

*AUS DEM LEHRSTUHL FÜR MEDIZINISCHE ZELLBIOLOGIE
PROF. DR. MED. RICHARD WARTH*

**FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

**Mitochondriales Maltargeting eines peroxisomalen Proteins
als Ursache eines autosomal-dominant vererbten renalen
Fanconi-Syndroms**

INAUGURAL – DISSERTATION

**zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg**

**vorgelegt von
Dominika Elisabeth Peindl**

2012

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Richard Warth

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Olaf Strauß

Tag der mündlichen Prüfung: 10.10.2012

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	3
1.1 Überblick über Aufbau und Funktion der Niere im menschlichen Körper	3
1.2 Der proximale Tubulus - wichtigster Ort der renalen Rückresorption	6
1.2.1 Aufbau.....	6
1.2.2 Transportprozesse im proximalen Tubulus	6
1.3 Mitochondrien – mehr als nur Energielieferanten der Zelle.....	8
1.3.1 Aufbau.....	8
1.3.2 Funktion	9
1.3.3 Proteinsynthese und – import.....	12
1.4 Peroxisomen.....	13
1.4.1 Aufbau.....	13
1.4.2 Funktion	13
1.4.3 Proteinimport.....	14
1.5 EHHADH und seine Rolle in der β -Oxidation	15
1.6 Das Fanconi-Syndrom – Klinik, Formen, Ursachen	17
1.6.1 Klinische Manifestation.....	17
1.6.2 Angeborenes Fanconi-Syndrom	18
1.6.3 Erworbenes Fanconi-Syndrom	21
2. Zielsetzung.....	23
3. Material und Methoden	25
3.1 Material	25
3.1.1 Geräte	25
3.1.2 Verbrauchsmaterial	25
3.1.3 Chemikalien	26
3.1.4 Zellkultur	26
3.1.5 Plasmide	27
3.1.6 Oligonukleotide	27
3.1.7 Antikörper.....	27
3.1.8 Puffer und Lösungen	28
3.1.9 Software	29
3.2 Methoden	30
3.2.1 Immunhistochemische Färbungen von Nierengewebe	30
3.2.2 Zellkultur	35
3.2.3 Mikroskopie	38
3.2.4 Urinalysen von L-PBE ^{+/+} , L-PBE ^{+/-} und L-PBE ^{-/-} -Mäusen	40
3.2.5 Röntgenbilder von L-PBE ^{+/+} - und L-PBE ^{-/-} -Mäusen.....	41

4. Ergebnisse	42
4.1 Phänotyp der L-PBE ^{+/+} - und L-PBE ^{-/-} - Mäuse	42
4.2 Testung verschiedener Antikörper gegen EHHADH auf transient transfizierten Zellen	43
4.3 Lokalisation von EHHADH in der Niere	45
4.3.1 Mausniere	45
4.3.2 Humane Niere	46
4.4 Lokalisation von EHHADH _{wt} und EHHADH _{mut} in transient transfizierten Zellen.....	50
4.4.1 Immunfluoreszenzfärbungen auf mit hEHHADH _{wt} und hEHHADH _{mut} transient transfizierten COS7-Zellen	51
4.4.2 Immunfluoreszenzfärbungen auf transient transfizierten HEK-Zellen zum Vergleich von humanem und mausspezifischem EHHADH.....	53
4.5 Elektronenmikroskopische Untersuchung von transient transfizierten HEK-Zellen .	56
4.6 Urinanalysen von L-PBE ^{+/+} -, L-PBE ^{+/-} - und L-PBE ^{-/-} - Mäusen.....	61
5. Diskussion.....	64
5.1 EHHADH in der Niere	64
5.2 Maltargeting von EHHADH _{mut} in die Mitochondrien	66
5.2.1 Verknüpfung von Mitochondrien und Peroxisomen im Zellstoffwechsel.....	66
5.2.2 Peroxisomaler versus mitochondrialer Proteinimport – N-terminale Mutation von EHHADH als Ursache des Maltargetings	67
5.2.3 Folgen des Maltargetings	71
5.3 Mitochondriale Dysfunktion als Ursache des Fanconi-Syndroms	73
5.3.1 Mutationen der mitochondrialen DNA.....	73
5.3.2 Energiemangel	73
5.3.3 Oxidativer Stress und Apoptose	75
5.3.4 Ca ²⁺ -Homöostase.....	76
5.4 Fanconi-Syndrom durch EHHADH _{mut} – Peroxisomale oder mitochondriale Erkrankung?	77
5.5 Fanconi-Syndrom durch EHHADH _{mut} - Haploinsuffizienz vs. dominant negativer Effekt	78
5.6 Ausblick	79
6. Zusammenfassung	81
7. Literaturverzeichnis	83
8. Abbildungsverzeichnis.....	91
9. Abkürzungsverzeichnis.....	92

1. Einleitung

1.1 Überblick über Aufbau und Funktion der Niere im menschlichen Körper

Umgeben von einer festen bindegewebigen Kapsel liegen die Nieren retroperitoneal beidseits der Wirbelsäule in einem atemverschieblichen Fasziensack. Betrachtet man das Organ im Längsschnitt (Abb. 2), wird die Aufteilung in eine äußere hellere Rindenregion und die dunkler erscheinenden Markpyramiden deutlich.

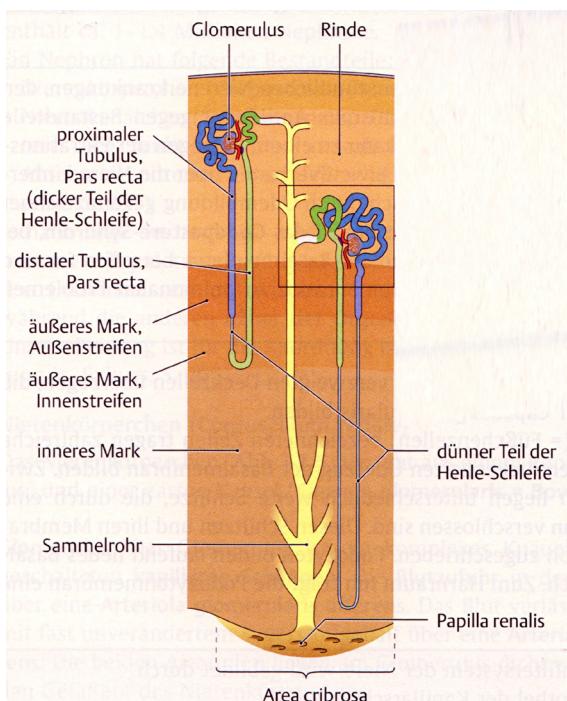


Abb. 1: Bau eines Nephrons

(Duale Reihe: Anatomie, Thieme, 2007)

Das Nephron (Abb. 1) bildet die funktionelle Grundeinheit der Niere und besteht aus dem sog. „Nierenkörperchen“ und den „Nierenkanälchen“ oder „Tubuli“. Das Nierenkörperchen wird aus einem Kapillarknäuel, dem sog. „Glomerulus“, und der umgebenden Bowman-Kapsel gebildet, deren viszerales Blatt direkt dem Gefäßknäuel aufliegt. Endothel, Basallamina und Podozyten bilden die sog. „Blut-Harn-Schranke“, die für das Abfiltrieren von Wasser und gelösten Stoffen aus dem Blut (Ultrafiltration) zuständig ist. Zwischen viszeralem und parietalem Blatt der Kapsel liegt der Kapselraum, der sich am Harnpol in das Tubulussystem der Niere öffnet. Dieses besteht, wie in Abb. 1 dargestellt, aus dem proximalen, dem intermediären und dem distalen Tubulus. Jeweils der gerade Anteil des proximalen und distalen Tubulus (Pars recta) bildet mit dem Intermediärtubulus die sog. „Henle-Schleife“. Über Verbindungstubuli wird der Harn in die *Sammelrohre* und anschließend ins Nierenbeckenkelchsystem und die ableitenden Harnwege abgeführt.

und dem distalen Tubulus. Jeweils der gerade Anteil des proximalen und distalen Tubulus (Pars recta) bildet mit dem Intermediärtubulus die sog. „Henle-Schleife“. Über Verbindungstubuli wird der Harn in die *Sammelrohre* und anschließend ins Nierenbeckenkelchsystem und die ableitenden Harnwege abgeführt.

Durch ihren speziellen Aufbau können die Nieren im menschlichen Körper vielfältige wichtige Aufgaben übernehmen:

Ausscheidungs- und Entgiftungsfunktion

Mit 1200 ml pro Minute gehörten die Nieren zu den am stärksten durchbluteten Organen des menschlichen Körpers. Pro Tag filtrieren über 1 Mio. Nephrene ca. 40mal das gesamte Blutvolumen und sorgen durch die Bildung von Urin für die Ausscheidung von Fremdstoffen und Stoffwechselprodukten (= harnpflichtige Substanzen) wie Ammoniak, Harnstoff, Harnsäure, Bilirubin und Kreatinin. Dieses entsteht als Abbauprodukt von

Kreatinphosphat in den Muskelfasern und dient als wichtiger Retentionsparameter zur labormedizinischen Einschätzung der Nierenfunktion. Zahlreiche im Urin bestimmte Parameter werden bezogen auf die ausgeschiedene Kreatininmenge angegeben.

Kontrolle des Wasser- und Elektrolythaushaltes

Eine der zentralen Aufgaben der Niere besteht in der Konstanthaltung der Elektrolytkonzentration im Extrazellulärraum des Körpers. Durch Filtration in den Kapillarschlingen des Glomerulus wird zunächst der Primärharn gebildet, welcher in seiner Zusammensetzung dem Plasma ähnelt und alle dort vorhandenen Elektrolyte und niedermolekularen Stoffe enthält. Um diese wertvollen Ressourcen nicht über den Urin zu verlieren, werden sie entlang des Tubulussystems nahezu vollständig rückresorbiert. Hauptresorptionsort ist der proximale Tubulus, welcher bereits 70% des filtrierten Natriumchlorids, nahezu alle Aminosäuren und Proteine sowie annähernd die gesamte Menge an Glucose zurückgewinnt. Die Nieren kontrollieren somit durch Filtration und gezielte Rückresorption nicht nur die ausgeschiedene Wassermenge sondern auch die Zusammensetzung der Elektrolyte (v.a. Natrium, Kalium, Chlorid, Calcium, Magnesium und Phosphat) im Blutplasma und sorgen damit für eine konstante Osmolarität des Blutes von 290 - 300 mosm/l. Durch die Regulation des Wasserhaushalts nehmen sie außerdem Einfluss auf die Größe des extrazellulären Flüssigkeitsvolumens und damit auf den systemischen Blutdruck.

Steuerung des Säure-Base-Haushalts

Durch die Ausscheidung oder Rückresorption von H^+ bzw. HCO_3^- tragen die Nieren wesentlich zur pH-Regulation im Körper bei.

Bildung von Hormonen und Gewebefaktoren

Die Niere ist über die Ausschüttung der Hormone Erythropoetin (EPO) und Thrombopoetin wesentlich an der Neubildung von Erythrozyten und Thrombozyten im Knochenmark beteiligt. Außerdem spielt sie eine wichtige Rolle bei der Synthese von Calcitriol aus Calcidiol und greift damit in den Calcium- und Phosphatstoffwechsel ein. Das in den Myoepithelzellen der *Arteriola afferens* gebildete Renin trägt zur Steuerung des Wasser- und Elektrolythaushalts und dadurch zur Blutdruckregulation bei. Es handelt sich dabei um ein proteolytisches Enzym, das durch Abspaltung eines Peptids das von der Leber gebildete Glykoprotein Angiotensinogen in Angiotensin I umwandelt. Dieses wird in der Lunge durch das sog. „angiotensin converting enzym“ (ACE) zu Angiotensin II konvertiert, welches schließlich durch Vasokonstriktion, gesteigerten Salzhunger und Durstgefühl zu einer Blutdruckerhöhung führt. Außerdem stimuliert Angiotensin II die Ausschüttung des Mineralokortikoids Aldosteron aus der Nebenniere. Als Folge der Aldosteronwirkung kommt es durch eine Steigerung der Natriumrückresorption v. a. in den Sammelrohren der Nieren ebenfalls zu einem Blutdruckanstieg. Die renale Bildung von Prostaglandinen führt zur Vasodilatation v. a. im Nierenmark.

Regulation des Blutdrucks

In die Steuerung des Blutdrucks greift die Niere sowohl über das oben beschriebene Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) als auch über die Kontrolle der Ausscheidung und Rückresorption von Wasser und Natrium ein. Dabei sind ADH (antidiuretisches Hormon / Vasopressin) und ANP (atriales natriuretisches Peptid) als Mediatoren von Bedeutung.

Insgesamt werden pro Tag in den Glomeruli etwa 180 – 200 l Primärharn filtriert. Davon werden 99% der gelösten Stoffe und der Flüssigkeit im Tubulussystem der Niere wieder rückresorbiert und nur diejenigen Substanzen ausgeschieden, die tatsächlich eliminiert werden sollen. Eine entscheidende Rolle spielt hierbei der proximale Tubulus, dessen Funktionsstörung zur Entstehung eines Fanconi-Syndroms führen kann.

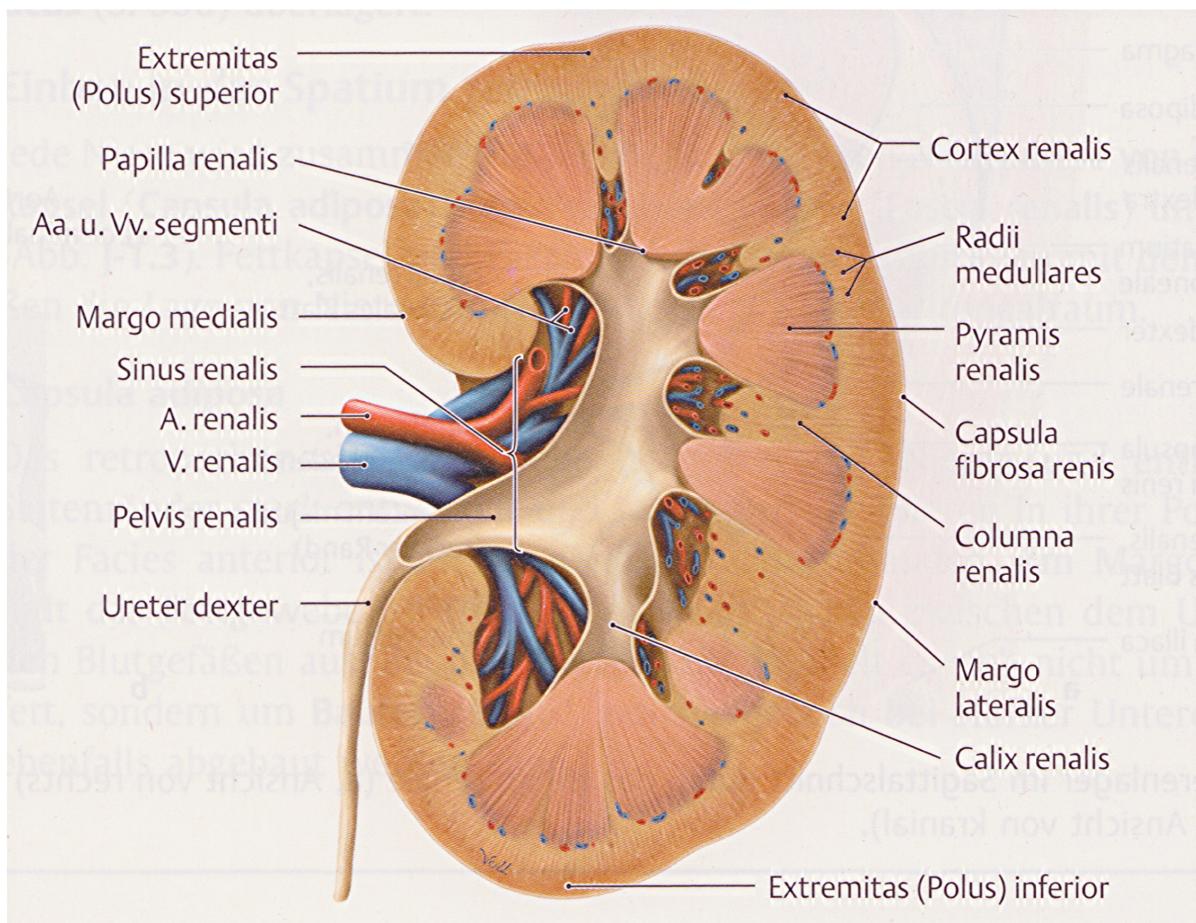


Abb. 2: Längsschnitt durch die rechte Niere von dorsal

(Duale Reihe: Anatomie, Thieme, 2007)

1.2 Der proximale Tubulus - wichtigster Ort der renalen Rückresorption

1.2.1 Aufbau

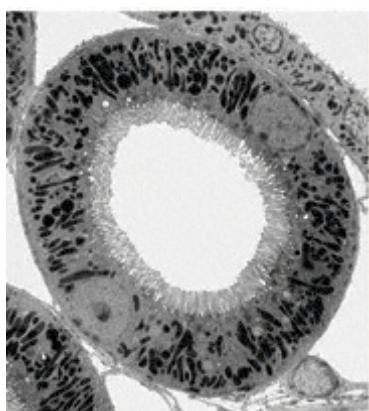


Abb. 3: Querschnitt durch den proximalen Tubulus
(Lehrbuch Vorklinik, Deutscher Ärzte-Verlag, 2003)

Der proximale Tubulus (\varnothing 50 – 60 μm) schließt sich als erstes Stück des Tubulussystems am Harnpol direkt an den Innenraum der Bowman-Kapsel an und nimmt somit den im Glomerulus gefilterten Primärharn auf.

Als längster Teil des Nephrons besteht er aus einer geknäuelten „Pars convoluta“ in der Nierenrinde und einer gestreckten „Pars recta“, die je nach Nephronlage entweder in den Markstrahlen oder im Außenstreifen des äußeren Marks gelegen ist. Innerhalb des Innenstreifens findet man keine proximalen Tubulusabschnitte. Um eine hohe Resorptionsleistung erbringen zu können, sind die Zellen zur Oberflächenvergrößerung luminal mit einem dichten Bürstensaum ausgestattet (Abb.3), der diesen Nierenabschnitt von anderen Tubulussegmenten unterscheidet. Zwischen den basolateralen Invaginationen sind zahlreiche lange Mitochondrien angeordnet, die die Energiebereitstellung für den aktiven Transport gewährleisten.

ausgestattet (Abb.3), der diesen Nierenabschnitt von anderen Tubulussegmenten unterscheidet. Zwischen den basolateralen Invaginationen sind zahlreiche lange Mitochondrien angeordnet, die die Energiebereitstellung für den aktiven Transport gewährleisten.

1.2.2 Transportprozesse im proximalen Tubulus

Der proximale Tubulus gilt als Hauptresorptionsort für Wasser und gelöste Stoffe aus dem Glomerolusultrafiltrat. Pro Tag erreichen etwa 180 – 200 l Primärharn diesen Nierenabschnitt. Hier erfolgt die Rückresorption von ca. 60 – 70% des filtrierten Natriums und Kaliums, 50% des filtrierten Magnesiums, Calciums und Chlorids, 95% des Bikarbonats und etwa 80 - 90% des filtrierten Phosphats. Glucose und Aminosäuren werden zu 100% rückresorbiert, Wasser zu 60 – 70%. Hierbei spielen im Wesentlichen drei Transportmechanismen eine Rolle:

Primär-aktiver Transport

Unter primär-aktivem Transport versteht man einen Transportprozess, bei dem direkt ATP verbraucht wird. Das wichtigste Transportprotein ist dabei die ubiquitär vorkommende „ Na^+/K^+ -ATPase“. Mit der Energie aus der Spaltung eines ATP-Moleküls transportiert sie 3 Na^+ -Ionen aus der Zelle hinaus und 2 K^+ -Ionen hinein. Dadurch wird ein Konzentrationsgradient für Na^+ aufgebaut, der die chemische Grundlage für alle sekundär-aktiven Transportvorgänge in der Niere darstellt. Im proximalen Tubulus sind die „ Na^+/K^+ -ATPasen“ basolateral in direkter Nachbarschaft zu ihren Energielieferanten, den Mitochondrien, angeordnet. So kann das in der oxidativen Phosphorylierung produzierte ATP direkt für die

Arbeit der Ionenpumpen verwendet werden. Der primär-aktive Transport durch die „ Na^+/K^+ -ATPase“ und der damit erzeugte Konzentrationsgradient für Na^+ sind unbedingte Voraussetzungen für alle sekundär-aktiven Transportprozesse in der Niere. Eine Störung des primär-aktiven Transports z. B. aufgrund eines ATP-Mangels bei eingeschränkter Mitochondrienfunktion führt in der Folge auch zur Störung aller sekundär-aktiven Transportvorgänge, wie es beim Fanconi-Syndrom der Fall ist.

Sekundär-aktiver Transport

Sekundär-aktive Transportprozesse verbrauchen ATP nur indirekt, da sie Konzentrationsgradienten als treibende Kraft benötigen, die vorher unter Energieaufwand aufgebaut werden müssen. So werden im proximalen Tubulus eine Reihe von Substanzen mit Hilfe des durch die „ Na^+/K^+ -ATPase“ erzeugten Konzentrationsgradienten für Na^+ (Plasma: 140 mmol/l, Zelle: 10 mmol/l) rückresorbiert. Beispiele sind der „ Na^+/H^+ -Antiport“, über den indirekt auch HCO_3^- wieder in die Zelle gelangen kann, sowie die Wiederaufnahme von Aminosäuren und Glucose im Symport mit Na^+ . Andere Na^+ -Symporter sorgen für die Wiederaufnahme von Phosphat (HPO_4^{2-}), Sulfat (SO_4^{2-}) und Laktat.

Aktiver Transport durch Endozytose

Proteine, wie Albumin, das physiologischer Weise zu 1% filtriert wird, können über Endozytose wiederaufgenommen werden. Auch dieser Transportvorgang ist stark energieabhängig, da das Verschmelzen der Vesikel mit der Plasmamembran ATP verbraucht.

Passiver Transport

Durch den aktiven Transport von Na^+ und anderen gelösten Teilchen aus dem Tubuluslumen ins Interstitium entsteht ein osmotisches Gefälle, das durch das Nachströmen von Wasser sowohl transzellulär durch Aquaporine (AQP 1) als auch parazellulär ausgeglichen wird. Hierbei werden im Wasser gelöste Elektrolyte, wie Na^+ , K^+ , Cl^- , Mg^{2+} und Ca^{2+} , als sog. „solvent drag“ passiv mitgenommen. Der Aufbau von Konzentrationsgradienten durch aktive Transportprozesse bildet somit auch die Grundlage für passive Resorptionsvorgänge v.a. von Wasser und Elektrolyten.

Da der proximale Tubulus den Hauptanteil der Rückresorption in der Niere leistet, sind Störungen in diesem Segment durch nachfolgende Tubulusabschnitte nur schwer zu kompensieren. Grundsätzlich sind alle renalen Rückresorptionsmechanismen nur mit Hilfe von Energie möglich. Diese wird in Form von ATP durch die Mitochondrien der Tubuluszellen zur Verfügung gestellt.

1.3 Mitochondrien – mehr als nur Energielieferanten der Zelle

Mitochondrien (griech. mitos = Faden, chondros = Korn) sind die sog. „Kraftwerke“ der Zelle. Sie kommen in allen kernhaltigen Zellen vor, in besonders hoher Zahl jedoch in Zellen mit hohem Energieverbrauch wie Muskel-, Nerven-, Sinnes- und Eizellen sowie den Epithelzellen der Nierentubuli. Hier sind sie in Form eines „basolateralen Labyrinths“ zwischen den basalen Invaginationen der Tubuluszellen angeordnet. Nach der sog. „Endosymbiontentheorie“ (griech. endo = innen, symbiosis = Zusammenleben) geht man davon aus, dass Mitochondrien aus einer Symbiose von aeroben Bakterien mit den Vorfahren der heutigen Eukaryonten hervorgegangen sind. Hinweise darauf sind der Besitz einer eigenen zirkulären doppelsträngigen DNA (mtDNA) aus ca. 16500 Basenpaaren (Clayton, 1992), eine eigene Proteinsynthese sowie das Vorhandensein einer bakterienähnlichen inneren Membran, die sich deutlich vom Aufbau der äußeren Membran unterscheidet. Das mitochondriale Genom wird ausschließlich über die Mutter vererbt, da lediglich die Mitochondrien der Eizelle weitergegeben werden, während vom Spermium nur die nukleäre DNA bei der Befruchtung in die Eizelle gelangt (Giles *et al.*, 1980). Die Replikation von Mitochondrien ist unabhängig von der Zelle und kann an den jeweiligen Energiebedarf der Zelle angepasst werden.

1.3.1 Aufbau



Abb. 4: Mitochondrien im Querschnitt:
Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme (Lehrbuch Vorklinik, Deutscher Ärzte-Verlag, 2003)

Mitochondrien sind längliche Zylinder mit einem Durchmesser von ca. 0,2 - 0,5 µm und einer Länge von ca. 10 – 40 µm. Ihre Verteilung in der Zelle wird durch ihre Assoziation an die Mikrotubuli des zellulären Zytoskeletts bestimmt. Sie besitzen eine Doppelmembran, die das Organell in verschiedene Kompartimente mit jeweils spezifischer Proteinausstattung und Funktion teilt.

Die **Außenmembran** enthält neben Enzymen für die mitochondriale Lipidsynthese ein kanalbildendes Protein namens „Porin“, das Moleküle bis ca.

5000 Da ungehindert ins Mitochondrium gelangen lässt.

Die hochspezialisierte **Innenmembran** ist zur Oberflächenvergrößerung je nach Mitochondrientyp in sog. „Cristae“, „Tubuli“ oder „Sacculi“ gefaltet und enthält einen hohen Anteil an Cardiolipin, sodass sie für Ionen besonders undurchlässig ist. Dies ist wichtig, um einen elektrochemischen Protonengradienten über die Membran aufrechtzuerhalten, der die ATP-Synthese antreibt. Transportproteine sorgen für eine selektive Durchlässigkeit von Metaboliten, die von den Matrixenzymen gebraucht oder synthetisiert werden. In der In-

nenmembran sitzen außerdem die Enzyme der Atmungskette, welche für die oxidative Phosphorylierung von Bedeutung sind.

Im **Intermembranraum** befinden sich zahlreiche Enzyme (Kreatin-Kinase, Adenylat-Kinase u.a.), die ATP durch Phosphorylierung aus ADP oder AMP herstellen bzw. andere Nukleoside und Nukleotide unter ATP-Verbrauch beispielsweise zu GTP, CTP oder UTP phosphorylieren, sodass diese wiederum als Energielieferanten und Enzym-Kofaktoren für eine Reihe zellulärer Stoffwechselprozesse zur Verfügung stehen.

Hier sowie teilweise mit der Innenmembran assoziiert befindet sich auch das Hämprotein Cytochrom c, das als Elektronenüberträger im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung der Atmungskette eine wichtige Rolle spielt. Bei Beschädigung der Außenmembran wird Cytochrom c ins Zytosol freigesetzt, wo es über eine Signalkaskade den programmierten Zelltod (Apoptose) auslöst.

Die **Mitochondrienmatrix** enthält Enzyme für Citratzyklus, Oxidation von Pyruvat und Fettsäuren sowie für die Amplifizierung des mitochondrialen Genoms, welches sich genauso wie die mitochondrialen Ribosomen und tRNAs in der Matrix befindet.

Spezifische Transportsysteme sind für den Stoffaustausch zwischen dem Intermembranraum und der mitochondrialen Matrix verantwortlich.

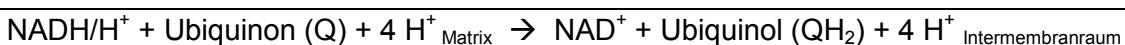
1.3.2 Funktion

Energiegewinnung

Während ein Molekül Glucose in der anaeroben Glykolyse nur zwei ATP liefert, können durch die aerobe Verstoffwechslung ca. 30 ATP pro Molekül Glucose gewonnen werden.

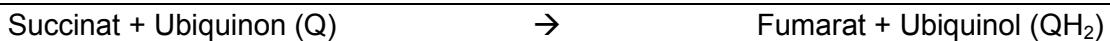
Hierzu wird das in der Glykolyse im Cytosol produzierte Pyruvat zusammen mit Fettsäuren, die ebenfalls als Brennstoffe dienen, mit Hilfe des elektrochemischen Gradienten über die Mitochondrieninnenmembran transportiert und durch Matrixenzyme zu Acetyl-CoA abgebaut. Im Citratzyklus, der ebenfalls in der Mitochondrienmatrix stattfindet, werden die Acetylgruppen unter Erzeugung energiereicher Elektronen (e^-) oxidiert, wobei als Reduktionsäquivalente $NADH/H^+$ und $FADH_2$ entstehen. Diese e^- werden in der nun folgenden Atmungskette auf die entsprechenden Enzymkomplexe in der Innenmembran übertragen. Vier Multienzymkomplexe, die auch als Protonenpumpen fungieren, sind dabei für den mitochondrialen Elektronentransport verantwortlich:

Komplex I : NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (NADH-Dehydrogenase)



Dieser Enzymkomplex benötigt flavinhaltige Nukleotide (FMN) sowie Eisen-Schwefel-Zentren als prosthetische Gruppen. Pro oxidiertem NADH werden netto vier Protonen in den Intermembranraum transportiert.

Komplex II: Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase (Succinat-Dehydrogenase)



Der Komplex II der Atmungskette entspricht der Succinat-Dehydrogenase aus dem Citratzyklus. Als Koenzyme dienen FAD, 3 Eisen-Schwefel-Zentren und Häm b. Durch den Komplex II werden keine Protonen in den Intermembranraum gepumpt. Weitere e^- -Lieferanten mit FAD als Kofaktor sind die **Acyl-CoA-Dehydrogenase** aus der β -Oxidation sowie die **Glycerin-3-P-Dehydrogenase** und andere mitochondriale Dehydrogenasen.

Komplex III: Ubichinol-Cytochrom c-Oxidoreduktase (Cytochrom-c-Reduktase)



Der Komplex III transportiert insgesamt vier H⁺ pro oxidiertem Ubiquinon über die Innemembran. Als prosthetische Gruppen dienen drei Häm-Gruppen (Häm b_L, Häm b_H und Häm c) sowie ein Eisen-Schwefel-Zentrum (Rieske-Zentrum).

Komplex IV: Cytochrom-c-Oxidase

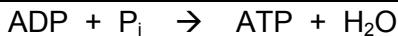


Am Komplex IV wird Cytochrom c oxidiert und dabei ein Elektron auf den Komplex übertragen. Nach der sukzessiven Übertragung von vier e^- kann ein gebundenes Sauerstoffmolekül zu zwei Wassermolekülen (H₂O) reduziert werden. Die dabei benötigten vier Protonen werden der Matrix entzogen. Bei der Reduktion von Sauerstoff zu Wasser wird Energie frei, die vom Enzym genutzt wird, um vier Protonen pro Sauerstoffmolekül (\triangleq 2 H⁺ pro $\frac{1}{2}$ O₂) von der Matrix über die innere Mitochondrienmembran in den Intermembranraum zu pumpen. Als prostethische Gruppen enthält die Cytochrom-c-Oxidase zwei Häm a Moleküle (Häm a und Häm a3) und zwei Kupfer-Zentren (CuA und CuB).

Durch die Verlagerung von H⁺ aus der Matrix in den Intermembranraum entsteht sowohl ein elektrischer (Membranpotential von 180 – 190 mV) als auch ein chemischer Gradient (pH Matrix > pH Cytosol), der H⁺ in die Matrix zurücktreibt und so als protonenmotorische Kraft wirkt.

Durch das Zurückströmen der Protonen ins Mitochondrium wird Energie frei, die für den Antrieb der Rotationsbewegung des letzten Komplexes (Komplex V), der ATP-Synthase, genutzt werden kann (Hatefi, 1985). Somit wird die elektrochemische Energie des Protonengradienten in die mechanische Energie der Rotation der ATP-Synthase umgewandelt.

Komplex V: ATP-Synthase (F_1/F_0 -ATPase)



Der Komplex V der mitochondrialen Atmungskette, der schließlich ATP synthetisiert, besteht aus zwei Teilen: Der F_0 -Teil bildet einen Protonen-Kanal durch die innere Mitochondrienmembran, durch den die H^+ entlang ihres elektrochemischen Gradienten wieder in die Mitochondrien zurückfließen. Die F_1 -Einheit synthetisiert ATP aus ADP und anorganischem Phosphat. Ihre γ -Untereinheit rotiert mit dem F_0 -Teil und regelt so den Zustandswechsel der drei katalytischen Zentren von F_1 zwischen „loose“ (ATP und P_i gebunden), „tight“ (ATP-Synthese) und „open“ (ATP-Freisetzung). Damit ist die Funktion des Protonengradienten nicht in erster Linie die ATP-Bildung, sondern die Freisetzung des Energieträgers durch die Rotation der γ -Untereinheit.

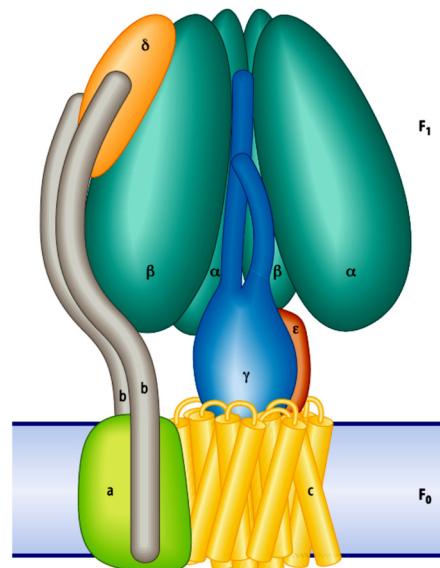


Abb. 5: Aufbau der ATP-Synthase:

Der F_0 -Teil besteht aus 9 sog. c-Untereinheiten und bildet einen regulierten Protonenkanal durch die Innemembran. Der F_1 -Teil ist für die ATP-Synthese verantwortlich.

(Löffler, Biochemie und Pathobiochemie, Springer, 2007)

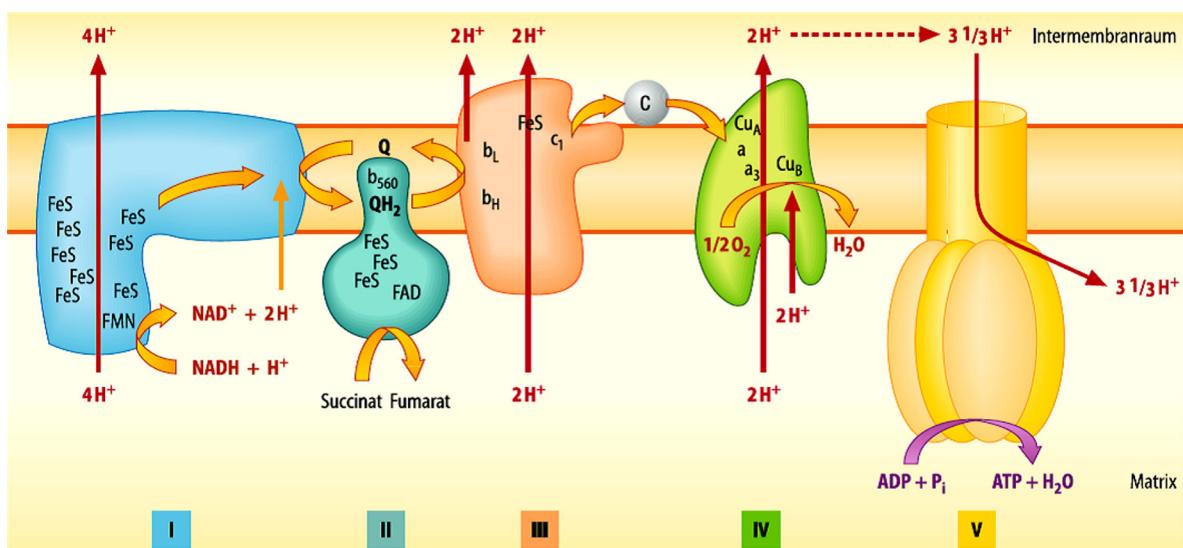


Abb. 6: Schematische Darstellung der fünf Komplexe der oxidativen Phosphorylierung

Der Elektronentransport über die ersten vier Komplexe der Atmungskette erfolgt über die mobilen Substrate Ubichinon (Q/QH_2) und Cytochrom c (C). Pro oxidiertem NADH werden 10 Protonen, pro oxidiertem Succinat 6 Protonen über die Membran gepumpt. Die ATP-Synthase benötigt rechnerisch 3 Protonen zur Synthese von einem ATP. Zusätzlich wird jeweils ein Proton für den Transport von ADP, P_i und ATP verbraucht.

(Löffler, Biochemie und Pathobiochemie, Springer, 2007)

Mitochondriale β -Oxidation von Fettsäuren

Beim Abbau von Fettsäuren im Rahmen der β -Oxidation sind die Mitochondrien v.a. für die Oxidation kurzer ($< C_8$), mittlerer ($C_8 – C_{12}$) und langer ($C_{14} – C_{20}$) unverzweigter Fettsäuren zuständig. Die Verstoffwechslung sehr langer ($> C_{20}$) und verzweigter Fettsäuren findet in den Peroxisomen statt (Hashimoto, 1999; Wanders *et al.*, 2001).

Weitere mitochondriale Funktionen

Die Funktion der Mitochondrien reicht weit über die alleinige Energieproduktion hinaus. So spielen sie z.B. eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der intrazellulären Calcium-Homöostase und der Generierung aber auch Eliminierung freier Sauerstoffradikale. Außerdem greifen sie wesentlich in die Regulation von Zellproliferation und Apoptose ein (Duchen, 2004a; Mayer and Oberbauer, 2003). Die Tatsache, dass die Proteinausstattung der Organellen zwischen den einzelnen Geweben variiert, legt nahe, dass den Mitochondrien unterschiedliche Funktionen in unterschiedlichen Geweben zukommen (Hall and Unwin, 2007).

1.3.3 Proteinsynthese und – import

Mitochondrien werden als semiautonom bezeichnet. Ihr Genom kodiert selbst nur einen kleinen Teil der vom Mitochondrium benötigten Proteine (Schrader *et al.*, 2007). So kontrollieren beim Menschen 37 mitochondriale Gene die Synthese von 13 der ca. 100 Polypeptide der Atmungskette (Niaudet, 1998). Die restlichen der 1500 verschiedenen mitochondrialen Proteine des Menschen werden im Kerngenom kodiert und müssen über komplexe Mechanismen ins Mitochondrium importiert werden. Mitochondriale Präproteine haben dafür N-terminale Signalsequenzen, deren gemeinsames Merkmal die Faltung in Form einer amphipathischen α -Helix mit positiv geladenen Aminosäureresten auf der einen und vorwiegend ungeladenen, hydrophoben Resten auf der anderen Seite ist (Wiedemann *et al.*, 2004). Diese Sekundärstruktur und nicht allein die Abfolge bestimmter Aminosäuren wird von spezifischen Rezeptorproteinen erkannt, welche daraufhin die Einschleusung des Proteins einleiten. Die Proteintranslokation wird dabei von 3 Multiproteinkomplexen vermittelt: Der TOM-Komplex (**t**ranslocase of the **o**uter **m**embrane) bringt Proteine über die Außenmembran, die beiden TIM-Komplexe (**t**ranslocase of the **i**nner **m**embrane) sind für den Transport über die innere Mitochondrienmembran zuständig.

Insgesamt sind in der Literatur bisher etwa 50 Erkrankungen beschrieben, die durch eine defekte Mitochondrienfunktion hervorgerufen werden (Zeviani and Di Donato, 2004).

Ein fehlerhafter Import von Proteinen ins Mitochondrium, wie es auch bei der Primären Hyperoxalurie Typ I der Fall ist, kann Ursache schwerwiegender Erkrankungen sein (Danpure, 2006). Auch bei der Entstehung der von Prof. R. Kleta entdeckten dominant vererbten Form des Fanconi-Syndroms könnte dieses sog. „Maltargeting“ eines mutierten Proteins eine Rolle spielen. Hinsichtlich dieses Aspekts wurde in dieser Arbeit die Enoyl-

CoA–Hydratase/3–Hydroxyacyl–CoA–Dehydrogenase untersucht, ein Protein, welches physiologischerweise in den Peroxisomen lokalisiert ist und dort als bifunktionales Enzym zwei wichtige aufeinanderfolgende Reaktionen der β -Oxidation katalysiert.

1.4 Peroxisomen

1.4.1 Aufbau

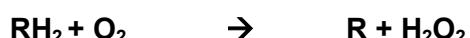
Peroxisomen (syn. microbodies) sind kleine ($\varnothing = 200 - 500$ nm), mit einer einfachen Membran umhüllte Vesikel, die in allen eukaryotischen Zellen vorkommen. Sie replizieren sich selbst durch Wachstum und Teilung schon vorhandener Peroxisomen, wobei Membranproteine und notwendige Lipide im Cytosol gefertigt und importiert werden müssen, da diese Zellorganellen weder eigene DNA noch Ribosomen besitzen.

1.4.2 Funktion

Beim Menschen kommen den Peroxisomen drei wichtige Funktionen zu:

Entgiftung

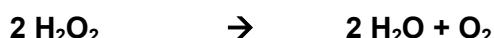
Peroxisomen spielen eine wichtige Rolle bei vielfältigen Entgiftungsprozessen und sind essentiell bei der Bewältigung von oxidativem Stress. In ihnen befinden sich eine Reihe von Enzymen (ca. 60 Monooxygenasen und Oxidasen), die den oxidativen Abbau von Fettsäuren, Alkohol und anderen schädlichen Verbindungen katalysieren (Hawkins *et al.*, 2007; Schrader *et al.*, 2007). Dabei spalten sie Wasserstoffatome von verschiedenen Substraten ab und binden sie an molekularen Sauerstoff (O_2). Als Reaktionsprodukt entsteht Wasserstoffperoxid (H_2O_2).



Dieses äußerst reaktive Zellgift wird schließlich von der namensgebenden Peroxidase verwendet, um andere Substrate, darunter Phenole, Alkohole, Formaldehyd und Ameisensäure, im Zuge einer „peroxidativen Reaktion“ zu oxidieren.



Diese Oxidationsreaktionen sind besonders in Leber und Niere im Rahmen der Elimination giftiger Verbindungen von Bedeutung. Eine zweite Möglichkeit zur Entgiftung von H_2O_2 besteht in der Umsetzung durch das Enzym Katalase. Dieses katalysiert eine Disproportionierungsreaktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff:



Abbau von Fettsäuren in Rahmen der α - und β -Oxidation

Fettsäuren werden in Mitochondrien und Peroxisomen physiologischerweise im Rahmen der β -Oxidation (s.u.) abgebaut. Die α -Oxidation ist ein alternativer Abbaumechanismus für Fettsäuren, falls die β -Oxidation aufgrund einer Methylgruppe am C_β nicht möglich ist. Alternativ wird dann das C_α -Atom oxidiert (Wierzbicki, 2007).

Biosynthese von Plasmalogenen

Peroxisomen katalysieren wichtige Schritte in der Synthese von Plasmalogenen. Dabei handelt es sich um Phospholipide, die zu 80 – 90% die Myelinscheiden von Nervenzellen bilden. Defekte führen zu schwerwiegenden neurologischen Krankheitsbildern wie z.B. der x-chromosomal-rezessiv vererbten Adrenoleukodystrophie (Faust *et al.*, 2010).

1.4.3 Proteinimport

Alle notwendigen Proteine, die das Peroxisom für seine Arbeit benötigt, müssen aus dem Cytosol importiert werden. Der Mechanismus ist bisher noch nicht gänzlich verstanden. Man geht aber davon aus, dass Signalsequenzen von 3 Aminosäuren, meist Serin-Lysin-Leucin, am Carboxyterminus (Hawkins *et al.*, 2007) von einem löslichen Rezeptorprotein im Cytosol erkannt werden und über Andockproteine ins Peroxisom gelangen. Dabei spielen mindestens 23 verschiedene Proteine, sog. „Peroxine“, als Komponenten des Erkennungs- und / oder Transportsystems eine Rolle. Im Gegensatz zu den meisten anderen Importmechanismen von Proteinen - z.B. in das endoplasmatische Retikulum oder die Mitochondrien - müssen die Proteine für den Import jedoch nicht entfaltet werden, sondern können in oligomerisiertem Zustand, d.h. in ihrer Tertiär- oder sogar Quartärstruktur in die Peroxisomen gelangen. Funktionsstörungen im Proteinimportsysteem können zu verschiedenen Erkrankungen führen wie z.B. dem Zellweger-Syndrom (autosomal-rezessiv) oder der Adrenoleukodystrophie (x-chromosomal-rezessiv) (Lazarow, 2003; Geisbrecht *et al.*, 1998).

1.5 EHHADH und seine Rolle in der β -Oxidation

EHHADH steht für Enoyl-CoA-Hydratase/3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase und bezeichnet ein bifunktionales Enzym, das zwei aufeinanderfolgende Reaktionen beim Abbau von Fettsäuren im Rahmen der peroxisomalen β -Oxidation katalysiert.

Fettsäuren, die über die Nahrung aufgenommen werden, können nach Bildung eines energiereichen Thioesters durch die Acyl-CoA-Synthetase in die β -Oxidation eintreten. Dabei werden sie in einem sich immer wiederholenden Kreislauf aus vier Reaktionsschritten (Abb. 7) jeweils am C-3-Atom (C_B -Atom) oxidiert, bis sie vollständig zu Acetyl-CoA abgebaut sind. Ungeradzahlige Fettsäuren, bei welchen im letzten Durchlauf Propionyl-CoA entsteht, werden nach Carboxylierung zu Methylmalonyl-CoA und Umlagerung zu Succinyl-CoA in den Citratzyklus eingeschleust.

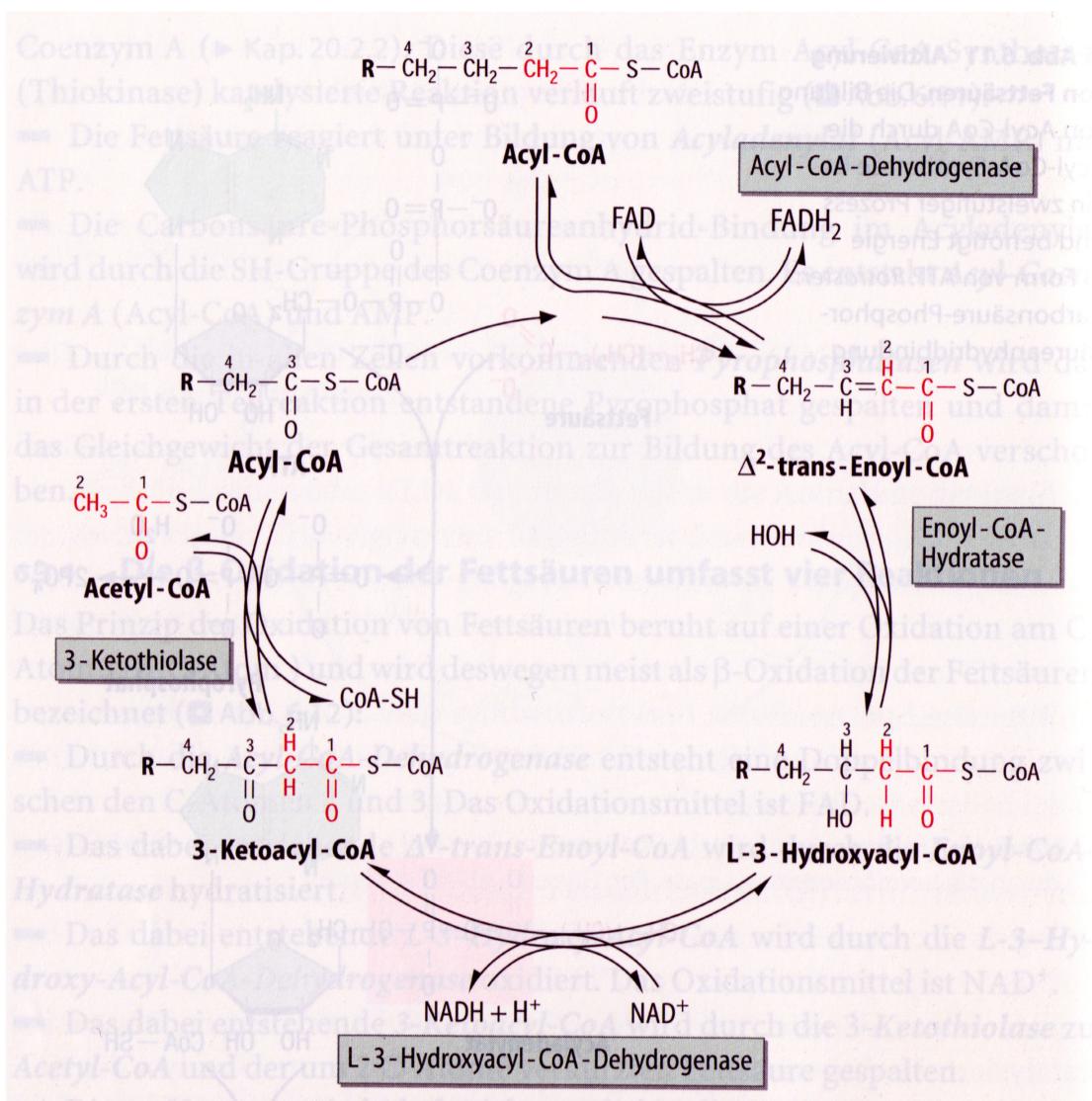


Abb. 7: Abbau geradzahliger Fettsäuren durch β -Oxidation: Schematische Darstellung der sich immer wieder wiederholenden 4 Reaktionsschritte (Löffler, Biochemie und Pathobiochemie, Springer, 2007)

Bei der peroxisomalen β -Oxidation unterscheidet man grundsätzlich zwei Systeme (Tab.1): Das L-spezifische System verwendet v.a. unverzweigte Acyl-CoA-Moleküle als Substrate und kann durch PPAR (Peroxisomen-Proliferator-Aktivator-Rezeptor) – Liganden induziert werden. Das D-spezifische System, das 2-Methyl-verzweigte Acyl-CoA-Moleküle und ungesättigte Fettsäuren abbaut, ist dagegen nicht induzierbar (Reddy and Hashimoto, 2001; Wanders *et al.*, 2001; Hashimoto, 1999; Reddy and Mannaerts, 1994; Baumgart *et al.*, 1996).

Reaktionsschritt	L-spezifisches System	D-spezifisches System
I : Dehydrierung	Acyl-CoA-Oxidase (AOX)	Verzweigt Ketten Acyl-CoA-Oxidase
II : Hydratisierung	L-PBE (EHHADH)	D-PBE
III: Oxidation		
IV: Thiolyse	3-Ketoacyl-CoA-Thiolase	sterol carrier protein x (SCPx)

Tab. 1: Darstellung der beiden peroxisomalen β -Oxidationssysteme im Vergleich

Das erste Enzym im klassischen L-Oxidationssystem ist die Acyl-CoA-Oxidase (AOX) oder auch Acyl-CoA-Dehydrogenase, die eine Doppelbindung zwischen dem C₂- und C₃-Atom der Fettsäuren herstellt und im Gegenzug FAD zu FADH₂ reduziert. Während bei der mitochondrialen β -Oxidation zwei verschiedene Enzyme für die Reaktionsschritte 2 und 3 zuständig sind, werden sie im L-System der Peroxisomen vom selben Enzym katalysiert, der Enoyl-CoA-Hydratase/3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase (EHHADH) oder auch L-PBE (L-peroxisomal bifunctional enzyme). Untersuchungen an Ratten haben ergeben, dass die Enoyl-CoA-Hydratase-Aktivität am N-terminalen Ende, die 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase-Aktivität am C-Terminus des 77 000 Da großen Proteins liegt (Ishii *et al.*, 1987).

Das Gen, das für EHHADH kodiert, besteht aus 31 Kilobasen - sieben Exons getrennt durch sechs Introns (Ishii *et al.*, 1987) – und ist auf Chromosom 3q27 lokalisiert. Hoefler *et al.* beschrieben 1994 zum ersten Mal die vollständige Sequenz der dazugehörigen cDNA, die sich über 3779 Nukleotide erstreckt. Mit Hilfe der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung konnten sie den Genlocus für EHHADH auf Chromosom 3q26.3-q28 festlegen (Hoefler *et al.*, 1994). Qi *et al.* konnten schließlich 1999 eine entsprechende L-PBE-Knockoutmaus (L-PBE^{-/-}-Maus) generieren, auf deren Konstruktion im Teil „Material und Methoden“ näher eingegangen wird (Qi *et al.*, 1999). Die Tatsache, dass bei der L-PBE^{-/-}-Maus keinerlei phänotypische Auffälligkeiten auftraten, lässt vermuten, dass bei einem Fehlen von L-PBE dieser β -Oxidationsschritt vom D-System übernommen werden kann. Bei einer kompletten Unterbrechung der peroxisomalen β -Oxidation durch das Ausschalten beider Gene, sowohl für L- als auch für D-PBE kam es zu schweren Erkrankungen der Mäuse wie Wachstumsretardierung, Untergewicht, microvaskulärer Steatose und einer erhöhten postnatalen Sterblichkeit (Jia *et al.*, 2003).

Prof. Robert Kleta vom Institut für Nephrologie am University College London entdeckte eine N-terminale Mutation im Gen des EHHADH-Enzymkomplexes, welche für eine bisher unbekannte Form des dominant vererbten renalen Fanconi-Syndroms verantwortlich sein könnte. Es handelt sich dabei um den Austausch von Guanin gegen Adenin an Position 7, was auf Proteinebene einem Austausch der negativ geladenen Aminosäure Glutamat (GAG) gegen das positiv geladene Lysin (AAG) an Position 3 entspricht.

1.6 Das Fanconi-Syndrom – Klinik, Formen, Ursachen

Bereits Anfang der 30er Jahre beschrieben de Toni, Debré und der Schweizer Kinderarzt Guido Fanconi (1892 – 1979) unabhängig voneinander mehrere Kinder mit der Symptomenkonstellation Rachitis, Hypophosphatämie und Glukosurie (De Toni G., 1933; Debré R. et al., 1934; Fanconi G., 1936). 1943 verwendete McCune zum ersten Mal den Begriff „Fanconi-Syndrom“ (McCune DJ et al., 1943) für diese Erkrankung, welche generell eine Funktionsstörung des proximalen Tubulus beschreibt und durch eine Vielzahl renaler Symptome in unterschiedlicher Kombination und Ausprägung charakterisiert ist. Zu den häufigsten gehören Glukosurie, Hypophosphatämie und Aminoazidurie, daneben Hyperkalziurie, Urikosurie, Proteinurie (v.a. Leichtkettenproteinurie), eine verminderte Konzentrationsfähigkeit der Niere sowie der Verlust von Bikarbonat, Kalium, Natrium und Carnitin. Eine volle Ausprägung aller Symptome konnte in einer klinischen Studie von Tolaymat und Sakarcan 1992 nur bei drei von 21 Mitgliedern einer Familie mit Fanconi-Syndrom beobachtet werden (Tolaymat et al., 1992).

1.6.1 Klinische Manifestation



Abb. 8: Skelettveränderungen einer 12-jährigen Patientin mit Fanconi-Syndrom

Während die vermehrte Ausscheidung von Glucose und Aminosäuren zu keinen wesentlichen klinischen Erscheinungen führt, ist die verminderte tubuläre Rückresorption von anorganischem Phosphat und die daraus resultierende Hypophosphatämie mitverantwortlich für oft massive Skelettveränderungen bei den Patienten (Abb. 8). Durch eine Entmineralisierung der Knochen kommt es bei Kindern zu Minderwuchs, Frakturen und Vitamin-D-resistenter Rachitis. Erwachsene leiden unter Osteoporose und Osteomalazie. Die inadäquate Rückresorption von Calcium und eine verminderte Aufnahme von aktivem Vitamin D (Clarke et al., 1995) spielen hierbei ebenfalls eine wichtige Rolle (Bando et al., 2009). Ferner wurden bei einer groß angelegten Studie von

Tolaymat und Sakarcan 1991 bei Familien mit autosomal-dominantem Fanconi-Syndrom neben Rachitis und Osteomalazie vor allem Dehydratation, Polyurie und Polydipsie, unspezifisches Fieber sowie das Auftreten einer metabolischen Azidose als häufigste klinische Manifestationsformen festgestellt (Tolaymat *et al.*, 1992). Ähnliche Symptome konnten auch in früher durchgeführten klinischen Studien zum Fanconi-Syndrom beobachtet werden (BEN ISHAY *et al.*, 1961; Friedman *et al.*, 1978; Patrick *et al.*, 1981; Wen *et al.*, 1989). Schwerwiegende Komplikationen wie terminale Niereninsuffizienz, Dehydratation und Elektrolytstörungen sind v.a. bei der nephropathischen Zystinose häufig und oft lebensbedrohlich (Nesterova and Gahl, 2008).

1.6.2 Angeborenes Fanconi-Syndrom

Das Fanconi-Syndrom kann autosomal-dominant, autosomal-rezessiv oder x-chromosomal (Tolaymat *et al.*, 1992; Monnens and Levchenko, 2008) auftreten. Eine Zusammenfassung der verschiedenen genetischen Ursachen zeigt Tabelle 2.

Genetische Erkrankung	Gendefekt/ Mapping	Protein/ Pathomechanismus	OMIM
Autosomal-dominant			
Fanconi renotubuläres Syndrom (FRTS)	Chr. 15q15.3	unbekannt	%134600
Autosomal-rezessiv			
Zystinose <ul style="list-style-type: none"> • Infantil • Juvenil • Ocular 	CTNS Chr. 17p13	Zystinosin-Defekt	#219800 #219900 #219750
Hereditäre Fructoseintoleranz	ALDOB Chr. 9q22.3	Aldolase-B-Mangel	#229600
Galaktosämie	GALT Chr. 9p13	Galaktokinase (Gal-1-P-Uridyltransferase)-Mangel	#230400
Tyrosinämie	FAH Chr. 15q23 - q25	Fumarylacetoacetat-Hydrolase-Defekt	+276700
Morbus Wilson	ATP7B Chr. 13q14.3 - q21.1	Membranprotein (ATPase) für den Kupfertransport (β -Polypeptid)	#277900
Fanconi-Bickel-Syndrom	SLC2A2 Chr. 3q26.1 – q26.3	GLUT 2 Glucosetransporter	#227810

Vitamin-D-abhängige Rachitis <ul style="list-style-type: none"> • Typ 1 • Typ 2 	CYP27B1 12q13.1 - q13.3 12q12 - q14	1α-Hydroxylase-Mangel Vitamin-D-Rezeptor-Defekt	#264700 #277440
X-chromosomal-rezessiv			
Lowe-Syndrom (Okulozerebrorenales Syndrom)	OCRL1 Chr. Xq26.1	Phosphatidylinositol-4,5-Biphosphat-5-Phosphatase	#309000
Dent's disease	CLCN5 Chr. Xp11.22 OCRL1 Chr. Xq26.1	Chloridkanal-5-Defekt Phosphatidylinositol-4,5-Biphosphat-5-Phosphatase	#300009 #300555
Mitochondriendefekte			
Komplex-III-Mangel	UQCRC, UQCRCQ, BCS1L, 8q22, 5q31.1, 2q33	Cytochrom-c-Reduktase-Mangel	#124000
Komplex-IV-Mangel	MTCO1-3, MTTS1, MTTL1 2q33.3, 19q13.1	Cytochrom-c-Oxidase-Mangel	#220110
Chronisch tubulointerstitielle Nephropathie	mtDNA Deletion	Cytochrom-c-Oxidase-Mangel	#551200
Leigh Syndrom mit Fanconi Symptomatik	Verschiedene	Alle Komplexe der Atmungskette (I – V)	#256000

Tab. 2: Die häufigsten genetischen Ursachen des renalen Fanconi-Syndroms

Autosomal-dominant

Die autosomal-dominante Form ist selten und bisher nur in 6 Familien beschrieben (Tolaymat *et al.*, 1992). Ein Gendefekt liegt dabei auf Chr. 15q15.3 wie Lichter-Konecki et al. 2001 zeigen konnten (Lichter-Konecki *et al.*, 2001). Tolaymat untersuchte 1992 eine weitere afroamerikanische Familie mit dominant vererbtem Fanconi-Syndrom mit 39 Mitgliedern in 3 Generationen bezüglich ihrer klinischen Symptomatik (Tolaymat *et al.*, 1992). Diese Familie wurde von Prof. Robert Kleta vom Institut für Nephrologie am University College London erneut mit Hilfe von DNA-Kopplungsanalysen untersucht, wobei er auf die in dieser Arbeit behandelte Mutation im EHHADH-Gen stieß.

Autosomal-rezessiv

Das Fanconi-Syndrom des infantilen Typs wird autosomal-rezessiv vererbt, kann jedoch auch sporadisch auftreten. Außerdem kann es sekundär bei einer Reihe autosomal-rezessiv vererbter Stoffwechselerkrankungen zum renalen Fanconi-Syndrom kommen.

Die nephropatische Zystinose ist dabei mit einer Inzidenz von 1:100 000 die häufigste Ursache des genetisch bedingten Fanconi-Syndroms (Nesterova *et al.*, 2008). Town *et al.* fanden 1998 11 verschiedenen Mutationen im CTNS-Gen, das für das lysosomale Membranprotein Zystinosin kodiert (Town *et al.*, 1998). Durch eine Störung des Zystintransports von den Lysosomen ins Zytoplasma kommt es in der Folge zur Anreicherung von Zystin besonders in Niere, Cornea, Bindegewebe, Leber, Milz, Lymphknoten und Knochenmark. Die Akkumulation von Zystin in den Zellen der proximalen Tubuli führt schließlich zum Fanconi-Syndrom (Baum, 1998; Gahl *et al.*, 2002). Weitere autosomal-rezessiv vererbte Erkrankungen, die mit einem Fanconi-Syndrom einhergehen, sind in Tab.2 aufgeführt, u. a. auch das *Fanconi-Bickel-Syndrom*, bei dem ein Defekt im Glucosetransporter GLUT 2 zu einer hepatorenalen Akkumulation von Glykogen und als Folge dessen zum Auftreten eines Fanconi-Syndroms führt (Santer *et al.*, 1998).

X-chromosomal-rezessiv

Zu den X-chromosomal-rezessiven Erkrankungen mit Fanconi-Syndrom zählen das Okulozerebrorenale Syndrom (Lowe-Syndrom) und die sog. Dent-Erkrankung (Tab. 2).

Beide können durch eine Veränderung des OCRL1-Gens bedingt sein, das für eine Lipidphosphatase kodiert, welche Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat hydrolysiert (Cui *et al.*, 2010). Die Dent-Erkrankung kann auch durch eine Mutation des Chloridkanals CLCN5 hervorgerufen werden. Neben neurologischen Auffälligkeiten kommt es zur Dysfunktion des proximalen Tubulus (Bockenhauer *et al.*, 2008) und anderen renalen Symptomen wie Leichtkettenproteinurie, Hyperkalziurie, Nephrokalzinose, Nephrolithiasis und schließlich zur terminalen Niereninsuffizienz (Cho *et al.*, 2008; Ludwig *et al.*, 2006).

Mitochondriale Defekte

Pathologien der Mitochondrien und der mitochondrialen Atmungskette, deren reibungslose Funktion für die Energiebereitstellung der Zelle essentiell ist, können eine Reihe von verschiedenen Störungen in vielen Organen und Geweben zur Folge haben (Debray *et al.*, 2008; von Kleist-Retzow *et al.*, 2003; Niaudet, 1998). Besonders betroffen sind dabei Gewebe mit einem hohen Bedarf an aerober Energiegewinnung, wie das zentrale Nervensystem (DiMauro *et al.*, 1990), die Skelett- und Herzmuskelatur (Petty *et al.*, 1986) und nicht zuletzt die proximalen Tubuli der Niere (Wang *et al.*, 2000). Das Toni-Debré-Fanconi-Syndrom stellt die häufigste renale Manifestationsform mitochondrialer Zytopathien dar (Niaudet, 1998). Der ATP-Verbrauch des proximalen Tubulus ist transportbedingt sehr hoch und wird zu mehr als 95% durch oxidative Phosphorylierung gedeckt (Epstein, 1997; Balaban *et al.*, 1980). Es konnte beobachtet werden, dass in proximalen Tubuluszellen der

Energieverbrauch nahe am Kapazitätsslimit der ATP-Bereitstellung liegt und eine Stimulierung des epithelialen Na^+ -Transports zu einem schnellen Abfall der intrazellulären ATP-Vorräte führt (Beck *et al.*, 1991). Somit ist es nicht verwunderlich, dass eine Störung der Mitochondrienfunktion zu einem renalen Verlust wichtiger Substanzen wie Glucose, Aminosäuren, Proteine, Elektrolyte und Wasser führt, wie es für das De-Toni-Debré-Fanconi-Syndrom charakteristisch ist (Debray *et al.*, 2008; Niaudet, 1998). Die Störung kann dabei sowohl durch eine Mutation der mitochondrialen DNA als auch durch Defekte von Enzymkomplexen der Atmungskette oder eine Reihe anderer verschiedener Ursachen bedingt sein.

In Nierenbiopsien zeigten sich histologisch nur unspezifische Abnormalitäten des Tubulusepithels wie Entdifferenzierung und Atrophie. Jedoch konnte man bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung des Gewebes als Zeichen der mitochondrialen Zytopathie regelmäßig viele abnorme, oft übergroße Riesenmitochondrien beobachten (Au *et al.*, 2007; Niaudet and Rotig, 1997; Niaudet, 1998). Für eine mitochondriale Funktionsstörung bei Patienten mit Fanconi-Syndrom spricht außerdem das Vorliegen einer Laktatazidose sowie die häufig auftretende Kombination der renalen Symptome mit Muskelschwäche oder neurologischen Auffälligkeiten, wie sie bei Mitochondriedefekten typisch sind (Wang *et al.*, 2000; Buemi *et al.*, 1997).

1.6.3 Erworbenes Fanconi-Syndrom

Eine Schädigung des proximalen Tubulus der Niere im Sinne eines Faconi-Syndroms kann nicht nur genetisch bedingt sein, sondern auch im Rahmen verschiedener erworbenen Erkrankungen bzw. durch Einfluss von Medikamenten oder Toxinen entstehen (Izzedine *et al.*, 2003):

Erworbene Erkrankungen mit Fanconi-Syndrom

- Nierenerkrankungen, z.B. akute tubuläre Nekrose, Abstoßungsreaktion nach Nierentransplantation
- Maligne Erkrankungen, z.B. Multiples Myelom
- Autoimmunerkrankungen, z.B. Sjögren Syndrom
- Virusinfektionen, z.B. HIV
- Stoffwechselerkrankungen, z.B. Hyperparathyreoidismus

Medikamenten-induziertes Fanconi-Syndrom

- Chemotherapeutika: Ifosfamid, Cis- / Carboplatin, Azacitidin, Suramin, Mercaptoperin
- Antibiotika: Tetracycline, Aminoglycoside
- Antikonvulsiva: Valproinsäure
- Antiretrovirale Medikamente: Didanosin, Cidofovir, Adefovir; Tenofovir (Irizarry-Alvarado *et al.*, 2009; Izzedine *et al.*, 2009) Bei Zidovudin, Stavudin, Lamivudin,

Ritonavir und Ribavirin ist eine Mitochondrienschädigung beschrieben, die ebenfalls zur Entwicklung eines Fanconi-Syndroms führen könnte (Nelson *et al.*, 2008).

- H₂-Blocker: Ranitidin
- Fumarsäure (Psoriasisbehandlung)

Andere Toxine, die ein Fanconi-Syndrom verursachen können

- Schwermetallintoxikation (Quecksilber, Blei, Cadmium, Uran)
- chronischer Alkoholabusus
- Klebstoff schnüffeln
- Boui-Ougi-Tou (Chinesisches Medikament gegen Adipositas)

2. Zielsetzung

Die zugrunde liegenden Ursachen für das Auftreten eines renalen Fanconi-Syndroms sind vielfältig und immer noch Gegenstand der Forschung.

Ein neuer Ansatzpunkt ergab sich mit der Entdeckung einer N-terminalen Mutation im EHHADH-Gen durch Prof. Robert Kleta vom Institut für Nephrologie am University College London. Bei der genetischen Untersuchung einer bereits 1991 durch Tolaymat et. al. klinisch beschriebenen afroamerikanischen Familie mit dominant vererbtem Fanconi-Syndrom (Tolaymat et al., 1992) konnte die Mutation im EHHADH-Gen mittels Kopplungsanalysen bei allen Erkrankten, nicht jedoch bei gesunden Familienmitgliedern und auch nicht bei weiteren 200 gesunden Probanden nachgewiesen werden. Bisher bekannte Ursachen für das Auftreten eines Fanconi-Syndroms wurden im Vorfeld ausgeschlossen. Die Patienten zeigten phänotypisch Rachitis als Leitsymptom sowie Glucosurie, Proteinurie (Leichtkettenproteinurie), Aminoazidurie und Phosphaturie als charakteristische Veränderungen des renalen Ausscheidungsprofils.

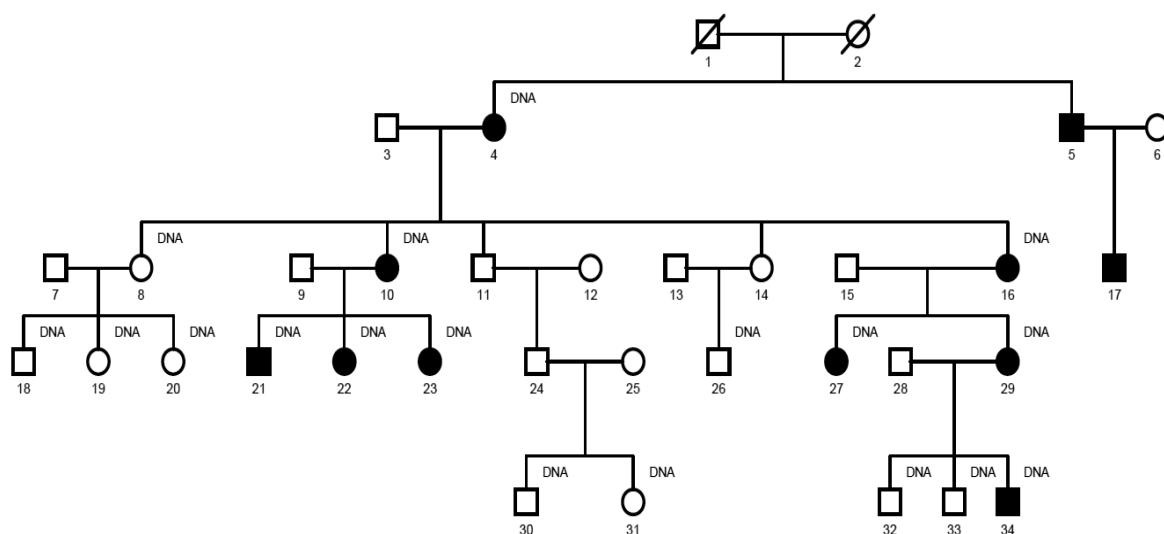


Abb. 9: Stammbaum der afroamerikanischen Familie mit dominant vererbtem Fanconi-Syndrom:

Die mittels DNA-Kopplungsanalysen untersuchten Patienten sind mit „DNA“ gekennzeichnet, Patienten 1 und 2 waren bei Durchführung der Untersuchung bereits verstorben.

EHHADH (Enoyl-CoA-Hydrtase/3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase) bezeichnet ein bifunktionales Enzym der β -Oxidation, welches physiologischerweise in den Peroxisomen der Zelle lokalisiert ist.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Pathomechanismus, durch welchen die N-terminale Mutation dieses Proteins zur Entstehung eines Fanconi-Syndroms führt.

Dazu wurde mittels immunhistochemischer Färbungen zunächst die physiologische Verteilung von EHHADH in der Niere von L-PBE-Knockout (L-PBE^{-/-})- und L-PBE-Wildtyp (L-

PBE^{+/+})- Mäusen sowie in der humanen Niere untersucht. Ferner wurde ein Zusammenhang zwischen der Lokalisation von EHHADH in der Niere und dem beim Fanconi-Syndrom betroffenen Nierenabschnitt, dem proximalen Tubulus, hergestellt.

Mit Hilfe einer Online-Software wurde ermittelt, dass die Mutation zu einer Fehllokalisierung des normalerweise in den Peroxisomen ansässigen EHHADHs in die Mitochondrien führt. Deshalb wurde in einem nächsten Schritt die intrazelluläre Lokalisation des Wildtyp-Proteins (EHHADH_{wt}) und der mutierten Form (EHHADH_{mut}) an transient transfizierten Zellen untersucht.

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie wurden die mit EHHADH_{mut} transfizierten Zellen bzgl. morphologischer Veränderungen v.a. der Mitochondrien analysiert.

Die Analyse von Aminosäuren und verschiedener Metabolite des Energiestoffwechsels in Urinproben von L-PBE^{-/-}, L-PBE^{+/+}, und heterozygoten L-PBE⁺⁻-Mäusen wurde durchgeführt, um zu klären, ob bereits das Fehlen von EHHADH zu fanconisyndromtypischen Veränderungen der Nierenfunktion insbesondere Aminoazidurie oder Glucosurie führt.

Ziel dieser Arbeit war es somit, erste Anhaltspunkte für die Erklärung des Pathomechanismus zu liefern, durch welchen die von Prof. Kleta entdeckte Mutation zur Funktionsstörung des proximalen Nierentubulus und damit zur phänotypischen Ausbildung eines Fanconi-Syndroms führt. Der Schwerpunkt lag dabei auf der grundlegenden Charakterisierung des peroxisomalen Proteins hinsichtlich seiner Lokalisation in der Niere sowie dem Nachweis des vermuteten „Maltargetings“ von EHHADH_{mut} in die Mitochondrien. Mitochondriale Defekte, wie sie durch ein Maltargeting von EHHADH_{mut} entstehen könnten, sind als Ursachen anderer Formen des Fanconi-Syndroms bereits vielfach beschrieben (Wang *et al.*, 2000; Niaudet, 1998; Niaudet *et al.*, 1994; Debray *et al.*, 2008).

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Augenschere (und weitere chirurgische Instrumente)	FST, Bad Oeynhausen, D
Autoklav	Tuttnauer 2540ELC, biomedis GmbH, Gießen, D
Brutschrank	Heraeus Instruments, Osteode, D
Gasmischlanlage für Isofluran-Verdampfer	MFI Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim, D
Hämatokritzentrifuge	Biofuge haemo, Heraeus Instruments, Osteode, D
Invertmikroskop	Axiovert 200, Zeiss, Jena, D
Isofluran-Verdampfer	Vapor 19.3, Dragerwerk AG, Lübeck, D
Kaffeemaschine	Master 5000, Solis, CH
Kamera	AxioCam MRm, Zeiss, Jena, D
konfokales Mikroskop	LSM 510, Zeiss, Jena, D
Kryostat	Leica CM3050 S, Wetzlar, D
Mikroliterzentrifuge	Hettich, Tuttlingen, D
Mikrotiterplatten-Photometer	TECAN Sunrise, Tecan Trading AG, CH
Rollerpumpe	Ismatec SA., Zürich, CH
Thermomixer 5436	Eppendorf GmbH, Hamburg, D
Stereo-Mikroskop (OP-Platz)	Stemi SV6, Zeiss, Jena, D
UV-Meter	Genova, Jenway, Essex, E
Vortex Genie™	Scientific Industries, Inc., Bohemia, N.Y. USA
Wärmeplatte für Operationen	Dr. J. Barhanin, Nizza, F
Wärmeschrank	Modell 300, Memmert, Schwabach, D
Wasserbad	Modell W13, Haake, Karlsruhe, D
Zentrifuge ZK 364	Hermle, Wehingen, D

3.1.2 Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
Glasdeckplättchen für Zellfärbungen	Hartenstein, Würzburg, D
Glycergel mounting medium, fluoreszenzfrei	DakoCytomation, Dako North America Inc., Carpinteria, USA
heparinisierte Mikro-Hämatokrit-Kapillaren	Brand GmbH + CO KG, Wertheim, D
Latex-Handschuhe	Kimberly-Clark, Roswell, USA
Mikrotiterplatten	Nuclon Surface, Nunc A/S, Roskilde, DK
PE-Schlauch (Katheter)	Benno Kummer, Freiburg, D
Petrischalen	Nuclon Surface, Nunc A/S, Roskilde, DK
Polysin Objekträger	Kindler, Freiburg, D
Superfrost® Plus Objekträger	Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig, D
Tissue Tek, Einbett- Medium	Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude,

	NL
--	----

3.1.3 Chemikalien

Produkt	Hersteller
2-Methylbutan	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Agarose	AppliChem, Darmstadt, D
BSA (Albumin from bovine serum)	Sigma, Taufkirchen, D
CaCl ₂	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
EDTA	Sigma, Taufkirchen, D
EGTA	Sigma, Taufkirchen, D
Ethanol	J. T. Baker, Deventer, NL
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, D
Glucose	Merck, Darmstadt, D
Heparin-Lösung	Liquemin N 25000, 5 ml, Roche, Mannheim, D
HEPES	AppliChem, Darmstadt, D
Isofluran	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, D
Isopropanol	Merck, Darmstadt, D
isotone Natriumchloridlösung 0,9%	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
K ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt, D
Kreatinin	Sigma, Taufkirchen, D
KH ₂ PO ₄ *3H ₂ O	Merck, Darmstadt, D
MgCl ₂ *6H ₂ O	Merck, Darmstadt, D
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	Merck, Darmstadt, D
NaCl	Merck, Darmstadt, D
Natriumcitrat- Dihydrat	Merck, Darmstadt, D
NH ₄ Ac (Ammoniumacetat)	Merck, Darmstadt, D
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, D
Proteinkinase K	Sigma, Taufkirchen, D
REDTaq™ ReadyMix™ PCR Reaction Mix	Sigma, Taufkirchen, D
Saccharose	Merck, Darmstadt, D
SDS (Dodecylsulfat Natriumsalz)	Merck, Darmstadt, D
TAE (Tris – Acetat- EDTA) – Puffer	AppliChem, Darmstadt, D
TRIS HCl (Trizma® hydrochloride)	Sigma, Taufkirchen, D
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen, D
Trypsin-EDTA-Lösung (10x), Flüssig	0,5% Trypsin, 5,3 mM EDTA, Gibco Cell Culture Systems - Invitrogen, Karlsruhe, D
Xylol	Merck, Darmstadt, D
Zitronensäure- Monohydrat	Sigma, Taufkirchen, D

3.1.4 Zellkultur

Bovines Fibronectin	Biochrome AG, Berlin, D
Collagen type I	Sigma, Taufkirchen, D

DPBS	Gibco Cell Culture Systems - Invitrogen, Karlsruhe, D
FCS (Fötales Rinderserum)	Gibco Cell Culture Systems - Invitrogen, Karlsruhe, D
FuGENE® Transfektionsreagenz	Roche, Mannheim, D
L-Glutamin, 200 mM (100x), Flüssig	Gibco Cell Culture Systems - Invitrogen, Karlsruhe, D
Lipofectamine™ 2000, Transfektionsreagenz	Gibco Cell Culture Systems - Invitrogen, Karlsruhe, D
MEM alpha Zellmedium	Gibco Cell Culture Systems - Invitrogen, Karlsruhe, D
MitoTracker® Orange	Invitrogen, Eugene, Oregon USA
Na-Pyruvat, 100 mM Lösung	Sigma, Taufkirchen, D
Opti MEM Zellmedium	Gibco Cell Culture Systems - Invitrogen, Karlsruhe, D
Penicillin-Streptomycin-Lösung, flüssig	1000 I.E./ml Pen G, 10000 µg/ml Strep.-Sulfat, Gibco Cell Culture Systems - Invitrogen, Karlsruhe, D

3.1.5 Plasmide

Plasmid	Vektor	Länge
hEHHADH _{wt} hEHHADH _{mut}	pGFP C1	8528 bps zirkuläre DNA
hEHHADH _{wt} hEHHADH _{mut}	plres CD8	8951 bps zirkuläre DNA
mEHHADH _{wt} mEHHADH _{mut}	plres CD8	7309 bps zirkuläre DNA

3.1.6 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von Invitrogen, Karlsruhe, D hergestellt.

Gen	Primer	Sequenz	Annealing-T	Amplikon
L- PBE ^{+/+}	sense antisense	GAGCTGGCCTGGGCTGTCACTA TAGAACGCTGCGTCCCTTGCACCA	70° 70°	1855 bp
L- PBE ^{-/-}	sense antisense	TGAATGAAC TGCAAGACGAGG CCACAGTCGATGAATCCAGAA	64° 61°	460 bp

3.1.7 Antikörper

Bezeichnung	Art	Verd.	Hersteller
Anti-RNG (hEHHADH) rabbit polyclonal IgG Epitop: RNGLQKASLDHTVRAI	Prim.-Ak	1: 500	Davids Biotechnologie GmbH, Regensburg, D
Anti-EPS (hEHHADH) rabbit polyclonal IgG Epitop: EPSDYLLRLVAQGSPPPLK	Prim.-Ak	1: 500 1:1000 1:2000	Davids Biotechnologie GmbH, Regensburg, D
Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit	Sek.-Ak	1:400	Invitrogen, Karlsruhe, D

Alexa Fluor® 647 donkey anti-rabbit	Sek.-Ak	1:400	Invitrogen, Karlsruhe, D
Cy3 goat anti rabbit	Sek.-Ak	1:400	Invitrogen, Karlsruhe, D
HOE33342 (Stockkonz.: 5×10^{-4} M)	kein Ak	1:400	Invitrogen, Karlsruhe, D

3.1.8 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Inhaltsstoffe	Menge
Fixierlösung I, pH 7,4	EGTA K ₂ HPO ₄ MgCl ₂ NaCl Paraformaldehyd Saccharose Aqua dest.	1 mM 15 mM 2 mM 90 mM 3% 100 mM
Fixierlösung II, pH 7,4	EGTA K ₂ HPO ₄ MgCl ₂ NaCl Paraformaldehyd Saccharose in Aqua dest.	1 mM 15 mM 2 mM 90 mM 1% 17%
PBS-Puffer, pH 7,4	KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ NaCl in Aqua dest.	1,8 mM 10,3 mM 137 mM
Citratpuffer, pH 6	Natriumcitrat-Dihydrat Zitronensäure-Monohydrat in Aqua dest.	2,059 g 0,317 g ad 1000 ml
Block-Lösung, pH 7,4	BSA Triton X-100 in PBS-Puffer	5% 0,04%
Ak-Verdünnungslösung, pH 7,4	BSA Triton X-100 in PBS-Puffer	0,5% 0,04%
TRIS EDTA (TE)	TRIS HCl pH 7,6 EDTA pH 8,0	10 mM 1 mM
Tail Buffer	EDTA SDS TRIS HCl pH 8,0	0,1 M 0,5% 50 mM

CHO-/ COS-Zellmedium	MEM alpha Medium	
	FCS	20%
	Penicillin / Streptomycin	0,5%
	Na- Pyruvat	1%
	L- Glutamin	1%

HEK-Zellmedium	MEM alpha Medium	
	FCS	10%
	Penicillin / Streptomycin	1%

Coating-Medium	Bovine Fibronectin (1 mg/ml)	1%
	Kollagen Typ I (1 mg/ml)	1%
	Penicillin- Streptomycin- Lsg.	1%
	in DPBS - Lösung	

3.1.9 Software

Produkt	Hersteller
AxioVision LE Rel. 4.5	Carl Zeiss Vision GmbH, Jena
ImageJ V1.37c	Wayne Rasband, NIH, USA
Metamorph V6.2r2	Molecular Devices Corporation, Downingtown, PA , USA
Zeiss LSM Image Browser V3,5,0,376	Carl Zeiss GmbH, Jena

3.2 Methoden

3.2.1 Immunhistochemische Färbungen von Nierengewebe

Unter Immunhistochemie versteht man den Nachweis antigener Komponenten in Zellen und Gewebeschnitten durch Antikörper (Ak), die mit Fluoreszenzfarbstoffen, Enzymen, Goldpartikeln oder Isotopen gekoppelt sind. Bei der indirekten Immunfluoreszenzfärbung bindet zunächst der primäre, unkonjugierte Antikörper (Primär-Ak) an das Antigen im Gewebeschnitt. Anschließend werden die Schnitte mit einem zweiten, fluoreszierenden Antikörper (Sekundär-Ak), der gegen den F_c-Teil des primären Antikörpers gerichtet ist, inkubiert. Dadurch wird der Antigen-Antikörper-Komplex detektierbar, wenn eine Anregung des Fluorophors mit Licht entsprechender Wellenlänge erfolgt.

In dieser Arbeit wurden für die Färbungen sowohl Gewebeschnitte von Versuchstieren (L-PBE^{+/+} / L-PBE^{-/-}-Mäuse) als auch humanes Nierengewebe verwendet.

3.2.1.1 Antiköperfärbungen auf Nierengewebe von L-PBE^{+/+}- und L-PBE^{-/-}-Mäusen

a) Modell der L-PBE-Knockout (L-PBE^{-/-})-Maus

Die für diese Arbeit verwendeten L-PBE^{-/-}-Mäuse wurden über die Methode der homologen Rekombination hergestellt (Qi et al., 1999).

Das Konstrukt für die Generierung des L-PBE^{-/-}-Mausmodells ist in Abb. 10 dargestellt. Dieses wurde in BK4 embryonale Stammzellen (ES) eingebracht. Nach Selektion mit Ganciclovir und Geneticin (G 418) und Analyse im Southern-Blot-Verfahren konnten zwei positive ES-Klone in dreieinhalb Tage alte C57BL/6J-Blastozysten injiziert und diese in scheinschwangere CBAF1-Mäuse transferiert werden. Die daraus resultierenden Chimären wurden mit C57BL/6J-Mäusen gepaart und die Genübertragung mittels Fellfarbe und Southern-Blot festgestellt. Durch Kreuzung F1-heterozygoter Geschwister erhielt man schließlich homozygote L-PBE^{-/-}-Mäuse. Trotz des Genverlusts zeigten sich keinerlei Abnormalitäten in Wachstum, Morphologie oder Fertilität (Qi et al., 1999).

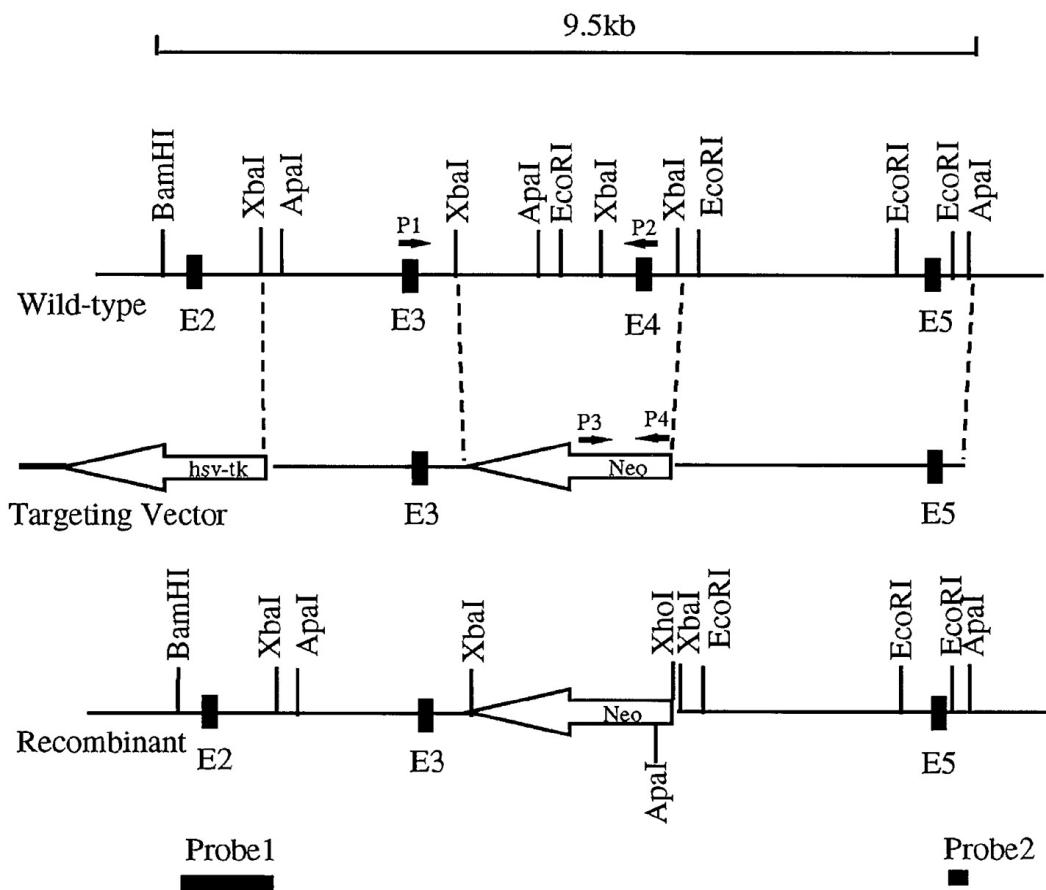


Abb. 10: Generierung des L-PBE^{-/-}-Genkonstrukts: Schematische Darstellung des murinen L-PBE-Gens, des „targeting Vektors“ und der Rekombinante. Dargestellt sind die Exone 2-5 als schwarze Kästchen, sowie die Restriktionsschnittstellen und die Angriffsseite der Primer (P1 – P4) für die Polymerasekettenreaktion. Ebenfalls markiert sind die Hybridisierungsorte der Proben 1 und 2 für die Southern-Blot-Analysen. (Qi et al., 1999)

Sowohl L-PBE^{-/-}- als auch die entsprechenden genetisch nicht modifizierten Kontrolltiere (L-PBE^{+/+}) wurden nach dem geltenden Tierschutzgesetz gehalten. Die Mäuse hatten einen 12 Stunden-Hell-Dunkel-Rhythmus und erhielten speziespezifische Standarddiät und Leitungswasser *ad libitum*. L-PBE^{+/+}- und L-PBE^{-/-}-Mäuse wurden unter gleichen Bedingungen in offener Tierhaltung gehalten.

b) Genotypisierung

Um nach Verpaarung heterozygoter Eltern, die für die Experimente verwendeten homozygoten Versuchstiere zu identifizieren, wurden die Mäuse genotypisiert.

Dafür wurde genomische DNA aus Schwanzbiopsien gewonnen und diese nach Vervielfältigung mittels PCR durch Agarosegelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Bei homozygoten Wildtypmäusen (L-PBE^{+/+}) ergab sich eine Bande bei 1,85 kb, was der Größe des Wildtypallels entspricht, bei homozygoten L-PBE^{-/-}-Mäusen entsprechend des Knockout-Allels eine Bande bei 0,46 kb. Heterozygote Mäuse (L-PBE^{+/+}) wiesen beide Banden auf.

Zur Präparation der genomischen DNA wurde ein ca. 0,3 cm langes Schwanzstück der Mäuse mit 300 µl „Tail Buffer“ und 1 µl Proteinase K versetzt und über Nacht bei 55°C verdaut. Am nächsten Tag wurden 100 µl 7,5 M Ammoniumacetat und 600 µl Isopropanol zugegeben und das Gemisch 20 min bei -20°C gefällt. Nach zehnminütigem Zentrifugieren konnte nun der Überstand verworfen und das verbleibende Pellet mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen werden. Nun wurde erneut für 10 min zentrifugiert und das Pellet nach Verwerfen des Überstandes an der Luft getrocknet und anschließend in 80 µl Tris -EDTA aufgenommen. Zum vollständigen Lösen des Pellets wurde das Cup zwei bis drei Stunden bei 55°C in den Thermomixer gestellt. Der PCR-Ansatz enthielt:

Für das Wildtyp-Allel:

- 2 µl DNA
- 10 µl REDTaq™ PCR Reaction Mix von Sigma, bestehend aus 20 mM Tris-HCl pH 8,3 mit 100 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0,002% Gelatine, Stabilisatoren, 0,4 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und 0,06 unit/ µl Taq DNA Polymerase
- 1 µl Primer L-PBE^{+/+} sense (10 µM)
- 1 µl Primer L-PBE^{+/+} antisense (10 µM)
- 6 µl H₂O

Für das Knockout-Allel:

- 2 µl DNA
- 10 µl REDTaq™ PCR Reaction Mix
- 1 µl Primer L-PBE^{-/-} sense (10 µM)
- 1 µl Primer L-PBE^{-/-} antisense (10 µM)
- 6 µl H₂O

Die DNA wurde nun in der anschließenden PCR mit folgendem Programm amplifiziert:

Wildtyp-PCR:

94°C/ 3 min	
94°C/ 30 sec	} 30 Zyklen
66°C/ 30 sec	
72°C/ 2 min	
4°C	

Knockout-PCR:

94°C/ 3 min	
94°C/ 30 sec	} 30 Zyklen
59°C/ 30 sec	
72°C/ 30 sec	
4°C	

Nach der anschließenden Agarosegelektrophorese, bei der die amplifizierten DNA-Stücke der Größe nach aufgetrennt wurden, konnten die jeweiligen Banden für das L-

PBE^{+/+} - (1,85 kb) bzw. L-PBE^{-/-}-Allel (0,46 kb) abgelesen werden und so der Genotyp der Mäuse bestimmt werden.

c) Gewebefixierung durch retrograde arterielle Perfusion

Um Gewebe der Versuchstiere für histologische Färbungen verwenden zu können, wurde als erstes eine Fixierung mit Paraformaldehyd durchgeführt. Diese führt zur Ausbildung von Querverbindungen zwischen den Eiweißmolekülen und damit zur Stabilisierung der Strukturen. Autokatalytische Vorgänge werden verhindert und die Zellstruktur bleibt dadurch in einem möglichst natürlichen Zustand erhalten. Außerdem wird durch die Härtung des Probenmaterials eine bessere Schneidbarkeit erzielt.

Dafür wurden sowohl L-PBE^{-/-}- als auch L-PBE^{+/+}-Mäuse durch Inhalationsanästhesie mit Isofluran (2,5% Isofluran in einem Gasgemisch aus 50% Sauerstoff und 50% Stickstoff mit einem Fluss von 60 ml/min) narkotisiert. Nach Öffnen des Abdomens und Freilegen der Bauchaorta wurde die Aorta unterhalb der Abgänge der Arteriae renales abgeklemmt. Proximal der Klemme wurde ein Perfusionskatheter eingeführt, über den anschließend nach Entfernen der Klemme zunächst 10 ml isotone NaCl-Lösung mit 10 I.E./ml Heparin zur Entfernung des Blutes und Verhinderung der Blutgerinnung und danach Fixierlösung I (3% Paraformaldehyd in gepufferter Salzlösung) mit einem konstanten Fluss von 15 ml/min über eine Rollerpumpe retrograd infundiert wurde.

Als Abfluss für das Perfusat wurde die Vena cava inferior durch einen Schnitt geöffnet. Die fixierten Organe, in diesem Fall die Nieren, wurden anschließend entfernt und wie im nächsten Punkt beschrieben für die Anfertigung von Kryoschnitten vorbereitet.

d) Vorbereitung und Anfertigung der Kryopräparate

Um die Organe später für die Anfertigung von Gefrierschnitten zu verwenden, wurden die herausgenommenen perfundierten Mausnieren über Nacht bei 4°C in einer PBS-basierten Lösung inkubiert, die 1% Paraformaldehyd und 17% Saccharose enthielt (Fixierlösung II). Danach wurden die Organe schonend in -35°C kaltem 2-Methylbutan eingefroren, da bei zu raschem Abkühlen Risse entstehen können, und anschließend bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Vor dem Schneiden wurden die Gewebestücke mittels Einbettung in Tissue Tek auf dem Objekthalter des Kryostaten fixiert. Bei einer KammerTemperatur von -27°C konnten nun 5 µm dicke Schnitte der Nieren angefertigt werden, die nach Aufziehen auf Polysin-Objektträger für etwa 20 min bei Raumtemperatur (RT) getrocknet und für die anschließenden Färbungen für ca. 5 min in PBS getaucht wurden, um das wasserlösliche Tissue Tek-Medium zu entfernen.

e) Immunhistochemische Färbung der Kryopräparate

Zur Epitop-Demaskierung wurden die Nierenschnitte zuerst in 0,1%iger SDS-Lösung (in PBS) 5 min inkubiert und anschließend zweimal mit PBS-Puffer 5 min lang gewaschen. Um unspezifische Bindungen der Antikörper abzuschwächen, folgte sodann eine Behandlung mit einer Block-Lösung (5% BSA in PBS + 0,04% Triton X-100) für 15 min und anschließend ein erneuter Waschvorgang mit PBS-Puffer (5 min). Sowohl Primär- als auch Sekundär-Ak wurden mit PBS-Lösung verdünnt, die 0,5% BSA und 0,04% Triton X-100 enthielt (Ak-Verdünnungslösung). Dieses Detergens bewirkt eine Permeabilisierung der Zellmembranen im Gewebe und erleichtert die Diffusion der Antikörper zu intrazellulären Zielstrukturen. Die Inkubation mit der Primär-Ak-haltigen Lösung (Anti-EPS 1:2000) erfolgte über Nacht bei 4°C in einer feuchten, geschlossenen Kammer. Nachdem die Schnitte zweimal 5 min in PBS gewaschen wurden, wurden sie am nächsten Tag für 1 h bei RT unter Lichtausschluss mit dem Sekundär-Ak „*Cy3 goat anti rabbit*“ in einer Verdünnung von 1:400 inkubiert. Um die Zellkerne sichtbar zu machen, wurde der Farbstoff HOE 33342, ebenfalls 1:400 verdünnt, zugefügt, der an adenin- und thymidinreiche Sequenzen bindet und somit spezifisch DNA im Zellkern anfärbt. Nach abschließendem Waschen (5 min in PBS) und kurzem Eintauchen in Aqua dest. wurden die Objekträger mit Hilfe von fluoreszenzfreiem Glycergel mit Deckgläsern versehen.

3.2.1.2 Antikörperfärbungen von humanem Nierengewebe

Für die Immunfluoreszenzfärbung von humanem Nierengewebe wurde in Paraffin eingebettetes Archivmaterial verwendet. Die 5 µm dicken Paraffinschnitte wurden zum „entparaffinieren“ zuerst jeweils zweimal 12 min in Xylol und in absteigender Konzentration in Ethanol (100%, 95%, 80%, 70%) eingelegt und anschließend mit PBS gewaschen. Zur Epitopdemaskierung folgte eine Inkubation mit Citratpuffer bei 95° C und anschließend ein erneuter Waschvorgang mit PBS. Nachdem die humanen Gewebeschnitte zur Abschwächung unspezifischer Bindungen 10 min mit der Blocklösung (5% BSA in PBS + 0,04% Triton X-100) behandelt worden waren, konnten sie über Nacht mit dem Primär-Ak Anti-EPS (1:500) inkubiert werden. Die nachfolgende Behandlung mit Sekundär-Ak und das Versehen mit Deckgläsern erfolgte analog zur Färbung der Kryoschnitte (siehe 3.2.1.1 e).

3.2.2 Zellkultur

3.2.2.1 Verwendete Zelllinien

In dieser Arbeit wurden für die Experimente mit EHHADH als Zellmodelle HEK-, CHO- und COS-7-Zellen verwendet.

HEK steht für "*Human Embryonic Kidney*"-Zellen. Die HEK-Zelllinie wird auch als HEK-293 bezeichnet. Es handelt sich dabei um eine seit Ende der 1970er Jahre bestehende humane Zelllinie, die als Transformationsprodukt einer menschlichen embryonalen Nierenzelle mit DNA-Teilen des menschlichen Adenovirus 5 geschaffen wurde. Spezifisch wurden 4,5 Kilobasen des viralen Genoms in das Erbgut der Nierenzelle eingebaut. HEK-293 sind Epithelzellen, welche adhärent wachsen und gut in serumfreiem Medium kultiviert werden können.

CHO (*Chinese hamster ovary*)-Zellen sind Zellen aus den Ovarien chinesischer Hamster. Sie wurden Anfang der 1960er Jahre als eine entwicklungsähige Epithelzelllinie in die Forschung eingeführt und enthalten zwei weibliche X-Chromosomen.

Bei den **COS-7**-Zellen handelt es sich um fibroblastische Zellen, die ursprünglich aus der Niere grüner Meerkatzen (*Cercopithecus aethiops*) stammen. Dabei steht COS für „*Cercopithecus aethiops, origin-defective SV-40*“.

3.2.2.2 Transfektion

a) Plasmide

Um ein Plasmid mit **humanem EHHADH** (hEHHADH) zu erhalten, wurde die kodierende Sequenz des Proteins mit Hilfe der Restriktionsenzyme EcoRI und Bam HI an Position 940 bis 4760 in den Vektor pIRES CD8 umkloniert. Der insgesamt 8951 bps lange Vektor enthielt neben den Genen für IRES (5116 – 5701) und CD8 (5712 – 6419) als weitere Gene das CMV- (232 – 820), IVS- (4792 – 5087) und Ampicillin-Gen (7954 – 8714).

Bei der Mutante (hEHHADH_{mut}) ist im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz (hEHHADH_{wt}) an Position 7 ein Guanin gegen ein Adenin ausgetauscht, was auf Proteinebene einen Austausch der negativ geladenen Aminosäure Glutamat (GAG) an Position 3 gegen das positiv geladene Lysin (AAG) bedeutet. Dies entspricht der von Prof. Kleta entdeckten Mutation, die bei Patienten mit dominant vererbtem Fanconi-Syndrom gefunden wurde.

Für die Antikörpertestungen an transfizierten Zellen wurde ein anderer Vektor verwendet, der neben der Sequenz des humanen EHHADH in Wildtyp- bzw. mutierter Form auch die Gensequenz für ein grün fluoreszierendes Protein (green fluorescence protein = GFP) von Postion 613 bis 1407 enthält. So ergibt sich ein fluoreszierendes Fusionsprotein, das durch Anregung mit Licht bestimmter Wellenlänge im Fluoreszenzmikroskop sichtbar ge-

macht werden kann. Außerdem beinhaltet der pGFP-C1-Vektor das Gen für pCMV und Kanamycin.

Das Plasmid mit **mausspezifischem EHHADH** (mEHHADH) wurde über Amplifizierung von cDNA aus der Leber, Klonierung in pBSK und Umklonierung in pIRES CD8 mit Hilfe von NotI gewonnen und umfasst 7309bps (mEHHADH von 919 bis 3105). Der Vektor entspricht dem des humanen Plasmids, enthält jedoch noch eine Poly A-Sequenz von Position 4778 bis 5053. Die Mutation entspricht der des humanen EHHADH_{mut}.

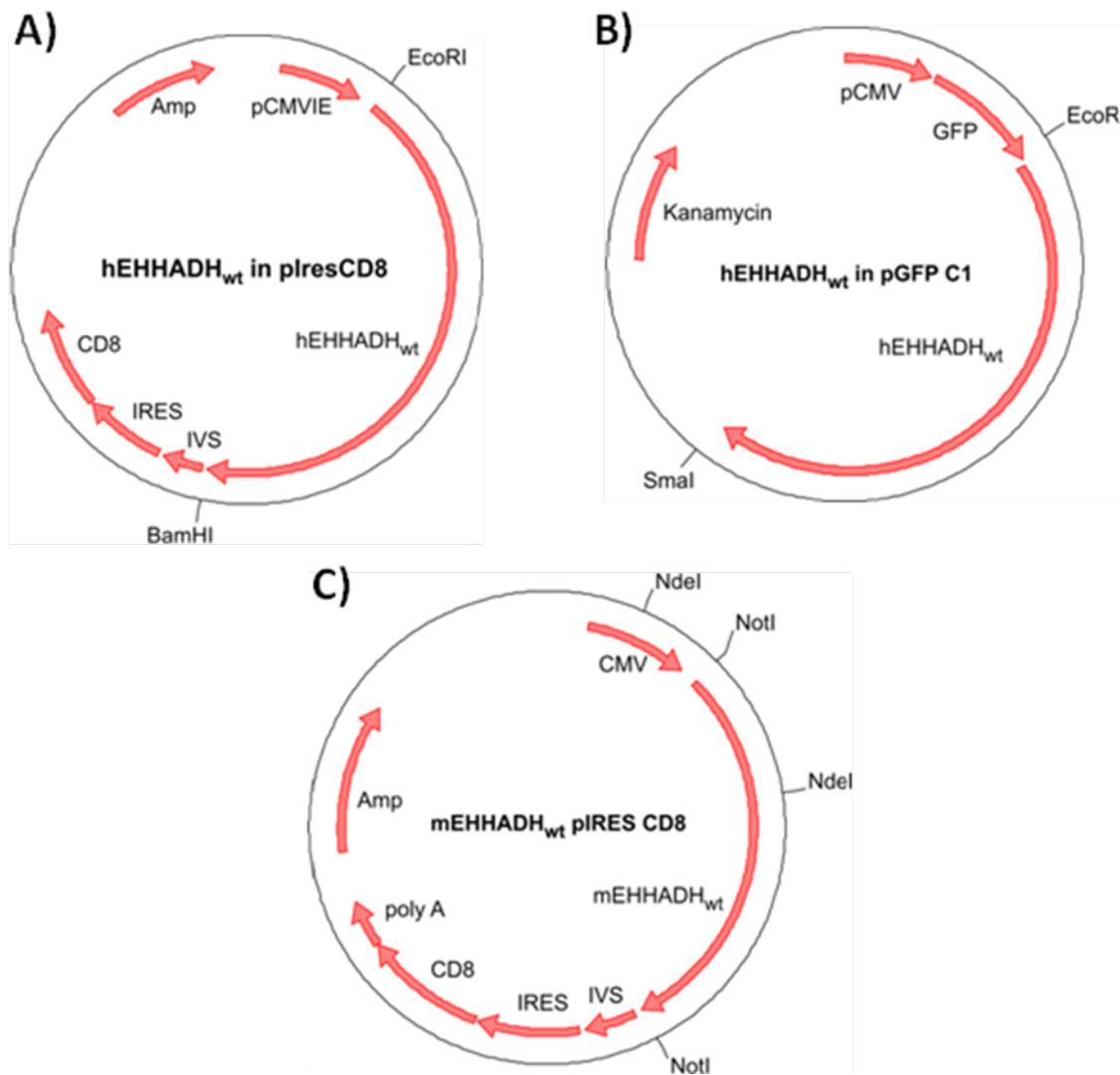


Abb. 11: Darstellung der verwendeten Plasmide: hEHHADH_{wt} in pIRES CD8 (A), hEHHADH_{wt} in pGFP C1 (B) und mEHHADH_{wt} in pIRES CD8 (C)

Für die Experimente am Zellmodell wurden grundsätzlich zwei verschiedenen Transfektionsprotokolle angewandt:

b) Transfektion von CHO- bzw. COS7-Zellen mit Fugene (Transfektionsprotokoll I)

Vor der Transfektion wurden die Zellen zunächst „gesplittet“, d. h. auf verschiedene Schalen aufgeteilt. Dazu wurden sie kurz mit 10 ml DPBS gewaschen und danach zum Ablösen vom Schalenboden 10 min mit Trypsin-EDTA bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend konnten sie auf mehrere kleine Schälchen mit jeweils 2 ml Medium überführt werden. In die Petrischalen wurde zuvor ein herausnehmbares Glasplättchen eingelegt, auf dem die Zellen bei einer dreistündigen Inkubation im Brutschrank anwachsen konnten. Die Transfektionslösung für eine Schale enthielt 100 µl MEM alpha Medium und 3 µl Fugene der Firma Roche. Diese wurde zunächst 5 min und nach Zugabe von 1 µg Plasmid DNA weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Erst dann wurden jeweils 100 µl der fertigen Transfektionslösung auf die Zellen gegeben und durch leichtes Kippen der Schälchen im Medium verteilt. Nach zwei Tagen im Brutschrank konnten die Zellen für die Immunfluoreszenzfärbungen weiterverwendet werden.

c) Transfektion von HEK-Zellen mit Lipofectamine (Transfektionsprotokoll II)

Für die Transfektion von HEK-Zellen wurden runde Glasplättchen mit einem speziellen „Coating Medium“ beschichtet, damit sich die Zellen im nachfolgenden Färbevorgang nicht so leicht vom Untergrund ablösten. Diese Plättchen wurden in kleine Petrischalen gelegt, in denen später die HEK-Zellen transfiziert werden sollten.

Die Zellen wurden zum „Splitten“ mit 10 ml DPBS gewaschen und mit Hilfe von Trypsin-EDTA vom Schalenboden gelöst. Anschließend erfolgte die Überführung in 4 ml HEK-Medium. Um die Zellen von Trypsin zu befreien, wurden sie bei 1000 upm 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 4 ml HEK-Medium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde nun auf die gecoateten Glasplättchen in den mit 2 ml HEK-Medium gefüllten Schalen gegeben und diese über Nacht im Brutschrank gelagert.

Die Transfektion erfolgte, sobald die Zellen eine Konfluenz von 70% aufwiesen. Dafür wurden 2 µg des jeweiligen Plasmids und die doppelte Menge an Lipofectamine (4 µg) in jeweils 500 µl Opti MEM Medium 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Zusammenpipettieren beider Lösungen erfolgte eine erneute Inkubation des Gemisches für 20 min bei Raumtemperatur. Nun wurden die Zellen aus dem Brutschrank genommen, das Medium abgesaugt und jeweils 1000 µl der Transfektionslösung auf die Schälchen verteilt. Nach weiteren 3 Stunden im Brutschrank wurde das Medium wieder gegen einfaches HEK-Zellmedium ersetzt. Die Zellen wurden jeweils am Folgetag gefärbt.

3.2.2.3 Immunfluoreszenzfärbungen transfizierter Zellen

Um die Mitochondrien sichtbar zu machen wurden die transfizierten Zellen vor der Färbung zuerst 30 min mit MitoTracker® Orange (1:10000 bzw. 1:5000) im jeweiligen Medium bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Das fluoreszierende Reagenz lagert sich in die Mitochondrienmembran vitaler Zellen ein und emittiert bei Anregung mit Licht von etwa 554 nm fluoreszierendes Licht mit einer Wellenlänge von ca. 576 nm.

Vor und nach der darauffolgenden 30minütigen Fixierung mit Paraformaldehyd (3% in PBS) wurden die Zellen jeweils 5 min mit 1 ml Ringerlösung gewaschen. Danach erfolgte die Epitopdemaskierung mit 1 ml SDS (0,1% in PBS) für 5 min. Nach erneutem Waschen mit 1 ml Ringerlösung konnte nun die Inkubation mit Anti-EPS als Primärantikörper erfolgen. Dazu wurde eine 1:1000 verdünnte Antikörperlösung (in PBS + 0,04% Triton) auf die Zellen gegeben und diese für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Vor und nach der Färbung mit Sekundärantikörper (Alexa488 goat anti rabbit/ Alexa647 donkey anti rabbit, 1:400 in PBS + 0,04% Triton) und HOE33342 (1:400), die ebenfalls 1 h bei Raumtemperatur durchgeführt wurde, wurden die Zellen zum Entfernen des nicht gebundenen Sekundärantikörpers jeweils mit 1 ml PBS gewaschen. Abschließend wurden die Deckgläschchen mit den Zellen mit Hilfe von fluoreszenzfreiem Glycergel Mounting Medium von Dako auf Objektträger aufgebracht.

Die Immunfluoreszenzfärbungen zur Antikörpertestung von Anti-EPS und Anti-RNG auf transfizierten Zellen erfolgten ohne Zugabe von MitoTracker® Orange.

3.2.3 Mikroskopie

3.2.3.1 Fluoreszenzmikroskopie

Das Grundprinzip der Fluoreszenzmikroskopie ist in Abb. 12 schematisch dargestellt. Die zuvor immunhistochemisch gefärbten Präparate enthalten Sekundär-Ak, die mit fluoreszierenden Stoffen (Fluorochromen) gekoppelt sind. Diese können mit Licht einer bestimmten Wellenlänge (Exzitationswellenlänge) zur Emission von Licht (Emissionswellenlänge) angeregt werden, das durch die Stokesverschiebung langwelliger ist als das anregende Licht. Im Strahlengang befindliche Farbteiler trennen anschließend das

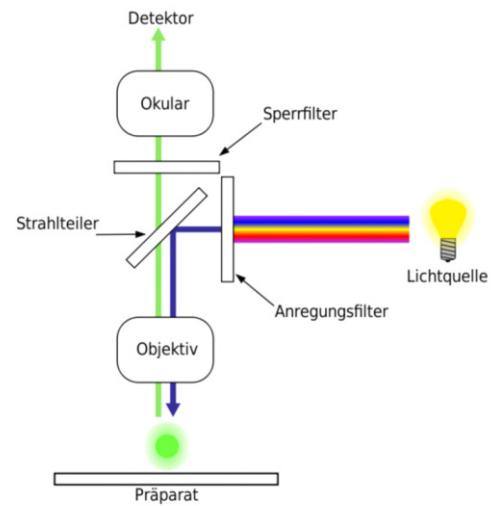


Abb. 12: Grundprinzip der Fluoreszenzmikroskopie: Fluoreszierende Antikörper auf dem Präparat emittieren nach Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge (blau) längerwelliges Fluoreszenzlicht (grün), das über einen Strahlenteiler an das Okular weitergeleitet wird. (zentrales Medienarchiv Wikimedia Commons)

emittierte Fluoreszenzlicht vom anregenden Licht und leiten es in das Okular des Mikroskops, auf eine Fotokamera oder auf einen elektronischen Verstärker (Photomultiplier).

a) Inverse Mikroskopie

Die Betrachtung der gefärbten Zellen und Nierenschnitte erfolgte mittels eines inversen Mikroskops (Axiovert 200M) von Zeiss. Folgende Bandpassfilter wurden dabei zur Detektion der fluoreszierenden Antikörper verwendet:

Farbstoff / Sekundär-Ak	Filter	
	Exzitationsmaxima	Emissionsmaxima
HOE 33342	365 nm	420 – 470 nm
Cy3 / MitoTracker® Orange	530 – 555 nm	575 – 630 nm
Alexa Fluor® 488 / GFP	465 – 495 nm	515 – 555 nm
Alexa Fluor® 647	575 – 625 nm	660 – 710 nm

Tab. 3: Bandpassfilter zur Detektion der verwendeten fluoreszierenden Antikörper

Die Aufnahme digitaler Bilder erfolgte mit Hilfe einer Schwarzweiß-CCD-Kamera (AxioCam MRm) und der Software AxioVision LE Rel. 4.5 von Zeiss.

Da die Nierenschnitte der adulten Versuchstiere aufgrund ihrer Größe nicht auf einmal vollständig abgebildet werden konnten, wurden sie zur Erzeugung von Übersichtsbildern quadrantenweise in 10facher Vergrößerung abfotografiert und die Teilbilder mittels AxioVision wieder zusammengefügt. Dabei war eine Überlappung der einzelnen Bilder von mindestens 5% notwendig.

b) Konfokale Mikroskopie

Transfizierte Zellen wurden mit einem konfokalen Mikroskop (LSM 510, Zeiss) untersucht. Als Objektiv diente ein Plan Apochromat 63x/1.4 Öl. Das Pinhole wurde auf 1 µM optische Schnittdicke eingestellt. Die Sekundär-Antikörper wurden mit monochromatischem Licht der Wellenlängen 488 nm (AlexaFluor® 488) und 543 nm (MitoTracker® Orange) angeregt. Das emittierte Fluoreszenzlicht wurde entsprechend mit Bandpass-Filtern von 505 nm bis 530 nm und 560 nm bis 615 nm detektiert. HOE33342 wurde dagegen nicht mit Laserlicht, sondern wie im Invertmikroskop über Epifluoreszenz sichtbar gemacht.

3.2.3.2 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen zur Darstellung der Mitochondriemorphologie in transfizierten Zellen wurden von Dr. Josef Schröder, Leiter des zentralen Labors für Elektronenmikroskopie am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg, durchgeführt.

3.2.4 Urinanalysen von L-PBE^{+/+}-, L-PBE^{+/-}- und L-PBE^{-/-}-Mäusen

Die Urinanalysen von L-PBE^{+/+}-, L-PBE^{+/-}- und L-PBE^{-/-}-Mäusen wurden von Dr. Katja Dettmer vom Institut für Funktionelle Genomik der Universität Regensburg unter Leitung von Prof. Dr. Oefner durchgeführt. In jeder Untersuchungsgruppe befanden sich pro Genotyp jeweils mindestens 6 männliche und 6 weibliche Tiere.

3.2.4.1 Aminosäureausscheidung von L-PBE^{+/+}-, L-PBE^{+/-}- und L-PBE^{-/-}-Mäusen

Für die quantitative Analyse verschiedener Aminosäuren im Urin von L-PBE^{+/+}-, L-PBE^{+/-}- und L-PBE^{-/-}-Mäusen wurde ein vom Institut für Funktionelle Genomik mitentwickeltes Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Verfahren (GC-MS) angewandt (Kaspar *et al.*, 2008). Dabei dient der Gas-Chromatograph zur Auftrennung des zu untersuchenden Stoffgemisches und das Massenspektrometer zur Identifizierung und gegebenenfalls auch Quantifizierung der einzelnen Komponenten. Für die Aminosäureanalysen wurden jeweils 10 µl Spontanurin je Versuchstier verwendet. Gemessen wurden die Aminosäuren Alanin, Asparagin, Aspartat, Cystin, Glutamin, Glutamat, Glycin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Tryptophan, Tyrosin und Valin. Um Schwankungen in der Konzentration des Urins auszugleichen, wurden die Aminosäurekonzentrationen im Urin ($[AS_{Urin}]$) auf die jeweiligen Kreatininkonzentrationen im Urin ($[Krea_{Urin}]$) normalisiert ($[AS_{Urin}]/[Krea_{Urin}]$). Da die Konzentration von Kreatinin im Plasma praktisch konstant ist und die Substanz weder tubulär resorbiert noch relevant sezerniert wird, kann $[Krea_{Urin}]$ als Maß für die Konzentrierung des Urins herangezogen werden.

3.2.4.2 Metaboliten des Energiestoffwechsels – „metabolic fingerprinting“

Für die Messung der Ausscheidung von Metaboliten des Energiestoffwechsels wurden jeweils 20 µl Spontanurin von L-PBE^{+/+}-, L-PBE^{+/-}- und L-PBE^{-/-}-Mäusen mittels GC-APCI-TOF-MS (gas chromatography/atmospheric pressure chemical ionisation time-of-flight mass spectrometry) untersucht. Gemessen wurden die Konzentrationen von Glucose, Laktat, Pyruvat, Succinat, Glycerat, Fumarat, Malat, Citrat sowie 3-Hydroxybuttersäure. Dafür wurden die Urinproben zur Entfernung von Harnstoff zuerst mit Urease (2 U für 30 min bei 37°C) versetzt und anschließend zur Fällung der Proteine mit Ethanol/EDTA behandelt. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet zweimal gewaschen. Danach wurde

der Ethanolextrakt getrocknet und nach Derivatisierung mittels Methoximierung und Silylierung mit GC-MS bezüglich Masse, Retentionszeit und Peak-Intensität analysiert. Die gewonnenen Daten wurden jeweils auf die Kreatininkonzentration der Urinproben bezogen.

3.2.5 Röntgenbilder von L-PBE^{+/+}- und L-PBE^{-/-}-Mäusen

Die Röntgenbilder von L-PBE^{+/+}- und L-PBE^{-/-}-Mäusen zur radiologischen Beurteilung des Skelettsystems wurden von PD Dr. Niels Zorger, Chefarzt der Abteilung für Radiologie am Krankenhaus Barmherzige Brüder in Regensburg, angefertigt.

4. Ergebnisse

4.1 Phänotyp der L-PBE^{+/+}- und L-PBE^{-/-}- Mäuse

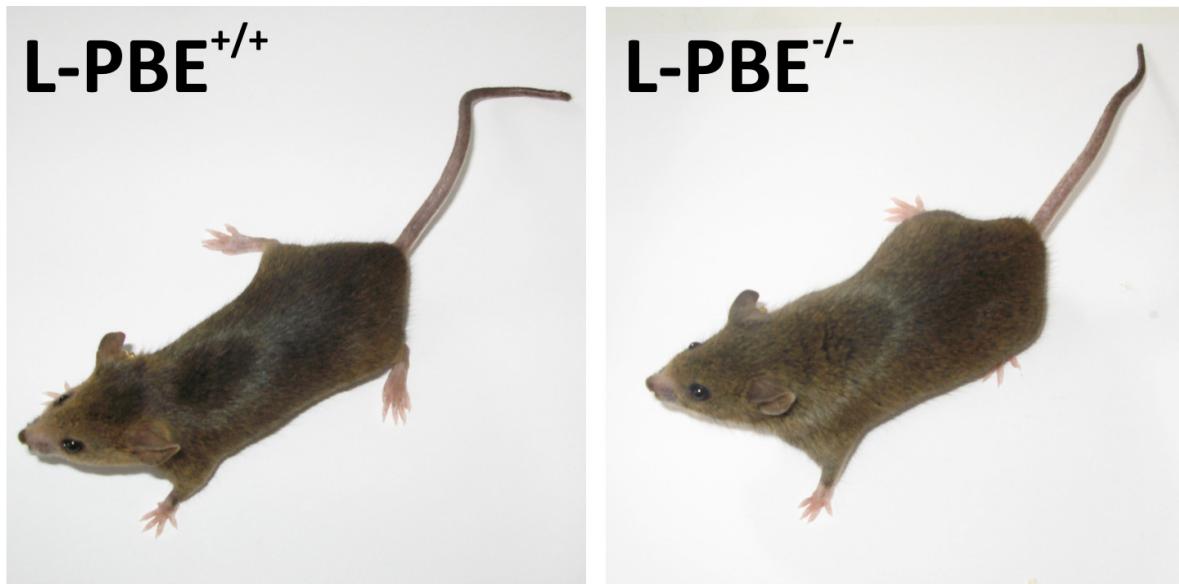


Abb. 13: Phänotyp einer L-PBE^{+/+}- (45 Wochen) und einer L-PBE^{-/-}-Maus (51 Wochen):

Es sind keine Hinweise auf Wachstumsstörungen, Skelettdysplasien oder andere charakteristische Symptome eines Fanconi-Syndroms zu erkennen.

Phänotypisch zeigten sich keinerlei Unterschiede zwischen L-PBE^{+/+}- und L-PBE^{-/-}-Mäusen (Abb. 13), insbesondere keine Wachstumsstörungen oder Skelettdysplasien bei den L-PBE^{-/-}-Tieren wie sie für ein Fanconi-Syndrom charakteristisch wären. Die Lebensdauer war im Vergleich zu den L-PBE^{+/+}-Mäusen nicht eingeschränkt. Pathologische Skelettveränderungen konnten auch radiologisch ausgeschlossen werden (Abb. 14). Somit scheint das Fehlen von EHHADH im Peroxisom bzw. dessen verminderte Expression allein nicht zu phänotypischen Veränderungen i. S. eines Fanconi-Syndroms zu führen.

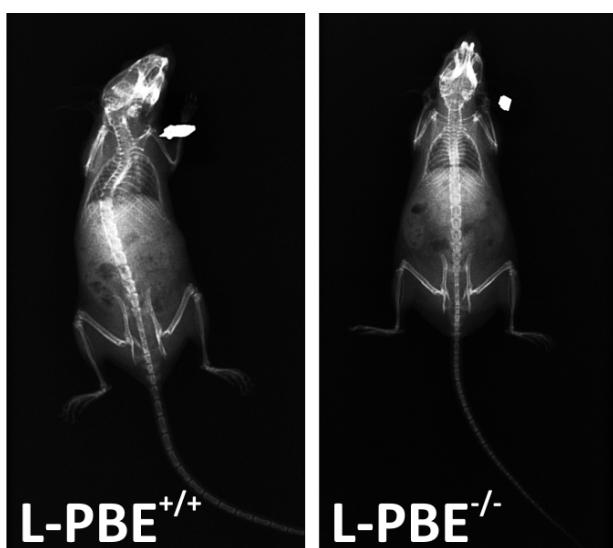


Abb. 14: Röntgenaufnahmen einer L-PBE^{+/+}- (45 Wochen) und einer L-PBE^{-/-}-Maus (51 Wochen): Es zeigen sich keine pathologischen Skelettveränderungen der L-PBE^{-/-}-Maus (z.B. Rachitis) wie sie bei Patienten mit Fanconi-Syndrom beobachtet werden. (Anfertigung der Röntgenaufnahmen durch PD Dr. Niels Zorger, Chefarzt der Abteilung für Radiologie am Krankenhaus Barmherige Brüder in Regensburg)

4.2 Testung verschiedener Antikörper gegen EHHADH auf transient transfizierten Zellen

Um den idealen Primär-Antikörper gegen EHHADH für die folgenden Immunfluoreszenzfärbungen zu ermitteln wurden zwei Antikörper mit unterschiedlichen Bindungsstellen an der Aminosäuresequenz von EHHADH getestet (siehe Tab. 4). Beide Antikörper waren affinitätsgereinigte polyklonale Kaninchchen-IgG-Antikörper, die von Davids Biotechnologie GmbH in Regensburg durch Immunisierung der Tiere mit Teilesequenzen des humanen EHHADH hergestellt wurden. Sie werden im Folgenden jeweils mit den ersten drei Aminosäuren des Antigens abgekürzt, gegen das sie gerichtet sind (Anti-EPS bzw. Anti-RNG) und mit dem die Immunisierung durchgeführt wurde. Die volle Aminosäuresequenz der Epitope kann in Tab. 4 abgelesen werden.

Zur Testung der Antikörper wurden CHO-Zellen mit einem Plasmid transfiziert, das neben der Gensequenz des humanen EHHADH auch eine Sequenz enthielt, die für ein grün fluoreszierendes Protein (green fluorescence protein = GFP) kodiert. Das dadurch entstehende Fusionsprotein kann durch Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 465 – 495 nm im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

Nach Fixierung mit 3%igem PFA und Epitopdemaskierung mit SDS (0,1% in PBS) wurden die Zellen immunhistochemisch jeweils mit einem der zwei verschiedenen Primär-Ak (1:500) gefärbt.

Antikörper	Aminosäuresequenz des Epitops
Anti-EPS	EPSDYLRRLVAQGSPLK
Anti-RNG	RNGLQKASLDHTVRAI

Tab. 4: Aminosäuresequenz der verwendeten Antikörperepitope

Als Sekundär-Ak wurde Alexa647 donkey anti rabbit verwendet. Außerdem erfolgte eine Anfärbung der Zellkerne mit HOE33342 (1:400).

Unter dem Mikroskop wurden schließlich die Fluoreszenzsignale der Antikörper (rot) mit denen von GFP (grün) verglichen, um herauszufinden ob bzw. wie spezifisch die EHHADH-GFP-Fusionsproteine tatsächlich vom jeweiligen Antikörper erkannt wurden (Abb.15).

Dabei zeigte sich für den EPS-Ak eine deutliche Kolokalisation (gelb) mit dem EHHADH-GFP-Signal (Abb.15 linkes Bild), während bei den mit Anti-RNG gefärbten Zellen nur ein sehr schwaches und unspezifisches Leuchten zu erkennen war, das sich nicht mit dem von GFP (\triangleq EHHADH, grün) deckte (Abb.15, rechtes Bild). Somit wurde für alle weiteren

Immunfluoreszenzfärbungen der Primär-Ak gegen das EPS-Epitop verwendet, der in der Testreihe spezifisch an das gesuchte Protein gebunden hatte.

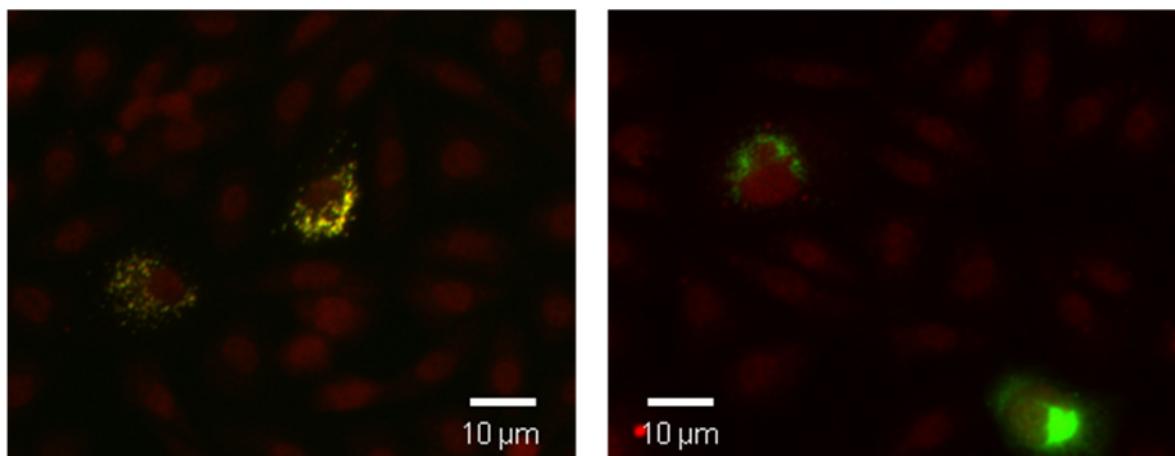


Abb. 15: Antikörpertestung auf mit hEHHADH_{WT} transient transfizierten CHO-Zellen:

Links: Spezifische Bindung des Anti-EPS-Antikörpers (rot) an EHHADH-GFP (grün) \triangleq gelbe Fluoreszenzsignale; rechts: Keine Kolokalisation von EHHADH-GFP (grün) und Anti-RNG (rot)

4.3 Lokalisation von EHHADH in der Niere

4.3.1 Mausniere

Für die Lokalisation von EHHADH in der Mausniere wurden 5 µm dicke Kryoschnitte der Nieren sowohl von L-PBE^{+/+}- als auch von L-PBE^{-/-}-Versuchstieren zuerst mit Anti-EPS (1:2000) als Primär- und anschließend mit Cy3 goat anti rabbit (1:400) als Sekundär-Ak immunhistochemisch gefärbt und unter dem inversen Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Insgesamt wurden fünf L-PBE^{+/+}- und vier L-PBE^{-/-}-Tiere beider Geschlechter untersucht. Bei allen L-PBE^{+/+}-Mäusen konnte ein granuläres intrazelluläres Fluoreszenzsignal im Bereich der spätproximalen Tubuli beobachtet werden (Abb.16). Die Färbung konzentrierte sich dabei vor allem auf den marknahen Rindenbereich und erstreckte sich auch in Ansätzen in die Columnae renales. In der Markregion zeigte sich das Fluoreszenzsignal nur im Außenstreifen der Außenzone. Das sonstige Mark, in dem sich keine Abschnitte des proximalen Tubulus mehr befinden, war nicht angefärbt. Die Lokalisation der EHHADH-Färbung, wie sie in Abb.16 zu sehen ist, entspricht also offensichtlich dem S3-Segment des spätproximalen Tubulus, der die gesamte Pars recta beinhaltet. Betrachtet man bei höherer Vergrößerung die Verteilung des Fluoreszenzsignals innerhalb der Zellen (Abb.16, vergrößerte Ausschnitte), so zeigt sich konsistent dasselbe granuläre Färbemuster, was zu einer Expression von EHHADH in den Peroxisomen der Zellen passt. Dieses charakteristische granuläre „Staining“ war bei den L-PBE^{+/+}-Mäusen auf allen an gefertigten Nierenschnitten zu finden. Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Färbung konnten nicht beobachtet werden.

Als Kontrollen wurden in derselben Weise Kryoschnitte von L-PBE^{-/-}-Nieren angefertigt und mit Anti-EPS (1:2000) im selben Färweg gefärbt (Abb.17). Diese waren eindeutig negativ für EHHADH und zeigten keinerlei spezifische Fluoreszenzsignale, was wiederum auch die Spezifität des Anti-EPS-Antikörpers für EHHADH bestätigte.

4.3.2 Humane Niere

Das Expressionsmuster von EHHADH in der humanen Niere (Abb. 18) war dem der Mausniere in weiten Teilen ähnlich. Genau wie in der Mausniere waren lediglich proximale Tubuli angefärbt. Die Färbung konzentrierte sich dabei vor allem auf die marknahen Rindenbereiche und den Außenstreifen der äußeren Medulla, war aber in etwas schwächerer Form auch in den kapselnahen Rindenbereichen ausgeprägt.

Die Innenzone des Marks sowie auch der Innenstreifen des äußeren Marks - Nierenbereiche, in denen sich keine proximalen Tubuli mehr befinden - waren negativ für EHHADH.

Bei höherer Vergrößerung war genau wie in der murinen Niere das charakteristische granuläre Staining des Fluoreszenzsignals innerhalb der Tubuluszellen sichtbar, welches durch die Expression von EHHADH in den Peroxisomen erklärt werden kann.

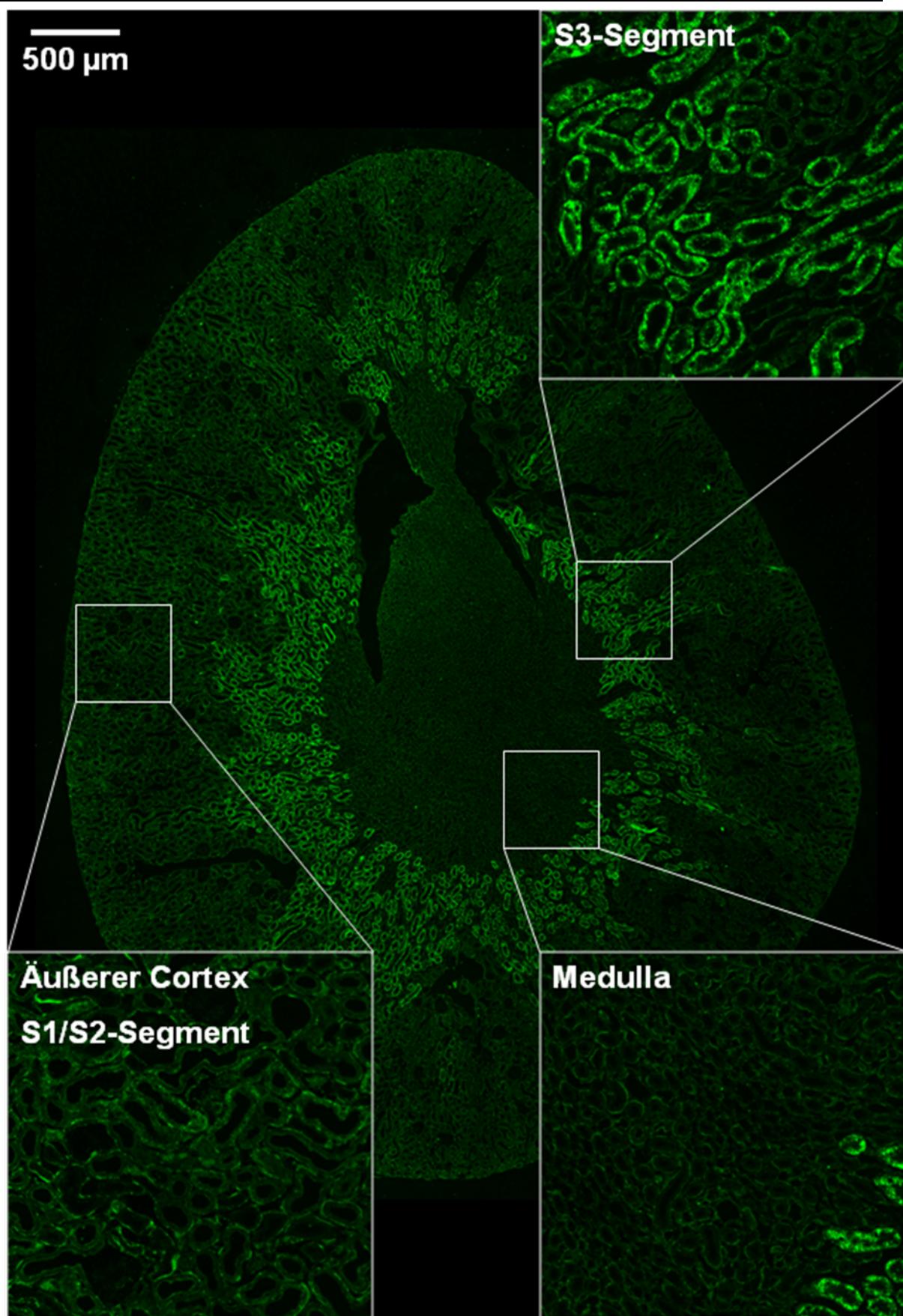


Abb. 16: Expression von EHHADH (grün) in der Niere einer L-PBE^{+/+}-Maus: Es zeigt sich ein granuläres intrazelluläres Fluoreszenzsignal im Bereich des spätproximalen Tubulus (S3-Segment).

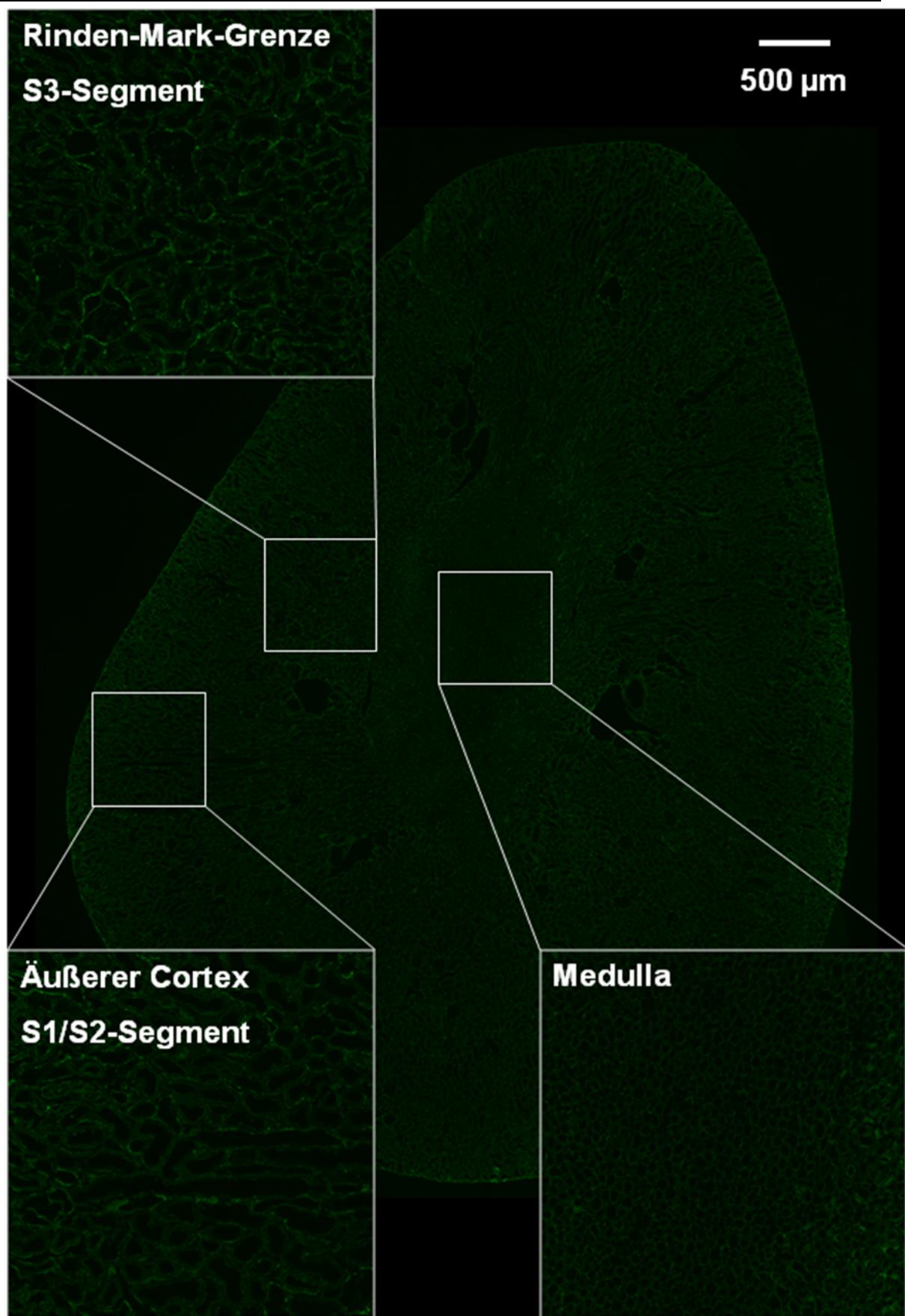


Abb. 17: Keine Expression von EHHADH (grün) in der Niere einer L-PBE^{-/-}-Maus

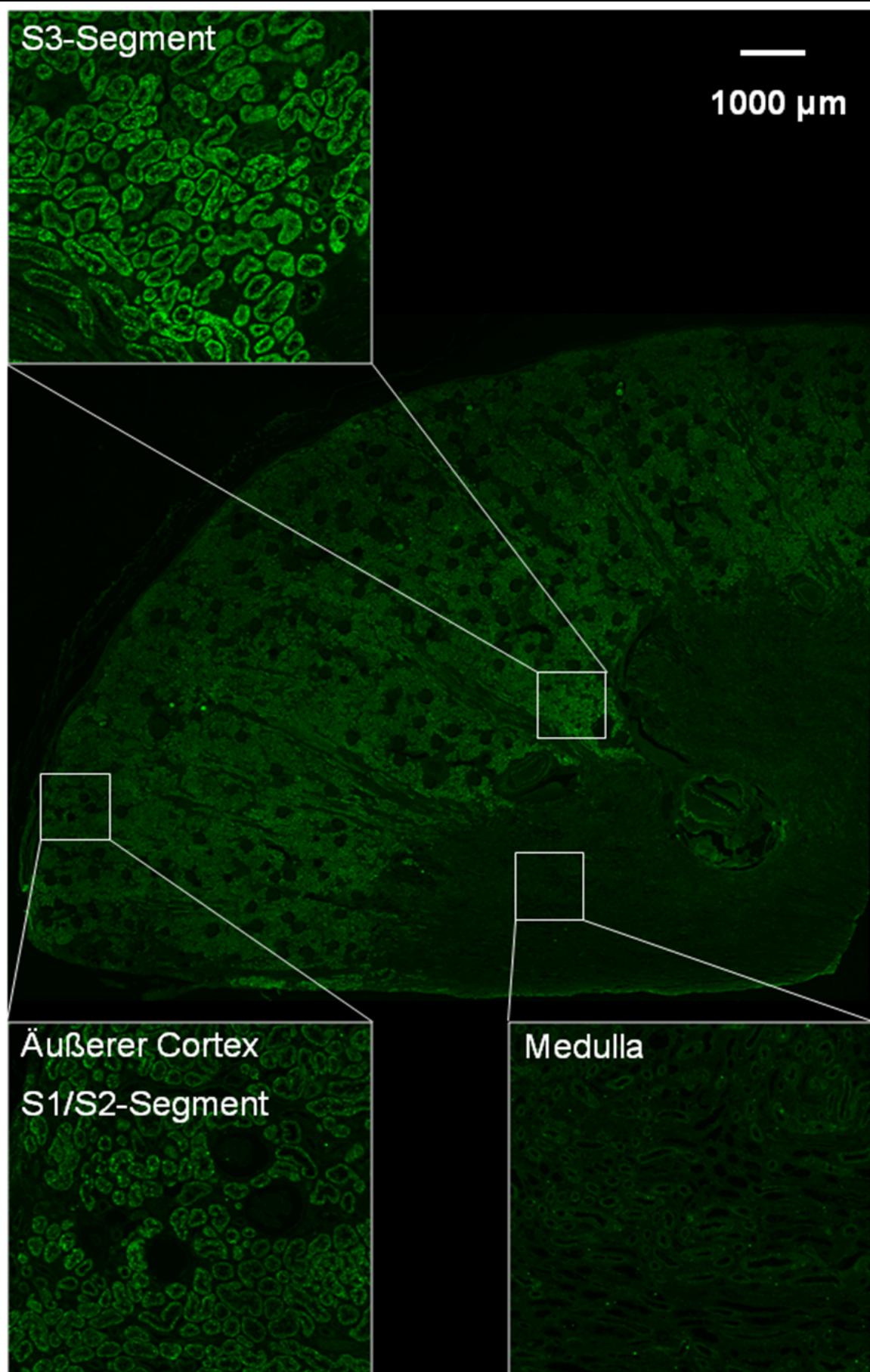


Abb. 18: Expression von EHHADH (grün) in der humanen Niere: Es zeigt sich analog zur Mausniere ein granuläres intrazelluläres Fluoreszenzsignal im Bereich des spätproximalen Tubulus (S3-Segment).

4.4 Lokalisation von EHHADH_{wt} und EHHADH_{mut} in transient transfizierten Zellen

Mit Hilfe des online verfügbaren Programms „Protein prowler“ kann theoretisch vorhergesagt werden, in welches intrazelluläre Kompartiment ein Protein nach dessen Translation dirigiert wird. Nach Eingabe der entsprechenden Gensequenz von EHHADH_{wt} und EHHADH_{mut} konnte so die mutmaßliche Lokalisation des Proteins in der Zelle vorhergesagt werden.

Abb.19 zeigt die Ergebnisse des „Protein prowlers“ für die Wildtypform von EHHADH (EHHADH_{wt}) und die Mutante (EHHADH_{mut}). Dabei steht „SP“ für Proteine, die sezerniert werden („secretory pathway“), „MTP“ für das Vorhandensein eines „mitochondrial targeting peptide“, also ein Peptid, das die jeweiligen Proteine ins Mitochondrium dirigiert und analog dazu „PTS1“ für eine Aminosäuresequenz, die für die Einschleusung ins Peroxisom notwendig ist („peroxisomal targeting sequence 1“). Mit „other“ wird die Verteilung in andere Zellkompartimente wie z.B. in das Zytosol bezeichnet.

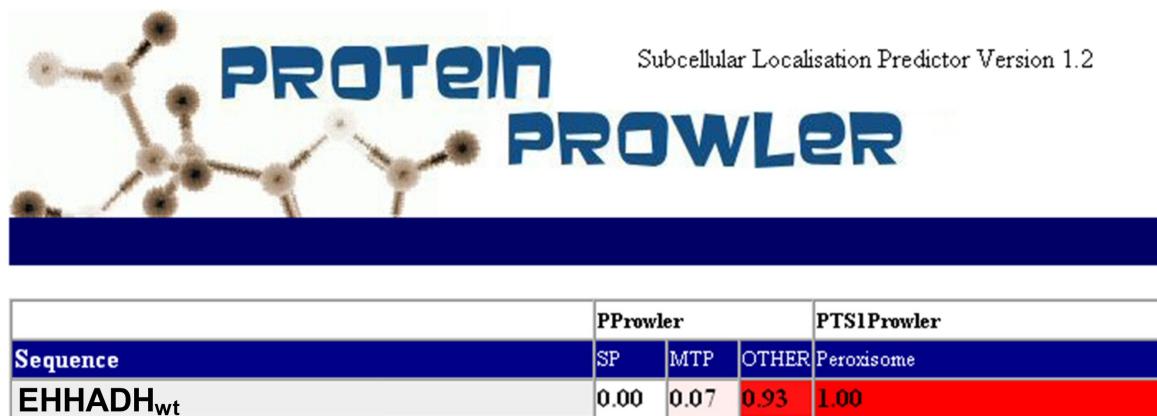


Abb. 19: Voraussage der subzellulären Lokalisation von EHHADH_{wt} und EHHADH_{mut} durch das Programm „protein prowler“: EHHADH_{mut} enthält im Gegensatz zum Wildtypprotein ein mitochondrielles „targeting peptide“.

Laut dieser Vorhersage zeigt sich ein deutlicher Unterschied der beiden Proteine in der subzellulären Verteilung. Während sich EHHADH_{wt} fast ausschließlich auf die Peroxisomen verteilt, wird EHHADH_{mut} zu einem großen Teil in die Mitochondrien transportiert. Über eine daraus resultierende Störung der Energieversorgung der Zelle könnte dies möglicherweise zu einem Funktionsdefizit des proximalen Tubulus und damit zum Phänotyp eines Fanconi-Syndroms führen. Anhand eines Zellmodells wurde diese theoretische Hypothese des Maltargetings mit Hilfe transient transfizierter Zellen näher untersucht.

4.4.1 Immunfluoreszenzfärbungen auf mit hEHHADH_{wt} und hEHHADH_{mut} transient transfizierten COS7-Zellen

Für dieses Experiment wurden COS7-Zellen mit hEHHADH_{wt} und hEHHADH_{mut} im pIRES-CD8-Vektor transient transfiziert. Als Transfektionsreagenz wurde FuGENE® von Roche verwendet.

Nach zwei Tagen im Brutschrank bei 37°C konnten die Zellen immunhistochemisch gefärbt werden. Die Schwierigkeit lag darin, Bedingungen zu finden, bei welchen sowohl der EPS-Ak zur Detektion von EHHADH spezifisch binden konnte als auch der MitoTracker® zur Färbung der Mitochondrien ausreichend funktionierte. Die Behandlung mit SDS nach nur kurzer Fixierung der Zellen (5 min mit PFA 3%) führte zum Verlust der Granula und zur Ablösung der Zellen vom Deckglas. Ohne SDS war jedoch eine spezifische Bindung des EPS-Ak nicht möglich. Somit musste das Färbeprotokoll modifiziert werden und vor der Behandlung mit SDS (0,1% für 5 min) eine längere Fixierung der Zellen mit PFA 3% für 30 min durchgeführt werden, um eine stärkere Vernetzung der Proteine und dadurch eine Fixierung der Granula in der Zelle zu erreichen.

Bei der anschließenden Betrachtung im Fluoreszenz- und im konfokalen Mikroskop konnten eindeutige Unterschiede in der intrazellulären Lokalisation von EHHADH_{wt} und EHHADH_{mut} beobachtet werden (Abb. 20, 21). Beide Proteine zeigten ein granuläres Färbemuster entsprechend ihrer Lokalisation in den Peroxisomen der Zellen, wie es auch in den proximalen Tubuluszellen der gefärbten Nierenschnitte der Fall war.

Betrachtet man Abb. 20 erkennt man, dass EHHADH_{wt} (grün) und die Mitochondrien (rot) nicht kolokal liegen. Ihre Fluoreszenzsignale überlagern sich nicht, d.h. das Wildtypprotein befindet sich nicht in den Mitochondrien, sondern nur in den Peroxisomen der Zelle.

Anders bei der mutierten Form des Enzyms (Abb. 21). Hier kommt es im „Overlaybild“ zu einer deutlichen Kolokalität der Fluoreszenzsignale von EHHADH_{mut} (grün) und MitoTracker® (rot) (Δ gelb). Offensichtlich führt die Mutation also tatsächlich zu einem Maltargeting von EHHADH_{mut} in die Mitochondrien.

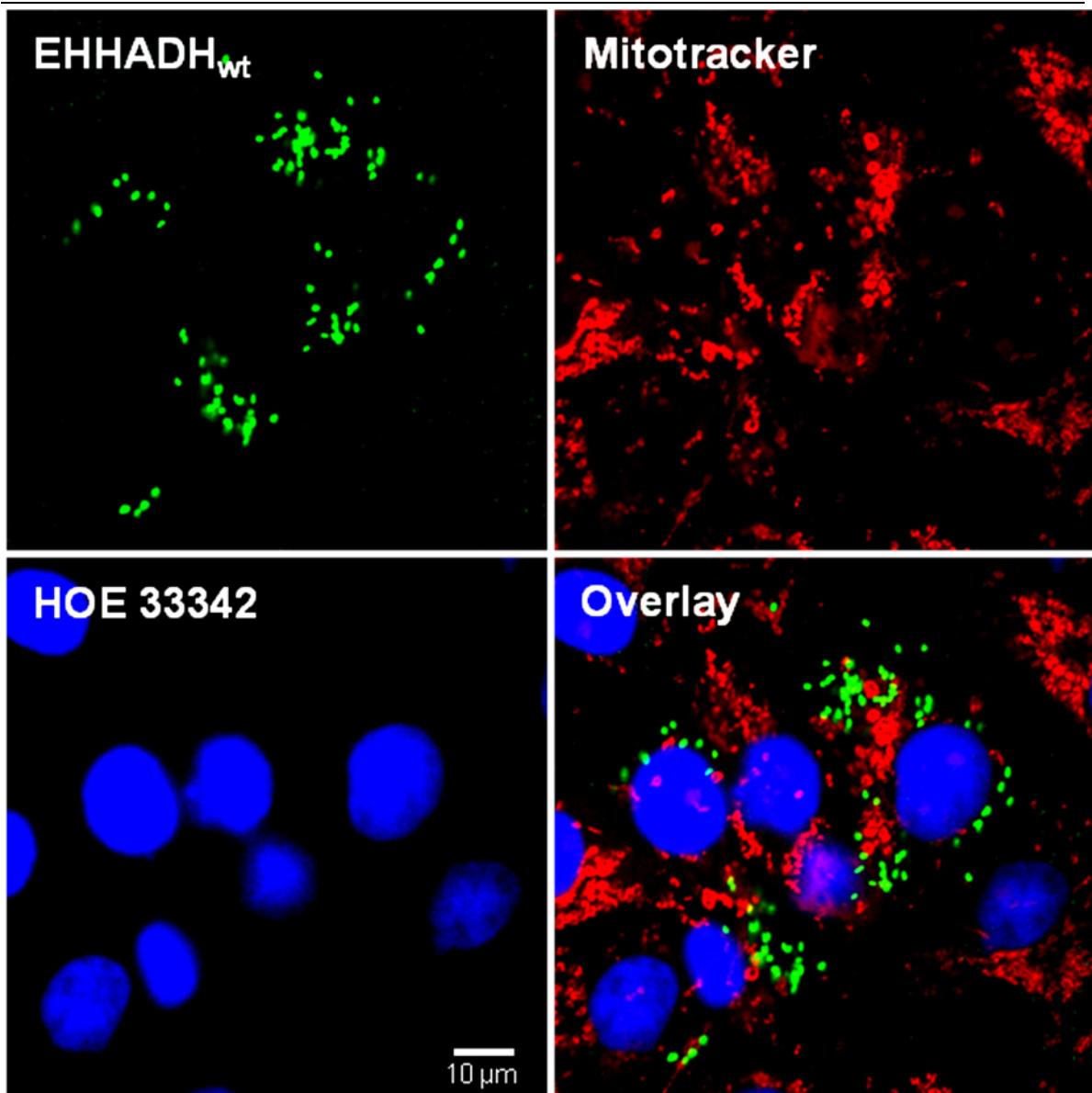


Abb. 20: Subzelluläre Lokalisation von hEHHADH_{WT} in transient transfizierten COS7-Zellen:
hEHHADH_{WT} (grün) liegt außerhalb der mit MitoTracker® sichtbar gemachten Mitochondrien (rot). Die Zellkerne sind mit HOE33342 (blau) angefärbt.

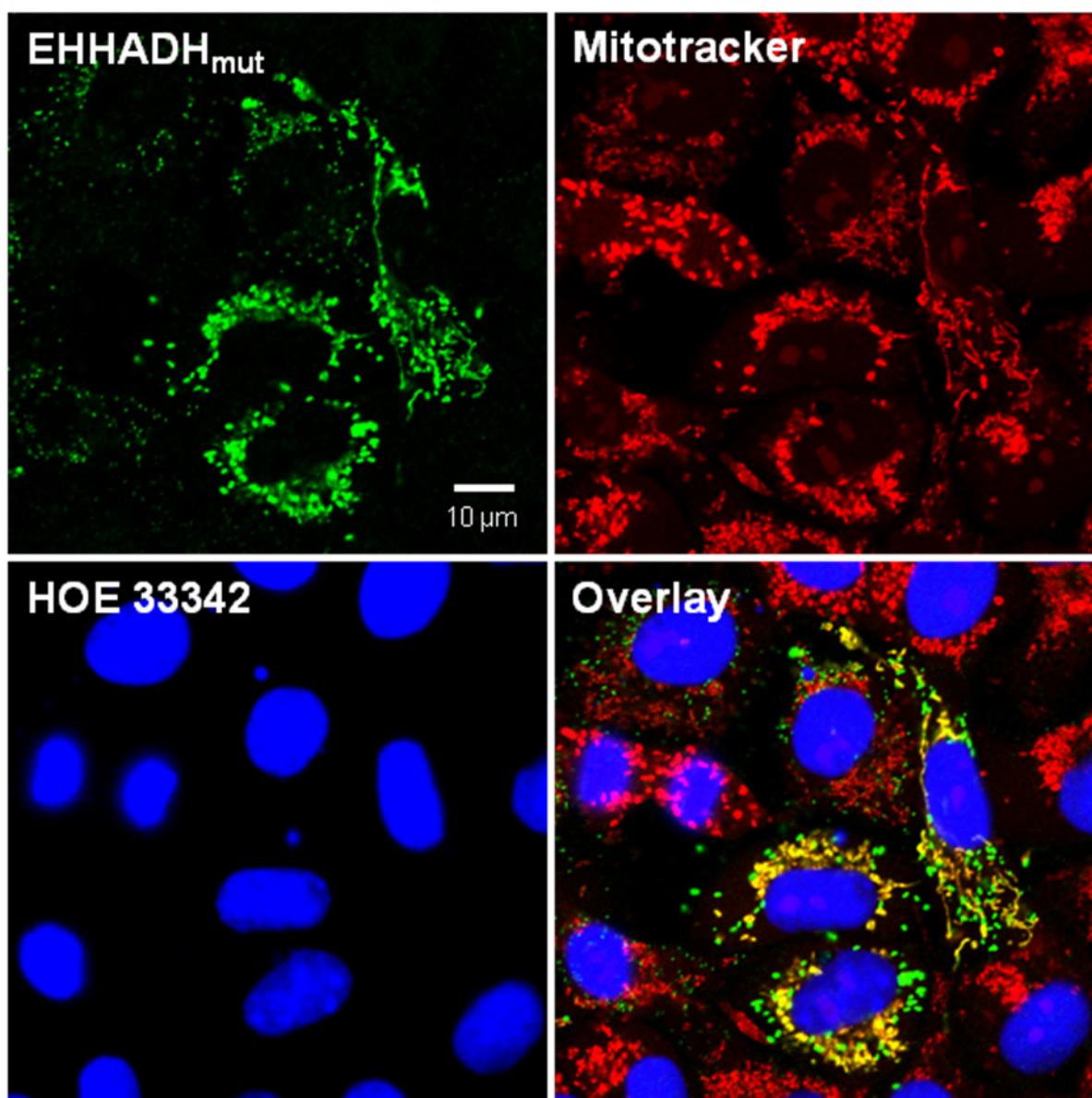


Abb. 21: Subzelluläre Lokalisation von hEHHADH_{mut} in transient transfizierten COS7-Zellen:
Es zeigt sich eine deutliche Kolokalisation (gelb) von hEHHADH_{mut} (grün) und MitoTracker® (rot). Die Zellkerne sind mit HOE33342 (blau) angefärbt.

4.4.2 Immunfluoreszenzfärbungen auf transient transfizierten HEK-Zellen zum Vergleich von humanem und mausspezifischem EHHADH

Zum Vergleich von humanem und mausspezifischem EHHADH im Zellmodell wurden HEK-Zellen mit Plasmiden transfiziert, welche für mEHHADH_{wt} und mEHHADH_{mut} kodierten. Als Transfektionsreagenz diente Lipofectamine von Invitrogen. Die Immunfluoreszenzfärbung mit Anti-EPS (1:1000) und MitoTracker® Orange (1:10000 bzw. 1:5000) erfolgte am nächsten Tag.

Bei der Betrachtung unter dem konfokalen Mikroskop (Abb. 22/23) bot sich ein vergleichbares Bild wie bei den vorherigen Färbungen mit humanem EHHADH. Das mutierte En-

zym ($\text{mEHHADH}_{\text{mut}}$) befand sich wieder teilweise in den Mitochondrien (Abb. 23), wohingegen für das Wildtypprotein keine Kolokalität mit den Mitochondrien nachgewiesen werden konnte (Abb. 22). Insgesamt kann somit die intrazelluläre Lokalisation von menschlichem und mausspezifischem EHHADH – sowohl in mutierter als auch in Wildtypform – als annähernd identisch beurteilt werden.

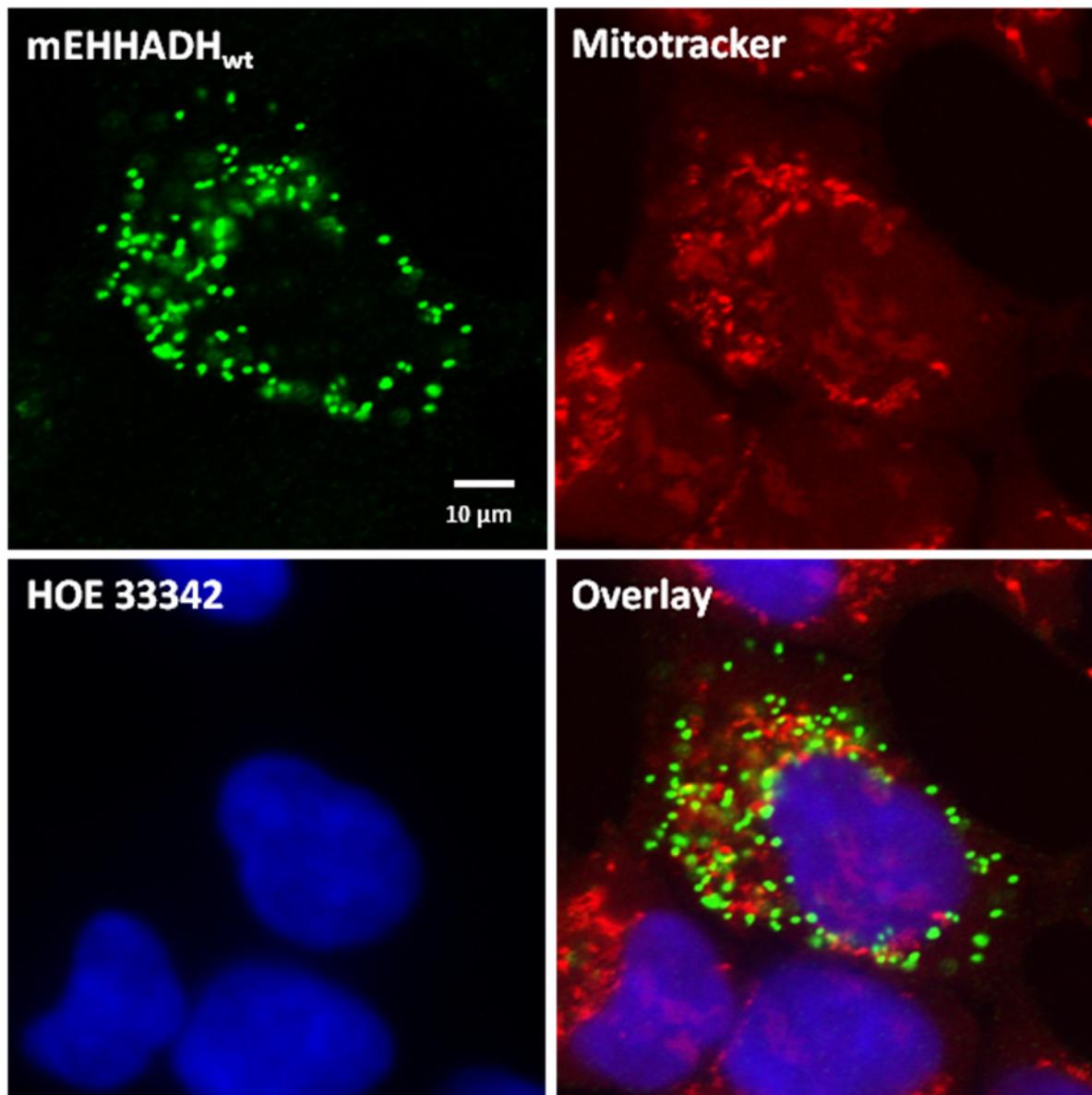


Abb. 22: Subzelluläre Lokalisation von $\text{mEHHADH}_{\text{wt}}$ (grün) in transient transfizierten HEK-Zellen: Es zeigt sich keine Kolokalisation mit MitoTracker® Orange (rot). Anfärbung der Zellkerne mit HOE33342 (blau).

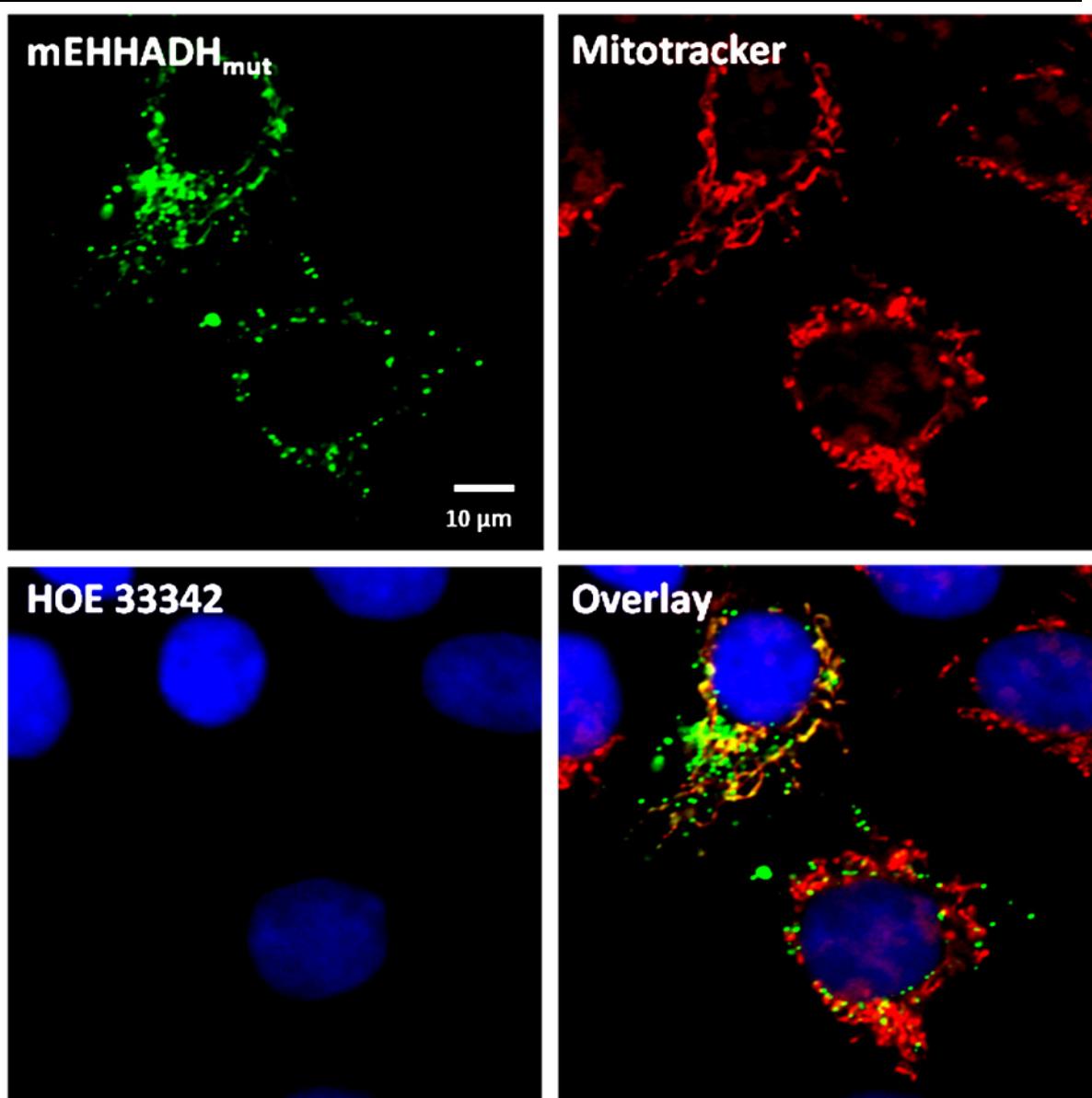


Abb. 23: Subzelluläre Lokalisation von mEHHADH_{mut} (grün) in transient transfizierten HEK-Zellen:
mEHHADH_{mut} (grün) und MitoTracker® Orange (rot) liegen kolokal (gelb). Aufgrund der eher niedrigen Transfektionseffizienz sind nicht alle Zellen davon betroffen. Anfärbung der Zellkerne mit HOE33342 (blau).

4.5 Elektronenmikroskopische Untersuchung von transient transfizierten HEK-Zellen

In Nierenbiopsien von Patienten mit Fanconi-Syndrom mitochondrialer Genese zeigten sich lichtmikroskopisch meist nur unspezifische Abnormalitäten des Tubulusepithels wie Entdifferenzierung und Atrophie. Jedoch konnte man bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen des Gewebes als Zeichen der mitochondrialen Zytopathie regelmäßig viele abnormale, oft übergroße Riesenmitochondrien beobachten (Niaudet, 1998). Aus diesem Grund wurden auch die mit hEHHADH_{mut} transient transfizierten HEK-Zellen bzgl. ihrer Mitochondriemorphologie untersucht. Die elektronenmikroskopischen Analysen der Zellen wurden von Dr. Josef Schröder, Leiter des zentralen Labors für Elektronenmikroskopie am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg, durchgeführt.

Dafür wurde je eine HEK-Zellgruppe mit humanem EHHADH_{wt} bzw. EHHADH_{mut} transfiziert und eine weitere Zellgruppe als Kontrolle unbehandelt gelassen. Um zu überprüfen, ob das Transfektionsreagenz evtl. selbst Mitochondrienschäden verursacht, wurde eine vierte Zellgruppe nur mit Lipofectamin (ohne Plasmid) „scheintransfiziert“.

Die Zellen aller vier Gruppen wurden im selben Arbeitsgang mit Karnovsky-Fixativ (bereitgestellt vom Institut für Pathologie, Universität Regensburg) fixiert und anschließend von Dr. Schröder am Elektronenmikroskop vor allem bezüglich ihrer Mitochondriemorphologie beurteilt. Dabei war dem Untersucher nicht bekannt, welche der mit den Buchstaben von A bis D bezeichneten Zellgruppen wie transfiziert worden war.

Bei der Analyse des Bildmaterials fanden sich laut Dr. Schröder in der Kontrollgruppe (Abb.24, A) physiologische Mitochondrienverhältnisse mit einer normalen Variationsbreite in Größe und Form (Abb.24, A1). Bei höherer Vergrößerung (Abb.24, A2) waren die Mitochondrien durch ihre gut abgrenzbare Doppelmembran (⇒) zu erkennen. Die Binnenstruktur der Zellorganellen war wie für gesunde Mitochondrien typisch hellgrau und fein granuliert. Einzelne Ca²⁺- und Mg²⁺-Ablagerungen (→) erschienen als dunkle, intramitochondriale Granula ohne pathologischen Wert. Die Cristae (*) waren nicht dilatiert und erschienen nur an einzelnen Stellen bedingt durch die Schnittführung etwas verbreitert. Die Aktivität und Anzahl der Mitochondrien pro Zelle variiert physiologisch je nach Zustand und Wachstumsphase. Aufgrund des physiologischen „Turnovers“ der Zelle befanden sich auch einzelne Mitochondrien im Stadium der Degeneration, in dem es zur Ödematisierung und Auflösung der Matrix kommt und die Binnenstruktur verwaschen erscheint. Autophagische Vakuolen, die aufgrund ihrer Form auch als „myelinartige Einschlüsse“ bezeichnet werden, fanden sich vereinzelt als Zeichen des physiologischen lysosomalen Abbaus (Daten nicht gezeigt). Insgesamt präsentierte sich in der Kontroll-

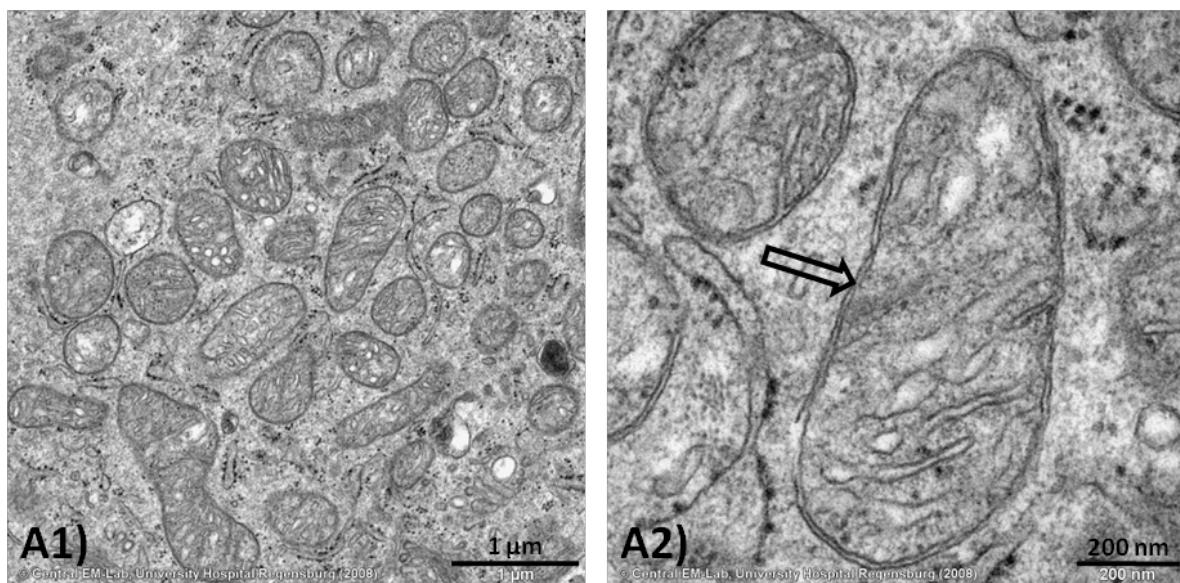
gruppe, wie zu erwarten war, ein physiologischer Normalbefund der Mitochondrien ohne Hinweise auf eine vorliegende pathologische Schädigung.

Bei den nur mit Transfektionsreagenz behandelten Zellen (Abb.24, B) fanden sich vereinzelt mitochondriale Veränderungen wie vergrößerte oder pleomorphe Zellorganellen (Daten nicht gezeigt), so dass von einer diskreten Zellschädigung durch Lipofectamin selbst ausgegangen werden muss. Jedoch waren auch hier die Cristae schmal (*) und die Matrix homogen, hellgrau und fein granuliert, wie für intakte Mitochondrien charakteristisch.

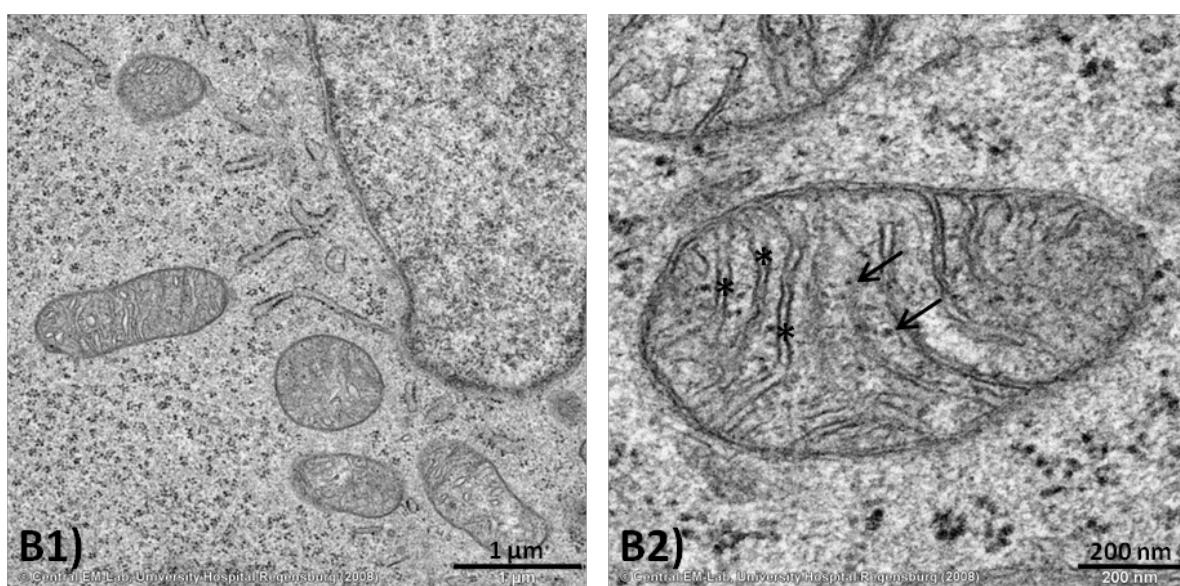
Auch in der Zellgruppe, die mit hEHHADH_{wt} transfiziert worden war (Abb.24, C), konnten Abweichungen in Größe und Form sowie ein etwas erhöhter lysosomaler Abbau beobachtet werden. Die Anzahl der myelinartigen Einschlüsse war im Vergleich zur Kontrollgruppe größer und die Pleomorphie schien zugenommen zu haben. Die mitochondriale Binnenstruktur (M) wirkte teilweise verwaschen und dunkler als in der Kontrollzellgruppe, jedoch homogen. Die Cristae stellten sich überwiegend schmal dar.

Im Vergleich dazu fanden sich in der mit hEHHADH_{mut} transfizierten Zellgruppe (Abb.24, D) zahlreiche Mitochondrien, deren Cristae im Inneren ödematos aufgeweitet waren (Abb.24, D4 →) und deren Matrix dunkelgrau und grob granuliert erschien (Abb. 24, D2). Die Anzahl der vergrößerten und degenerierten Mitochondrien schien erhöht und der lysosomale Abbau war im Vergleich zu den anderen Zellgruppen vermehrt (Abb. 24, D1/2: ⇒). Außerdem waren in einzelnen Zellen fast alle Mitochondrien klein, dunkel und kondensiert (Abb. 24, D1), was laut Dr. Schröder eine deutliche Funktionseinschränkung und Degeneration vermuten lässt. Viele Mitochondrien waren des Weiteren in ihrer Form verändert und im Vergleich zu normalen Mitochondrien (Abb. 24, D3 *) stark vergrößert. Solche abnormen „Megamitochondrien“ (Abb. 24, D3 →) treten regelmäßig als Zeichen mitochondrialen Zytopathien auf (Au *et al.*, 2007; Niaudet *et al.*, 1997; Niaudet, 1998).

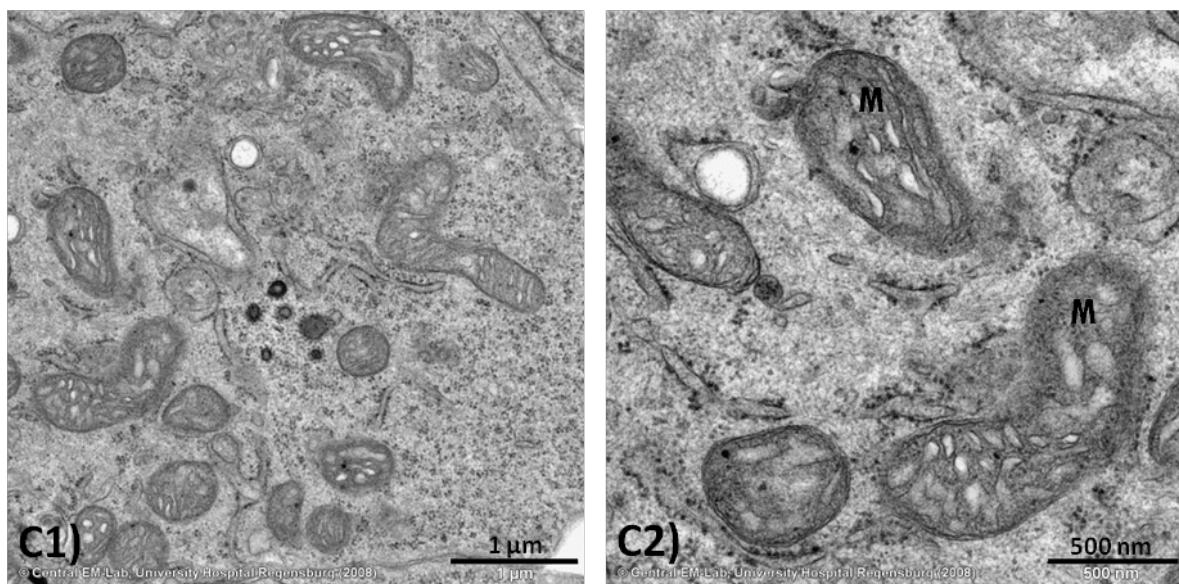
Abb.24: Elektronenmikroskopische Untersuchung der Mitochondrien in transfizierten HEK-Zellen

A) Kontrollzellen

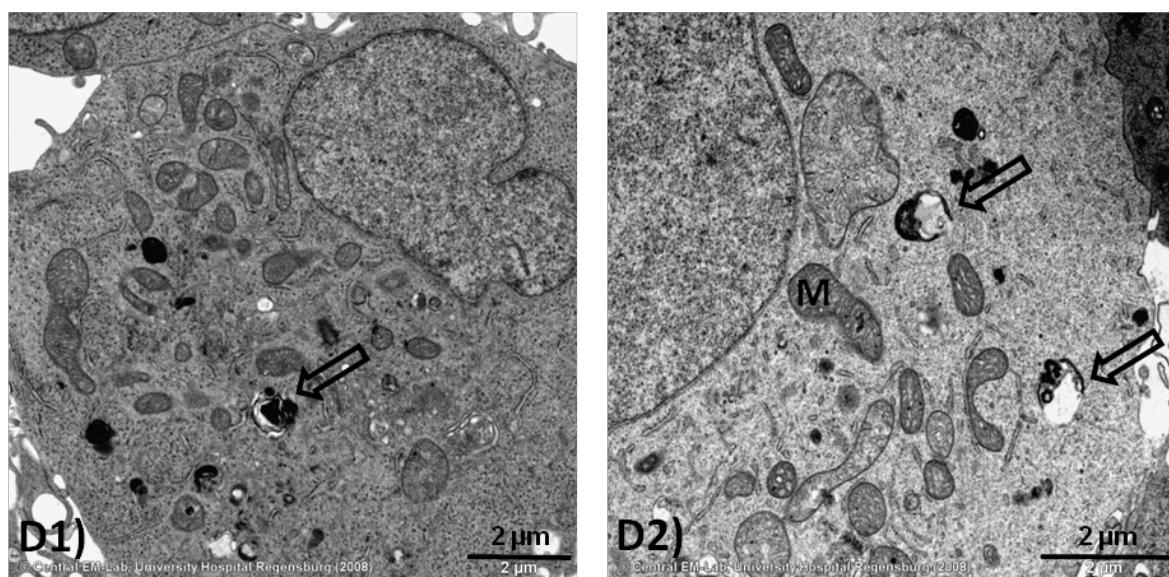
A1) Physiologische Variationsbreite der Mitochondrien bzgl. Größe und Form. A2) Die Mitochondrien erscheinen physiologischerweise hell, homogen und feingranuliert mit schmalen Crsitae (*) und einzelnen Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ablagerungen ohne pathologischen Wert (→). Die Doppelmembran (⇒) ist gut abgrenzbar.

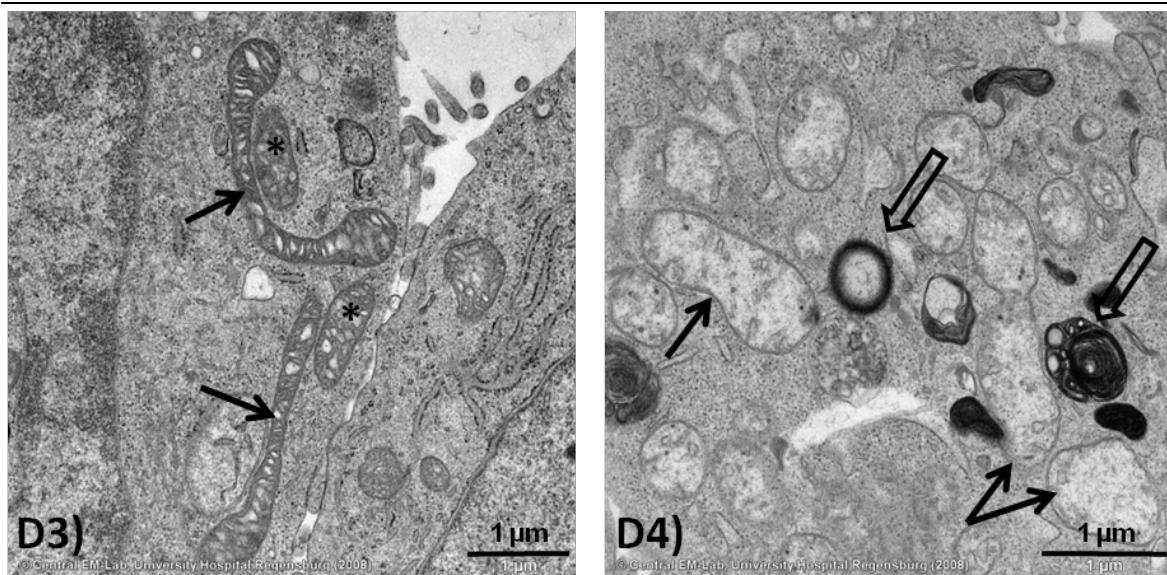
B) Mit Lipofectamin scheintransfizierte Zellen

Mitochondrien mit physiologischer Binnenstruktur und schmalen Cristae (*). Bei höherer Vergrößerung fallen intramitochondriale Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ablagerungen als dunkle Granula auf (→).

C) hEHHADH_{wt} exprimierende Zellen

Mitochondrien vereinzelt vergrößert und pleomorph. Die Binnenstruktur (M) scheint teilweise verwaschen und dunkler als bei A und B jedoch homogen.

D) hEHHADH_{mut} exprimierenden HEK-Zellen



Es zeigt sich ein erhöhter lysosomaler Abbau (D1/2/4 ⇒) und eine deutliche Pleomorphie der Mitochondrien (D1/2). Die Anzahl der Mitochondrien im sog. „niedrigenergetischen Zustand“ (klein, dunkel, kondensiert) ist erhöht (D1). D3) zeigt das Auftreten sog. „Riesenmitochondrien“ (→) im Vergleich zu normalgroßen Organellen (*) D4) Ödematös degenerierte Mitochondrien (→) - Die Cristae sind dilatiert und die Doppelmembran nicht mehr abgrenzbar.

4.6 Urinanalysen von L-PBE^{+/+}, L-PBE^{+/-} und L-PBE^{-/-} Mäusen

4.6.1 Aminosäureausscheidung

Ein charakteristisches Symptom des renalen Fanconi-Syndroms ist die Aminoazidurie (Tolaymat *et al.*, 1992).

Mittels GC-MS (gas chromatography / mass spectrometry) wurden die Konzentrationen der Aminosäuren Alanin, Asparagin, Aspartat, Cystin, Glutamin, Glutamat, Glycin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Tryptophan, Tyrosin und Valin in jeweils 10 µl Spontanurin von L-PBE^{+/+}-, L-PBE^{+/-} und L-PBE^{-/-}-Mäusen bestimmt. Um Schwankungen in der Konzentration des Urins auszugleichen, wurden die Aminosäurekonzentrationen im Urin ($[AS_{Urin}]$) auf die jeweiligen Kreatinin-Konzentrationen im Urin ($[Krea_{Urin}]$) normalisiert ($[AS_{Urin}]/[Krea_{Urin}]$).

Die Messergebnisse der homozygoten L-PBE^{-/-}-Mäuse zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe bestehend aus L-PBE^{+/+}- und L-PBE^{+/-}-Mäusen (Abb. 25) keine signifikanten Unterschiede. Eine Aminoazidurie als Hinweis auf das Vorliegen eines renalen Fanconi-Syndroms konnte weder bei der Kontrollgruppe noch bei den homozygoten L-PBE^{-/-}-Mäusen beobachtet werden.

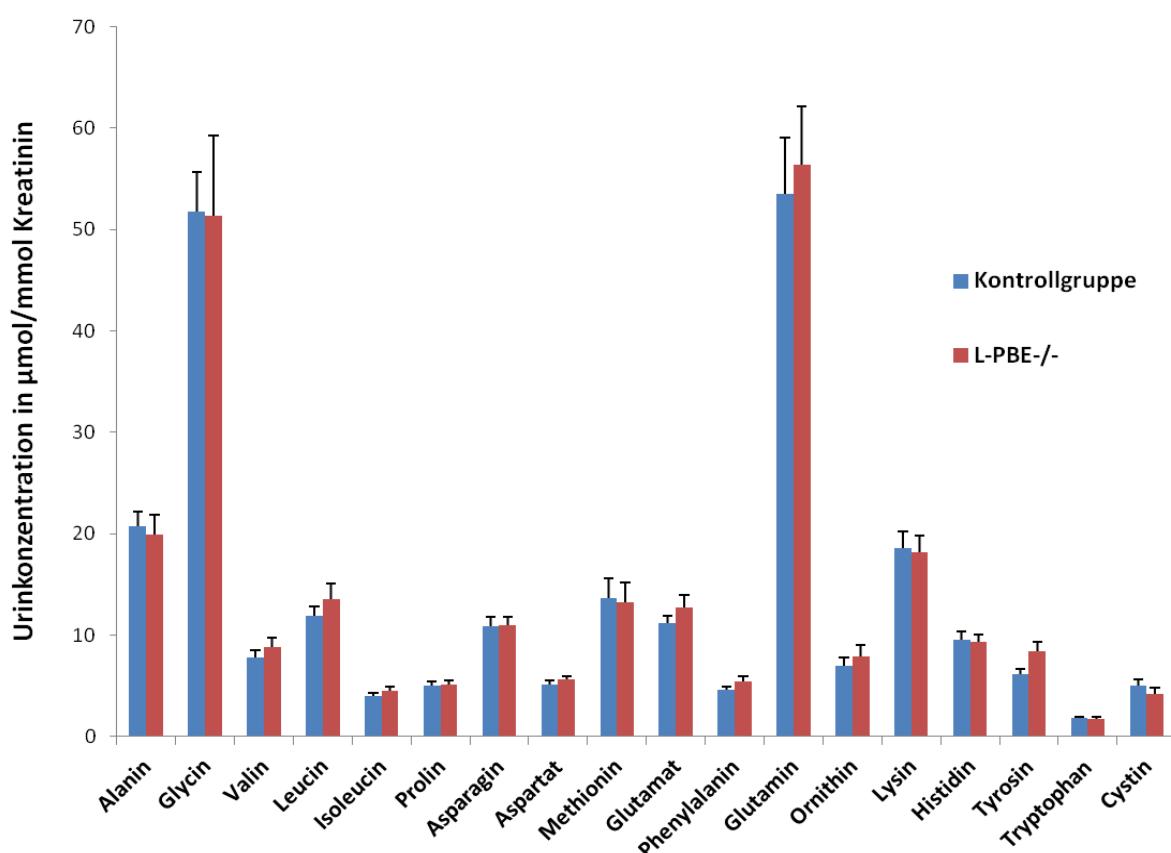


Abb. 25: Aminosäureausscheidung im Urin von L-PBE^{+/+}/L-PBE^{+/-}- (= Kontrollgruppe: n = 25) und L-PBE^{-/-}-Mäusen (n = 12): Es zeigen sich keine physiologisch relevanten Unterschiede.

4.6.2 Ausscheidung von Metaboliten des Energiestoffwechsels - "metabolic fingerprinting"

Mitochondriale Funktionsstörungen sind vielfach als Ursache eines Fanconi-Syndroms beschrieben (Niaudet, 1998; Stein *et al.*, 2002; Buemi *et al.*, 1997; Wendel *et al.*, 1995; Emma *et al.*, 2011). Auch für die von Prof. Kleta entdeckte Form mit Mutation im EHHADH-Gen wird dies vermutet. Oft ist ein renales Fanconi-Syndrom das erste Symptom einer mitochondrialen Zytopathie (Wendel *et al.*, 1995). Die Patienten fallen durch eine veränderte Ausscheidung von Metaboliten des Energiestoffwechsels wie Laktat, Pyruvat, 3-Hydroxybutyrat und einiger Intermediate des Citratzyklus im Urin auf (Wendel *et al.*, 1995). Bei einer Funktionsstörung der Atmungskette kommt es zur Akkumulation von reduziertem NADH, was im Mitochondrium die Umwandlung von Acetessigsäure in 3-Hydroxybutyrat begünstigt. Im Zytosol wird vermehrt Pyruvat zu Laktat reduziert. Somit ergibt sich aus der Messung von Metaboliten des Energiestoffwechsels im Urin oft ein entscheidender Hinweis auf mitochondriale Defekte (Niaudet *et al.*, 1997).

Dieses sog. „metabolic fingerprinting“ wurde mittels GC-APCI-TOF-MS (gas chromatography/atmospheric pressure chemical ionisation time-of-flight mass spectrometry) bei Urinproben von L-PBE^{-/-}-Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe bestehend aus L-PBE^{+/+}- und L-PBE^{+/-}-Mäusen durchgeführt. Gemessen wurden dabei die Konzentrationen von Laktat, Pyruvat, 3-Hydroxybutyrat, Succinat, Glycerat, Fumerat, Malat und Citrat. Außerdem wurde die Glucosekonzentration im Urin bestimmt.

Die Ergebnisse (Abb. 26) zeigten keine Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den L-PBE^{-/-}-Mäusen. Eine Glucosurie, wie sie für das Fanconi-Syndrom charakteristisch ist, wurde weder bei der Kontrollgruppe noch bei den L-PBE^{-/-}-Mäusen beobachtet. Das alleinige Fehlen des EHHADH-Gens bei den L-PBE^{-/-}-Tieren scheint somit nicht zu einem renalen Phänotyp im Sinne eines Fanconi-Syndroms zu führen.

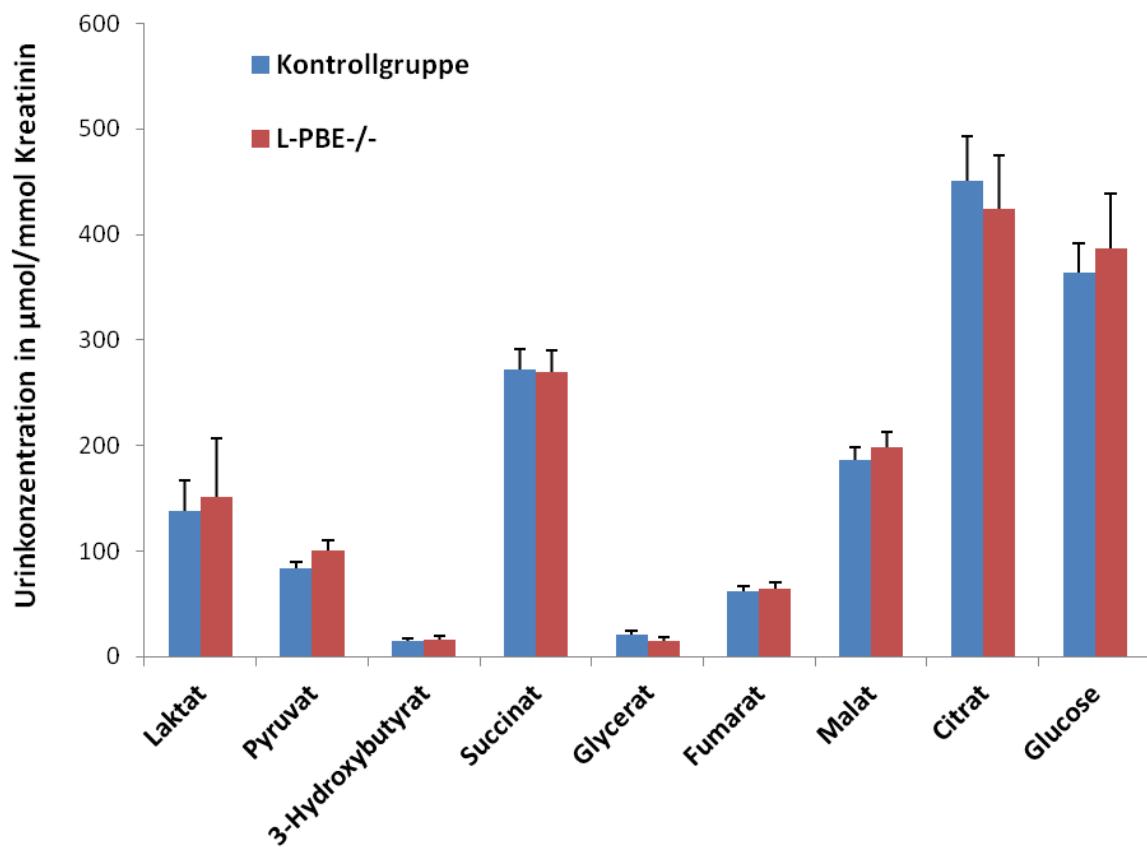


Abb. 26: „Metabolic fingerprinting“ aus Urinproben von L-PBE^{+/+}-/L-PBE^{+/-} (= Kontrollgruppe: n = 26) und L-PBE^{-/-}-Mäusen (n = 12): Es zeigen sich keine physiologisch relevanten Unterschiede in der Ausscheidung von Metaboliten des Energiestoffwechsels.

5. Diskussion

5.1 EHHADH in der Niere

Nur wenig ist bisher in der Literatur über die peroxisomale Enoyl-CoA-Hydrolase/3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase (EHHADH) bekannt, obwohl die strukturelle Organisation des Enzyms bei der Ratte bereits 1987 von Naoko Ishii et al. beschrieben wurde (Ishii et al., 1987). Beim Menschen kommt das peroxisomale Enzym vor allem in Niere, Leber, Zunge und Trachea vor

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/ESTProfileViewer.cgi?uglist=Hs_429879).

Eine Überexpression von EHHADH und anderer Gene, die für Enzyme des Fettsäuremetabolismus kodieren, wurde bei Patienten mit Darmkrebs beobachtet (Yeh et al., 2006).

DeWan et al. stellten zum ersten Mal 2001 einen Zusammenhang des Proteins mit der Nierenfunktion fest und beobachteten, dass die Kreatininclearance bei Hypertonikern eng mit einer Genregion auf Chromosom 3q27 verknüpft ist, die unter anderem für EHHADH kodiert. Diese Verknüpfung war besonders in einer afroamerikanischen Patientengruppe ausgeprägt, während bei der weißen Vergleichsgruppe v. a. eine Region auf Chromosom 6 mit Veränderungen in der Kreatininclearance assoziiert war (DeWan et al., 2001).

Die von Prof. Kleta entdeckte N-terminale Mutation des EHHADH-Gens bei Patienten mit dominant vererbtem Fanconi-Syndrom wurde ebenfalls bei einer afroamerikanischen Familie gefunden, die bereits 1992 von Tolaymat et al. unter klinischen Gesichtspunkten beschrieben wurde und als Familie mit den meisten Erkrankten innerhalb einer Familie gilt (Tolaymat et al., 1992). Dies lässt vermuten, dass auch ethnische Aspekte bei der Entstehung des Fanconi-Syndroms eine Rolle spielen könnten.

Die Lokalisation von EHHADH in der Niere wurde bisher noch nicht untersucht und war eines der Hauptziele dieser Arbeit. Mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen auf Gefrierschnitten von L-PBE^{+/+}- und L-PBE^{-/-}-Mausnieren sowie Paraffinschnitten von humanem Nierengewebe konnte diese näher untersucht werden.

Die Ergebnisse zeigten dabei eine starke Expression des Proteins im gesamten proximalen Tubulus mit Betonung des S3-Segments in der humanen Niere (Abb. 18), während in der Mausniere nur der spätproximale Tubulus (S3-Segment) EHHADH exprimierte (Abb. 16). Warum das peroxisomale Protein gerade hier in besonders hoher Dichte vorkommt, ist unklar, könnte aber mit den speziellen Anforderungen an die Zellen des proximalen Tubulus als Hauptresortionsort von Elektrolyten, Glucose, Aminosäuren, Wasser und anderen Stoffen aus dem Primärharn zusammenhängen – ein energieaufwendiger Prozess, für den die Bereitstellung von ATP durch eine hohe Anzahl an Mitochondrien im basolateralen Labyrinth der Zellen notwendig ist. Man weiß, dass die Biogenese der Mito-

chondrien eng mit der der Peroxisomen verknüpft ist, da sie einerseits auf ähnliche Stimuli wie z.B. ein erhöhtes Angebot an Fettsäuren reagieren, andererseits aber auch die Signalwege ihrer Proliferation voneinander abhängen. So wird die Entstehung neuer Peroxisomen und deren Enzyme besonders durch PPAR α -Liganden aktiviert (Reddy and Lalwai, 1983). PGC-1 (PPAR γ coactivator-1), über den die mitochondriale Genexpression gesteigert werden kann, ist wiederum ein essentieller Kofaktor für diesen Rezeptor (PPAR α) und PPAR γ (Wu *et al.*, 1999; Vega *et al.*, 2000). Diese biogenetische Verbindung zwischen der Zahl der Peroxisomen und der Mitochondriendichte könnte ein Grund dafür sein, dass im proximalen Tubulus, in dem sehr viele Mitochondrien als Energielieferanten gebraucht werden, auch die Anreicherung von Peroxisomen und ihrer Enzyme höher ist.

Beim Fanconi-Syndrom handelt es sich generell um eine Funktionsstörung des proximalen Tubulus. Die Mutation eines Proteins wie EHHADH, das vor allem dort lokalisiert ist, wo der Funktionsdefekt der Erkrankung liegt, wäre durchaus als Ursache denkbar.

Die genaue Kenntnis der Lokalisation des Proteins in der Niere, wie sie in den Immunfluoreszenzfärbungen (Abb.16, 17, 18) dargestellt werden konnte, ist ein wichtiger erster Schritt bei der Beurteilung des Stellenwertes dieses Enzyms für die Entstehung des Fanconi-Syndroms. Es bleibt jedoch die Frage nach dem Pathomechanismus, der letztendlich zu der für das Fanconi-Syndrom charakteristischen Transportstörung führt.

Da bei den L-PBE $^{+/+}$ -Tieren keinerlei phänotypische Auffälligkeiten zu beobachten waren und sich auch bei den Urinalysen und histologisch keine Abnormalitäten zeigten, kann davon ausgegangen werden, dass die Abwesenheit des L-spezifischen Enzyms der β -Oxidation vom noch intakten D-System kompensiert werden kann. Dies konnte auch schon von Chao Qi, Yuzhi Jia *et al.* in der Leber von Nagetieren beobachtet werden (Qi *et al.*, 1999). Ein Funktionsausfall von L-PBE würde somit erst ein Problem darstellen, wenn auch das Gen für D-PBE (D-specific peroxisomal bifunctional enzyme) ausgeschaltet ist.

Anders als bei einer Mutation der mitochondrialen 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase, welche den dritten Schritt der β -Oxidation katalysiert, scheint es bei einem Defekt des peroxisomalen EHHADH nicht zu einer Störung des Fettsäureabbaus mit darausfolgender Akkumulation von Fettsäuren und Symptomen wie Hepatomegalie, Steatose, Leberzirrhose und Kardiomegalie zu kommen, wie sie Tyni *et al.* bei Patienten mit der G1528C-Mutation beschrieben haben (Tyni and Pihko, 1999). Eine Anreicherung von Fettsäuren in Myocard, Niere oder Skelettmuskel, wie sie bei den geschilderten Patienten auftrat, wurde allerdings im L-PBE-Knockout-Mausmodell nicht untersucht und kann somit nicht sicher ausgeschlossen werden. Trotzdem scheint die Ursache für das Auftreten des Fanconi-Syndroms nicht allein im Fehlen bzw. einem durch die Mutation verursachten Funktionsdefekt von EHHADH zu liegen. Vielmehr weist alles darauf hin, dass die Funktionsstörung

des proximalen Tubulus durch einen fehlerhaften Transport von EHHADH_{mut} in die Mitochondrien hervorgerufen wird.

5.2 Maltargeting von EHHADH_{mut} in die Mitochondrien

5.2.1 Verknüpfung von Mitochondrien und Peroxisomen im Zellstoffwechsel

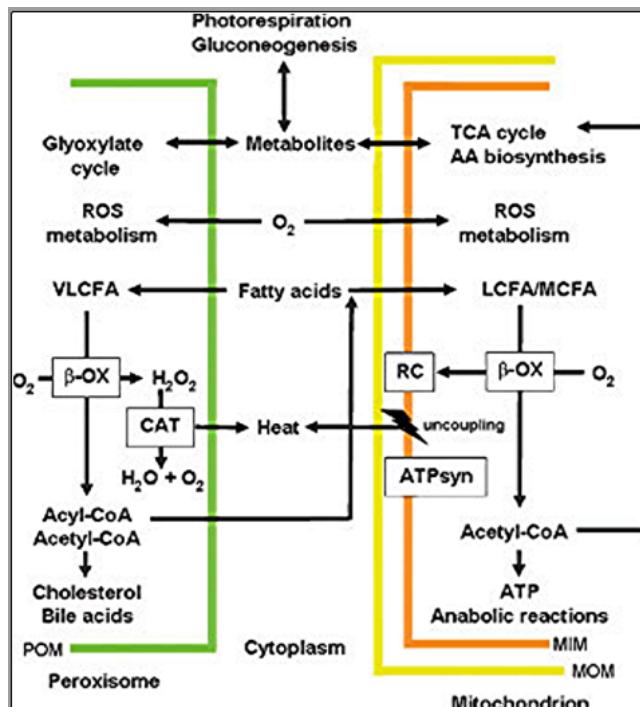


Abb. 27: Kooperation zwischen Mitochondrien und Peroxisomen (Schrader and Yoon, 2007): POM = peroxisomal membrane, MIM = mitochondrial inner membrane, MOM = mitochondrial outer membrane, TCA = tricarboxylic acid, AA = amino acid, ROS = reactive oxygen species, VLCFA = very long-chain fatty acids, LCFA = long-chain fatty acids, MCFA = medium-chain fatty acids, β -OX = β -oxidation, CAT = catalase, RC = respiratory chain, ATPsyn = ATP synthetase

Mitochondrien und Peroxisomen sind im Zellstoffwechsel eng verknüpft. So hängen ihre Proliferations- und Teilungsmechanismen teilweise voneinander ab (Vega et al., 2000; Koch et al., 2005) und die Kooperation beider Organellen ist im Rahmen des Fettsäuremetabolismus und der Produktion und Entsorgung reaktiver Sauerstoffradikale von essentieller Bedeutung (Schrader et al., 2007; Moldovan and Moldovan, 2004). Fettsäuren, die nicht im Mitochondrium abgebaut werden können, werden von Peroxisomen verstoffwechselt und dessen Endprodukte wiederum für die vollständige Oxidation zu CO_2 und H_2O in die Mitochondrien eingeschleust. Obwohl in beiden Zellorganellen die β -Oxidation nach denselben Reaktionsschritten abläuft, unterscheiden sich beide Systeme deutlich bzgl. ihrer Enzymausstattung sowohl im Hinblick auf molekulare als auch katalytische Eigenschaften (Schrader et al., 2007).

Die Mechanismen für den Import nuklear kodierter Proteine weichen ebenfalls zwischen Peroxisomen und Mitochondrien deutlich ab, sind aber vermutlich ein Schlüsselpunkt bei der Beantwortung der Frage, wie es durch die N-terminale Mutation zu einer fehlerhaften Einschleusung des peroxisomalen EHHADH in die Mitochondrien kommen kann.

5.2.2 Peroxisomaler versus mitochondrialer Proteinimport – N-terminale Mutation von EHHADH als Ursache des Maltargetings

a) Proteinimport ins Peroxisom

Peroxisomen können im Gegensatz zu Mitochondrien Proteine in ihrer vollständig gefalteten Tertiär- bzw. Quartärstruktur importieren (Leon *et al.*, 2006a; Hausler *et al.*, 1996).

Dafür sind v.a. drei Arten von Signalsequenzen, die sog. „PTS“ (peroxisome targeting signals) von Bedeutung. PTS1 und PTS2 dirigieren Proteine in die peroxisomale Matrix, während mPTSs einen Einbau in die Membran der Organellen bewirken (Lazarow, 2003). PTS1-Sequenzen sind kurze, C-terminale Signale mit der Aminosäureabfolge (S/A/C)–(K/R/H)–(L/L/M), die oft mehrmals wiederholt vorliegt. EHHADH trägt für die Einschleusung ins Peroxisom an seinem C-Terminus die Abfolge SKL, was den Aminosäuren Serin, Lysin und Leucin entspricht. Diese PTS1 werden dann von dem löslichen Rezeptor Peroxin-5 (Pex5p) im Cytosol erkannt und gebunden (Brown and Baker, 2003). Für PTS2-Sequenzen, die aus 9 Aminosäuren etwa 20 Reste vom N-Terminus entfernt bestehen, ist Peroxin 7 (Pex7p) und sein Korezeptor Pex20p zuständig (Leon *et al.*, 2006b; Rehling *et al.*, 1996; Zhang and Lazarow, 1996; Stein *et al.*, 2002). mPTSs hingegen werden von Pex19p erfasst (Jones *et al.*, 2004). Der jeweilige Rezeptor bringt sein Importprodukt schließlich an die peroxisomale Membran, wo weitere Peroxine die Einschleusung ermöglichen (Agne *et al.*, 2003; Hazra *et al.*, 2002; Fang *et al.*, 2004).

Es folgt der Eintritt des Protein-Rezeptor-Komplexes in die Matrix bzw. die Einbettung in die peroxisomale Membran, wonach die Rezeptoren ihr Importprodukt abladen und wieder ins Cytosol zurückkehren (Dammai and Subramani, 2001; Nair *et al.*, 2004; Miyata and Fujiki, 2005; Leon *et al.*, 2006b). Sowohl der Import der Proteine als auch der Export zum Recycling der Peroxine verbrauchen Energie in Form von ATP (Miyata *et al.*, 2005).

Durch die in Abb. 28 gezeigte N-terminale Mutation von EHHADH bleibt die Signalsequenz für den Import in die Peroxisomen völlig unberührt, so dass auch für das mutierte Protein, wie in unseren Immunfluoreszenzfärbungen beobachtet, eine problemlose Einschleusung möglich ist.

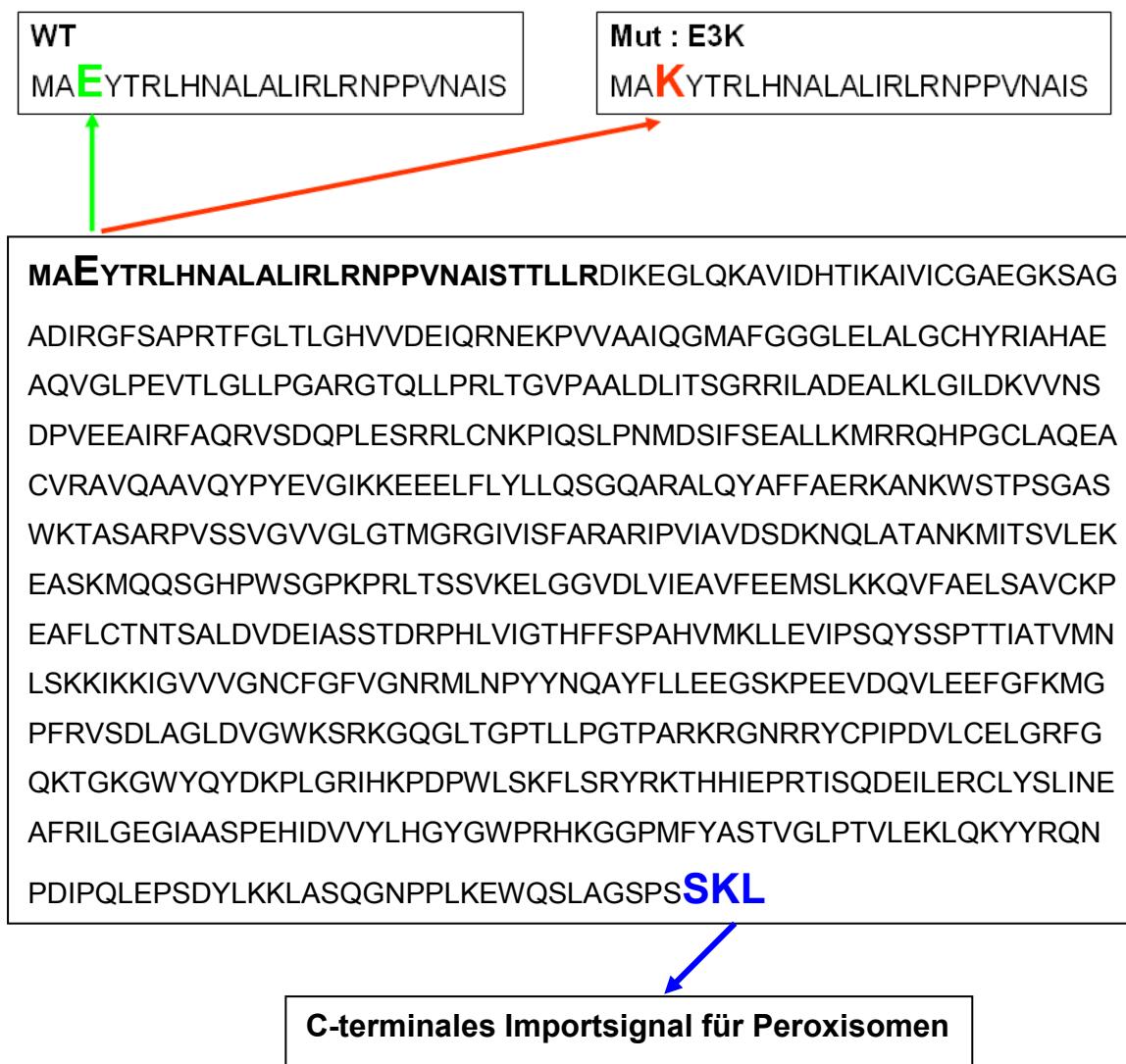


Abb. 28: Aminosäureabfolge von EHHADH mit Kennzeichnung der Mutationsstelle und der peroxisomalen Importsequenz

b) Proteinimport ins Mitochondrium

Voraussetzung für den Import in die mitochondriale Matrix, die innere Membran oder den Intermembranraum eines Mitochondriums ist eine Signalsequenz am N-Terminus des entsprechenden Proteins, die aus 10 – 30 Aminosäuren besteht und in Form einer amphipathischen α -Helix mit hydrophoben Resten auf der einen und positiv geladenen Aminosäuren auf der anderen Seite vorliegt (Wiedemann *et al.*, 2004). Die Bildung einer solchen α -Helix, die als sog. „mitochondrial targeting sequence“ (MTS) fungiert, wird im Wildtyp-EHHADH-Protein normalerweise durch das negativ geladene Glutamat an der dritten Stelle der Aminosäuresequenz verhindert. Betrachtet man jedoch die ersten 30 Aminosäuren von EHHADH_{mut}, die für den Import ins Mitochondrium eine Rolle spielen könnten, so fällt auf, dass diese nach dem Austausch von Glutamat gegen das positiv

geladene Lysin nur noch aus positiven, unpolaren und einigen wenigen polaren ungeladenen Aminosäuren besteht. Es entsteht also eine arginin- und lysinreiche Anfangsequenz, welche durchaus die Kriterien für die Erkennung durch den TOM (translocase of the outer membrane)-Komplex des mitochondrialen Proteinimportsystems erfüllen könnte.

EHHADH _{wt} :	EHHADH _{mut} :
Met-Ala-Glu-Tyr-Thr-Arg-Leu-His-	Met-Ala-Lys-Tyr-Thr-Arg-Leu-His-
Asn-Ala-Leu-Ala-Leu-Ile-Arg-Leu-	Asn-Ala-Leu-Ala-Leu-Ile-Arg-Leu-
Arg-Asn-Pro-Pro-Val-Asn-Ala-Ile-	Arg-Asn-Pro-Pro-Val-Asn-Ala-Ile-
Ser-Thr-Thr-Leu-Leu-Arg	Ser-Thr-Thr-Leu-Leu-Arg

■ negativ geladen
 ■ positiv geladen
 polar ungeladen
 unpol. aliphatisch

Abb. 29: Vergleich der N-terminalen Aminosäuresequenz von EHHADH_{wt} und EHHADH_{mut}

Dieser TOM-Komplex in der äußeren Mitochondrienmembran besteht insgesamt aus 7 Untereinheiten, 3 Rezeptoren (Tom 20 für Bindung an die hydrophobe Seite der α -Helix, Tom22 für die Bindung an die positiv geladene Seite der α -Helix und Tom70), einem kovalenten β -Fass-Protein (Tom 40) und 3 kleineren Tom-Proteinen (Tom5, Tom6, Tom7) für Zusammenhalt und Stabilität des Komplexes (Hill *et al.*, 1998; Kunkele *et al.*, 1998; van Wilpe *et al.*, 1999; Model *et al.*, 2001), und bildet die zentrale Eintrittsstelle aller importierten Proteine ins Mitochondrium.

Danach werden die Importprodukte je nach Bestimmungsort auf drei möglichen Pfaden weitertransportiert: In die Matrix mit Hilfe des TIM (translocase of the inner membrane) 23-Komplexes und des Matrix-Hitzeschockproteins mtHsp70, das als Chaperon fungiert und den Kern des „presequence translocase-associated motor“ (PAM) bildet, in die innere Mitochondrienmembran mit Hilfe von TIM22 und in die Außenmembran des Zellorganells durch den sog. „sorting and assembly machinery“-Komplex (SAM) (Wiedemann *et al.*, 2003). Vor dem Import verhindern cytosolische Chaperone eine zu frühe Faltung des jeweiligen Proteins, da Mitochondrien im Gegensatz zu Peroxisomen nur ungefaltete Eiweißmoleküle einschleusen können.

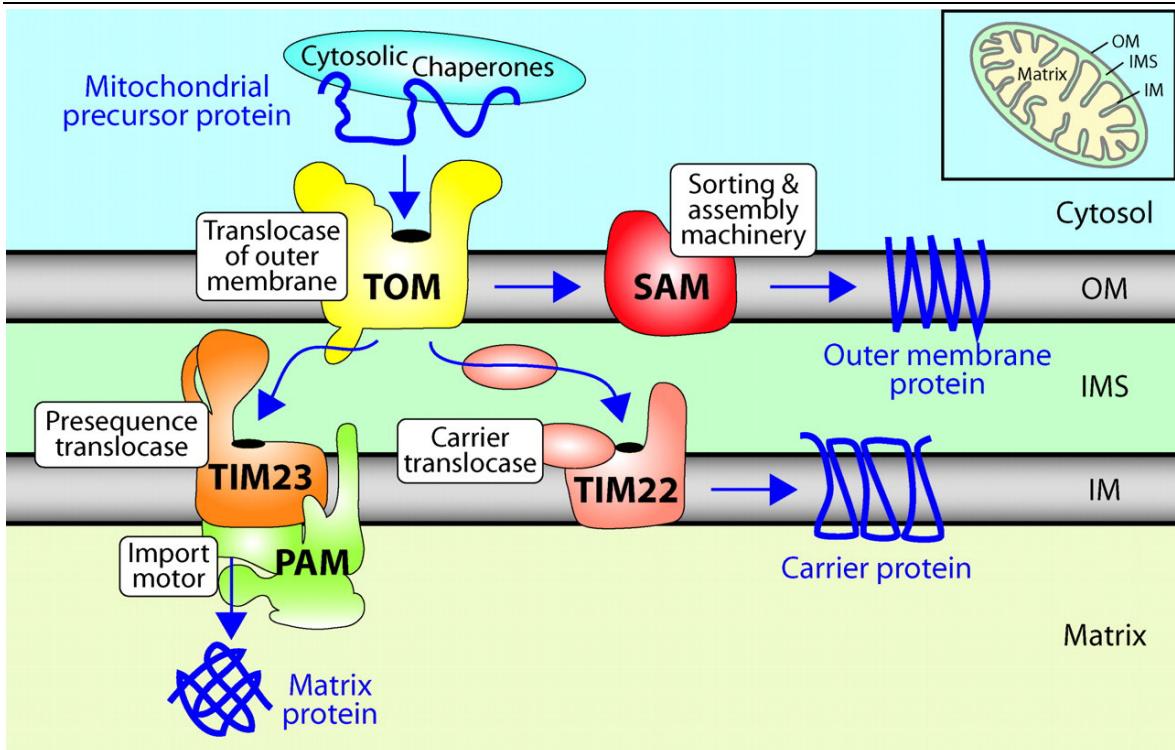


Abb. 30: Schematische Darstellung des Proteinimports ins Mitochondrium (Wiedemann et al., 2004)

Unsere Versuche mit transfizierten Zellen konnten die theoretischen Vorhersagen des Programms „Protein Prowler 1.2“ (Abb. 19) für das „Maltargeting“ des mutierten EHHADH in die Mitochondrien bestätigen (Abb. 20, 21, 22). Die genaue Analyse der Aminosäuresequenz des Wildtypproteins im Vergleich zur Mutante im Hinblick auf mitochondriale und peroxisomale Importsignale gibt eine plausible Erklärung für diesen Vorgang, der auch in unseren Immunfluoreszenzfärbungen beobachtet wurde.

5.2.3 Folgen des Maltargetings

Durch die N-terminale Mutation von Glutamat zu Lysin kommt es, wie wir im Zellmodell beobachten konnten, zu einem „Maltargeting“ des normalerweise in den Peroxisomen lokalisierten EHHADH in die Mitochondrien.

Ein ähnlicher Pathomechanismus wurde auch bei einer weiteren renalen Erkrankung, der primären Hyperoxalurie Typ I, beschrieben (Danpure, 2006). Hier führt die Mutation Gly170Arg im Gen für die Glyoxylat-Aminotransferase zusammen mit einem häufig verbreiteten Pro11Leu Polymorphismus zu einem „Maltargeting“ des Proteins von den Peroxisomen in die Mitochondrien (Danpure *et al.*, 1989). Analog zu unserem Protein kommt es auch hier durch eine Punktmutation zur Entstehung einer mitochondrialen Importsignalsequenz, die vom mitochondrialen TOM-Komplex erkannt werden kann. In der Folge kommt es bei der autosomal-rezessiv vererbten Primären Hyperoxalurie Typ I zu einem Mangel der Glyoxylat-Aminotransferase in den Peroxisomen, wo sie normalerweise eine wichtige Entgiftungsreaktion, nämlich die Umwandlung von Glyoxylat zu Glycin katalysiert. Das nicht verstoffwechselte Glyoxylat kann ins Cytosol entweichen, wo es zu Oxalat oxidiert wird. Da dieses nicht mehr weiter metabolisiert werden kann, kommt es zu einer vermehrten renalen Ausscheidung, die schließlich zur Ansammlung von unlöslichem Calciumoxalat in der Niere als Hauptproblem der Erkrankung führt (Danpure, 2006).

Unser Modell geht jedoch davon aus, dass die renalen Symptome beim Fanconi-Syndrom direkt durch einen Funktionsdefekt des proximalen Tubulus entstehen, der, wie in der Literatur schon mehrfach beschrieben, durch eine Dysfunktion der Mitochondrien bedingt sein kann (Niaudet, 1998; Hall *et al.*, 2007; Martin-Hernandez *et al.*, 2005; Debray *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2000).

Elektronenmikroskopisch zeigte sich in HEK-Zellen, die mit EHHADH_{mut} transfiziert worden waren, ein vermehrtes Auftreten vergrößerter, pleomorpher und ödematischer Mitochondrien mit erweiterten Cristae sowie ein erhöhter lysosomaler Abbau (Abb.25). Außerdem traten vermehrt abnorme und vergrößerte Mitochondrien auf, wie sie in der Literatur schon mehrfach bei mitochondrialen Zytopathien beschrieben wurden (Niaudet, 1998; Niaudet *et al.*, 1997; Au *et al.*, 2007). Solche Veränderungen können laut Dr. Schröder vom zentralen Labor für Elektronenmikroskopie (Institut für Pathologie der Universität Regensburg) Hinweise auf eine mitochondriale Dysfunktion darstellen. Besonders das Auftreten sog. „Megamitochondrien“, die teilweise die 10fache Größe eines normalen Mitochondriums erreichen, ist in der Literatur für das Fanconi-Syndrom beschrieben (Niaudet, 1998). Elektronenmikroskopische Abnormalitäten von Mitochondrien werden auch für das in Verbindung mit dem multiplen Myelom auftretende Fanconi-Syndrom erwähnt und konnten von Smolens *et al.* an der Ratteniere beobachtet werden (Smolens *et al.*, 1986). Bei einer Intoxikation mit Valproat, die ebenfalls zu der renalen Erkrankung

führt, traten v. a. vergrößerte und angeschwollene Mitochondrien auf (Graf *et al.*, 1985). Allerdings sind Kriterien wie eine Vergrößerung oder Erhöhung der Pleomorphie sowie ein gesteigerter lysosomaler Abbau relativ unspezifisch und konnten, wenn auch in geringerer Ausprägung, auch in den anderen Zellgruppen beobachtet werden. Die elektronenmikroskopischen Beobachtungen werden außerdem in ihrer Aussagekraft von der niedrigen Transfektionseffizienz von nur ca. 40% eingeschränkt. So waren in der Mutantenzellgruppe offensichtlich nicht alle Zellen gleich von der Schädigung betroffen, wobei jedoch nicht festgestellt werden konnte, ob es an der fehlenden Transfektion lag oder EHHADH_{mut} nicht in allen Zellen Mitochondrienschäden verursacht. Genauso könnte eine fehlende Transfektion der EHHADH_{wt}-Zellen fälschlicherweise zu einem „Normalbefund“ der Mitochondrienverhältnisse geführt haben. Um dieses Problem zu lösen, soll die elektronenmikroskopische Begutachtung in naher Zukunft nochmals mit Zellen durchgeführt werden, in denen EHHADH_{wt} bzw. EHHADH_{mut} in allen Zellen über ein Tet-on-System mit Tetrazyklin induziert werden kann und somit die Transfektionseffizienz als Unsicherheitsfaktor wegfällt. Letztlich kann nicht mit Sicherheit beurteilt werden, ob die beobachteten Hinweise auf eine Mitochondrienschädigung in der EHHADH_{mut}-Zellgruppe auch wirklich mit dem Maltargeting des Proteins zusammenhängen. Außerdem kann die Morphologie der Organellen alleine ohnehin nicht genügend Aufschluss über die Mitochondrienfunktion geben. Eine klare Aussage kann erst getroffen werden, wenn funktionelle Tests des oxidativen Stoffwechsels bzw. der Mitochondrienfunktion durchgeführt wurden und bei der Beurteilung miteinbezogen werden können.

5.3 Mitochondriale Dysfunktion als Ursache des Fanconi-Syndroms

Mitochondrialen Funktionsstörungen kommt in der Pathogenese von Erkrankungen immer mehr Bedeutung zu. Da ihre reibungslose Funktion für die Energiebereitstellung aller Zellen im menschlichen Körper von enormer Bedeutung ist, können Pathologien der Mitochondrien und der mitochondrialen Atmungskette eine Reihe von Störungen in vielen unterschiedlichen Organen und Geweben zur Folge haben. Erkrankungen wie Diabetes mellitus, neurodegenerative Veränderungen, Reperfusionsschäden nach kardialer Ischämie oder die Entstehung eines septischen Schocks können heute ebenso auf eine mitochondriale Dysfunktion zurückgeführt werden wie der physiologische Prozess des Alterns (Hall *et al.*, 2007). Auch für das Fanconi-Syndrom werden mitochondriale Defekte in der Literatur schon länger als Ursache beschrieben (Niaudet, 1998; Wang *et al.*, 2000; Zeviani *et al.*, 2004; Hall *et al.*, 2007; Debray *et al.*, 2008). Warum die tubuläre Funktion der Nieren, speziell des proximalen Tubulus, bei mitochondrialen Defekten vermindert ist, ist jedoch noch weitgehend unklar. Verschiedenen Faktoren könnten bei der Auslösung einer Transportstörung durch die mitochondriale Dysfunktion eine Rolle spielen.

5.3.1 Mutationen der mitochondrialen DNA

Die Mutationsrate des mitochondrialen Genoms ist zehnmal höher als die der nukleären DNA (Hall *et al.*, 2007). Vor allem bei Kindern sind eine Vielzahl von renalen Erkrankungen durch hereditäre Mitochondriedefekte bekannt (Martin-Hernandez *et al.*, 2005). Dazu zählen neben dem Fanconi-Syndrom tubulointerstitielle Erkrankungen, die renal tubuläre Azidose, das nephrotische Syndrom und ein Bartter-ähnliches Syndrom. Bei Erwachsenen hingegen wird nur eine Punktmutation der mitochondrialen DNA in Verbindung mit einer Nierenerkrankung gebracht. Die Mutation A3243G des tRNA(Leu) Gens führt dabei in den meisten Fällen zur fokalen segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) (Hall *et al.*, 2007).

Auch bei erworbenen Formen des Fanconi-Syndroms z.B. im Rahmen einer Intoxikation mit Cadmium oder Medikamenten wie Ifosfamid können Mutationen in der mtDNA und die daraus resultierende Funktionsstörung der Organellen Auslöser für die Erkrankung sein (Takebayashi *et al.*, 2003; Di Cataldo *et al.*, 1999).

5.3.2 Energiemangel

Eine andere Ursache für Transportstörungen im proximalen Tubulus im Sinne eines Fanconi-Syndroms kann ein Mangel an ATP sein, wie er bei einer Funktionsstörung der mitochondrialen Atmungskette auftritt. Der Energieverbrauch des proximalen Tubulus ist

aufgrund seiner enormen aktiven Transportleistungen im Rahmen der renalen Rückresorption sehr hoch und wird zu mehr als 95% aus der oxidativen Phosphorylierung gedeckt (Epstein, 1997). Dabei liegt der Energieverbrauch in diesen Zellen bereits nahezu am Kapazitätsgrenzen der ATP-Bereitstellung (Beck *et al.*, 1991). Ein Abfall der ATP-Konzentration durch eine Einschränkung der Mitochondrienfunktion kann folglich nicht oder nur unausreichend kompensiert werden und wird als Ursache für die Entstehung einer renalen Funktionsstörung für sehr wahrscheinlich gehalten (Hall *et al.*, 2007).

Einen solchen Zusammenhang konnte auch M. Baum im Rahmen von Untersuchungen zum Pathomechanismus der nephropathischen Zystinose, der häufigsten Ursache des vererbten Fanconi-Syndroms, feststellen (Baum, 1998). Durch Inkubation von proximalen Tubuluszellen mit Zystin-Dimethylester (Zystin selbst ist nicht membrangängig) wurden intrazelluläre Zystinkonzentrationen vergleichbar denen von Zystinosepatienten hergestellt und so ein *in-vitro*-Modell eines Fanconi-Syndroms nachgestellt. Die Zystinüberladenen Zellen wiesen einen generalisierten Transportdefekt auf, wie er für das Fanconi-Syndrom charakteristisch ist. Es wurde beobachtet, dass v. a. der aktive Transport der Nierentubuli wesentlich eingeschränkt war. Dieser wird im Normalfall durch den von der Na^+/K^+ -ATPase aufgebauten elektrochemischen Gradienten für Natrium angetrieben. Eine vergleichbare Hemmung des Na^+ -abhängigen Transports in Zystin-beladenen humanen Zellen wurde auch in einer Studie von Çetinkaya 2002 beobachtet (Çetinkaya *et al.*, 2002). Die Transportstörung war jedoch nicht durch eine direkte Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase durch Zystin bedingt, sondern vielmehr durch eine Einschränkung der intrazellulären ATP-Produktion, von der die Funktion der Na^+/K^+ -ATPase wesentlich abhängt. Messungen der intrazellulären ATP-Konzentration zeigten eine dramatische Reduktion in den Tubuluszellen mit Fanconi-Syndrom im Vergleich zu den Kontrollzellen. Dass die Einschränkung des aktiven Transports wirklich an der ATP-Reduktion lag, wurde durch exogenes Zugeben von ATP belegt. Während Zystin-beladenen Tubuli ohne ATP-Zufuhr eine Transportreduktion von 89 % aufwiesen, kam es unter Zugabe von ATP nur zu einer 45%igen Reduktion (Baum, 1998).

Bei Untersuchungen der zellulären Atmung konnte außerdem beobachtet werden, dass der Sauerstoffverbrauch der Zystin-beladenen Tubuli nur halb soviel betrug wie der der Kontrollzellen und v. a. für den aktiven Transport fast vollständig gehemmt war, während der nicht für Transportprozesse vorgesehene O_2 -Verbrauch normal blieb (Baum, 1998). Dies und die Reduktion des ATP-Gehalts in den Zystin-beladenen Zellen weisen deutlich auf eine mitochondriale Störung hin, die hier zum Fanconi-Syndrom führt. Auch bei der hereditären Tyrosämie, einer weiteren Erkrankung mit Ausbildung eines Fanconi-Syndroms, kommt es zum Absinken der ATP-Konzentration und des O_2 -Verbrauchs vermutlich aufgrund einer Störung von Komplex I durch die Ablagerung von Succinylacetone in den proximalen Tubuluszellen (Roth *et al.*, 1991). Aminoglykoside wie Gentamycin können eben-

falls über die Hemmung der oxidativen Phosphorylierung und eine Reduktion der ATP-Level ein Fanconi-Syndrom auslösen (Simmons, Jr. et al., 1980).

Balban et al. konnten außerdem zeigen, dass eine enge Verbindung zwischen aerobem Stoffwechsel und dem Ionentransport bei isolierten Tubuli herrscht (Balaban et al., 1980). Darum scheint es nicht verwunderlich, dass es bei einer Störung der Mitochondrienfunktion zu einem renalen Verlust wichtiger Stoffe wie Glucose, Aminosäuren, Proteine, Elektrolyte und Wasser kommt.

Ähnlich könnte es durch das Maltargeting von EHHADH_{mut} zu einer mitochondrialen Dysfunktion und damit einer Verminderung der ATP-Konzentration kommen, die zur Einschränkung des aktiven Transports in den Zellen des proximalen Tubulus und damit zu den für das Fanconi-Syndrom charakteristischen Symptomen führt.

Eine mitochondriale Dysfunktion könnte aber nicht nur über einen Energiemangel zur Auslösung einer Transportstörung führen. Aufgrund der vielfältigen Funktionen der Zellorganellen kommen auch mehrere andere mögliche Pathomechanismen in Betracht.

5.3.3 Oxidativer Stress und Apoptose

Es wird vermutet, dass auch eine Einschränkung der Elimination freier Radikale zu mitochondrialen Funktionsstörungen und zum Fanconi-Syndrom führen kann. An kultivierten humanen Zellen des proximalen Tubulus aus dem Urin von Zystinosepatienten konnte gezeigt werden, dass die Konzentration des wichtigen Antioxidans Glutathion im Vergleich zu den Kontrollgruppen vermindert ist. Die Zellen sind dadurch anfällig für oxidativen Stress und zeigen eine beeinträchtigte Mitochondrienfunktion unter Hypoxie (Laube et al., 2006). Während unter Standardbedingungen keine Verminderung der Aktivität der Atmungskettenkomplexe oder der ATP-Konzentration zu beobachten war, kam es unter Hypoxie zu einem signifikanten Abfall von ATP. Bei den Kontrollzellen konnte eine Aktivitätssteigerung der Komplexe I und IV gemessen werden, die offensichtlich bei den Zystinosezellen nicht möglich war. Außerdem war in den Zellen die Apoptoserate deutlich erhöht, was vermutlich ebenfalls an der eingeschränkten Möglichkeit der Mitochondrien zur Bewältigung von oxidativem Stress lag (Laube et al., 2006). Normalerweise sind hierfür Antioxidationssysteme wie Glutathion, NADH oder Thioredoxin zuständig. Bei einem Mangel dieser Substanzen können Mitochondrienschädigungen durch freie Radikale zur Ausschüttung verschiedener Faktoren wie z.B. Cytochrom C ins Zytosol führen und so Apoptosevorgänge triggern (Jezek and Hlavata, 2005).

Auch bei dem durch das Toxin Maleat hervorgerufenen Fanconi-Syndrom kommt es über eine Reduktion der Glutathion-Konzentration zu einer erhöhten Empfindlichkeit der Zellen gegenüber freien Radikalen und dadurch zu Transportdefekten der proximalen Nierentubuli. Diese sind durch Zugabe des Antioxidans Glycin wieder teilsweise reversi-

bel, was die Rolle von oxidativem Stress bei der Entstehung eines Fanconi-Syndrom zusätzlich unterstreicht (Nissim and Weinberg, 1996).

5.3.4 Ca²⁺-Homöostase

Eine weitere Aufgabe der Mitochondrien ist die Regulation der zellulären Ca²⁺-Homöostase (Duchen, 2004b). Die Endozytose von Proteinen im proximalen Tubulus ist sehr empfindlich für Veränderungen der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration (Wu, 2004). Es ist deshalb denkbar, dass ein Defekt der Mitochondrien auch über diesen Mechanismus zu Transportstörungen, insbesondere zur Proteinurie führen kann. Die spezialisierte Funktion des proximalen Tubulus v.a. bei der Wiederaufnahme von niedermolekularen Proteinen macht diesen Nierenabschnitt besonders anfällig für die Konsequenzen der mitochondriale Funktionsstörungen, die nicht nur in einem Mangel an ATP resultieren (Hall *et al.*, 2007).

Mitochondriale Dysfunktionen können also über eine Reihe von Pathomechanismen zu Transportstörungen im proximalen Tubulus und damit zum Auftreten eines Fanconi-Syndroms führen. Ein kausaler Zusammenhang zwischen der Fehllokalisierung von EHHADH_{mut} und einer Mitochondrienschädigung ist jedoch noch nicht belegt. Hierfür sind weitere Untersuchungen, insbesondere auch funktionelle Tests des oxidativen Stoffwechsels von EHHADH_{mut} exprimierenden Zellen, notwendig.

5.4 Fanconi-Syndrom durch EHHADH_{mut} – Peroxisomale oder mitochondriale Erkrankung?

Die bisherigen Ergebnisse sprechen am ehesten dafür, dass die Transportstörungen im proximalen Tubulus bei Trägern der EHHADH-Mutation durch eine Funktionsstörung der Mitochondrien hervorgerufen werden. Jedoch wurde bisher nicht untersucht, ob das mutierte Protein seine Funktion in den Peroxisomen noch erfüllt. Es wäre denkbar, dass sich eine beeinträchtigte Funktion der Peroxisomen ebenfalls auf die Entwicklung eines Fanconi-Syndroms auswirken könnte bzw. indirekt über eine Beeinflussung der Mitochondrien zu Störungen führt, da beide Organellen in ihrer Funktion eng miteinander verknüpft sind (Schrader *et al.*, 2007; Koch *et al.*, 2005; Moldovan *et al.*, 2004).

Eine Beeinträchtigung der Peroxisomenfunktion könnte auch auftreten, wenn aufgrund des Maltargetings in die Mitochondrien zu wenig EHHADH (L-PBE) in die Peroxisomen gelangt. Die Untersuchungen am Knockout-Mausmodell konnten allerdings zeigen, dass es durch das alleinige Fehlen von EHHADH nicht zur Entwicklung eines phänotypischen Fanconi-Syndroms kommt, da die katalysierten Schritte in der β-Oxidation vermutlich vom D-spezifischen System übernommen werden können.

Am Zellmodell wurden diese Beobachtungen jedoch noch nicht überprüft. Die Expression von endogenem EHHADH könnte durch Behandlung von LLC-PK1 Zellen mit entsprechender siRNA stark reduziert werden. Zeigen die Zellen nach Suppression von EHHADH den gleichen Phänotyp wie nach Induktion der EHHADH_{mut}-Expression, wäre dies ein wichtiger Hinweis dafür, dass die Funktionsstörung doch nur auf einen Mangel an EHHADH in den Peroxisomen zurückzuführen ist. Auch eine Kombination von mitochondrialer und peroxisomaler Funktionsstörung durch EHHADH_{mut} ist bisher nicht auszuschließen.

5.5 Fanconi-Syndrom durch EHHADH_{mut} - Haploinsuffizienz vs. dominant negativer Effekt

Eine autosomal-dominant vererbte Genmutation kann in unterschiedlicher Weise zur phänotypischen Ausprägung einer Erkrankung führen. Zum einen durch Haploinsuffizienz, d.h. der heterozygote Träger erkrankt, weil die Aktivität des normalen Allels für die Compensation des mutierten Allels nicht ausreicht. Zum anderen kann es aber auch sein, dass das mutierte Genprodukt die Funktion des normalen stört, aufhebt oder eine ganz neue Wirkung besitzt. Dieses Phänomen wird als dominant-negativer Effekt bezeichnet.

Bei den Urinanalysen von L-PBE^{+/+}, L-PBE^{+/-} und L-PBE^{-/-} Mäusen zeigten sich sowohl in der Aminosäureausscheidung als auch in der Ausscheidung von Metaboliten des Energiestoffwechsels keinerlei relevante Unterschiede. Das Auftreten eines renalen Phänotyps des Fanconi-Syndroms mit Aminoazidurie und Glucosurie konnte ebenso wenig beobachtet werden wie Veränderungen in der Konzentration von Metaboliten des Energiestoffwechsels als Hinweise auf eine mitochondriale Zytopathie.

Eine Haploinsuffizienz scheint als Pathomechanismus auszuscheiden, da die heterozygoten L-PBE^{+/-}-Tiere weder im äußeren Erscheinungsbild noch radiologisch oder bei den Urinmessungen phänotypische Auffälligkeiten zeigten. Die Ergebnisse legen vielmehr nahe, dass auch ein völliges Fehlen von L-PBE bei den L-PBE^{-/-}-Tieren vom Organismus kompensiert werden kann. Somit scheint die Mutation im EHHADH-Gen am ehesten über einen dominant-negativen Effekt zur Entstehung eines Fanconi-Syndroms zu führen. Jedoch ist der kausale Zusammenhang zwischen dem Maltargeting von EHHADH_{mut} und einer mitochondrialen Zytopathie als Ursache für die Entstehung eines Fanconi-Syndroms noch nicht eindeutig belegt und muss erst durch weitere Untersuchungen v.a. zum oxidativen Stoffwechsel untermauert werden.

5.6 Ausblick

Im Anschluss an diese Arbeit wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. Warth Versuche an LLC-PK1-Zellen durchgeführt, bei denen die Expression von EHHADH_{wt} bzw. EHHADH_{mut} durch Zugabe von Tetrazyklin zum Zellmedium beliebig induziert werden kann. Dadurch konnten die Nachteile einer transienten Transfektion umgangen werden. Außerdem sind LLC-PK1-Zellen von proximalen Tubuluszellen abgeleitet und deswegen als Modell für die Erkrankung besonders geeignet. (Kleta *et al.*, 1995; Ciarimboli *et al.*, 2011)

Immunhistochemische Untersuchungen zeigten auch hier ein „Maltargeting“ von EHHADH_{mut} in die Mitochondrien. Morphologisch zeigten sich keinerlei Unterschiede zwischen LLC-PK1-Zellen, die mit EHHADH_{mut} bzw. EHHADH_{wt} transfiziert worden waren.

Respirometrische Untersuchungen an den induzierbaren LLC-PK1-Zellen zeigten jedoch eine reduzierte Aktivität der oxidativen Phosphorylierung und ein verminderter Ansprechen auf eine Stimulation der Atmungskette. Bei metabolischen Messungen kam es bei LLC-PK1_{mut}-Zellen zu einem schnelleren Verbrauch der Glucosevorräte und einem schnelleren Anstieg der Laktatkonzentration im Zellmedium. Die offensichtliche Steigerung der anaeroben Glykolyse zur Energiebereitstellung lässt auf eine Beeinträchtigung des oxidativen Stoffwechsels schließen. Das frühere Sterben der LLC-PK1_{mut}-Zellen im Vergleich zur LLC-PK1_{wt}-Kontrollgruppe könnte mit der schnelleren und höheren Akkumulation von Laktat und dem dadurch verursachten pH-Abfall durch die anaerobe Glykolyse zusammenhängen bzw. durch eine Anhäufung reaktiver Sauerstoffradikale entstehen (Broeker, 2011).

Die Beeinträchtigung der oxidativen Phosphorylierung der LLC-PK1_{mut}-Zellen lässt auf das Vorhandensein einer mitochondriale Funktionsstörung durch die falsche Lokalisation von EHHADH_{mut} schließen. Der genaue Mechanismus ist jedoch noch nicht ausreichend geklärt.

Da sehr wahrscheinlich nicht das Fehlen, sondern sehr viel mehr das Maltargeting von EHHADH_{mut} für die Krankheitsentstehung von Bedeutung ist, ist begonnen worden, eine EHHADH_{mut}-Knockin-Maus herzustellen, die die menschliche Erkrankung simulieren soll. Die L-PBE^{-/-}-Maus scheint als Modell nicht geeignet.

Die identische intrazelluläre Lokalisation von humanem und mausspezifischem EHHADH_{wt} bzw. EHHADH_{mut} wurde bereits in dieser Arbeit am HEK-Zellmodell überprüft. Inwieweit die histologischen und funktionellen Daten aus den *in vitro* Versuchen und Tiermodellen auch Gültigkeit für die menschliche Pathophysiologie haben, ist noch nicht vorherzusagen. Die in dieser Arbeit angefertigten Fluoreszenzfärbungen der humanen Niere mit Anti-EPS haben gezeigt, dass EHHADH auch beim Menschen in den Peroxisomen des proximalen Tubulus lokalisiert ist. Jedoch scheint es in der Physiologie

der humanen Niere eine bedeutendere Rolle zu spielen als in der Mausniere, da es hier nicht nur im spätproximalen S3-Segment, sondern im gesamten proximalen Tubulus exprimiert wird. Der Vergleich von Ausscheidungsprofilen von Fanconi-Syndrom-Patienten und EHHADH_{mut}-Knockin-Mäusen könnte ein erster Anhaltspunkt dafür sein, ob ein Rückschluss vom Tiermodell auf die menschliche Pathophysiologie möglich ist.

6. Zusammenfassung

Das renale Fanconi-Syndrom (Debré-de-Toni-Fanconi-Syndrom) beschreibt generell eine Funktionsstörung des proximalen Nierentubulus mit charakteristischen Symptomen wie Glukosurie, Aminoazidurie und Proteinurie. Die Erkrankung kann autosomal-dominant, autosomal-rezessiv oder x-chromosomal (Tolaymat *et al.*, 1992; Monnens *et al.*, 2008) auftreten, wobei auch mitochondriale Funktionsstörungen in der Pathogenese eine wichtige Rolle spielen (Wang *et al.*, 2000). Oft ist das renale Fanconi-Syndrom sogar die erste Manifestationsform einer mitochondrialen Zytopathie (Wendel *et al.*, 1995), da der proximale Tubulus als Hauptresortsort der Niere in hohem Maße auf eine adäquate Energiebereitsstellung in Form von ATP angewiesen ist. Diese wird zu mehr als 95% durch oxidative Phosphorylierung gedeckt (Epstein, 1997; Balaban *et al.*, 1980).

Bei der genetischen Untersuchung einer bereits 1991 durch Tolaymat et. al. klinisch beschriebenen afroamerikanischen Familie mit dominant vererbtem Fanconi-Syndrom (Tolaymat *et al.*, 1992) entdeckte Prof. Robert Kleta (Institut für Nephrologie am University College London) eine N-terminale Mutation im EHHADH-Gen (L-PBE-Gen). EHHADH (Enoyl-CoA-Hydrolase/3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase) bezeichnet ein bifunktionales Enzym der β-Oxidation und ist physiologischerweise in den Peroxisomen der Zelle lokalisiert.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass EHHADH sowohl in der humanen als auch in der Mausniere im proximalen Tubulus lokalisiert ist.

Die Mutation führte im Zellmodell zu einer Fehllokalisierung von EHHADH_{mut} in die Mitochondrien, so dass als Pathomechanismus eine mitochondriale Schädigung durch EHHADH_{mut} als Ursache für die Transportstörungen im proximalen Tubulus vermutet wurde. Elektronenmikroskopische Untersuchungen von transient mit EHHADH_{mut} transplantierten Zellen ergaben jedoch keine ausreichenden Hinweise auf eine mitochondriale Zytopathie.

L-PBE^{-/-}-Mäuse, die kein EHHADH exprimierten, zeigten im Vergleich zum Wildtyp (L-PBE^{+/+}) bzw. den heterozygoten L-PBE⁺⁻-Mäusen weder im Erscheinungsbild noch bei Urinuntersuchungen phänotypische Veränderungen im Sinne eines Fanconi-Syndroms. Es konnten weder Skelettveränderungen noch das typische Ausscheidungsprofil mit Aminoazidurie und Glucosurie nachgewiesen werden. Messungen von Metaboliten des Energiestoffwechsels („metabolic fingerprinting“) zeigten ebenfalls keine Unterschiede zwischen L-PBE^{-/-}-Mäusen und der Kontrollgruppe bestehend aus L-PBE^{+/+}- und L-PBE⁺⁻-Mäusen, insbesondere keine Hinweise auf eine mitochondriale Funktionsstörung bei den L-PBE^{-/-}-Tieren. Somit scheidet eine Haploinsuffizienz als genetischer Pathomechanismus der Erkrankung aus. Die Ergebnisse legen vielmehr nahe, dass die Mutation im EHHADH-

Gen über ein Maltargeting des Proteins in die Mitochondrien zur Entstehung eines Fanconi-Syndroms führt. Mitochondriale Defekte sind als Ursachen anderer Formen des Fanconi-Syndroms bereits vielfach beschrieben (Wang *et al.*, 2000; Niaudet, 1998; Niaudet *et al.*, 1994; Debray *et al.*, 2008). Jedoch ist der kausale Zusammenhang zwischen der Fehllokalisierung von EHHADH_{mut} und der Entstehung einer mitochondrialen Zytopathie noch nicht eindeutig belegt und muss erst durch weitere Untersuchungen v.a. zum oxidativen Stoffwechsel untermauert werden.

7. Literaturverzeichnis

1. Agne B, Meindl NM, Niederhoff K, Einwachter H, Rehling P, Sickmann A, Meyer HE, Girzalsky W, and Kunau WH (2003) Pex8p: an intraperoxisomal organizer of the peroxisomal import machinery. *Mol Cell*, **11**, 635-646.
2. Au KM, Lau SC, Mak YF, Lai WM, Chow TC, Chen ML, Chiu MC, and Chan AY (2007) Mitochondrial DNA deletion in a girl with Fanconi's syndrome. *Pediatr Nephrol*, **22**, 136-140.
3. Balaban RS, Mandel LJ, Soltoff SP, and Storey JM (1980) Coupling of active ion transport and aerobic respiratory rate in isolated renal tubules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 447-451.
4. Bando H, Hashimoto N, Hirota Y, Sakaguchi K, Hisa I, Inoue Y, Imanishi Y, Seino S, and Kaji H (2009) Severe hypophosphatemic osteomalacia with fanconi syndrome, renal tubular acidosis, vitamin D deficiency and primary biliary cirrhosis. *Intern Med*, **48**, 353-358.
5. Baum M (1998) The Fanconi syndrome of cystinosis: insights into the pathophysiology. *Pediatr Nephrol*, **12**, 492-497.
6. Baumgart E, Vanhooren JC, Fransen M, Marynen P, Puype M, Vandekerckhove J, Leunissen JA, Fahimi HD, Mannaerts GP, and Van Veldhoven PP (1996) Molecular characterization of the human peroxisomal branched-chain acyl-CoA oxidase: cDNA cloning, chromosomal assignment, tissue distribution, and evidence for the absence of the protein in Zellweger syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 13748-13753.
7. Beck JS, Breton S, Mairbaurl H, Laprade R, and Giebisch G (1991) Relationship between sodium transport and intracellular ATP in isolated perfused rabbit proximal convoluted tubule. *Am J Physiol*, **261**, F634-F639.
8. BEN ISHAY D, DREYFUSS F, and ULLMANN TD (1961) Fanconi syndrome with hypouricemia in an adult: family study. *Am J Med*, **31**, 793-800.
9. Bockenhauer D, Bokenkamp A, van't Hoff W, Levchenko E, Kist-van Holthe JE, Tasic V, and Ludwig M (2008) Renal phenotype in Lowe Syndrome: a selective proximal tubular dysfunction. *Clin J Am Soc Nephrol*, **3**, 1430-1436.
10. Brown LA and Baker A (2003) Peroxisome biogenesis and the role of protein import. *J Cell Mol Med*, **7**, 388-400.
11. Buemi M, Allegra A, Rotig A, Gubler MC, Aloisi C, Corica F, Pettinato G, Frisina N, and Niaudet P (1997) Renal failure from mitochondrial cytopathies. *Nephron*, **76**, 249-253.
12. Carsten Broeker. Untersuchungen zur Funktion des Fanconi-assoziierten Proteins (FAP). Diplomarbeit Biologie, Universität Regensburg. 2011.
13. Cetinkaya I, Schlatter E, Hirsch JR, Herter P, Harms E, and Kleta R (2002) Inhibition of Na⁽⁺⁾-dependent transporters in cystine-loaded human renal cells: electrophysiological studies on the Fanconi syndrome of cystinosis. *J Am Soc Nephrol*, **13**, 2085-2093.

14. Cho HY, Lee BH, Choi HJ, Ha IS, Choi Y, and Cheong HI (2008) Renal manifestations of Dent disease and Lowe syndrome. *Pediatr Nephrol*, **23**, 243-249.
15. Ciarimboli G, Holle SK, Vollenbrocker B, Hagos Y, Reuter S, Burckhardt G, Bierer S, Herrmann E, Pavenstadt H, Rossi R, Kleta R, and Schlatter E (2011) New clues for nephrotoxicity induced by ifosfamide: preferential renal uptake via the human organic cation transporter 2. *Mol Pharm*, **8**, 270-279.
16. Clarke BL, Wynne AG, Wilson DM, and Fitzpatrick LA (1995) Osteomalacia associated with adult Fanconi's syndrome: clinical and diagnostic features. *Clin Endocrinol (Oxf)*, **43**, 479-490.
17. Clayton DA (1992) Structure and function of the mitochondrial genome. *J Inherit Metab Dis*, **15**, 439-447.
18. Cui S, Guerriero CJ, Szalinski CM, Kinlough CL, Hughey RP, and Weisz OA (2010) OCRL1 function in renal epithelial membrane traffic. *Am J Physiol Renal Physiol*, **298**, F335-F345.
19. Dammai V and Subramani S (2001) The human peroxisomal targeting signal receptor, Pex5p, is translocated into the peroxisomal matrix and recycled to the cytosol. *Cell*, **105**, 187-196.
20. Danpure CJ (2006) Primary hyperoxaluria type 1: AGT mistargeting highlights the fundamental differences between the peroxisomal and mitochondrial protein import pathways. *Biochim Biophys Acta*, **1763**, 1776-1784.
21. Danpure CJ, Cooper PJ, Wise PJ, and Jennings PR (1989) An enzyme trafficking defect in two patients with primary hyperoxaluria type 1: peroxisomal alanine/glyoxylate aminotransferase rerouted to mitochondria. *J Cell Biol*, **108**, 1345-1352.
22. De Toni G. (1933) *Remarks on the relations between rickets (renal dwarfism) and renal diabetes*. *Acta Paediatrica*, **16**, 479-484.
23. Debray FG, Merouani A, Lambert M, Brochu P, Bernard C, Robinson BH, and Mitchell GA (2008) Acute tubular dysfunction with Fanconi syndrome: a new manifestation of mitochondrial cytopathies. *Am J Kidney Dis*, **51**, 691-696.
24. Debré R., Marie J., Cleret F., and Messimy R. (1934) *Rachitisme tardif coexistant avec une néphrite chronique et une glycosurie*. *Archives de médecine des enfants, Paris*, **37**, 597-606.
25. DeWan AT, Arnett DK, Atwood LD, Province MA, Lewis CE, Hunt SC, and Eckfeldt J (2001) A genome scan for renal function among hypertensives: the HyperGEN study. *Am J Hum Genet*, **68**, 136-144.
26. Di Cataldo A, Palumbo M, Pittala D, Renis M, Schiliro G, Russo A, Ragusa R, Mollica F, and Li VS (1999) Deletions in the mitochondrial DNA and decrease in the oxidative phosphorylation activity of children with Fanconi syndrome secondary to antiblastic therapy. *Am J Kidney Dis*, **34**, 98-106.
27. DiMauro S, Bonilla E, Lombes A, Shanske S, Minetti C, and Moraes CT (1990) Mitochondrial encephalomyopathies. *Neurol Clin*, **8**, 483-506.
28. Duchen MR (2004a) Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol Aspects Med*, **25**, 365-451.

-
29. Duchen MR (2004b) Roles of mitochondria in health and disease. *Diabetes*, **53 Suppl 1**, S96-102.
 30. Emma F, Bertini E, Salviati L, and Montini G (2011) Renal involvement in mitochondrial cytopathies. *Pediatr Nephrol*.
 31. Epstein FH (1997) Oxygen and renal metabolism. *Kidney Int*, **51**, 381-385.
 32. Fanconi G. (1936) *Der frühinfantile nephrotisch-glycosurische Zwergwuchs mit hypophosphatämischer Rachitis. Jahrbuch Kinderheilkunde*, **147**, 299-305.
 33. Fang Y, Morrell JC, Jones JM, and Gould SJ (2004) PEX3 functions as a PEX19 docking factor in the import of class I peroxisomal membrane proteins. *J Cell Biol*, **164**, 863-875.
 34. Faust PL, Kaye EM, and Powers JM (2010) Myelin lesions associated with lysosomal and peroxisomal disorders. *Expert Rev Neurother*, **10**, 1449-1466.
 35. Friedman AL, Trygstad CW, and Chesney RW (1978) Autosomal dominant Fanconi syndrome with early renal failure. *Am J Med Genet*, **2**, 225-232.
 36. Gahl WA, Thoene JG, and Schneider JA (2002) Cystinosis. *N Engl J Med*, **347**, 111-121.
 37. Geisbrecht BV, Collins CS, Reuber BE, and Gould SJ (1998) Disruption of a PEX1-PEX6 interaction is the most common cause of the neurologic disorders Zellweger syndrome, neonatal adrenoleukodystrophy, and infantile Refsum disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 8630-8635.
 38. Giles RE, Blanc H, Cann HM, and Wallace DC (1980) Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 6715-6719.
 39. Graf R, Gossrau R, Merker HJ, Schwabe R, Stahlmann R, and Nau H (1985) Enzyme cytochemistry combined with electron microscopy, pharmacokinetics, and clinical chemistry for the evaluation of the effects of steady-state valproic acid concentrations on the mouse. *Histochemistry*, **83**, 347-358.
 40. Hall AM and Unwin RJ (2007) The not so 'mighty chondrion': emergence of renal diseases due to mitochondrial dysfunction. *Nephron Physiol*, **105**, 1-10.
 41. Hashimoto T (1999) Peroxisomal beta-oxidation enzymes. *Neurochem Res*, **24**, 551-563.
 42. Hatefi Y (1985) The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu Rev Biochem*, **54**, 1015-1069.
 43. Hausler T, Stierhof YD, Wirtz E, and Clayton C (1996) Import of a DHFR hybrid protein into glycosomes in vivo is not inhibited by the folate-analogue aminopterin. *J Cell Biol*, **132**, 311-324.
 44. Hawkins J, Mahony D, Maetschke S, Wakabayashi M, Teasdale RD, and Boden M (2007) Identifying novel peroxisomal proteins. *Proteins*, **69**, 606-616.
 45. Hazra PP, Suriaprana I, Snyder WB, and Subramani S (2002) Peroxisome remnants in pex3delta cells and the requirement of Pex3p for interactions between the peroxisomal docking and translocation subcomplexes. *Traffic*, **3**, 560-574.

-
46. Hill K, Model K, Ryan MT, Dietmeier K, Martin F, Wagner R, and Pfanner N (1998) Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins [see comment]. *Nature*, **395**, 516-521.
 47. Hoefler G, Forstner M, McGuinness MC, Hull W, Hiden M, Krisper P, Kenner L, Ried T, Lengauer C, Zechner R, and . (1994) cDNA cloning of the human peroxisomal enoyl-CoA hydratase: 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase bifunctional enzyme and localization to chromosome 3q26.3-3q28: a free left Alu Arm is inserted in the 3' noncoding region. *Genomics*, **19**, 60-67.
 48. Irizarry-Alvarado JM, Dwyer JP, Brumble LM, Alvarez S, and Mendez JC (2009) Proximal tubular dysfunction associated with tenofovir and didanosine causing Fanconi syndrome and diabetes insipidus: a report of 3 cases. *AIDS Read*, **19**, 114-121.
 49. Ishii N, Hijikata M, Osumi T, and Hashimoto T (1987) Structural organization of the gene for rat enoyl-CoA hydratase:3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase bifunctional enzyme. *J Biol Chem*, **262**, 8144-8150.
 50. Izzedine H, Kheder-Elfekih R, Housset P, Sarkozy C, Brocheriou I, and Deray G (2009) Adefovir dipivoxil-induced acute tubular necrosis and Fanconi syndrome in a renal transplant patient. *AIDS*, **23**, 544-545.
 51. Izzedine H, Launay-Vacher V, Isnard-Bagnis C, and Deray G (2003) Drug-induced Fanconi's syndrome. *Am J Kidney Dis*, **41**, 292-309.
 52. Jezek P and Hlavata L (2005) Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol*, **37**, 2478-2503.
 53. Jia Y, Qi C, Zhang Z, Hashimoto T, Rao MS, Huyghe S, Suzuki Y, Van Veldhoven PP, Baes M, and Reddy JK (2003) Overexpression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha)-regulated genes in liver in the absence of peroxisome proliferation in mice deficient in both L- and D-forms of enoyl-CoA hydratase/dehydrogenase enzymes of peroxisomal beta-oxidation system. *J Biol Chem*, **278**, 47232-47239.
 54. Jones JM, Morrell JC, and Gould SJ (2004) PEX19 is a predominantly cytosolic chaperone and import receptor for class 1 peroxisomal membrane proteins. *J Cell Biol*, **164**, 57-67.
 55. Kaspar H, Dettmer K, Gronwald W, and Oefner PJ (2008) Automated GC-MS analysis of free amino acids in biological fluids. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **870**, 222-232.
 56. Kleta R, Mohrmann M, and Schlatter E (1995) Effects of cell differentiation on ion conductances and membrane voltage in LLC-PK1 cells. *Pflugers Arch*, **429**, 370-377.
 57. Koch A, Yoon Y, Bonekamp NA, McNiven MA, and Schrader M (2005) A role for Fis1 in both mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Mol Biol Cell*, **16**, 5077-5086.
 58. Kunkele KP, Heins S, Dembowski M, Nargang FE, Benz R, Thieffry M, Walz J, Lill R, Nussberger S, and Neupert W (1998) The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria. *Cell*, **93**, 1009-1019.

59. Laube GF, Shah V, Stewart VC, Hargreaves IP, Haq MR, Heales SJ, and van't Hoff WG (2006) Glutathione depletion and increased apoptosis rate in human cystinotic proximal tubular cells. *Pediatr Nephrol*, **21**, 503-509.
60. Lazarow PB (2003) Peroxisome biogenesis: advances and conundrums. *Curr Opin Cell Biol*, **15**, 489-497.
61. Leon S, Goodman JM, and Subramani S (2006a) Uniqueness of the mechanism of protein import into the peroxisome matrix: transport of folded, co-factor-bound and oligomeric proteins by shuttling receptors. *Biochim Biophys Acta*, **1763**, 1552-1564.
62. Leon S, Zhang L, McDonald WH, Yates J, III, Cregg JM, and Subramani S (2006b) Dynamics of the peroxisomal import cycle of PpPex20p: ubiquitin-dependent localization and regulation. *J Cell Biol*, **172**, 67-78.
63. Lichter-Konecki U, Broman KW, Blau EB, and Konecki DS (2001) Genetic and physical mapping of the locus for autosomal dominant renal Fanconi syndrome, on chromosome 15q15.3. *Am J Hum Genet*, **68**, 264-268.
64. Ludwig M, Utsch B, and Monnens LA (2006) Recent advances in understanding the clinical and genetic heterogeneity of Dent's disease. *Nephrol Dial Transplant*, **21**, 2708-2717.
65. Martin-Hernandez E, Garcia-Silva MT, Vara J, Campos Y, Cabello A, Muley R, Del Hoyo P, Martin MA, and Arenas J (2005) Renal pathology in children with mitochondrial diseases. *Pediatr Nephrol*, **20**, 1299-1305.
66. Mayer B and Oberbauer R (2003) Mitochondrial regulation of apoptosis. *News Physiol Sci*, **18**, 89-94.
67. McCune DJ, Mason HH, and Clarke HT (1943) Intractable hypophosphatemic rickets with renal glycosuria and acidosis (the Fanconi syndrome). *Am J Dis Child*, **65**, 81-146.
68. Miyata N and Fujiki Y (2005) Shuttling mechanism of peroxisome targeting signal type 1 receptor Pex5: ATP-independent import and ATP-dependent export. *Mol Cell Biol*, **25**, 10822-10832.
69. Model K, Meisinger C, Prinz T, Wiedemann N, Truscott KN, Pfanner N, and Ryan MT (2001) Multistep assembly of the protein import channel of the mitochondrial outer membrane. *Nat Struct Biol*, **8**, 361-370.
70. Moldovan L and Moldovan NI (2004) Oxygen free radicals and redox biology of organelles. *Histochem Cell Biol*, **122**, 395-412.
71. Monnens L and Levchenko E (2008) Evaluation of the proximal tubular function in hereditary renal Fanconi syndrome. *Nephrol Dial Transplant*, **23**, 2719-2722.
72. Nair DM, Purdue PE, and Lazarow PB (2004) Pex7p translocates in and out of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, **167**, 599-604.
73. Nelson M, Azwa A, Sokwala A, Harania RS, and Stebbing J (2008) Fanconi syndrome and lactic acidosis associated with stavudine and lamivudine therapy. *AIDS*, **22**, 1374-1376.

74. Nesterova G and Gahl W (2008) Nephropathic cystinosis: late complications of a multisystemic disease. *Pediatr Nephrol*, **23**, 863-878.
75. Niaudet P (1998) Mitochondrial disorders and the kidney. *Arch Dis Child*, **78**, 387-390.
76. Niaudet P, Heidet L, Munnich A, Schmitz J, Bouissou F, Gubler MC, and Rotig A (1994) Deletion of the mitochondrial DNA in a case of de Toni-Debre-Fanconi syndrome and Pearson syndrome. *Pediatr Nephrol*, **8**, 164-168.
77. Niaudet P and Rotig A (1997) The kidney in mitochondrial cytopathies. *Kidney Int*, **51**, 1000-1007.
78. Nissim I and Weinberg JM (1996) Glycine attenuates Fanconi syndrome induced by maleate or ifosfamide in rats. *Kidney Int*, **49**, 684-695.
79. Patrick A, Cameron JS, and Ogg CS (1981) A family with a dominant form of idiopathic Fanconi syndrome leading to renal failure in adult life. *Clin Nephrol*, **16**, 289-292.
80. Petty RK, Harding AE, and Morgan-Hughes JA (1986) The clinical features of mitochondrial myopathy. *Brain*, **109** (Pt 5), 915-938.
81. Qi C, Zhu Y, Pan J, Usuda N, Maeda N, Yeldandi AV, Rao MS, Hashimoto T, and Reddy JK (1999) Absence of spontaneous peroxisome proliferation in enoyl-CoA Hydratase/L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase-deficient mouse liver. Further support for the role of fatty acyl CoA oxidase in PPARalpha ligand metabolism. *J Biol Chem*, **274**, 15775-15780.
82. Reddy JK and Hashimoto T (2001) Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annu Rev Nutr*, **21**, 193-230.
83. Reddy JK and Lalwai ND (1983) Carcinogenesis by hepatic peroxisome proliferators: evaluation of the risk of hypolipidemic drugs and industrial plasticizers to humans. *Crit Rev Toxicol*, **12**, 1-58.
84. Reddy JK and Mannaerts GP (1994) Peroxisomal lipid metabolism. *Annu Rev Nutr*, **14**, 343-370.
85. Rehling P, Marzioch M, Niesen F, Wittke E, Veenhuis M, and Kunau WH (1996) The import receptor for the peroxisomal targeting signal 2 (PTS2) in *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by the *PAS7* gene. *EMBO J*, **15**, 2901-2913.
86. Roth KS, Carter BE, and Higgins ES (1991) Succinylacetone effects on renal tubular phosphate metabolism: a model for experimental renal Fanconi syndrome. *Proc Soc Exp Biol Med*, **196**, 428-431.
87. Santer R, Schneppenheim R, Suter D, Schaub J, and Steinmann B (1998) Fanconi-Bickel syndrome--the original patient and his natural history, historical steps leading to the primary defect, and a review of the literature. *Eur J Pediatr*, **157**, 783-797.
88. Schrader M and Yoon Y (2007) Mitochondria and peroxisomes: are the 'big brother' and the 'little sister' closer than assumed? *Bioessays*, **29**, 1105-1114.

89. Simmons CF, Jr., Bogusky RT, and Humes HD (1980) Inhibitory effects of gentamicin on renal mitochondrial oxidative phosphorylation. *J Pharmacol Exp Ther*, **214**, 709-715.
90. Smolens P, Barnes JL, and Stein JH (1986) Effect of chronic administration of different Bence Jones proteins on rat kidney. *Kidney Int*, **30**, 874-882.
91. Stein K, Schell-Steven A, Erdmann R, and Rottensteiner H (2002) Interactions of Pex7p and Pex18p/Pex21p with the peroxisomal docking machinery: implications for the first steps in PTS2 protein import. *Mol Cell Biol*, **22**, 6056-6069.
92. Takebayashi S, Jimi S, Segawa M, and Takaki A (2003) Mitochondrial DNA deletion of proximal tubules is the result of itai-itai disease. *Clin Exp Nephrol*, **7**, 18-26.
93. Tolaymat A, Sakarcan A, and Neiberger R (1992) Idiopathic Fanconi syndrome in a family. Part I. Clinical aspects. *J Am Soc Nephrol*, **2**, 1310-1317.
94. Town M, Jean G, Cherqui S, Attard M, Forestier L, Whitmore SA, Callen DF, Gribouval O, Broyer M, Bates GP, van't Hoff W, and Antignac C (1998) A novel gene encoding an integral membrane protein is mutated in nephropathic cystinosis. *Nat Genet*, **18**, 319-324.
95. Tyni T and Pihko H (1999) Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Acta Paediatr*, **88**, 237-245.
96. van Wilpe S, Ryan MT, Hill K, Maarse AC, Meisinger C, Brix J, Dekker PJ, Moczko M, Wagner R, Meijer M, Guiard B, Honlinger A, and Pfanner N (1999) Tom22 is a multifunctional organizer of the mitochondrial preprotein translocase. *Nature*, **401**, 485-489.
97. Vega RB, Huss JM, and Kelly DP (2000) The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol Cell Biol*, **20**, 1868-1876.
98. von Kleist-Retzow JC, Cormier-Daire V, Viot G, Goldenberg A, Mardach B, Amiel J, Saada P, Dumez Y, Brunelle F, Saudubray JM, Chretien D, Rotig A, Rustin P, Munnich A, and De LP (2003) Antenatal manifestations of mitochondrial respiratory chain deficiency. *J Pediatr*, **143**, 208-212.
99. Wanders RJ, Vreken P, Ferdinandusse S, Jansen GA, Waterham HR, van Roermund CW, and Van Grunsven EG (2001) Peroxisomal fatty acid alpha- and beta-oxidation in humans: enzymology, peroxisomal metabolite transporters and peroxisomal diseases. *Biochem Soc Trans*, **29**, 250-267.
100. Wang LC, Lee WT, Tsai WY, Tsau YK, and Shen YZ (2000) Mitochondrial cytopathy combined with Fanconi's syndrome. *Pediatr Neurol*, **22**, 403-406.
101. Wen SF, Friedman AL, and Oberley TD (1989) Two case studies from a family with primary Fanconi syndrome. *Am J Kidney Dis*, **13**, 240-246.
102. Wendel U, Ruitenbeek W, Bentlage HA, Sengers RC, and Trijbels JM (1995) Neonatal De Toni-Debre-Fanconi syndrome due to a defect in complex III of the respiratory chain. *Eur J Pediatr*, **154**, 915-918.

-
103. Wiedemann N, Frazier AE, and Pfanner N (2004) The protein import machinery of mitochondria. *J Biol Chem*, **279**, 14473-14476.
 104. Wiedemann N, Kozjak V, Chacinska A, Schonfisch B, Rospert S, Ryan MT, Pfanner N, and Meisinger C (2003) Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane. *Nature*, **424**, 565-571.
 105. Wierzbicki AS (2007) Peroxisomal disorders affecting phytanic acid alpha-oxidation: a review. *Biochem Soc Trans*, **35**, 881-886.
 106. Wu LG (2004) Kinetic regulation of vesicle endocytosis at synapses. *Trends Neurosci*, **27**, 548-554.
 107. Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelman G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, and Spiegelman BM (1999) Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*, **98**, 115-124.
 108. Yeh CS, Wang JY, Cheng TL, Juan CH, Wu CH, and Lin SR (2006) Fatty acid metabolism pathway play an important role in carcinogenesis of human colorectal cancers by Microarray-Bioinformatics analysis. *Cancer Lett*, **233**, 297-308.
 109. Zeviani M and Di Donato S (2004) Mitochondrial disorders. *Brain*, **127**, 2153-2172.
 110. Zhang JW and Lazarow PB (1996) Peb1p (Pas7p) is an intraperoxisomal receptor for the NH₂-terminal, type 2, peroxisomal targeting sequence of thiolase: Peb1p itself is targeted to peroxisomes by an NH₂-terminal peptide. *J Cell Biol*, **132**, 325-334.

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Bau eines Nephrons	3
Abb. 2: Längsschnitt durch die rechte Niere von dorsal	5
Abb. 3: Querschnitt durch den proximalen Tubulus.....	6
Abb. 4: Mitochondrien im Querschnitt:	8
Abb. 5: Aufbau der ATP-Synthase.	11
Abb. 6: Schematische Darstellung der fünf Komplexe der oxidativen Phosphorylierung .	11
Abb. 7: Abbau geradzahliger Fettsäuren durch β -Oxidation	15
Abb. 8: Skelettveränderungen einer 12-jährigen Patientin mit Fanconi-Syndrom	17
Abb. 9: Stammbaum der afroamerikanischen Familie mit dominant vererbtem Fanconi-Syndrom	23
Abb. 10: Generierung des L-PBE ^{-/-} -Genkonstrukts.....	31
Abb. 11: Darstellung der verwendeten Plasmide.....	36
Abb. 12: Grundprinzip der Fluoreszenzmikroskopie	38
Abb. 13: Phänotyp einer L-PBE ^{+/+} - und einer L-PBE ^{-/-} -Maus	42
Abb. 14: Röntgenaufnahmen einer L-PBE ^{+/+} - und einer L-PBE ^{-/-} -Maus.	42
Abb. 15: Antikörpertestung auf mit hEHHADH _{wt} transient transfizierten CHO-Zellen.....	44
Abb. 16: Expression von EHHADH in der Niere einer L-PBE ^{+/+} -Maus	47
Abb. 17: Keine Expression von EHHADH in der Niere einer L-PBE ^{-/-} -Maus	48
Abb. 18: Expression von EHHADH in der humanen Niere.	49
Abb. 19: Voraussage der subzellulären Lokalisation von EHHADH _{wt} und EHHADH _{mut} durch das Programm „protein prowler“.	50
Abb. 20: Lokalisation von hEHHADH _{wt} in transient transfizierten COS7-Zellen	52
Abb. 21: Lokalisation von hEHHADH _{mut} in transient transfizierten COS7-Zellen.....	53
Abb. 22: Lokalisation von mEHHADH _{wt} in transient transfizierten HEK-Zellen	54
Abb. 23: Lokalisation von mEHHADH _{mut} in transient transfizierten HEK-Zellen	55
Abb. 24: Elektronenmikroskopische Untersuchung der Mitochondrien in transfizierten HEK-Zellen	58
Abb. 25: Aminosäureausscheidung im Urin v. L-PBE ^{+/+} /L-PBE ^{+/-} - und L-PBE ^{-/-} -Mäusen .	61
Abb. 26: „Metabolic fingerprinting“ aus Urinproben v. L-PBE ^{+/+} -/L-PBE ^{+/-} - und L-PBE ^{-/-} -Mäusen.....	63
Abb. 27: Kooperation zwischen Mitochondrien und Peroxisomen	66
Abb. 28: Aminosäureabfolge von EHHADH	68
Abb. 29: Vergleich der N-terminalen Aminosäuresequenz von EHHADH _{wt} und EHHADH _{mut}	69
Abb. 30: Schematische Darstellung des Proteinimports ins Mitochondrium	70

9. Abkürzungsverzeichnis

A. / Aa.	Arteria / Arteriae
ADP	Adenosindiphosphat
Ak	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	complementary DANN
CTP	Cytidintriphosphat
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
D-PBE	D-peroxisomal bifunctional enzyme
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EHHADH	Enoyl-CoA-Hydrolase/3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase
ES	embryonale Stammzellen
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GTP	Guanosintriphosphat
kb	Kilobasen
L-PBE	L-peroxisomal bifunctional enzyme
mRNA	messenger RNA
mtDNA	mitochondriale DNA
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
PPAR	peroxisome proliferator activated receptor
Q	Ubiquinon
RNA	Ribonukleinsäure
RR	Riva Rocci (Blutdruck)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
tRNA	Transfer - RNA
UTP	Uridintriphosphat
V. / Vv.	Vena / Venae

