Eppendorf.
- Stellmer F., Keyser B., Burckhardt B.C., Koepsell H., Streichert T., Glatzel M., Jabs S., Thiem J., Herdering W., Koeller D.M., Goodman S.I., Lukacs Z., Ullrich K., Burckhardt G., Bräulke T., Mühlhausen C. (2007): 3-Hydroxyglutaric acid is transported via the sodium-dependent dicarboxylate transporter NaDC3. *J Mol Med* 85: 763–770.
- Stokke O., Goodman S.I., Moe P.G. (1976): Inhibition of brain glutamate decarboxylase by glutarate, glutaconate, and β -hydroxyglutarate: explanation of the symptoms in glutaric aciduria? *Clin Chim Acta* 66: 411–415.
- Strauss K.A., Morton D.H. (2003a): Type I glutaric aciduria, part 2: a model of acute striatal necrosis. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 121C: 53–70.
- Strauss K.A., Puffenberger E.G., Robinson D.L., Morton D.H. (2003b): Type I glutaric aciduria, part 1: natural history of 77 patients. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 121C: 38–52.
- Terada T., Inui K (2007): Gene expression and regulation of drug transporters in the intestine and kidney. *Biochem Pharmacol* 73: 440–449.
- Thies B. (2010): Untersuchung zur induzierten metabolischen Krise im Tiermodell der Glutarazidurie Typ 1. Med. Dissertation. Universität Hamburg.
- Thies B., Meyer-Schwesinger C., Lamp J., Schweizer M., Koeller D.M., Ullrich K., Bräulke T., Mühlhausen C. (2013): Acute renal proximal tubule alterations during induced metabolic crises in a mouse model of glutaric aciduria type 1. *Biochim Biophys Acta* 1832: 1463–1472.

- Twomey E.L., Naughten E.R., Donoghue V.B., Ryan S. (2003): Neuroimaging findings in glutaric aciduria type 1. *Pediatr Radiol* 33: 823–830.
- Ullrich K., Flott-Rahmel B., Schluff P., Musshoff U., Das A., Lucke T., Steinfeld R., Christensen E., Jakobs C., Ludolph A., Neu A., Roper R. (1999): Glutaric aciduria type I: pathomechanisms of neurodegeneration. *J Inherit Metab Dis* 22: 392–403.
- Westover J.B., Goodman S.I., Frerman F.E. (2001): Binding, hydration, and decarboxylation of the reaction intermediate glutaconyl-coenzyme A by human glutaryl-CoA dehydrogenase. *Biochemistry* 40: 14106–14114.
- Zara V., Ferramosca A., Robitaille-Foucher P., Palmieri F., Young J.C. (2009): Mitochondrial carrier protein biogenesis: role of the chaperones Hsc70 und Hsp90. *Biochem J* 419: 369–375.
- Zinnanti W.J., Lazovic J., Wolpert E.B., Antonetti D.A., Smith M.B., Connor J.R., Wootner M., Goodman S.I., Cheng K.C. (2006): A diet-induced mouse model for glutaric aciduria type I. *Brain* 129: 899–910.
- Zinnanti W.J., Lazovic J., Housman C., LaNoue K., O'Callaghan J.P., Simpson I., Wootner M., Goodman S.I., Connor J.R., Jacobs R.E., Cheng K.C. (2007): Mechanism of age-dependent susceptibility and novel treatment strategy in glutaric acidemia type I. *J Clin Invest* 117: 3258–3270.
- Zschocke J., Quak E., Guldborg P., Hoffmann G.F. (2000): Mutation analysis in glutaric aciduria type I. *J Med Genet* 37: 177–181.

8 Danksagung

Großer Dank geht an PD Dr. Chris Mühlhausen für die hervorragende Betreuung und engagierte Unterstützung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Thomas Braulke danke ich für die Bereitstellung des Themas, die gute Betreuung vor allem in schwierigen Zeiten sowie die Bereitstellung des Labors.

Ein besonders herzlicher Dank geht an Britta Keyser, die mich engagiert eingearbeitet hat und mir gezeigt hat, wie viel Spaß experimentelles Arbeiten machen kann.

Außerdem bedanke ich mich bei Bastian Kortmann und Jessica Lamp für das nette „Arbeitsgruppen“-Klima und die gute Zusammenarbeit.

Annika Kurze danke ich für die freundliche Unterstützung, insbesondere bei Durchführung der Immunfluoreszenz und für ihre beruhigende Art und die guten Ratschläge in der Not.

Ich danke außerdem Giovanna, Imke, Katrin K. & M., Monica, Marisa und Sandra für die nette Zusammenarbeit.

Von ganzem Herzen danke ich Daniel Hermening für die liebevolle Unterstützung in all den Jahren, in denen diese Arbeit entstanden ist und für die kompetente Hilfe bei technischen und statistischen Schwierigkeiten.

Zum Abschluss möchte ich meiner Familie und insbesondere meiner kleinen Schwester Inga für ihre liebe unterstützende Art während des Studiums und der Erstellung dieser Arbeit von Herzen danken.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Brit Hofmann
Geboren: 14.05.1984 in Aschaffenburg

Ausbildung:

2004: Abitur
2004 – 2010: Studium der Humanmedizin
an der Semmelweis Universität in Budapest, Ungarn und
am UKE, Hamburg,
2010 Approbation
02/2011 – aktuell: Weiterbildung zur Fachärztin für Neurologie
02/2011 – 06/2013: Epilepsiezentrum Alsterdorf, Hamburg
07/2013 – aktuell: Asklepios Klinik Harburg, Hamburg, Abteilung Neurologie

Wissenschaftliche Tätigkeiten:

10/2007 – 10/2009: Experimentelle Arbeit im Arbeitsbereich
Molekularbiologie der Klinik für Pädiatrie des UKE,
Hamburg im Rahmen der Dissertation
09/2008 – 12/2008: Wahlfach „Experimentelle Medizin“ am UKE, Hamburg

10 Eidesstattliche Versicherung

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

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

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

.....