

Mitochondriopathien als Ursache des renalen Fanconi-Syndroms

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN
(DR. RER. NAT.) DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III
– BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG



vorgelegt von
Carsten Broeker aus Ingolstadt
im Jahr 2014

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von April 2011 bis Oktober 2014 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. Richard Warth am Lehrstuhl für Medizinische Zellbiologie/Institut für Physiologie der Universität Regensburg.

Promotionsgesuch eingereicht am: 14.11.2014

Die Arbeit wurde angeleitet von: Herr Prof. Dr. med. Richard Warth

Prüfungsausschuss:	Frau Prof. Dr. Charlotte Wagner	(Vorsitzende)
	Herr Prof. Dr. Richard Warth	(1. Gutachter/Prüfer)
	Herr Prof. Dr. Dr. Michael Krahn	(2. Gutachter/Prüfer)
	Herr Prof. Dr. Frank Schweda	(3. Prüfer)
	Herr Prof. Dr. Reinhard Sterner	(Ersatzprüfer)

Unterschrift

(Carsten Broeker)

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
1.1 Die Niere.....	1
1.2 Der proximale Tubulus	1
1.3 Aufbau und Funktion der Mitochondrien	3
1.3.1 Die mitochondriale β -Oxidation	3
1.3.2 Citratzyklus.....	4
1.3.3 Oxidative Phosphorylierung	4
1.4 Renales Fanconi-Syndrom	5
1.5 Expression und Funktion von EHHADH	8
1.5 Expression und Funktion des Fanconi-assoziierten Proteins 2	12
2. Zielsetzung	14
3. Material und Methoden	15
3.1 Material	15
3.1.1 Geräte.....	15
3.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	15
3.1.3 Chemikalien	16
3.1.4 Enzyme & Kits.....	17
3.1.5 Antikörper	18
3.1.6 Puffer und Lösungen	18
3.1.7 Zellmedien.....	20
3.2 Methoden.....	22
3.2.1 Zellkultur	22
3.2.2 (Immun-)Histochemische Färbemethoden	22
3.2.3 Methoden zur Charakterisierung der EHHADH-Mutation	24
3.2.4 Methoden zur Charakterisierung der FAP2-Expression	26
3.2.5 Mikroskopie.....	30
3.2.6 Statistik.....	31

4. Ergebnisse	32
4.1 Untersuchungen zur Pathophysiologie des EHHADH _{MUT} -assoziierten Fanconi-Syndroms....	32
4.1.1 Untersuchung der Peroxisomenverteilung in der humanen Niere.....	32
4.1.2 Untersuchung der intramitochondrialen Lokalisierung mittels ReAsH-Färbung	34
4.1.3 Untersuchung der Transportkapazität	36
4.2 Untersuchungen zur Pathophysiologie von FAP2 _{MUT}	38
4.2.1 FAP2-Expression in humanem und murinem Gewebe	38
4.2.2 Untersuchungen am FAP2-Zellmodell.....	41
4.2.3 Funktionelle Untersuchung der FAP2-Zellen	48
4.2.4 Histologische Untersuchung einer Patientenbiopsie	50
5. Diskussion	58
5.1 EHHADH _{MUT} -Mistargeting als Ursache eines renalen Fanconi-Syndroms	58
5.2 Charakterisierung einer FAP2-Mutation	61
5.2.1 Lokalisation und intramitochondriale Verteilung von FAP2	61
5.2.2 Charakterisierung des FAP2-knockouts.....	63
5.2.3 Funktionelle Untersuchung des Zellmodells	63
5.2.4 Mögliche Pathomechanismen.....	64
5.3 Mitochondriale Beteiligung am renalen Fanconi-Syndrom	67
6. Zusammenfassung.....	69
7. Literaturverzeichnis	71
8. Anhang	78
8.1 Kongressbeiträge.....	78
8.2 Publikationen	78
8.2.1 Veröffentlichte Publikationen	78
8.2.2 Eingereichte Publikationen	79
8.3 Eidesstattliche Erklärung.....	80
9. Danksagung	81

1. Einleitung

1.1 Die Niere

Die Niere spielt eine zentrale Rolle bei verschiedenen Prozessen im menschlichen Körper, etwa der Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalts, der Säure-/Basen-Homöostase, der Blutdruckregulation, der Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen und der Produktion von Hormonen wie Renin und Erythropoetin.

Die Nieren sind paarig angelegte Organe, die retroperitoneal liegen. Makroskopisch besteht die Niere aus dem Cortex, der Medulla und der Papille und ist von einer Kapsel aus Bindegewebe umgeben. Die funktionelle Einheit der Niere ist das Nephron, das sich aus dem Glomerulus und dem anschließenden Tubulussystem zusammensetzt. Dabei kommt dem Glomerulus die Funktion eines Filters zu, durch den 20% des renalen Plasmaflusses filtriert werden. Der glomeruläre Filter besteht aus dem fenestrierten Endothel der Kapillarschlingen, einer dreischichtigen Basalmembran sowie der Schlitzmembran zwischen den Fußfortsätzen der Podozyten. Die Schlitzmembran ist mit einer negativ geladenen Glykokalix ausgekleidet, die dafür sorgt, dass Anionen den Filter schlechter passieren können als positiv geladene Teilchen. Zudem wird die Filtrierbarkeit eines Stoffes von seiner Größe bestimmt. Stoffe mit einer Größe bis 6 kDa sind dabei frei filtrierbar, während die Filtrierbarkeit bis etwa 50-60 kDa stetig abnimmt.

1.2 Der proximale Tubulus

An den Glomerulus schließt sich der proximale Tubulus an. In diesem Tubulussegment findet der Massentransport statt. Das heißt, dass hier der Großteil der Resorption stattfindet. Konkret bedeutet dies etwa 70% des filtrierten Wassers und NaCl, 80% des filtrierten Bikarbonats, 60-80% des Phosphats und 100% der filtrierten Glucose, der niedermolekularen Proteine und der Aminosäuren. Die Transportmechanismen im proximalen Tubulus sind maßgeblich vom Na^+ -Gradienten abhängig, der zwischen Tubuluslumen und Zytoplasma besteht. Dabei muss die intrazelluläre Na^+ -Konzentration konstant niedrig gehalten werden. Dies wird durch die basolateral gelegene Na^+/K^+ -ATPase bewerkstelligt, die Na^+ und K^+ entgegen ihrer jeweiligen Konzentrationsgradienten im Verhältnis 3:2 unter ATP-Verbrauch im Antiport über die Zellmembran pumpt. Da die Na^+/K^+ -ATPase keinen elektroneutralen Transporter darstellt, trägt sie zudem mit etwa 10 mV zum Membranpotential bei, generiert also zusätzlich zum chemischen auch einen elektrischen Gradienten. Die Energie in der Form von ATP, die dafür erforderlich ist, wird zum größten Teil in den Mitochondrien gebildet. 95% des gebildeten ATP wird dabei für die Aufrechterhaltung der Na^+/K^+ -ATPase-Funktion verwendet [1;2]. Eine Beeinträchtigung der Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität hat schwerwiegende Auswirkungen auf die Funktion des proximalen Tubulus [3].

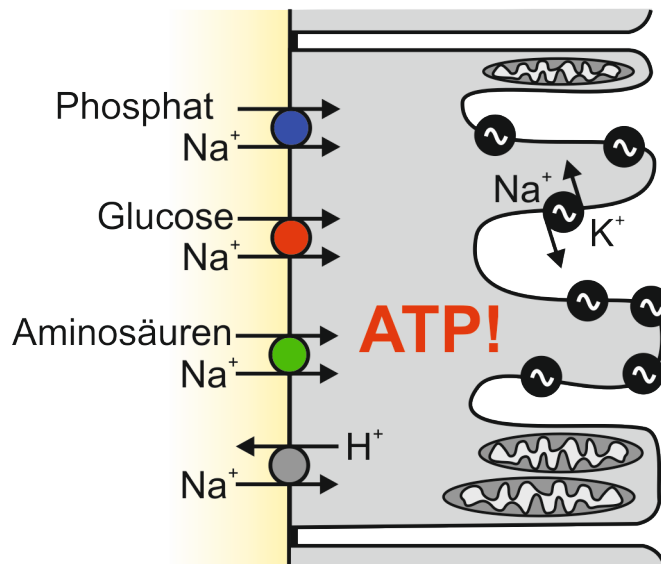
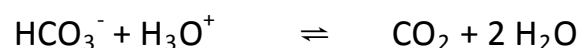


Abb. 1: Schematische Darstellung einer Zelle des proximalen Tubulus

Die konstant niedrige Na^+ -Konzentration ist vor allem deshalb wichtig, da viele Transportprozesse über sekundär aktive Transporter ablaufen, die Na^+ -gekoppelt sind. Dies gilt beispielsweise für die Na^+ -Glucose-Cotransporter SGLT1 und SGLT2 [4;5], die Na^+ -Phosphat-Cotransporter NaPi2a und NaPi2c [6], den Na^+ -Protonen-Austauscher NHE3 oder verschiedene Aminosäure-Transporter wie den EAAT3 [7;8] oder $\text{B}^0\text{AT1}$ [9;10]. NHE3 ist dabei derjenige Transporter, über den der größte Anteil an Na^+ resorbiert wird. Das dabei aus dem Zytoplasma transportierte Proton reagiert im Lumen, katalysiert von der membranständigen Carboanhydrase IV, mit Bikarbonat zu H_2O und CO_2 . Aufgrund seiner Lipophilie kann CO_2 nun über die Zellmembran diffundieren. In der Zelle läuft die entgegengesetzte Reaktion ab, katalysiert von der Carboanhydrase II. Das dabei entstehende Proton kann wieder vom NHE3 für den Antiport mit Na^+ genutzt werden.



Zudem wird im proximalen Tubulus Wasser überwiegend parazellulär entlang des osmotischen Gradienten resorbiert. Das Wasser zieht dabei Ionen mit, was man als „solvent drag“ bezeichnet.

Im proximalen Tubulus finden jedoch nicht nur Resorptionsprozesse statt. Hier werden auch Stoffe aus dem Blut in das Lumen sezerniert. Dazu gehören unter anderem organische Anionen und Kationen sowie Medikamente. Weiterhin wird in diesem Segment die aktive Form von Vitamin D3 gebildet und sezerniert.

Der hohe Energieaufwand, der für die Aufrechterhaltung der transzellulären Resorption erforderlich ist, führt zu einer charakteristischen Zellmorphologie. Proximale Tubuluszellen verfügen über eine Vielzahl von Einfaltungen an der basolateralen Seite, in denen palisadenartig die Mitochondrien liegen. Damit ist eine räumliche Nähe von ATP-Produktion in den Mitochondrien und ATP-Verbrauch durch die Na^+/K^+ -ATPase gewährleistet.

1.3 Aufbau und Funktion der Mitochondrien

Mitochondrien sind von einer Doppelmembran umgebene hochdynamische Zellorganellen, die über ihr eigenes Genom verfügen [11] und an einer Vielzahl zellulärer Vorgänge beteiligt sind. In ihnen läuft unter anderem der Citratzyklus ab, ein Teil der β -Oxidation sowie einige Schritte der Steroidbiosynthese. Des Weiteren dienen sie als Ca^{2+} -Speicher und spielen eine Rolle bei der Apoptose.

1.3.1 Die mitochondriale β -Oxidation

In den Mitochondrien werden mittlere und kurzkettige Fettsäuren in der mitochondrialen β -Oxidation zu Acetyl-CoA abgebaut. Dabei entstehen Reduktionsäquivalente in Form von FADH_2 und NADH/H^+ , die unter anderem in der Atmungskette wieder oxidiert werden. Fettsäuren liegen im Plasma hauptsächlich an Glycerin gebunden als Triacylglycerine vor, die vor ihrem Transport in die Mitochondrien hydrolysiert werden müssen. Die freien Fettsäuren können dann an Carnitin gebunden über Carnitin-Acyl-Transferasen in die Matrix transportiert werden, wo der eigentliche Abbau stattfindet. Dieser läuft dabei immer nach dem gleichen Schema ab, nämlich Oxidation, Dehydrierung, Oxidation, Thiolyse. Dadurch werden die Fettsäuren bei jedem Reaktionszyklus um zwei C-Atome verkürzt, bis sie vollständig abgebaut sind (Abb.2).

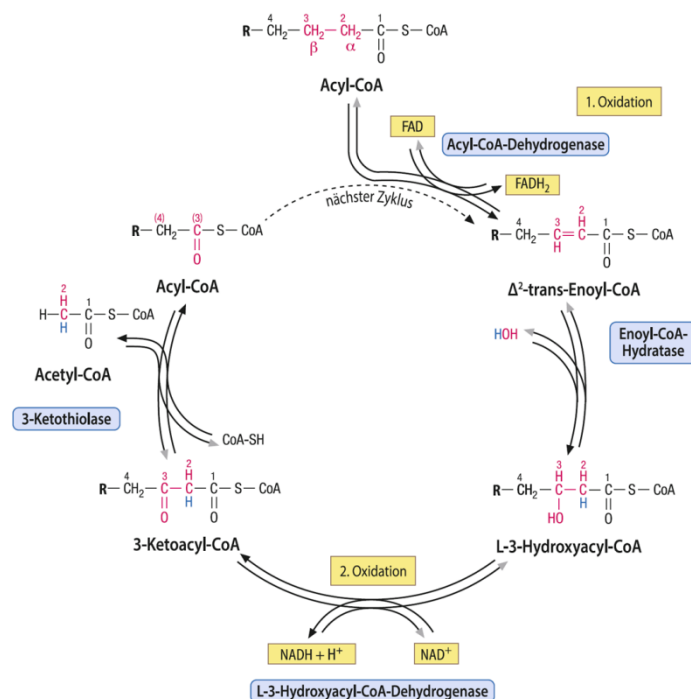


Abb. 2: Einzelreaktionen der β -Oxidation geradzahliger Fettsäuren (aus: Löffler, Petrides; Biochemie & Pathobiochemie; 9. Auflage 2014)

Je nach Länge der abzubauenen Fettsäure sind verschiedene Enzyme an der mitochondrialen β -Oxidation beteiligt. Die langkettigen Fettsäuren werden zunächst von long chain acyl-CoA-Dehydrogenasen (LCADH) oxidiert. Die Dehydrierung, der zweite Oxidationsschritt und die

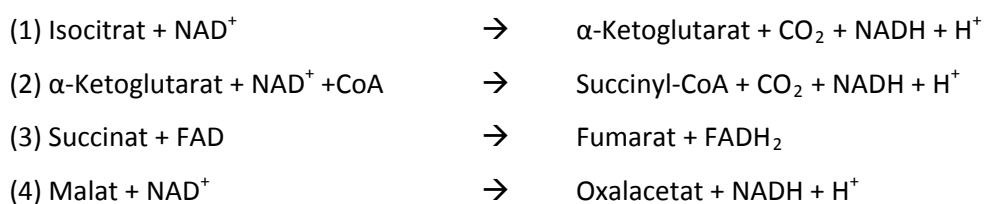
abschließende Thiolyse werden dann von einem Heterooktamer katalysiert, dem sogenannten mitochondrialen trifunktionellen Protein (MTP). Das MTP setzt sich aus zwei Untereinheiten zusammen, der Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase A (HADHA) und der Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase B (HADHB). Nach zwei bis drei Oxidationszyklen werden die verkürzten Fettsäuren von weiteren Enzymen vollständig abgebaut.

Dieser Vorgang ist im proximalen Tubulus von besonderer Bedeutung, da diese Zellen ihre Energie zum Großteil aus dem Abbau von Fettsäuren gewinnen [12]. Dies ist insofern bemerkenswert, da in der Niere die gesamte filtrierte Glucose in diesem Tubulussegment resorbiert wird. Dennoch findet hier keine Glykolyse statt, es wird im Gegenteil sogar noch Glucose über die Gluconeogenese neu gebildet [13-15].

1.3.2 Citratzyklus

Im Citratzyklus wird Acetyl-CoA, welches beim Abbau von Glucose, Fettsäuren und Aminosäuren entsteht, komplett abgebaut zu CO_2 , GTP und den Reduktionsäquivalenten NADH/H^+ und FADH_2 .

NADH/H^+ und FADH_2 dienen dabei als Elektronenüberträger, die ihre Elektronen in die Atmungskette einspeisen und damit den Austritt von Protonen aus der Matrix antreiben. Dies geschieht in den folgenden Reaktionen:



Reaktion (3) wird von der Succinat-Dehydrogenase katalysiert, die als Komplex II ebenfalls an der Atmungskette beteiligt ist. FADH_2 , welches hier generiert wird, verlässt den Enzymkomplex nicht, sondern die Elektronen werden direkt vom „electron transferring flavoprotein“ (ETF) in die Atmungskette eingeschleust [16].

1.3.3 Oxidative Phosphorylierung

Die wichtigste Aufgabe der Mitochondrien ist die Bereitstellung von Energie in Form von ATP. Dies geschieht in der oxidativen Phosphorylierung. Hierbei wird ein elektrochemisches oder chemiosmotisches Potential, welches über die innere Membran aufgebaut wird, genutzt, um die ATP-Synthase anzutreiben. Die Potentialdifferenz von etwa 180-200 mV entsteht dabei durch den Protonenefflux aus der Matrix in den Intermembranraum und der damit einhergehenden Akkumulation positiver Ladung im Intermembranraum (Abb. 3).

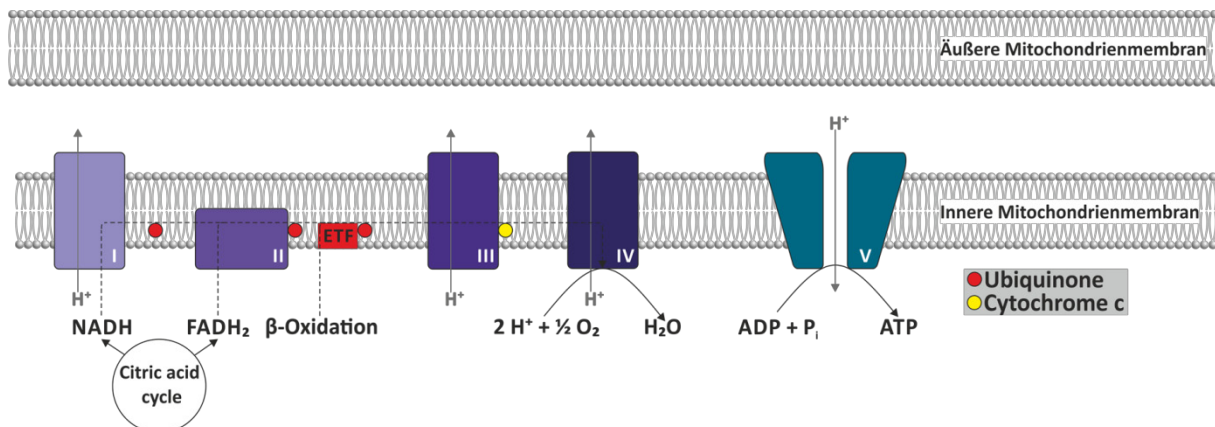


Abb. 3: Schematische Darstellung der Atmungskette

Die Protonen werden von Komplex I, III und IV aus der Matrix befördert und treiben bei ihrem Wiedereintritt in die Matrix die ATP-Synthase (Komplex V) an, was die Synthese von ATP ermöglicht.

Die Elektronen, die über Komplex I und II in die Atmungskette eingebracht werden, werden in Komplex IV genutzt, um O_2 zu H_2O zu reduzieren. Dies erklärt auch, warum gerade in den corticalen Nephronabschnitten wie dem proximalen und distalen Tubulus die Mitochondriendichte am höchsten ist, da hier die Nierenperfusion und damit auch die Sauerstoffzufuhr am größten ist.

Mitochondriale Defekte werden seit einiger Zeit auch mit renalen Erkrankungen in Verbindung gebracht [17-21]. Eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Atmungskette macht sich besonders in den Geweben bemerkbar, die auf eine konstant hohe Energieversorgung angewiesen sind, wie Skelett- und Herzmuskelzellen, Zellen des zentralen Nervensystems oder auch proximale und distale Tubuli des Nephrons [20;22;23]. Eine Störung der Mitochondrienfunktion kann daher zu Störungen des zentralen Nervensystems, zu Optikusatrophie, Ophthalmoplegie, Herzrhythmusstörungen, Muskelschwäche und Nierenfunktionsstörungen führen [24;25].

Im proximalen Tubulus ist die konstante Bereitstellung von Energie in Form von ATP zwingend erforderlich, um den transzellulären Transport aufrechtzuerhalten. Der Bedarf an ATP wird dabei zu 95% über die oxidative Phosphorylierung gedeckt [1;2;26]. Zudem liegt der ATP-Verbrauch nahe an der maximalen Kapazität der ATP-Generierung, da eine Stimulation der apikalen Na^+ -Aufnahme zu einem schnellen Abfall der intrazellulären ATP-Konzentration führt [3]. Daher ist es naheliegend, dass eine Störung der oxidativen Phosphorylierung mit einem renalen Verlust von Stoffen wie Glucose, Aminosäuren oder niedermolekularen Proteinen einhergeht, wie er bei Patienten mit renalem Fanconi-Syndrom zu beobachten ist.

1.4 Renales Fanconi-Syndrom

Als renales Fanconi-Syndrom bezeichnet man eine Reihe von Symptomen wie den renalen Verlust von Glucose, Phosphat, Bikarbonat und Aminosäuren. Dieses Krankheitsbild wurde zum ersten Mal 1924 von Lignac beschrieben [27] und in den dreißiger Jahren von Debré, de Toni und Fanconi näher

charakterisiert [28-30]. Die Bezeichnung Debré-de Toni-Fanconi-Syndrom oder kurz Fanconi-Syndrom wurde zum ersten Mal 1943 verwendet [31]. Mittlerweile definiert man das Fanconi-Syndrom als generelle Funktionsstörung des proximalen Tubulus mit einem einhergehenden renalen Verlust von Glucose, Phosphat, Bikarbonat, Aminosäuren und niedermolekularen Proteinen. Besonders schwerwiegend ist hierbei die vermehrte Ausscheidung von Phosphat, da dies zu einer verzögerten Mineralisierung bzw. einer Entmineralisierung der Knochen führt, was sich bei Kindern als Minderwuchs und Vitamin D-resistente Rachitis, bei Erwachsenen als Osteomalazie und Osteoporose manifestiert. Glucosurie und Proteinurie haben hingegen in der Regel keine gravierenden klinischen Auswirkungen. Bei Patienten, die in Folge einer Zystinose ein Fanconi-Syndrom entwickeln, kann es im Verlauf der Erkrankung zum terminalen Nierenversagen kommen [32;33].

Die Ursachen für Fanconi-Syndrom sind vielfältig. Ein renales Fanconi-Syndrom kann etwa eine Nebenwirkung von antiretroviraler Medikation wie Tenofovir oder Adenovir sein. Ebenso ist das Fanconi-Syndrom als Nebenwirkung des Wirkstoffes Valproat beschrieben, das als Antiepileptikum verwendet wird. Während man diese Formen des Fanconi-Syndroms als sekundär bezeichnet, kann es auch in Folge von erblichen Erkrankungen zur Ausprägung eines renalen Fanconi-Syndroms kommen. Zudem wird bereits länger vermutet, dass Mitochondriopathien an der Entstehung eines Fanconi-Syndroms beteiligt sind [17-21].

Gen. Erkrankung	Gendefekt/Mapping	Protein/Pathomechanismus	OMIM
Autosomal rezessiv			
Zystinose <ul style="list-style-type: none"> • Infantil [32] • Juvenil [33-35] 	CTNS Chr. 17p13	Zystinosin-Defekt	#219800 #219900
Hereditäre Fructose-Intoleranz [36]	ALDOB Chr.9q22.3	Aldolase B-Mangel	#229600
Galaktosämie [37]	GALT Chr. 9p13	Galaktokinase (Gal-1-P-Uridyltransferase)-Mangel	#230400
Tyrosinämie [38;39]	FAH Chr. 15q23-25	Fumarylacetoacetat-Hydrolase-Defekt	#276700
Morbus Wilson [40]	ATP7B Chr. 13q14.3-21.1	Membranprotein (ATPase) für den Kupfertransport (β-Polypeptid)	#277900
Fanconi-Bickel-Syndrom [41;42]	SLC2A2 Chr. 3q26.1-26.3	GLUT2 Glucosetransporter	#227810
Vit. D-abhängige Rachitis <ul style="list-style-type: none"> • Typ 1 [43] • Typ 2 [44] 	CYP27B1 12q13.1-13.3 12q12-14	1α-Hydrolase-Defekt Vit. D-Rezeptor-Defekt	#264700 #277440
X-chromosomal rezessiv			
Lowe-Syndrom (Okulozerebro-renales Syndrom) [45]	OCRL1 Chr. Xq26.1	Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat-5-Phosphatase	#309000
Dent's Disease 1 [46;47]	CLCN5 Chr. Xp11.22	Chloridkanal-Defekt	#300009
Dent's Disease 2 [48]	OCRL1 Chr. Xq26.1	Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat-5-Phosphatase	#300555
Mitochondriendefekte			
Komplex III-Mangel [49;50]	UQCRB, UQCRO, BCS1L 8q22, 5q31.1, 2q33	Cytochrom c Reduktase-Mangel	#124000
Komplex IV-Mangel [51;52]	MTCO1-3, MTTS1, MTTL1 2q33.3, 19q13.1	Cytochrom c Oxidase-Mangel	#220110
Chronisch-tubulo-interstitielle Nephropathie [53]	mtDNA-Deletion	Cytochrom c Oxidase-Mangel	#551200
Leigh-Syndrom mit Fanconi-Symptomatik [54]	Verschiedene	Alle Komplexe der Atmungskette (I-V)	#256000

Tab. 1: Die häufigsten genetischen Ursachen eines renalen Fanconi-Syndroms

Prof. Robert Kleta vom University College London gelang es, zwei weitere Gene zu identifizieren, die auf Grund einer Mutation zur Ausprägung eines renalen Fanconi-Syndroms führen. Bei diesen Genen handelt es sich zum einen um das peroxisomale Protein L-3-Enoyl-CoA-Hydratase/L-3-Hydroxy-Acyl-CoA-Dehydrogenase (EHHADH). Zum anderen konnte in weiteren Familien eine Mutation im sogenannten Fanconi-assoziierten Protein 2 (FAP2) identifiziert werden, die ebenfalls zur Ausprägung eines renalen Fanconi-Syndroms führt. Im Gegensatz zu den oben aufgeführten Genen ist der Erbgang in beiden Fällen autosomal dominant.

1.5 Expression und Funktion von EHHADH

Die L-3-Enoyl-CoA-Hydratase/L-3-Hydroxy-Acyl-CoA-Dehydrogenase (EHHADH, L-PBE - L-spezifisches peroxisomales bifunktionales Protein) ist ein peroxisomales Protein, das an der peroxisomalen β -Oxidation beteiligt ist. Es wurde 1994 auf Chromosom 3 am Locus 3q26.3-q28 lokalisiert [55]. Die vollständige Sequenz wurde 1998 beschrieben [56]. Die Aufklärung der Kristallstruktur des Rattenenzym 2010 zeigte, dass EHHADH über drei katalytische Domänen und zwei aktive Zentren verfügt [57]. EHHADH besitzt N-terminal eine Hydratase- sowie eine Isomerase-Domäne und C-terminal eine Dehydrogenase-Domäne. Damit die Intermediate das Enzym nicht verlassen können, sind die aktiven Zentren mit einer Art Tunnel verbunden, so dass durch Substrat-Channelling die Weitergabe erleichtert wird. In der Maus wie auch im Menschen wird EHHADH am stärksten in der Leber und in der Niere, hier vor allem im späten proximalen Tubulus, exprimiert, den sogenannten S2- und S3-Segmenten (Abb. 4).

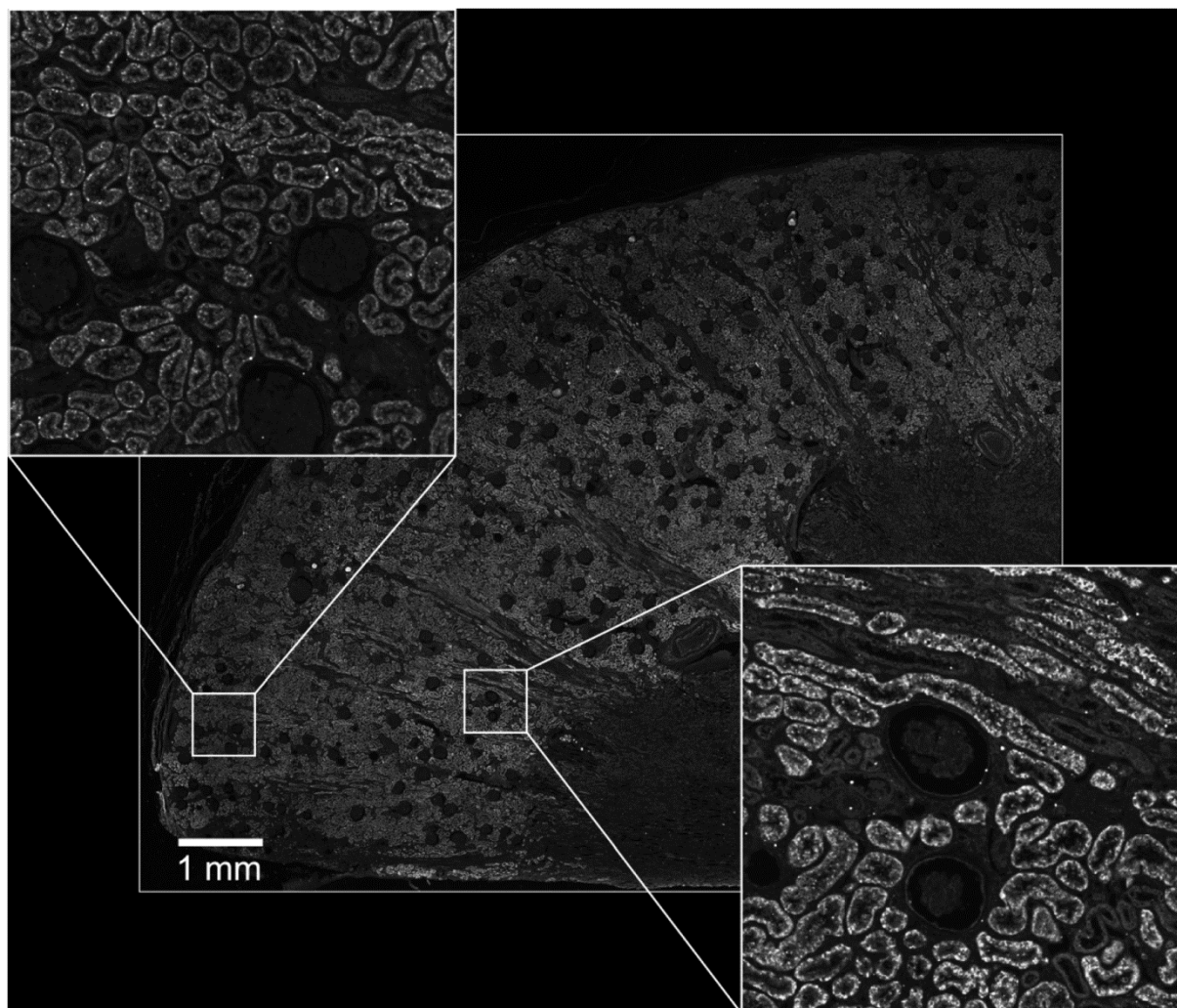


Abb. 4: Immunfluoreszenzfärbung einer humanen Niere auf EHHADH (Davids anti-EHHADH). Die Expression von EHHADH ist vor allem auf den späten proximalen Tubulus (S2-/S3-Segment) beschränkt.

Die peroxisomale β -Oxidation verfügt über zwei Abbauwege. Zum einen werden verzweigtkettige Fettsäuren vom D-spezifischen System abgebaut, dessen Enzyme eine spezifische Acyl-CoA-Oxidase, das D-spezifische peroxisomale bifunktionale Protein (D-PBE, HSD17B4) sowie das Sterol Carrier Protein-x (SCPx) sind. Zum anderen werden langkettige unverzweigte Fettsäuren vom L-spezifischen System abgebaut. Hier werden die an Coenzym-A gebundenen Acylreste zunächst von der Acyl-CoA-Oxidase dehydriert, ehe sie in zwei aufeinanderfolgenden Schritten vom EHHADH (L-PBE) zunächst hydratisiert und dann wieder dehydrogeniert werden. Zuletzt findet die Thiolyse statt, bei der ein Acetyl-CoA abgespalten und die Fettsäure somit um zwei C-Atome verkürzt wird. Diese Reaktion wird von der 3-Ketoacyl-Thiolase katalysiert.

Loss-of-function-Mutationen in EHHADH führen zu keinen nennenswerten Symptomen. EHHADH^{-/-}-Mäuse zeigten normales Wachstum und es ließen sich weder ein hepatischer noch ein renaler Phänotyp beobachten [58-60]. Dies liegt vermutlich daran, dass in der Abwesenheit von EHHADH die Substrate stattdessen vom D-spezifischen Abbauweg degradiert werden und so der EHHADH-Knockout kompensiert werden kann.

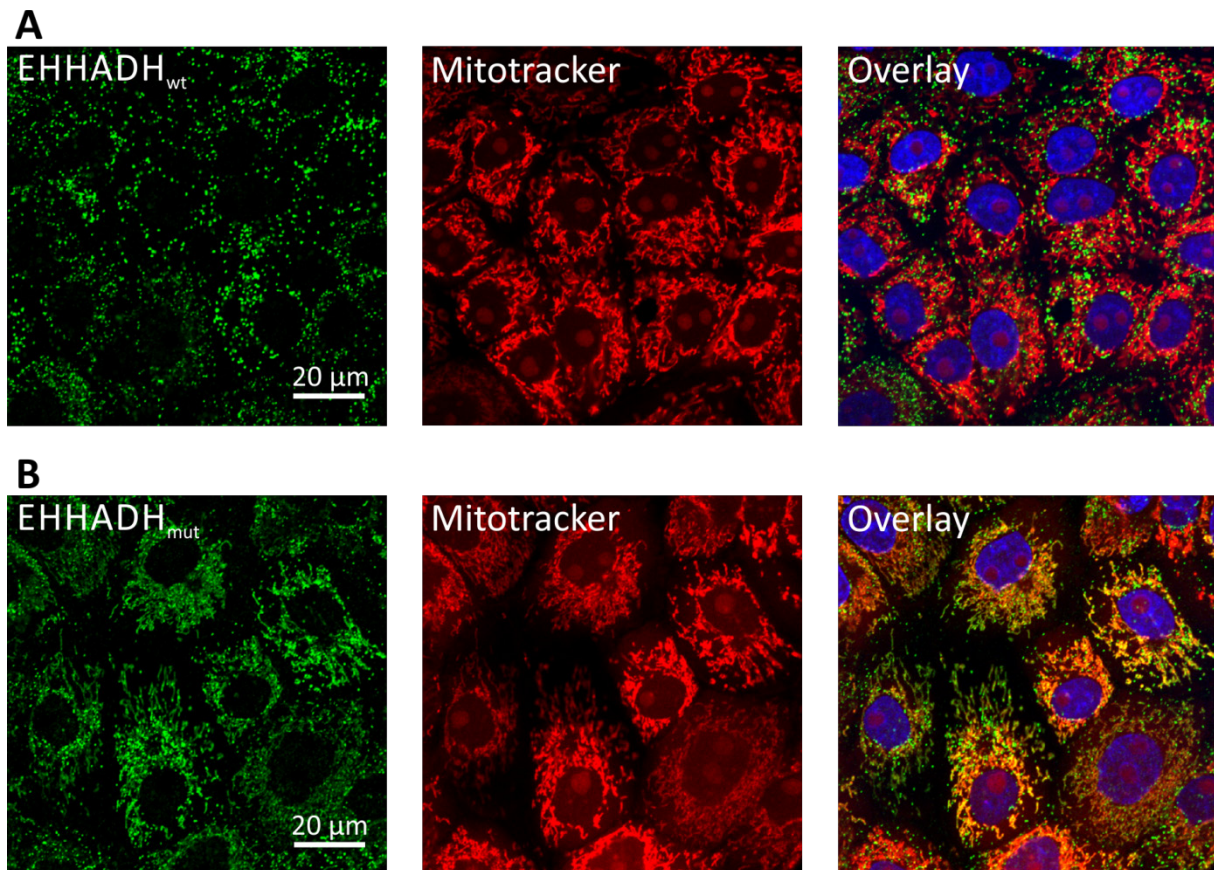


Abb. 6: Immunfluoreszenzfärbungen von stabil transfizierte LLC-PK1-Zellen auf EHHADH (Davids anti-EHHADH). Überexpression von (A) Wildtyp-EHHADH und (B) mutiertem EHHADH (grün). Mitochondrien sind mit dem Farbstoff Mitotracker angefärbt (rot). Zellkerne sind in blau dargestellt. Mutiertes EHHADH wird neben der physiologischen Lokalisation in Peroxisomen zusätzlich in Mitochondrien importiert (gelbe Flächen im Overlay-Bild).

Ein ähnliches Prinzip wurde bereits für die primäre Hyperoxalurie Typ 1 beschrieben [62]. Bei dieser Erkrankung führt eine Mutation im Gen der Alanin:Glyoxylat-Aminotransferase ebenfalls zu einem fehlerhaften Import eines ursprünglich peroxisomalen Proteins in die Mitochondrien, wodurch es schließlich zur Bildung von Ca^{2+} -Oxalat-Steinen in der Niere kommt.

Während bei der primären Hyperoxalurie Typ 1 die Funktion der Mitochondrien nicht beeinträchtigt ist, hat der fehlerhafte Import von EHHADH eine Störung der mitochondrialen Funktion zur Folge. Dies konnte ebenfalls am induzierbaren Zellmodell nachgewiesen werden. Zur Evaluation der oxidativen Phosphorylierung wurden respiratorische Messungen des O_2 -Verbrauchs durchgeführt. EHHADH_{MUT}-Zellen wiesen dabei eine um 21% verringerte Aktivität von Komplex IV der Atmungskette auf, wenn die Komplexe I und II durch Zugabe von Substraten im Überschuss maximal stimuliert wurden (Abb. 7A). Dieser Effekt wurde verstärkt, wenn zusätzlich noch Octanoyl-Carnitin als Substrat für die mitochondriale β -Oxidation zugegeben wurde (Abb. 7B, Daten noch nicht veröffentlicht).

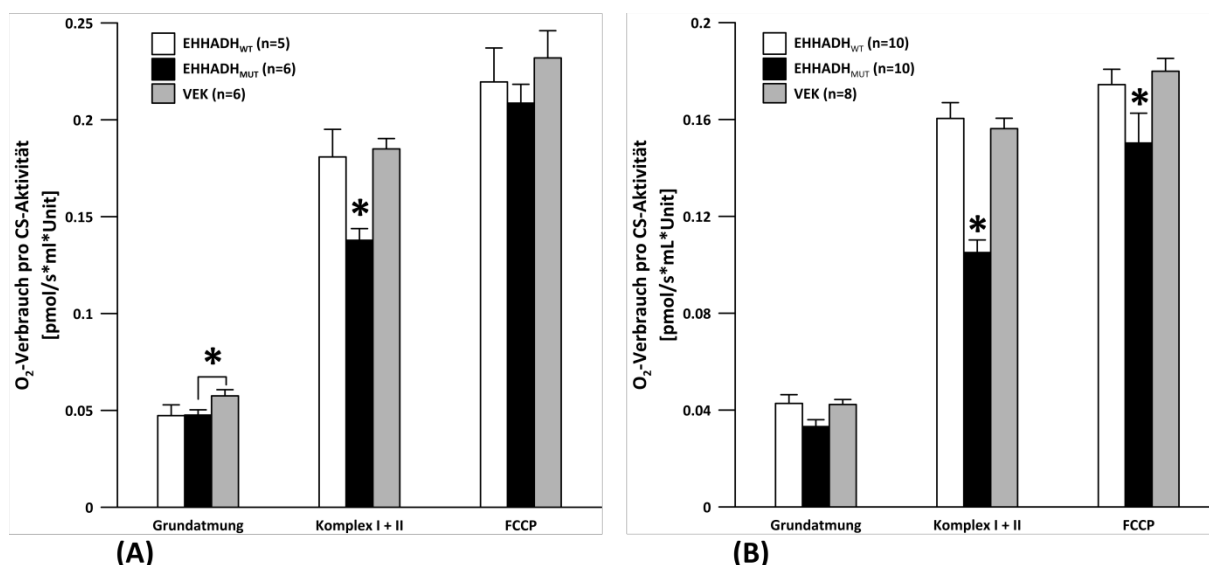


Abb. 7: Respirometrische Messung des O₂-Verbrauchs in EHHADH_{WT}⁻ und EHHADH_{MUT}⁻ und Vektortransfizierten Zellen (VEK).

(A) O₂-Verbrauch unter Stimulation der einzelnen Atmungskettenkomplexe. EHHADH_{MUT}-Zellen zeigen einen um 21% erniedrigten Verbrauch. VEK- und EHHADH_{WT}-Zellen verhalten sich gleich

(B) O₂-Verbrauch unter Zugabe von Octanoyl-Carnitin als Substrat der mitochondrialen β -Oxidation. Der Verbrauch liegt um 35% niedriger bei EHHADH_{MUT}-Zellen. VEK- und EHHADH_{WT}-Zellen verbrauchen im gleichen Maße O₂

1.5 Expression und Funktion des Fanconi-assoziierten Proteins 2

Neben EHHADH konnte Prof. Kleta ein weiteres Gen identifizieren, das aufgrund einer Punktmutation zur Ausprägung eines renalen Fanconi-Syndroms führt. Bei diesem Gen handelt es sich um das sogenannte Fanconi-assoziierte Protein 2 (FAP2).

FAP2 ist in den Kreatinstoffwechsel involviert und mitochondrial lokalisiert. Die Kreatinsynthese läuft in zwei Schritten in verschiedenen Organen ab. Im ersten Schritt wird eine Amidinogruppe von L-Arginin auf Glycin übertragen und es entsteht Guanidinoacetat. Im zweiten Schritt wird Guanidinoacetat unter Verbrauch von S-Adenosylmethionin methyliert und es entsteht Kreatin. Der Abbau von Kreatin erfolgt spontan über den Zerfall zu Kreatinin, das in der Niere frei filtriert und ausgeschieden wird.

Kreatin ist besonders in seiner phosphorylierten Form (PCr) wichtig für den Organismus, da es als kurzfristiger Energiespeicher zur Verfügung steht, um in Geweben mit hohem ATP-Bedarf, wie etwa Muskelgewebe, die ATP-Konzentration möglichst konstant zu halten. Diese Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Kreatin wird von der Kreatin-Kinase katalysiert. Abhängig von Gewebe und Entwicklungsstadium werden vier verschiedene Formen der Kreatin-Kinase exprimiert: Brain Kreatin-Kinase (B-CK) und Muskel-Kreatin-Kinase (M-CK) liegen beide im Zytosol vor, die mitochondriale Kreatin-Kinase (Mi-CK) wird entweder ubiquitär oder sarkolemmal exprimiert. Die mitochondrialen Isoformen phosphorylieren Kreatin am Syntheseort des ATP, während die cytosolischen Isoformen ADP wieder zu ATP regenerieren. Da PCr und Kreatin intrazellulär in höheren Konzentrationen als ATP vorliegen können, wirkt PCr als Puffer.

Prof. Kleta gelang es, mit Hilfe der Kopplungsanalyse Mutationen im Gen zu identifizieren, das für FAP2 codiert. Eine der Mutationen von FAP2, welche an Position 336 im Protein zum Austausch eines Threonins gegen ein Alanin (T336A) führt, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit näher untersucht. Das FAP2-assoziierte Fanconi-Syndrom wird autosomal dominant vererbt. Einige der betroffenen Patienten entwickeln im Verlauf der Erkrankung ein terminales Nierenversagen

2. Zielsetzung

Das renale Fanconi-Syndrom wurde bereits in verschiedenen Fällen mit mitochondrialen Defekten in Verbindung gebracht. In dieser Arbeit wurden zwei Formen des renalen Fanconi-Syndroms untersucht, in denen die Vererbung autosomal dominant erfolgt.

In Vorarbeiten wurde beobachtet, dass die Expression von EHHADH_{MUT} im Zellmodell die mitochondriale Funktion in erheblichem Maße beeinträchtigt. Allerdings war der Zusammenhang zwischen der Fehllokalisierung des mutierten Proteins in die Mitochondrien und der eingeschränkten Transportkapazität des proximalen Tubulus noch unklar. Daher war es zum einen Ziel dieser Arbeit, die genaue Lokalisation des mutierten EHHADH in den Mitochondrien zu ermitteln. Dies sollte mit Hilfe der ReAsH-Methode realisiert werden, mit der Proteine nach Modifikation mit einer definierten Aminosäuresequenz am Ort ihrer Expression elektronenmikroskopisch sichtbar gemacht werden können. Zum anderen sollte untersucht werden, ob der verminderte tubuläre Transport, welcher in vivo bei den Patienten auftritt, auch im Zellmodell beobachtet werden kann.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte eine weitere bislang unbekannte Form eines autosomal dominant vererbten renalen Fanconi-Syndroms untersucht werden. Bislang ist noch nichts darüber bekannt, wie die beobachtete Mutation im FAP2-Gen mit dem Auftreten eines Fanconi-Syndroms in Zusammenhang steht. Darüber hinaus kann auch die Progression zum terminalen Nierenversagen nicht erklärt werden. Um dies zu untersuchen sollte zunächst die Lokalisation von FAP2 in der Niere sowohl in humanem als auch murinem Gewebe bestimmt werden. Anschließend wurde eine stabil transfizierte Zelllinie als Modell für die Erkrankung charakterisiert. Zu diesem Zweck wurde entweder Wildtyp- oder mutiertes FAP2 überexprimiert. Im ersten Schritt sollte mit Hilfe der Immunfluoreszenz die intrazelluläre Lokalisation von FAP2 ermittelt werden. Anschließend wurde mittels der Respirometrie die Aktivität der Atmungskette untersucht. Zudem stand eine Patientenbiopsie zur Verfügung. Diese wurde sowohl mit (immun-)histologischen Färbemethoden als auch elektronenmikroskopisch im Hinblick auf die Lokalisation von FAP2 sowie mögliche strukturelle Veränderungen untersucht.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Geräte	Hersteller
Accucheck Comfort	Roche, Mannheim, D
Analysenwaage GR-120	A&D Instruments, Tokio, J
Autoklav	Tuttnauer 2540ELC, biomedis GmbH, Gießen, D
Brutschrank	Heraeus Instruments, Osterode, D
Mikroskop Axiovert 200	Zeiss, Jena, D
Mikrozentrifuge	Hettich, Tuttlingen, D
Milli-Q-Anlage (Biocel A10)	Millipore, Schwalbach/Ts., D
Nanodrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, NC, USA
Oxygraph-2k	Oroboros Instruments GmbH, Innsbruck, A
pH-Meter	Schott Geräte, Mainz, D
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, D
Pipetten	Gilson, Middleton, USA
Ultrospec™ 3100 <i>pro</i> UV/Visible Spectrophotometer	Amersham Biosciences, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, D
Sterilbank (Holten LaminAir)	Heto-/Holten AS, Allerød, DK
Thermomixer 5436	Eppendorf GmbH, Hamburg, D
Thermocycler T1	Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, D
UV-Photospektrometer	Genova, Jenway, Essex, E
Waage (EK-600)	A&D Instruments Ltd., Tokio, J
Wärmeschrank	Modell 300, Memmert, Schwabach, D
Zentrifuge ZK 364	Hermle, Wehingen, D

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
6x DNA Loading Dye	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
Accucheck Sensor Comfort Pro Teststreifen	Roche, Mannheim, D
Casyton Puffer	Roche Diagnostics, Mannheim, D
DEPEX Mounting Medium	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
dNTP-Mix	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
Einwegpipetten (5 ml, 10 ml und 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
GeneRuler™ DNA Ladder (100 bp, 1000bp)	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
Glasdeckplättchen für Zellfärbungen	Hartenstein, Würzburg, D
Glycergel mounting medium, fluoreszenzfrei	DakoCytomation, Dakato North America Inc., Carpinteria, USA
Kulturschalen klein (35 x 10 mm)	Nuclon Surface, Nunc A/S, Roskilde, DK
Kulturschalen mittel (60 x 15 mm)	Nuclon Surface, Nunc A/S, Roskilde, DK
Kulturschalen groß (100 x 15 mm)	Nuclon Surface, Nunc A/S, Roskilde, DK
Mikrotiterplatten	Nuclon Surface, Nunc A/S, Roskilde, DK
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim, D
PCF-Filter 0,4 µm	Merck, Darmstadt, D
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Polysin Objektträger	Kindler, Freiburg, D
TissueTek OCT-Medium	Sakura Finetek, Zoeterwoude, NL
Tubes (15 ml und 50 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen, D

3.1.3 Chemikalien

Produkt	Hersteller
α -D-Methylglucosid	Sigma, Taufkirchen, D
Acetyl-CoA	Sigma, Taufkirchen, D
ADP	Sigma, Taufkirchen, D
Agarose	AppliChem, Darmstadt, D
Ampicillin (50mg/ml)	Sigma, Taufkirchen, D
Antimycin A	Sigma, Taufkirchen, D
Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen, D
Ascorbat	Sigma, Taufkirchen, D
Bacto peptone	BD GmbH, Heidelberg, D
Bacto yeast extract	BD GmbH, Heidelberg, D
Bovines Fibronectin	Biochrome AG, Berlin, D
BSA (Albumin from bovine serum)	Sigma, Taufkirchen, D
CaCl ₂	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, D
Citrat-Synthase	Sigma, Taufkirchen, D
Citronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt, D
Collagen from calf skin	Sigma, Taufkirchen, D
Cytochrom c	Sigma, Taufkirchen, D
Deoxyribonucleinsäure Natriumsalz aus Kalbsthymus	Sigma, Taufkirchen, D
Digitonin	Sigma, Taufkirchen, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt, D
DTNB	Sigma, Taufkirchen, D
EDTA	Sigma, Taufkirchen, D
EGTA	Sigma, Taufkirchen, D
Eisen(III)chlorid	Merck, Darmstadt, D
Eosin-Lösung alkoholisch	Merck, Darmstadt, D
Ethanol	J. T. Baker, Deventer, NL
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, D
FCCP	Sigma, Taufkirchen, D
FCS (Fötale Kälberserum)	Gibco Cell Culture Systems - Invitrogen, Karlsruhe, D
Glucose	Merck, Darmstadt, D
Glutamat	Sigma, Taufkirchen, D
Glycerol	Merck, Darmstadt, D
HCl	Merck, Darmstadt, D
Hämatoxylin	Sigma, Taufkirchen, D
HEPES	AppliChem, Darmstadt, D
Isopropanol	Merck, Darmstadt, D
JetPEI® Transfektionsreagenz	Polyplus-Transfection, Illkirch, F
K ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt, D
KCl	Merck, Darmstadt, D
KH ₂ PO ₄ *3H ₂ O	Merck, Darmstadt, D
K-Lactobionat	Sigma, Taufkirchen, D
KOH	Merck, Darmstadt, D
L-Glutamin, 200 mM (100x), flüssig	Gibco Cell Culture Systems - Invitrogen, Karlsruhe, D
Lichtgrün	Chroma-Gesellschaft, Schmidt GmbH, Köngen, D
Lipofectamin	Invitrogen, Karlsruhe, D
Malat	Sigma, Taufkirchen, D
Mannitol	neoLab, Heidelberg, D
Mayers Hämalun alkoholisch	Merck, Darmstadt, D
2-Methylbutan	Sigma, Taufkirchen, D
Methanol	Merck, Darmstadt, D
MgCl ₂ *6H ₂ O	Merck, Darmstadt, D

MgSO ₄ *7H ₂ O	Merck, Darmstadt, D
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	Merck, Darmstadt, D
NaCl	Merck, Darmstadt, D
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	Merck, Darmstadt, D
NaOH	Merck, Darmstadt, D
Na-Hexanoat	Sigma, Taufkirchen, D
Na-Pyruvat, 100 mM Lösung	Sigma, Taufkirchen, D
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, D
Octanoyl-Carnitin	Tocris Bioscience, Bristol, UK
Oligomycin	Sigma, Taufkirchen, D
Orange G	Merck, Darmstadt, D
Oxalacetat	Sigma, Taufkirchen, D
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, D
Penicillin-Streptomycin-Lösung, flüssig	10000 I.E./ml Pen G, 10000 µg/ml Strep.-Sulfat, Gibco Cell Culture Systems - Invitrogen, Karlsruhe, D
Phosphorwolframsäure	Sigma, Taufkirchen, D
Ponceau	Serva, Heidelberg, D
Purified BSA 100x (10mg/ml)	New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA
Rotenon	Sigma, Taufkirchen, D
Saccharose	Merck, Darmstadt, D
Säurefuchsin	Merck, Darmstadt, D
SDS (Dodecylsulfat Natriumsalz)	Merck, Darmstadt, D
Succinat	Sigma, Taufkirchen, D
TAE (Tris – Acetat- EDTA) – Puffer	AppliChem, Darmstadt, D
Taurin	Sigma, Taufkirchen, D
Tetrazyklinstock (12,5 mg/ml) in EtOH	Bioline, Luckenwalde, D
TMPD	Sigma, Taufkirchen, D
Triethanolamin	Sigma, Taufkirchen, D
Trinatriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt, D
TRIS HCl (Trizma® hydrochloride)	Sigma, Taufkirchen, D
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen, D
Trypsin-EDTA-Lösung (10x), Flüssig	Gibco Cell Culture Systems - Invitrogen, Karlsruhe, D
Xylol	Sigma, Taufkirchen, D

3.1.4 Enzyme & Kits

Produkt	Hersteller
Antarctic Phosphatase (5000 U/ml)	New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA
FluoReporter Blue Fluorimetric dsDNA Quantitation Kit	Invitrogen, Karlsruhe, D
Nucleobond Xtra-Midi®Kit	Macherey-Nagel GmbH, Düren, D
Nucleospin Plasmid®Kit	Macherey-Nagel GmbH, Düren, D
QIAquick® Gelextraction Kit	Quiagen, Hilden, D
QIAquick® PCR-Purification Kit	Quiagen, Hilden, D
Quick T4 DNA Ligase (recombinant)	New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA
Quick Ligation Reaction Buffer (2x)	New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA
Restriktionsenzym BamHI (20000 U/ml)	New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA
Restriktionsenzym BamHI HF 20000 U/ml)	New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA
Restriktionsenzym BspE1	New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA
Restriktionsenzym Dpn1	New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA
Restriktionsenzym EcoRI HF (20000 U/ml)	New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA
Restriktionsenzym SmaI	New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA
Restriktionspuffer NEBuffer 4 (10x)	New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA
Ultra-Pfu-Polymerase	Stratagene, California, US
Ultra-Pfu-Polymerase Puffer (10x)	Stratagene, California, US

3.1.5 Antikörper

Bezeichnung	Art	Hersteller
Anti-AQP2 (sc-9882)	Primär-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D
Anti-Calbindin D-28k	Primär-Antikörper	Swant, Marly, CH
Anti-D Amino acid oxidase (ab140127)	Primär-Antikörper	Abcam, Cambridge, UK
Anti-EHHADH (ab93172)	Primär-Antikörper	Abcam, Cambridge, UK
Anti-EHHADH	Primär-Antikörper	Dauids Biotechnologie GmbH, Regensburg, D
Anti-FAP2	Primär-Antikörper	Proteintech, Manchester, UK
Alexa Fluor® 488 donkey anti rabbit	Sekundär-Antikörper	Invitrogen, Karlsruhe, D
Alexa Fluor® 555 donkey anti rabbit	Sekundär-Antikörper	Invitrogen, Karlsruhe, D
Alexa Fluor® 647 donkey anti rabbit	Sekundär-Antikörper	Invitrogen, Karlsruhe, D
Cy5 goat anti rabbit	Sekundär-Antikörper	Invitrogen, Karlsruhe, D
Gold goat anti rabbit	Sekundär-Antikörper	Aurion, Wageningen, NL
Mitotracker (Stockkonz.: 1 mM)	Mitochondrienmarker	Invitrogen, Karlsruhe, D
Phalloidin 647	f-Actin-Marker	Invitrogen, Karlsruhe, D
HOE33342 (Stockkonz.: 5×10^{-4} M)	Zellkernmarker	Invitrogen, Karlsruhe, D

3.1.6 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Inhaltsstoffe	Endkonzentration
PBS-Puffer, pH 7.4	KH_2PO_4	1.8 mM
	Na_2HPO_4	10.3 mM
	NaCl	137 mM
	In Aqua dest.	
Fixierlösung, pH 7.4 (für Immunfluoreszenz IF)	Paraformaldehyd	3%
	In PBS	
Lösung zur Epitopdemaskierung, pH 7.4 (für IF)	SDS	0,1%
	In PBS	
Ringer-Lösung, pH 7.4	NaCl	145 mM
	KH_2PO_4	0.4 mM
	K_2HPO_4	1.6 mM
	MgCl_2	1 mM
	Glucose	5 mM
	CaCl_2	1.3 mM
	HEPES	5 mM
	In Aqua dest.	
Fixierlösung, pH 7,4	NaCl	90 mM
	K_2HPO_4	15 mM
	MgCl_2	2 mM
	EGTA	1
	Saccharose	100
	Paraformaldehyd	3%
	In Aqua dest.	

Nachfixierlösung, pH 7,4	NaCl	90 mM
	K ₂ HPO ₄	15 mM
	MgCl ₂	2 mM
	EGTA	1
	Saccharose	17%
	Paraformaldehyd	1%
	In Aqua dest.	
Permeabilisierungslösung, pH 7.4 (für IF)	Triton X-100	0,04%
	In PBS-Puffer	
K-Lactobionat Stock, pH 7,0	K-Lactobionat	0,5 M
	In Aqua dest.	
Citratpuffer, pH 6,0 (für IF)	Citronensäure-Monohydrat	0,3165 g
	Trinatriumcitrat-Dihydrat	2,0587
	In Aqua dest.	
Tris-HCl-Puffer, pH 8,1	Tris	1 M
	In Aqua dest.	
Blocklösung (für IF)	BSA	5%
	Triton X-100	0,04%
	In Aqua dest.	
Antikörper-Verdünnungslösung (für IF)	BSA	0,5%
	Triton X-100	0,04%
	In Aqua dest.	
Triethanolamin-HCl-Puffer, pH 8,0	Triethanolamin	0,5 M
	EDTA	5 mM
	In Aqua dest.	
Triton-X100 (für Citrat-Synthase-Messung)	Triton-X100	10%
	In Aqua dest.	
Oxalacetat	Oxalacetat	10 mM
	In aqua dest.	
DTNB	DTNB	1,01 mM
	In 1M Tris-HCl-Puffer	
Citrat-Synthase	Citrat-Synthase	0,2%
	In 0,1 M Tris-HCl-Puffer	

Weigerts Eisenhämatoxylin Lösung A	Hämatoxylin In EtOH 96%	1%
Weigerts Eisenhämatoxylin Lösung B	Eisen(III)chloride In Aqua dest. + 1 mL 25% HCl	1,5%
Säurefuchsin-Ponceau-Lösung	Ponceau Säurefuchsin In 300 mL Aqua dest. + 0,6 mL Eisessig	0,2 g 0,1 g
Orange G-Differenzierungslösung	Phosphorwolframsäure Orange G In Aqua dest.	4% 2%
Lichtgrün	Lichtgrün In Aqua dest. + 0,2 mL Eisessig	2%
Transportlösung	α -MDG Mannitol In Aqua ad iniectabilia	200 mM 100 mM

3.1.7 Zellmedien

LB-Medium, pH 7,0 (für Transformation)	Bacto peptone Bacto yeast extract NaCl In Aqua dest.	10 g 5 g 10 g
Basismedium	Hersteller	Artikelnummer
DMEM (hoch Glucose)	Gibco Cell Culture Systems -	31053-028
DPBS		14190-094
Mem alpha Medium	Invitrogen, Karlsruhe, D	22561-021
RPMI Medium 1640 (mit Glucose)		21875-034
LLC-PK₁-Medium (mit Glucose 2 g/l)	RPMI Medium 1640 FCS (hitzeinaktiviert) Penicillin / Streptomycin Na-Hexanoat	10% 0,5% 5mM
LLC-PK₁-Medium (Hoch Glucose 4,5 g/l)	DMEM hoch Glucose FCS (hitzeinaktiviert) L-Glutamin Penicillin/Streptomycin Lipid Mix 1	8% 2 mM 0,5% 0,25%

Mir05-Medium, pH 7,1	EGTA	0,5 mM
	MgCl ₂ *6H ₂ O	3 mM
	K-Lactobionat (Stock)	60 mM
	Taurin	20 mM
	KH ₂ PO ₄	10 mM
	HEPES	20 mM
	Saccharose	110 mM
	BSA	1 g/l
	In Aqua dest.	

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Kultivierung stabil transfizierter induzierbarer Zellen

Als Zellmodell für den proximalen Tubulus wurden stabil transfizierte Zellen verwendet. Diese LLC-PK1-Zellen stammen ursprünglich von proximalen Tubuluszellen des Schweins und haben daher einige ihrer Eigenschaften erhalten. Die Zellen wurden von Enriko Klootwijk mit Hilfe des Tet-on-Systems stabil transfiziert. Nach Tetrazyklin-Gabe (1 µg/ml Medium) bindet Tetrazyklin dabei an einen Repressor und inhibiert damit die Blockade des Promotors durch den Repressor, so dass das nachgeschaltete Gen exprimiert wird.

Es wurden folgende Zellen verwendet:

Nachgeschaltetes Gen	Bezeichnung
hEHHADH Wildtyp	EHHADH _{WT}
hEHHADH c.7G→A	EHHADH _{MUT}
hFAP2 Wildtyp	FAP2 _{WT}
hFAP2 c.1006A→C	FAP2 _{MUT}
Leerer Vektor ohne nachgeschaltetes Gen	VEK

Tab. 2: Übersicht über die verwendeten stabil transfizierten Zelllinien

Die Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ in LLC-PK1-Medium kultiviert.

3.2.2 (Immun-)Histochemische Färbemethoden

3.2.2.1 Immunfluoreszenzfärbungen auf Paraffinschnitten

Um die Expression von EHHADH bzw. FAP2 in humanem Gewebe zu untersuchen, wurden humane Nierenproben gefärbt, die von Dr. Stefan Reinhold (Innere Medizin II, Universitätsklinikum Regensburg) zur Verfügung gestellt wurden. Die Proben waren in Paraffin eingebettet und wurden in Schnitten von 5 µm Dicke auf Polysin-Objektträgern aufgezogen. Um die Gewebeproben von Paraffin zu befreien, wurden die Proben zweimal zehn Minuten in Xylol eingebracht und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (99% Isopropanol, 95% EtOH, 80% EtOH, 70% EtOH) für jeweils zehn Minuten rehydriert. Zwischen den folgenden Schritten wurden die Schnitte jeweils fünf Minuten mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Schnitte 15 Minuten bei 95°C in Citratpuffer pH 6,0 gekocht, um die Epitope zu demaskieren. Um unspezifische Signale zu vermeiden, wurden die Schnitte 10 min mit Blocklösung inkubiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper fand über Nacht bei 4°C statt. Anschließend wurden die Schnitte 1h bei Raumtemperatur mit den sekundären Antikörpern inkubiert. Zusätzlich zu den sekundären Antikörpern wurde immer HOE33342 (Endkonzentration 5 x 10⁻⁷ M) als Kernmarker zugegeben. Sowohl primäre als auch sekundäre

Antikörper wurden in der Antikörper-Verdünnungslösung verdünnt. Die Schnitte wurden nach zweimaligem Waschen in PBS mit fluoreszenzfreiem Mounting Medium eingedeckelt.

3.2.2.2 Immunfluoreszenzfärbungen auf Kryoschnitten

Für die Immunfluoreszenz wurde Mäusen in tiefer Isoflurannarkose retrograd über die Aorta heparinisierte NaCl-Lösung (10 I.E./ml Heparin) infundiert, das Blut über eine eröffnete Vena cava inferior entfernt und damit die Tiere euthanasiert. Anschließend erfolgte die Perfusion der Mäuse mit Fixierlösung, um die Gewebestruktur zu erhalten und autokatalytische Vorgänge zu verhindern. Die Nieren wurden entnommen und für drei Stunden in Nachfixierlösung bei 4°C aufbewahrt. Für die weitere Aufbewahrung wurden die Nieren bei -40°C in Methylbutan eingefroren und bei -80°C gelagert. Vor dem Schneiden wurden die Nieren mit OCT-Medium auf dem Objekthalter des Kryostaten eingebettet. Es wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Polysin-Objektträgern aufgezogen. Die Schnitte wurden 20 Minuten bei RT getrocknet. Nachdem das Einbettmedium durch fünf Minuten Waschen in PBS entfernt wurde, wurden die Schnitte zehn Minuten in 0,1% SDS in PBS gestellt, um die Epitope zu demaskieren. Anschließend wurden die Schnitte zehn Minuten mit Blocklösung behandelt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Sowohl primäre als auch sekundäre Antikörper wurden in der Antikörper-Verdünnungslösung verdünnt. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper inkubiert. Der sekundäre Antikörper wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Schnitte gegeben. Zusätzlich zu den sekundären Antikörpern wurde immer HOE33342 (Endkonzentration 5×10^{-7} M) als Kernmarker zugegeben. Zuletzt wurden die Schnitte zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit fluoreszenzfreiem Mounting Medium eingedeckelt.

3.2.2.3 Hämalaun-Eosin-Färbung auf Paraffinschnitten

Um die Histologie der humanen Proben beurteilen zu können, wurde eine Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung durchgeführt. Dabei färbt das basische Hämalaun die Zellkerne blau, das saure Eosin das Zytoplasma rot.

Die Schnitte wurden durch zweimaliges Einbringen in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe für jeweils 10 min rehydriert. Anschließend wurden die Schnitte 3 min mit Mayer's Hämalaun inkubiert, kurz in 1% Eisessig in Aqua dest. getaucht und schließlich für 2 min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte 2 min mit Eosin bedeckt und im Anschluss in einer aufsteigenden Alkoholreihe sowie Xylol entwässert, bevor sie mit Xylolhaltigem DEPEX-Medium eingedeckelt wurden.

3.2.2.4 Masson-Goldner-Färbung auf Paraffinschnitten

Die Masson-Goldner-Färbung, auch Trichromfärbung genannt, ermöglicht die Anfärbung von Bindegewebe, das auf den Schnitten türkis erscheint. Die Zellkerne werden braun angefärbt, das Zytoplasma rot.

Für die Masson-Goldner-Färbung wurden die Schnitte nach dem Entparaffinieren zunächst 2 min in Weigerts Eisenhämalaun eingebracht, danach 2 min angebläut unter fließendem Leitungswasser und zum Differenzieren kurz in 0,1% HCl-Alkohol gestellt. Anschließend wurden die Schnitte 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut, für 15 sec in 0,5% Phosphorwolframsäure differenziert und 3 mal 5 min in Aqua dest. gewaschen, ehe sie 10 min in Säurefuchsin-Ponceau gefärbt wurden. Danach folgte 3 mal 1 min Inkubation in 1 % Essigsäure, 20 sec differenzieren in Orange G-Lösung, 2 min spülen in 1% Essigsäure, 4 min Färben in Lichtgrün-Lösung und zweimal 2 min spülen in 2% Essigsäure ehe die Schnitte entwässert wurden durch einbringen in 96% Isopropanol (20 sec, 99% Isopropanol (zweimal 5 min) und Xylol (zweimal 10 min). Die Schnitte wurden ebenfalls mit DEPEX-Medium eingedeckelt.

3.2.2.5 Immunfluoreszenzfärbung auf Zellen

Die Expression der Zielgene der induzierbaren Zelllinien wurde mit Hilfe der Immunfluoreszenz überprüft. Die Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und mit 1 µg/mL Tetrazyklin induziert. Nach 24h wurden die Zellen zunächst 30 min mit Mitotracker bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert, um die Mitochondrien zu markieren. Danach wurden die Zellen zunächst mit Ringerlösung gewaschen und 15 min mit 3% PFA in PBS fixiert. Zwischen den weiteren Färbeschritten wurden die Zellen jeweils mit PBS gewaschen. Darauf folgte die Epitop-Demaskierung mit 0,1% SDS in PBS und die Inkubation mit dem primären Antikörper für 1h. Zuletzt wurden die Zellen für 1 h mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Zusätzlich zu den sekundären Antikörpern wurde immer HOE33342 (Endkonzentraion 5×10^{-7} M) als Kernmarker zugegeben. Primäre und sekundäre Antikörper wurden in der Antikörper-Verdünnungslösung verdünnt Nach Waschen mit Aqua dest. wurden die Deckgläschen auf Superfrost Objektträger mit GlycerGel Mounting Medium eingedeckelt.

3.2.3 Methoden zur Charakterisierung der EHHADH-Mutation

3.2.3.1 Immunfluoreszenz an humanen Nierenproben

Die Expression von EHHADH war im Rahmen von Vorarbeiten bereits in humanen und murinen Gewebeschnitten in der Niere nachgewiesen worden [60]. Um die Lokalisation näher einzugrenzen, wurden weitere Färbungen mit zwei verschiedenen kommerziellen Antikörpern durchgeführt. Zum einen wurde der Peroxisomenmarker D-Amino acid oxidase (abcam anti-DAMOX, 1:100 verdünnt)

gefärbt, zum anderen EHHADH (abcam anti-EHHADH, 1:50 verdünnt). Die Schnitte wurden zudem gegen Aquaporin2 (AQP2, 1:500 verdünnt) gefärbt.

3.2.3.2 Nachweis der intramitochondrialen Lokalisation mittels ReAsH-Markierung

3.2.3.2.1 Plasmidpräparation

Damit die Zellen für die ReAsH-Markierung verwendet werden können, müssen sie mit einem Plasmid transient transfiziert werden, auf dem EHHADH mit einem eingefügten Tetracystein-Motiv (TC-Tag) codiert ist. Da EHHADH_{MUT} sowohl N-terminal als auch C-terminal über Targetingsignale für die Mitochondrien bzw. die Peroxisomen verfügt, wurde der TC-Tag in die Mitte der codierenden Sequenz kloniert. An den TC-Tag kann der fluoreszierende Stoff ReAsH (Resorufin-derived arsenical hairpin binding reagent) binden. Bei entsprechender Behandlung der transfizierten Zellen mit Diaminobenzidin und anschließender Photokonversion entsteht am Ort der Expression ein elektronendichter Niederschlag, der im Elektronenmikroskop als dunkle Flecken detektierbar ist.

Der TC-Tag wurde als zwei komplementäre Oligonukleotide bestellt, die auf beiden Seiten von einer KpnI-Schnittstelle flankiert waren. Nach Verdau der Oligonukleotide mit KpnI wurde der geschnittene Tag in das Plasmid pET21-EHHADH ligiert. Bei erfolgreicher Ligation wurde die komplette EHHADH-Sequenz mit TC-Tag mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI ausgeschnitten und in den Expressionsvektor pIRES-AcGFP ligiert, der zusätzlich zum Zielgen ein GFP exprimiert, um so transfizierte Zellen identifizieren zu können. Der Zwischenschritt über den Vektor pET21 war erforderlich, da pIRES-AcGFP endogen bereits über eine KpnI-Schnittstelle verfügt.

3.2.3.2.2 Zellkultur

Für die transiente Transfektion wurden native LLC-PK1-Zellen verwendet. Der Expressionsvektor hEHHADH-TC wurde mit Hilfe des Transfektionsreagens JetPEI transfiziert. Da die Expression des auf dem Expressionvektor codierten AcGFP nicht funktionierte, wurde zusätzlich ein pGFP-Plasmid cotransfiziert, damit transfizierte Zellen identifiziert werden konnten. Die Zellen wurden nach der Transfektion zum Institut für Anatomie unter der Leitung von Prof. Ralph Witzgall gebracht, wo die weitere Behandlung sowie die Photokonversion der Zellen durchgeführt und anschließend Bilder angefertigt wurden.

3.2.3.3 Evaluation der Transportkapazität

Für die Evaluation der Transportkapazität wurden EHHADH_{WT}- und EHHADH_{MUT}-Zellen auf PCF-Filter in 24well-Platten ausgesät. Sobald die Zellen auf der Filtermembran die vollständige Konfluenz erreicht haben, beginnen die Epithelzellen sich zu polarisieren. Das heißt, dass die Innenseite des Filters die apikale Seite darstellt, während die Außenseite des Filters der basolateralen Seite entspricht. Die Zellen wurden in LLC-PK1-Medium (Hoch-Glucose-Medium) kultiviert. Das Medium

wurde einmal nach drei Tagen gewechselt. Im weiteren Verlauf des Experiments wurde jeden zweiten Tag frisches Tetrazyklin zugegeben, um die Expression aufrechtzuerhalten. Anschließend wurden 100 µl der Transportlösung (200 mM α -MDG, 100 mM Mannitol in Aqua ad iniectabilia) zugegeben. α -MDG ist ein Substrat der Na^+ -Glucose-Cotransporter SGLT1 und SGLT2 mit vergleichbarer Affinität wie D-Glucose. Es wird zwar von den Zellen aufgenommen aber nicht abgebaut, sondern auf der basolateralen Seite wieder abgegeben. Durch die Zugabe von Mannitol sollte die Integrität des zellulären Monolayers überprüft werden, da für Mannitol kein Aufnahmemechanismus in die Zellen bekannt ist. Nach vier Stunden wurden je well 20 µl Proben entnommen sowohl von der apikalen (= Innenseite des Filters) als auch von der basolateralen (= Außenseite des Filters) Seite. Die Konzentration an α -MDG und Mannitol in den jeweiligen Proben wurde am Institut für funktionelle Genomik im Massenspektrometer vermessen.

3.2.4 Methoden zur Charakterisierung der FAP2-Expression

3.2.4.1 FAP2-Expression in humanem und murinem Gewebe

Die Expression und Lokalisation von FAP2 wurde an Paraffinschnitten von humanen Nierenproben sowie an Kryoschnitten von murinem Nierengewebe untersucht.

Für den Nachweis der Expression in murinem Gewebe wurden fixierte, eingefrorene Nieren verwendet. Die Färbungen wurden wie unter 3.3.2 beschrieben angefertigt. Die Gewebeproben wurden mit anti-FAP2 (Verdünnung 1:200) und Alexa Fluor®647 Phalloidin (Verdünnung 1:500) gefärbt.

Die Paraffinschnitte humaner Nieren wurden wie unter 3.3.1 beschrieben aufbereitet. Die humanen Proben wurden ebenfalls mit anti-FAP2 (Verdünnung 1:200) gefärbt. Zusätzlich wurde als Marker für den distalen Tubulus und das Verbindungsstück Calbindin (Verdünnung 1:200) und als Marker des Verbindungsstücks und Sammelrohrs AQP2 (Verdünnung 1:500) co-gefärbt.

3.2.4.2 Arbeiten am Zellmodell

3.2.4.2.1 Untersuchung der FAP2-Expression in LLC-PK1-Zellen

Um die Überexpression des Proteins nachzuweisen, wurden FAP2_{WT}- und FAP2_{MUT}-Zellen auf FAP2 gefärbt. Die Färbung wurde wie unter 3.2.2.5 beschrieben durchgeführt. Der Anti-FAP2-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt.

3.2.4.2.2 Elektronenmikroskopie an induzierten FAP2-Zellen

Um die Mitochondrien genauer zu untersuchen, wurden FAP2_{WT}-, FAP2_{MUT}- und VEK-Zellen auf Glasplättchen ausgesät und eine Woche lang mit 1 µg/ml Tetrazyklin induziert. Als Kontrolle wurden die gleichen Zellen auch ohne Tetrazyklin kultiviert. Nach einer Woche wurden die Zellen zum Institut

für Anatomie gebracht, wo sie für die Elektronenmikroskopie eingebettet wurden. Zunächst wurden die Zellen 2 h in 2% Glutaraldehyd in PBS fixiert. Nach viermal Waschen mit PBS für 15 min erfolgte eine Inkubation mit 2% Osmiumtetroxid in PBS über Nacht. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen viermal mit PBS für 5 min gewaschen und anschließend in einer aufsteigenden EtOH-Reihe (50%, 70%, 80%, 90%, abs. EtOH, Aceton EtOH 1:1, Aceton) jeweils 2x10 min entwässert. Die Einbettung erfolgte zunächst in Aceton und Epon 2:1 und Aceton und Epon 1:1 für jeweils 2 Stunden, danach in Aceton und Epon 1:2 über Nacht. Zuletzt wurden die Proben für jeweils 2 Tage in Epon eingebracht, zunächst bei 30°C, abschließend bei 60°C. Von den einzelnen Proben wurden jeweils 250 nm dicke Schnitte zur Betrachtung im Elektronenmikroskop angefertigt.

3.2.4.2.3 Intramitochondriale Lokalisation von FAP2

Für die Lokalisation von FAP2 innerhalb der Mitochondrien wurde eine Immuno-Gold-Markierung auf den Dünnschnitten von induzierten FAP2_{WT}⁻, FAP2_{MUT}⁻ und VEK-Zellen durchgeführt. Es wurden die unter 3.2.4.2.2 beschriebenen Schnitte verwendet. Die Schnitte wurden zunächst mit Anti-FAP2 (1:20 in 0,04% Triton X-100 in PBS) inkubiert. Anschließend wurde ein an Goldpartikel gekoppelter sekundärer Antikörper (goat anti-rabbit, Verdünnung 1:50 in 0,1% BSA in PBS) zugegeben.

3.2.4.2.4 Untersuchung der Abbaubarkeit des mutierten Proteins

Hier sollte untersucht werden, ob die Zellen in der Lage sind, die intramitochondrialen Ablagerungen abzubauen. Zu diesem Zweck wurden FAP2_{WT}⁻ und FAP2_{MUT}⁻-Zellen auf Glasplättchen in kleinen Schalen ausgesät und zwei Wochen lang mit 1 µg/ml Tetrazyklin induziert. Nach zwei Wochen wurde jeweils eine Schale gefärbt. Von den restlichen Schalen wurde die Hälfte weiterhin mit Tetrazyklin kultiviert, während die andere Hälfte ohne Tetrazyklin gezogen wurde. Jede Woche wurde für weitere acht Wochen von den beiden Versuchsgruppen (FAP2_{WT}/FAP2_{MUT} jeweils mit und ohne Tetrazyklin) eine Schale gefärbt. Die Färbungen wurden jeweils nach dem unter 3.2.2.5 beschriebenen Protokoll durchgeführt.

3.2.4.2.5 Untersuchung der mitochondrialen Funktion

Die Untersuchung der mitochondrialen Funktion erfolgte mit Hilfe der hochauflösenden Respirometrie (High-resolution respirometry). Bei dieser Methode wird der O₂-Verbrauch von Zellen oder Geweben unter Zugabe spezifischer Substrate und Inhibitoren der einzelnen Atmungskettenkomplexe gemessen. Vor jeder Messung wurden die Messkammern zur Kalibrierung mit 2 mL MIR05-Medium [63] befüllt und mit Stoppfern so verschlossen, dass noch eine Luftblase vorhanden war. Nachdem sich das Medium mit O₂ gesättigt hatte, wurde über eine Zeitspanne von fünf Minuten der Mittelwert des O₂-Gehalts gebildet und dieser Bereich als 100% O₂-Sättigung definiert.

Für die Experimente wurden sowohl FAP2_{WT}- als auch FAP2_{MUT}-Zellen auf große Schalen ausgesät und eine Woche mit 1 µg/ml Tetrazyklin induziert. Nach einer Woche wurden die Zellen abgelöst und in MIR05-Medium resuspendiert. Für die Messung der Zellen wurden 2,8 ml der Zellsuspensions luftblasenfrei in eine Kammer des Oxygraphen pipettiert. Aus jeder der beiden Messkammern wurden dann 700 µl Zellsuspension entnommen und für die spätere Standardisierung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

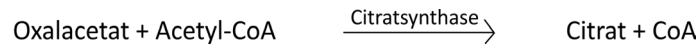
Anschließend wurden die Kammern mit den Stoppfern luftdicht verschlossen, über die mittels Hamilton-Spritzen Lösungen appliziert werden können. Zunächst wurde gewartet, bis sich ein konstanter O₂-Verbrauch eingestellt hatte. Anschließend wurde die Zellmembran mit Digitonin permeabilisiert, so dass die Messung an praktisch freien Mitochondrien fortgeführt werden konnte. Ferner wird damit sichergestellt, dass die endogenen Substrate verdünnt werden und somit keinen Einfluss mehr auf die Mitochondrien ausüben. Zum anderen können so spezifische Substrate und Inhibitoren in definierten Konzentrationen für die einzelnen Komplexe der Atmungskette zugeben werden. Die weiteren Substanzen wurden nach dem in Tabelle 3 angegebenen Schema zugegeben. Nach der Applikation wurde gewartet, bis die Änderung des O₂-Gehalts stabil war. Für die Auswertung wurde ein Bereich von etwa drei Minuten aus den jeweiligen Perioden markiert, wobei die Software den durchschnittlichen O₂-Verbrauch in diesem Zeitraum ermittelt. Wenn die O₂-Konzentration in einer Kammer unter 50 nmol/mL fiel, wurde die Kammer geöffnet, um das Medium wieder mit O₂ anzureichern. Es wurden zudem Messungen ohne Zellen durchgeführt. Dabei wurde nur MIR05-Medium in die Kammern pipettiert, um den technischen Hintergrund des Geräts zu bestimmen. Dieser wurde von den eigentlichen Messwerten abgezogen [64;65].

#	Substanz	Stockkonzentration	Volumen [µl]	Kammerkonzentration
1	Digitonin	8,1 mM	4	16,2 µM
2	Glutamat	1 M	20	1 mM
	Malat	1 M	4	2 mM
3	ADP	0,5 M	20	5 mM
4	Cytochrom c	4 mM	5	10 µM
5	Succinat	1 M	20	10 mM
6	Oligomycin	4 mg/ml	2	4 µg/ml
7	FCCP	1 mM	1(+1+1)	0,5 µM(/1 µM/1,5 µM)
8	Rotenon	0,5 mM	2	0,5 µM
9	Antimycin A	1 mM	5	2,5 µM
10	Ascorbat	0,8 M	20	8 mM
	TMPD	0,2 M	5	0,5 mM

Tabelle 3: Reihenfolge und Konzentration der zugegebenen Substanzen für die Respirometrie

Zur Standardisierung der Messergebnisse wurden zwei Methoden verwendet. Da die Standardisierung auf die Zellzahl problematisch ist, wurde zum einen die Aktivität der Citratsynthase als Maß der Mitochondrienmasse bestimmt. Die Citratsynthase ist das geschwindigkeits-

bestimmende Enzym des Citrat-Zyklus und katalysiert die Kondensation von Acetyl-CoA und Oxalacetat zu Citrat unter Freisetzung von Coenzym A.



Die Messung der Citratsynthase-Aktivität erfolgt photometrisch über die Umsetzung von 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB), welches nach der Reaktion mit Coenzym A bei 412 nm absorbiert. Die Messungen wurden in einem Spectrophotometer durchgeführt, wobei 200 s lang alle 20 s ein Wert aufgezeichnet wurde. Die Extinktion steigt dabei im Laufe der Messung linear an.

Das Inkubationsmedium wurde wie folgt für jede Probe vorbereitet:

Citratsynthase-Ansatz:

700 µl aqua dest.

100 µl 0,1 mM DTNB

25 µl 10% Triton X-100

50 µl Oxalacetat

25 µl Acetyl-CoA

Gesamtvolumen 900 µl → 10 min/30°C

Anschließend wurden 100 µl der Zellsuspension zugegeben, die Probe gut durchmischt und in eine Plastikküvette überführt. Die Küvetten wurden in das Spectrophotometer gestellt und der Reihe nach automatisiert vermessen.

Die spezifische Aktivität v der Citratsynthase wurde nach folgender Formel berechnet:

$$v = \frac{r_A}{l \cdot \epsilon_B \cdot v_B} \cdot \frac{V_{Küvette}}{V_{Probe}} \quad [\mu\text{mol}/\text{min}]$$

Dabei ist v die spezifische Aktivität der Citratsynthase [$\mu\text{mol}/\text{min}$], r_A die Differenz der Extinktionsänderung mit der Zeit [min^{-1}], l die Länge des optischen Pfades (= 1 cm), ϵ_B der Extinktionskoeffizient von 2-Nitro-5-thiobenzoessäure (TNB) bei 412 nm und pH 8,1 (= $13,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), v_B die stöchiometrische Zahl von TNB (= 1), $V_{Küvette}$ das Gesamtvolumen der Küvette und V_{Probe} das zugegebene Volumen der Probe.

Als weitere Methode zur Standardisierung wurde der DNA-Gehalt verwendet. Hierzu wurde der fluoreszenzbasierte FluoReporter Assay von Invitrogen verwendet. Von den aus der Messkammer entnommenen 700 µl wurden pro Probe jeweils drei Mal 50 µl in ein 96 well pipettiert und mit je 50 µl MIR05-Medium verdünnt. Danach wurde die Platte für 10 min bei -80°C inkubiert. Im nächsten Schritt wurden pro well 100 µl der HOE-Lösung (bestehend aus 25 µl HOE33258 in 10 ml TNE-Puffer) zupipettiert und die Platte in einem Plattenlesegerät vermessen (340 nm Exzitation, 510 nm Emission). Die Mittelwerte der Dreifachbestimmung wurden als ng DNA/µl Probe ausgewertet, auf

die die Messungen dann standardisiert wurden. Um die absoluten Werte zu erhalten wurde für jede Platte zusätzlich eine Verdünnungsreihe einer definierten DNA-Konzentration gemessen. Aus diesen Werten wurde eine Standardgerade erstellt.

3.2.4.3 Untersuchungen an einer humanen Nierenbiopsie

Zusätzlich zur induzierbaren Zelllinie wurden noch Schnitte einer in Paraffin eingebetteten Patientenbiopsie untersucht. In den 1960ern wurde diese einem Patienten entnommen, der die Mutation im FAP2-Gen aufwies. Die Biopsie wurde uns von Prof. Robert Kleta zur Verfügung gestellt.

3.2.4.3.1 Histologische Färbungen

Es wurden zwei verschiedene histologische Färbungen durchgeführt. Zum einen wurde die Niere mit Hilfe der HE-Färbung auf ihre Histologie untersucht. Diese Färbung wurde wie unter 3.2.2.3 beschrieben durchgeführt. Es wurden jeweils Schnitte der Patientenbiopsie sowie als Kontrolle Schnitte von humanen Nierenproben gefärbt.

Zum anderen wurde eine Masson-Goldner-Färbung durchgeführt, mit deren Hilfe Gewebeproben auf Kollagen-haltige Bereiche überprüft werden. Die Färbung wurde wie unter 3.2.2.4 beschrieben durchgeführt. Es wurden wiederum Schnitte der Patientenbiopsie gefärbt sowie als Kontrolle Schnitte von humanen Nierenproben.

3.2.4.3.2 FAP2-Expression in der Patientenbiopsie

Um die FAP2-Expression in der Patientenbiopsie zu überprüfen, wurden die Schnitte nach dem unter 3.2.2.1 beschriebenen Protokoll gefärbt. Als primärer Antikörper wurde anti-FAP2 in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt.

3.2.4.3.3 Elektronenmikroskopische Untersuchung der Patientenbiopsie

Für die Elektronenmikroskopie wurde ein Stück der Biopsie zunächst vollständig von Paraffin befreit und in Epon eingebettet. Die Entparaffinierung wurde unter der Leitung von Dr. Josef Schröder am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg durchgeführt. Die Einbettung in Epon sowie das Anfertigen der Schnitte erfolgte am Institut für Anatomie wie unter Punkt 3.2.4.2.2 beschrieben.

3.2.5 Mikroskopie

Die Übersichtsaufnahmen wurden mit einem Zeiss Observer mit motorisiertem Tisch angefertigt. Die Einzelbilder wurden mit einem 10x Plan Apochromat Objektiv gemacht und mit der Software Zeiss Axiovision zu einer Übersichtsaufnahme zusammengefügt und ausgerichtet.

Die konfokalen Aufnahmen entstanden an einem Zeiss LSM710 Mikroskop. Als Software wurde Zeiss Zen verwendet. Die Aufnahmen wurden mit einem 63x Plan Apochromat Öl-Objektiv angefertigt.

3.2.6 Statistik

Zur Bestimmung der Signifikanz wurde der student's t-Test verwendet. Die Zahlen in den Abbildungen geben die Anzahl der Experimente an, die für die Messserie durchgeführt wurden. Aus diesen wurden der Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) gebildet. Als signifikant wurden p-Werte $< 0,05$ gewertet. Entsprechende Ergebnisse wurden mit einem Stern (*) markiert.

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zur Pathophysiologie des EHHADH_{MUT}-assoziierten Fanconi-Syndroms

4.1.1 Untersuchung der Peroxisomenverteilung in der humanen Niere

In Vorarbeiten wurde EHHADH in der humanen Niere bereits mit Hilfe eines eigens hergestellten Antikörpers untersucht. Um die genaue intrazelluläre Lokalisation zu ermitteln, wurden weitere Färbungen auf Schnitten einer humanen Nierenprobe durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Schnitte zum einen mit einem kommerziell erhältlichen Antikörper von gegen EHHADH (abcam anti-EHHADH, Verdünnung 1:50) gefärbt, zum anderen mit einem Antikörper gegen ein peroxisomales Protein, die D-Amino acid-Oxidase (abcam anti-DAMOX, Verdünnung 1:100). Eine Kofärbung beider Antikörper war nicht möglich, da beide Antikörper aus dem Kaninchen stammen.

In der Übersicht war eine positive Färbung für EHHADH nur in den spät-proximalen Bereichen (S2/S3-Segment) der Niere erkennbar (Abb. 8). Der frühe proximale Tubulus sowie die medullären Bereiche waren negativ.

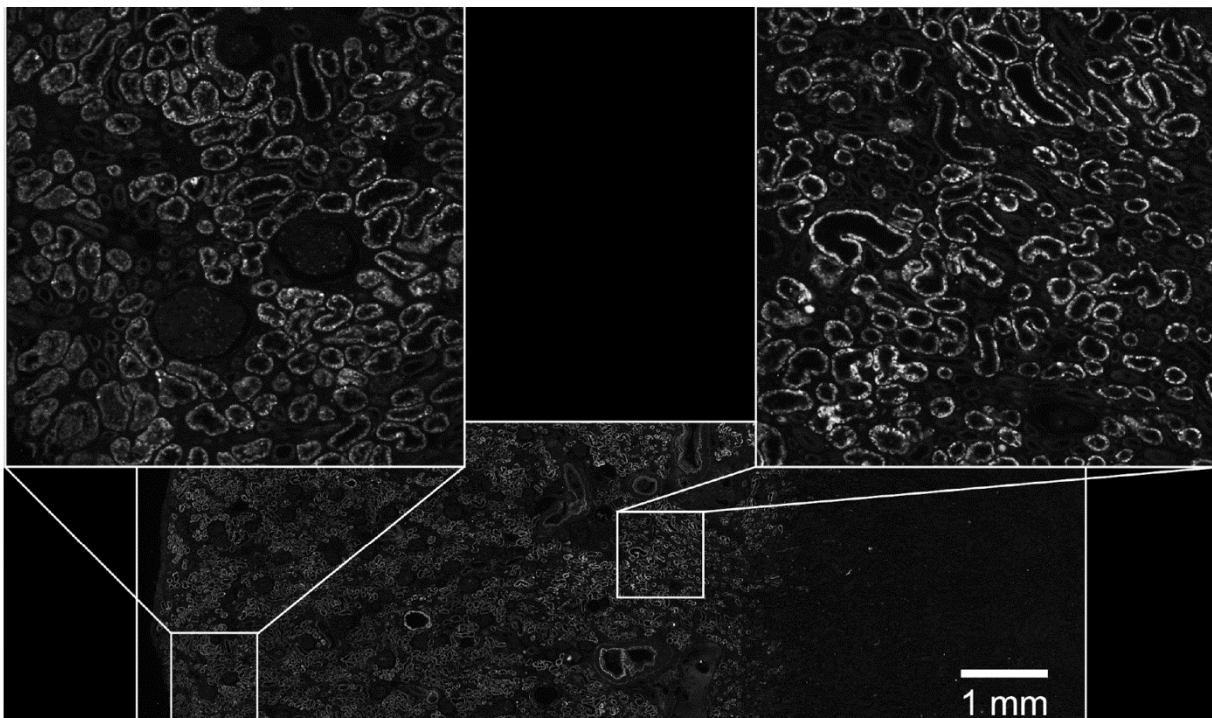


Abb. 8: Immunfluoreszenzfärbung einer humanen Niere. EHHADH (abcam anti-EHHADH) war nur in den spät-proximalen Tubuli lokalisiert.

Die Färbung derselben Niere auf den Peroxisomenmarkers DAMOX ergab ein vergleichbares Expressionsmuster wie für EHHADH (Abb. 8). Die proximalen Tubuli waren positiv, wohingegen in den medullären Bereichen keinerlei Expression erkennbar war.

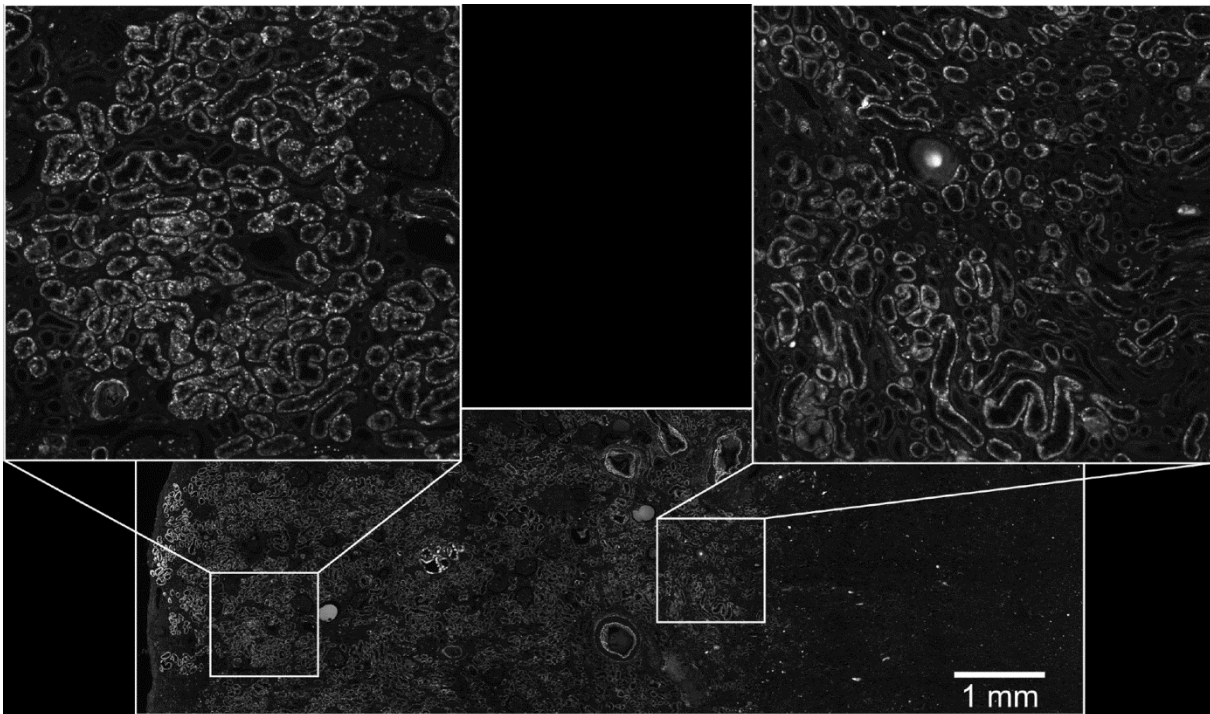


Abb. 9: Immunfluoreszenz derselben humanen Niere. DAMOX war im corticalen Bereich in den proximalen Tubuli exprimiert. Medulläre Bereiche waren negativ.

In einer höheren Vergrößerung ließ sich eine spezifische Färbung im proximalen Tubulus erkennen (Abb. 10). Die AQP2-positiven Tubulussegmente zeigten keine Expression. In den proximalen Tubuli wurde EHHADH granulär exprimiert.

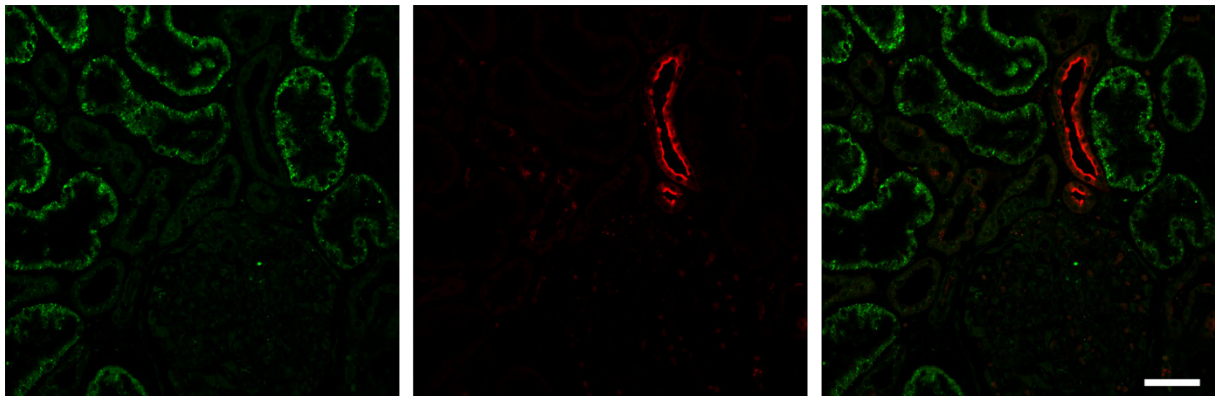


Abb. 10: Immunfluoreszenz einer humanen Niere auf EHHADH (abcam, in grün) und AQP2 (in rot).

Die Färbung auf DAMOX ergab ein ähnliches Expressionsmuster (Abb. 11) wie bei der Färbung auf EHHADH. In den proximalen Tubuli ließ sich ein spezifisches Signal detektieren. Die mit dem Sammelrohrmarker Aquaporin2 (AQP2) gefärbten Tubulussegmente waren hingegen negativ für DAMOX. Diese Befunde ließen darauf schließen, dass EHHADH in den spät-proximalen Tubuli peroxisomal lokalisiert war.

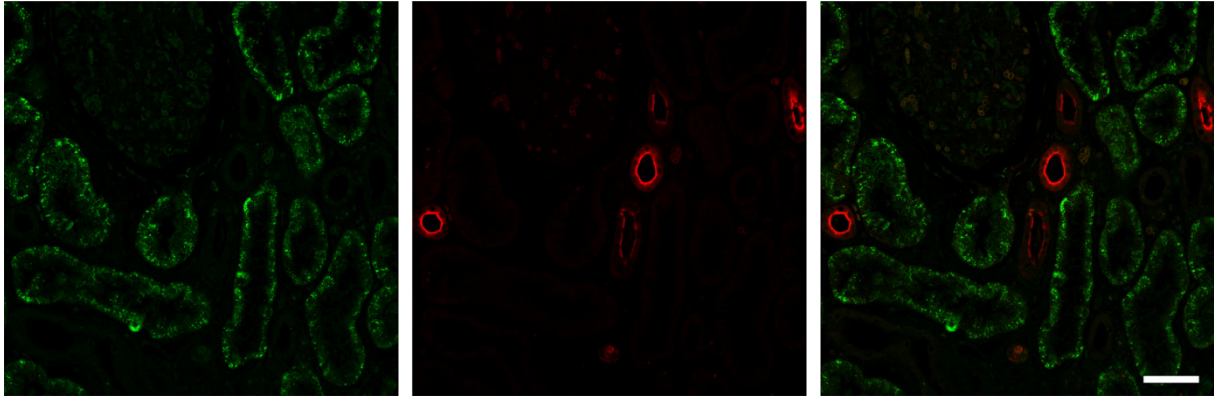


Abb. 11: Immunfluoreszenz derselben humanen Niere auf D-Amino acid oxidase (abcam anti-DAMOX, in grün) und AQP2 (in rot)

4.1.2 Untersuchung der intramitochondrialen Lokalisierung mittels ReAsH-Färbung

Die positive Färbung auf den Peroxisomenmarker DAMOX bestätigte die Lokalisation von EHHADH in den Peroxisomen des proximalen Tubulus. Um allerdings die genaue Lokalisation des mutierten Proteins in den Mitochondrien zu untersuchen, war die Immunfluoreszenz nicht geeignet. Dies wurde mit Hilfe der ReAsH-Methode ermittelt. Dabei wird zunächst ein Tetracystein-Motiv (oder TC-Tag) in die Zielsequenz kloniert. Da im Falle des mutierten EHHADH sowohl am N- wie auch am C-Terminus eine mitochondriale respektive eine peroxisomale Targeting-Sequenz vorliegt, musste der TC-Tag in die Mitte des EHHADH-Proteins eingebracht werden. Nach der transienten Transfektion von LLC-PK1-Zellen mit dem Wildtyp- oder dem mutierten Protein wurden die Zellen am Institut für Anatomie photokonvertiert und anschließend Schnitte für die Elektronenmikroskopie angefertigt. Die transfizierten Zellen waren daran zu erkennen, dass sich am Expressionsort des markierten Proteins ein elektronendichter Niederschlag gebildet hatte.

Bei Zellen, die mit dem Wildtyp-Plasmid transfiziert wurden, zeigten nur die Peroxisomen einen dunklen Niederschlag (Abb. 12, schwarze Pfeile), das heißt EHHADH war ausschließlich peroxisomal lokalisiert. Die Mitochondrien hatten eine unauffällige Morphologie (Abb. 12, weiße Pfeile).

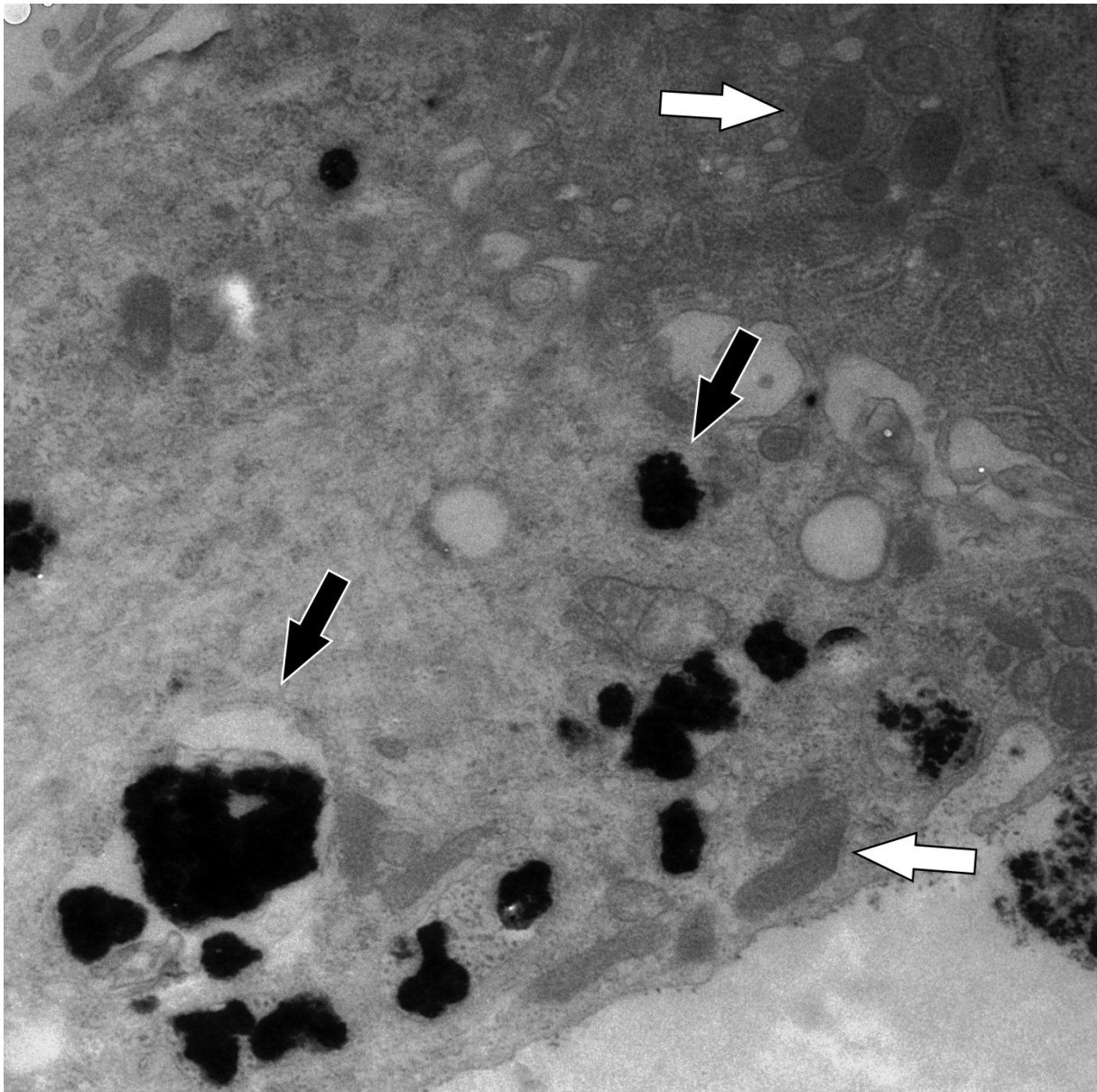


Abb. 12: ReAsH-Färbung einer mit EHHADH_{WT} transfizierten LLC-PK1-Zelle. Die schwarzen Pfeile markieren Peroxisomen, die weißen Pfeile markieren Mitochondrien. Die schwarzen Bereiche sind elektronendichter Niederschlag an den Expressionsorten des Proteins

Bei Zellen, die mit dem mutierten Plasmid transfiziert wurden, konnte man sowohl dunkle Peroxisomen (Abb. 13, schwarze Pfeilspitze) als auch dunkle Mitochondrien erkennen. Dabei schien die mitochondriale Matrix im gesamten dunkel eingefärbt zu sein (Abb. 13, schwarze Pfeile). In untransfizierten Zellen fehlte der dunkle Niederschlag in den Mitochondrien. Doppelmembran und Cristae waren deutlich erkennbar (Abb.13, weiße Pfeile).

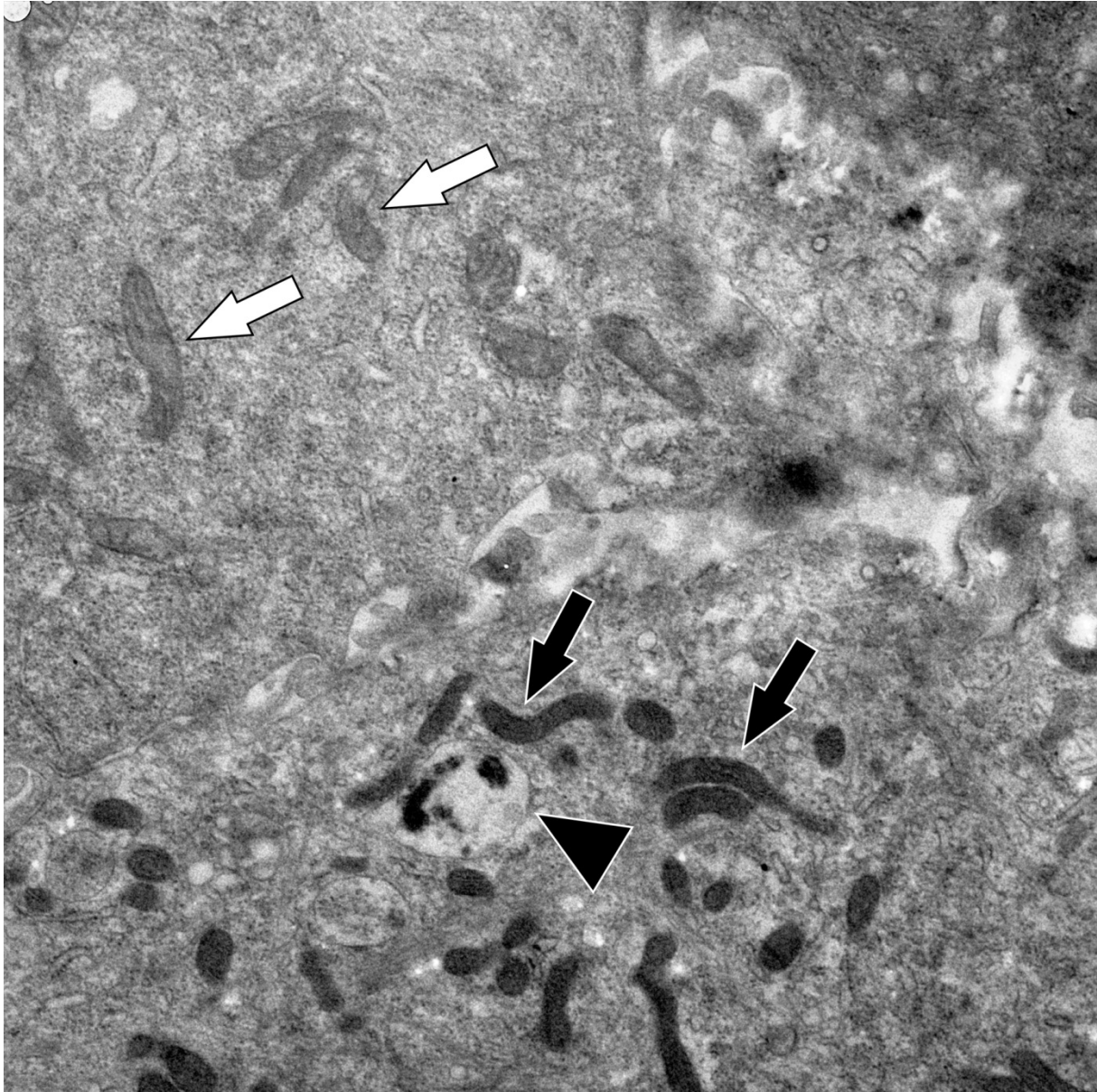


Abb. 13: LLC-PK1-Zellen, die mit EHHADH_{MUT} transfiziert wurden. Untransfizierte Zellen zeigten unauffällige Mitochondrien (weiße Pfeile). Transfizierte Zellen wiesen Mitochondrien auf, deren Matrix erkennbar dunkler war (schwarze Pfeile) ebenso wie schwarzen Niederschlag in Peroxisomen (schwarze Pfeilspitze)

4.1.3 Untersuchung der Transportkapazität

Die Messung der mitochondrialen Funktion in der Respirometrie ergab einen eingeschränkten O₂-Verbrauch bei den EHHADH_{MUT}-Zellen. Da die Resorption filtrierter Stoffe im proximalen Tubulus enorm energieaufwendig ist und die Energie zu 95% in der oxidativen Phosphorylierung der Mitochondrien generiert wird, war es denkbar, dass der eingeschränkte O₂-Verbrauch mit einer verminderten Transportkapazität einhergeht. Um die beeinträchtigte Rückresorption in Anwesenheit von mutiertem EHHADH *in vitro* zu untersuchen, wurden EHHADH_{WT}- und EHHADH_{MUT}-Zellen auf Filtern ausgesät. Die Innenseite des Filters stellt dabei die apikale Seite dar, die Außenseite des Filters die basolaterale. Nach Erreichen einer konfluenten Zelldecke wurden 100 µl der Transportlösung bestehend aus 200 mM α-D-Methylglucosid (α-MDG) und 100 mM Mannitol zugegeben, so dass in

jedem Filter ein Gesamtvolumen von 600 μl vorlag. α -MDG wird von den Na^+ -gekoppelten Glucosetransportern SGLT1 und SGLT2 in die Zellen aufgenommen, dort aber nicht verstoffwechselt. Der Zucker Mannitol wird hingegen nicht transzellulär transportiert und kann nur bei Undichtigkeit des Epithels von der apikalen Seite zur basolateralen gelangen. Mannitol wurde daher als Markersubstanz für die Dichtigkeit des Epithels eingesetzt. Nach vier Stunden wurden sowohl eine Probe der apikalen Seite als auch eine Probe der basolateralen Seite entnommen, die anschließend massenspektrometrisch vermessen wurden.

Die Messung von Mannitol ergab eine größere Diffusion über den Monolayer bei $\text{EHHADH}_{\text{WT}}$ -Zellen verglichen mit $\text{EHHADH}_{\text{MUT}}$ -Zellen, in denen in den basolateralen Proben kaum Mannitol nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Sowohl bei den Wildtyp-Zellen als auch bei den mutierten Zellen war das Verhältnis von α -MDG zu Mannitol auf der basolateralen Seite in Richtung α -MDG verschoben, was dafür spricht, dass der Monolayer konfluent war. Die Konzentration von α -MDG in der basolateralen Probe war deutlich erhöht in den $\text{EHHADH}_{\text{WT}}$ -Zellen verglichen mit den $\text{EHHADH}_{\text{MUT}}$ -Zellen. Aus der gemessenen Konzentration wurde der α -MDG-Transport über einen Zeitraum von 4 Stunden errechnet. Dabei zeigten $\text{EHHADH}_{\text{MUT}}$ -Zellen einen deutlich verringerten Transport von α -MDG (Abb. 14). Die $\text{EHHADH}_{\text{WT}}$ -Zellen transportierten etwa fünfmal so viel α -MDG wie die Zellen, die das mutierte Protein überexprimieren.

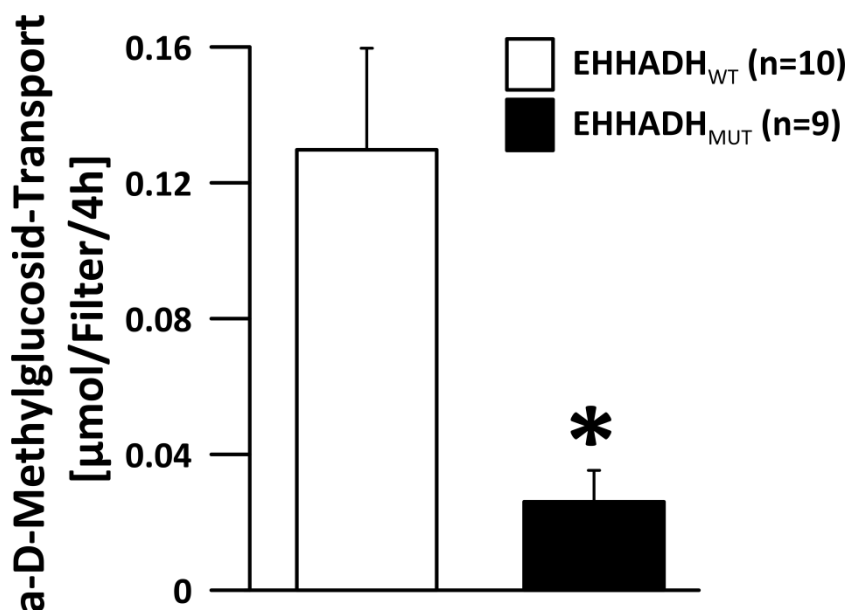


Abb. 14: Evaluation der Transportkapazität stimulierter EHHADH-Zellen

4.2 Untersuchungen zur Pathophysiologie von FAP2_{MUT}

4.2.1 FAP2-Expression in humanem und murinem Gewebe

Die Expression von FAP2 wurde an humanen Nierenproben untersucht. Die Schnitte wurden co-färbt mit Calbindin als Marker des distalen Tubulus und Verbindungsstücks sowie AQP2 als Marker des Verbindungsstücks und des Sammelrohrs

Die Übersichtsaufnahmen zeigten eine starke Expression von FAP2 im proximalen Tubulus, wohingegen in den distalen Segmenten keine Färbung erkennbar war (Abb. 15). Es war keine Koexpression erkennbar, weder mit Calbindin noch mit AQP2, so dass eine relevante Expression in distalen Tubulussegmenten ausgeschlossen werden kann.

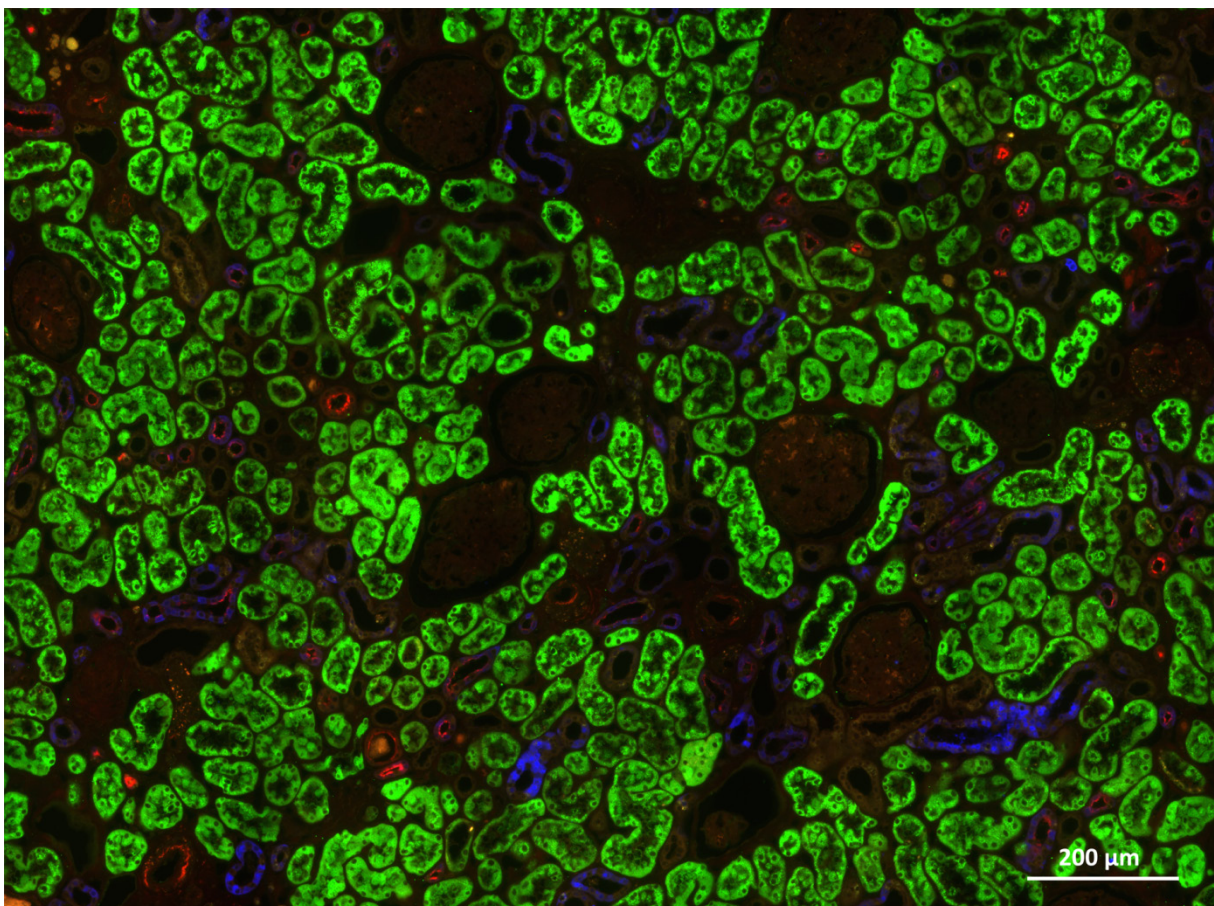


Abb. 15: Immunfluoreszenzfärbung einer humanen Niere. Die FAP2-Immunfluoreszenz (grün) ist ausschließlich in proximalen Tubulussegmenten detektierbar. Calbindin-positive distale Tubuli (blau) und AQP2-positive Sammelrohre (rot) zeigen keine FAP2-Färbung.

In einer höheren Vergrößerung erkannte man ein gefiedertes Muster, welches eher basolateral verteilt ist (Abb. 16). Diese Färbung ist charakteristisch für mitochondriale Proteine, da die Mitochondrien im proximalen Tubulus basolateral zwischen den Membraneinfaltungen palisadenförmig angeordnet sind.

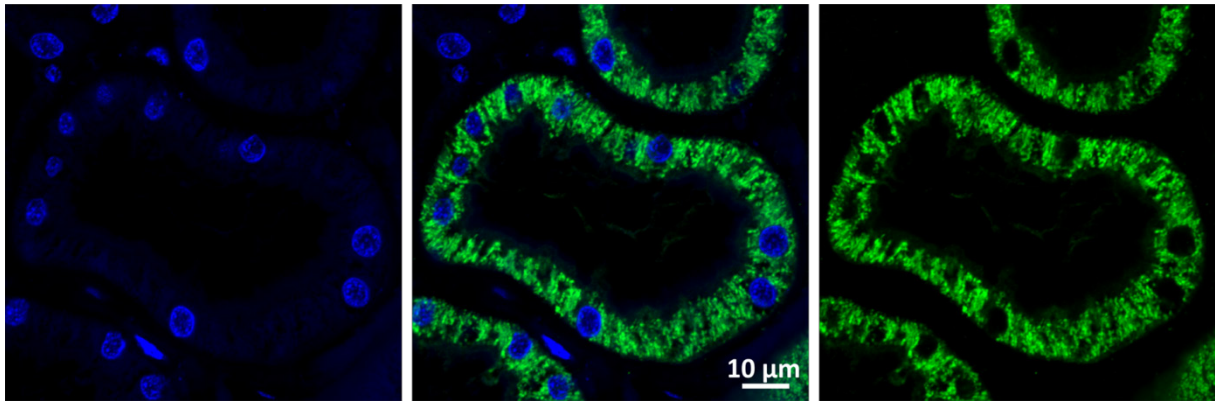


Abb 16: FAP2-Immunfluoreszenz in höherer Vergrößerung. In den proximalen Tubuli erkennt man eine gefiederte Färbung, die eher basolateral liegt.

Im Hinblick auf die geplante Untersuchung einer knockout- und knockin-Maus wurde weiterhin die Expression von FAP2 in der murinen Niere untersucht.

Hier war ein ähnliches Bild wie beim Menschen erkennbar. Die Expression ist auf die corticalen Bereiche beschränkt (Abb. 17). Die medullären Bereiche sind negativ für FAP2. Es war eine Kolo-kalisation mit f-Actin erkennbar, die allerdings auf den früh-proximalen Bereich beschränkt war. Der spät-proximale Tubulus war negativ für FAP2.

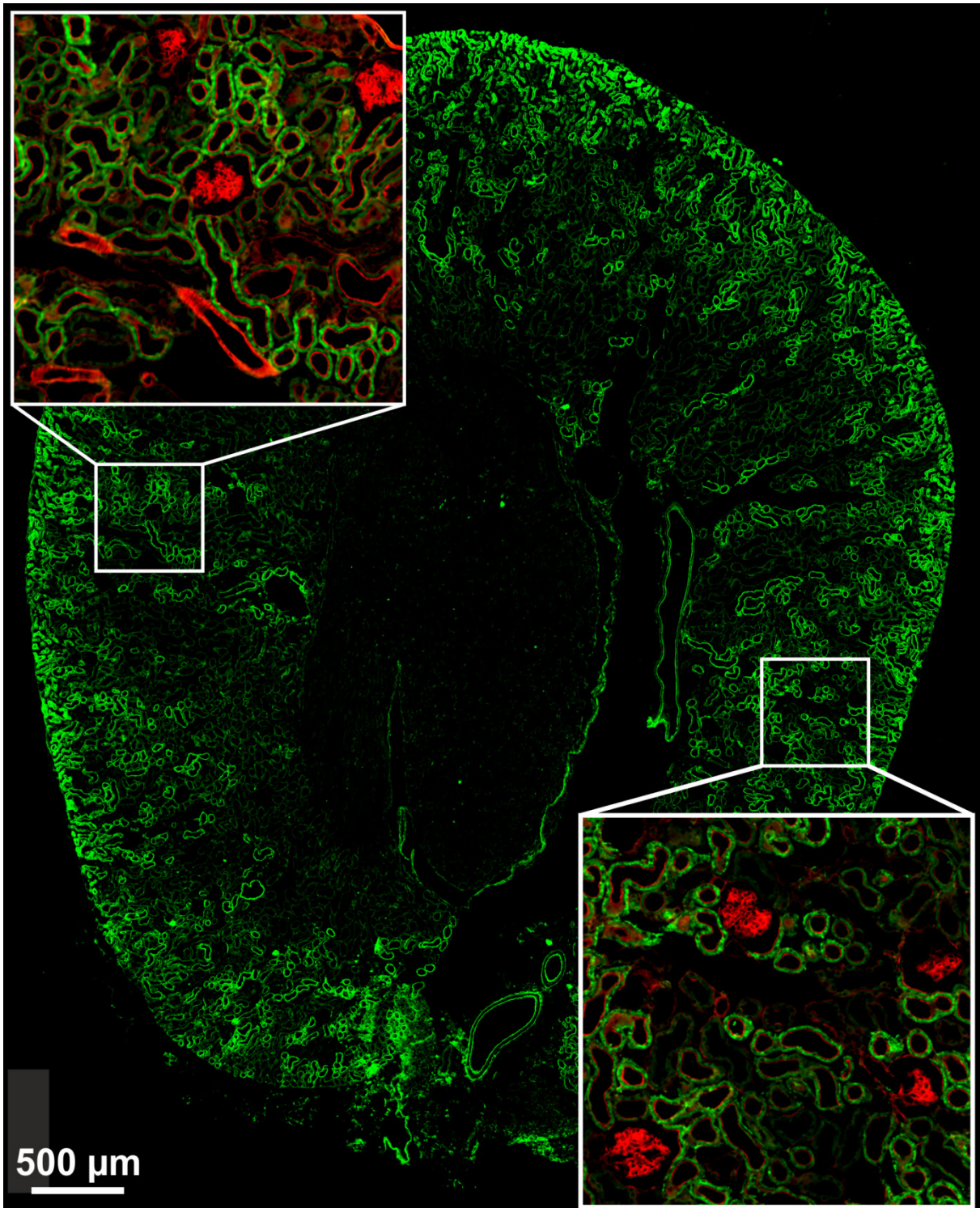


Abb. 17: Expression von FAP2 in der murinen Niere. FAP2 (grün) ist im corticalen Bereich exprimiert. FAP2 kolokalisiert mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin, welches an f-Actin bindet (rot).

Bei einer höheren Vergrößerung erkennt man, dass die Expression bereits am Harnpol beginnt und im Verlauf des proximalen Tubulus abnimmt (Abb. 18). Dies ist daran erkennbar, dass noch Segmente des proximalen Tubulus positiv für F-Actin sind, in denen keine FAP2-Expression mehr zu sehen ist.

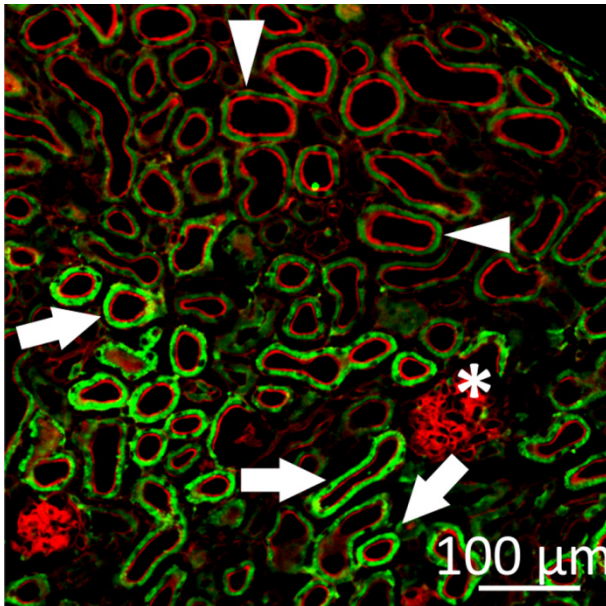


Abb. 18: Die FAP2-Expression (grün) beginnt direkt am Harnpol (weißer Stern) und ist auf die früh-proximalen Segmente beschränkt (weiße Pfeile). Fluoreszenzmarkiertes Phalloidin, welches an f-Actin bindet, (rot) als Marker des Bürstensaums des proximalen Tubulus färbt zusätzlich in spät-proximalen Segmenten, in denen keine FAP2-Expression detektierbar ist (weiße Pfeilspitzen).

4.2.2 Untersuchungen am FAP2-Zellmodell

4.2.2.1 FAP2-Expression in induzierbaren LLC-PK1-Zellen

Die intrazelluläre Lokalisation des Proteins wurde an stabil transfizierten, induzierten LLC-PK1-Zellen untersucht. Es wurden jeweils FAP2_{WT}- und FAP2_{MUT}-Zellen gefärbt.

Die Mitochondrien der Wildtyp-Zellen zeigten in der Immunfluoreszenz eine verhältnismäßig unauffällige Morphologie (Abb. 19). Die Mitochondrien erschienen etwas fragmentiert. FAP2 kolokalisierte mit dem Mitochondrienmarker Mitotracker.

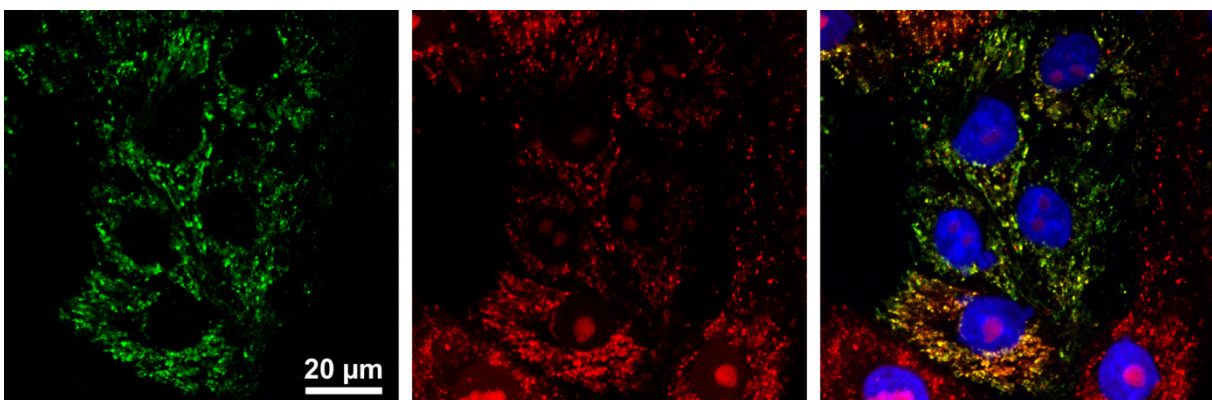


Abb. 19: FAP2_{WT}-Expression (grün) ist in den mit Mitotracker markierten Mitochondrien (rot) lokalisiert. Die gelben Bereiche zeigen eine Kofärbung von FAP2 und Mitotracker

Im Gegensatz dazu zeigten FAP2_{MUT}-Zellen stark elongierte Mitochondrien, die filamentartig die Zelle durchzogen (Abb. 20).

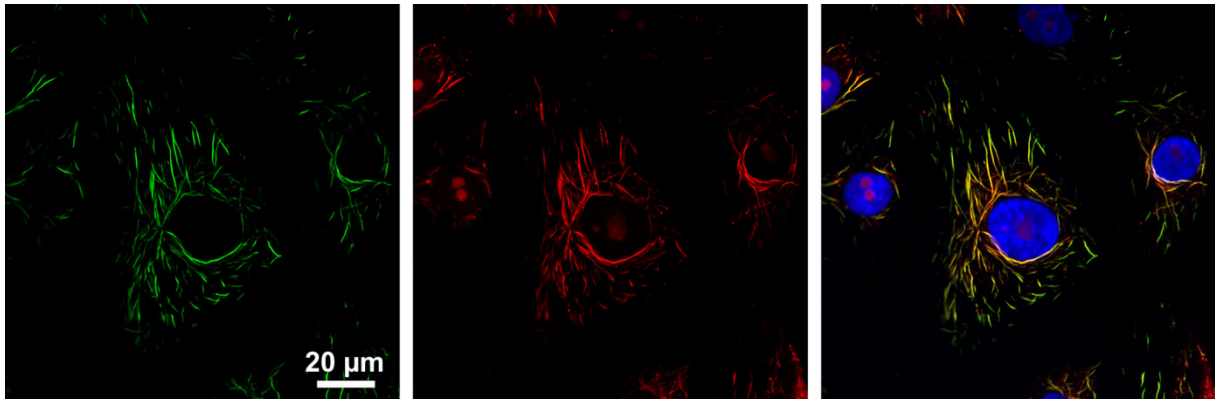


Abb. 20: FAP2_{MUT} (grün) führte zur Ausbildung elongierter Mitochondrien (rot). Hier konnte man ebenfalls eine Kofärbung von FAP2 und Mitotracker sehen.

4.2.2.2 Elektronenmikroskopische Untersuchung von induzierten LLC-PK1-Zellen

Bereits bei den verhältnismäßig niedrigen Vergrößerungen, die bei der Aufnahme konfokaler Bilder erreicht werden können, stach die extrem veränderte mitochondriale Morphologie der FAP2_{MUT}-Zellen ins Auge. Um die Ursache für die veränderte Morphologie genauer zu ermitteln, wurden induzierte Zellen mit Hilfe der Elektronenmikroskopie genauer untersucht.

Während FAP2_{WT}-Zellen in der Immunfluoreszenz wenig auffällig erschienen, bot sich in der Elektronenmikroskopie ein anderes Bild. Die Mitochondrien erscheinen aufgebläht mit wenig sichtbaren Cristae (Abb. 21). Es handelt sich unzweifelhaft um Mitochondrien, da immer noch die Doppelmembran und einzelne Cristae erkennbar sind. Die veränderte Morphologie ist vermutlich auf die Überexpression des stabil transfizierten FAP2 zurückzuführen, welches in die Mitochondrien importiert wurde und dort möglicherweise zum Anschwellen der Mitochondrien führte.

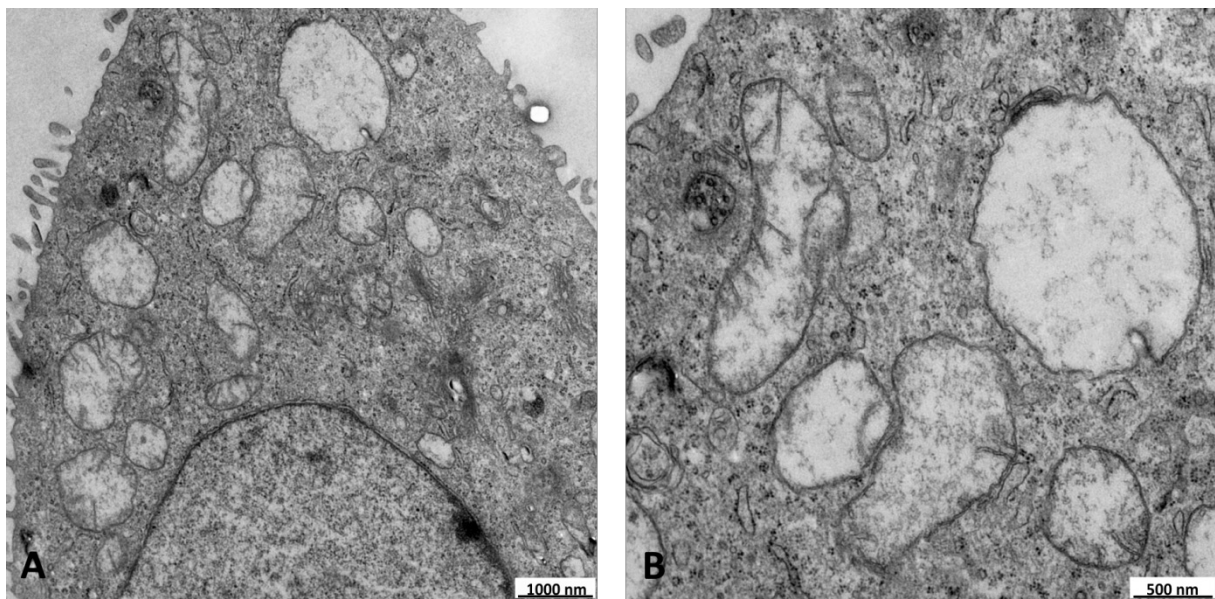


Abb. 21: FAP2_{WT}-Zellen nach Stimulation. Die Mitochondrien erschienen aufgebläht mit wenigen Cristae. Dies war vermutlich durch die Überexpression des mitochondrialen FAP2 bedingt

FAP2_{MUT}-Zellen zeigten einen noch auffälligeren Phänotyp. Die Mitochondrien waren stark elongiert und wurden von filamentartigen Fasern durchzogen (Abb. 22). Zwar waren noch vereinzelte

Mitochondrien erkennbar, die eine relativ normale Morphologie zeigten. Es hatte jedoch den Anschein, dass der Großteil der Mitochondrien als Riesenmitochondrien vorlag, die die filamentartigen Einschlüsse beinhalteten.

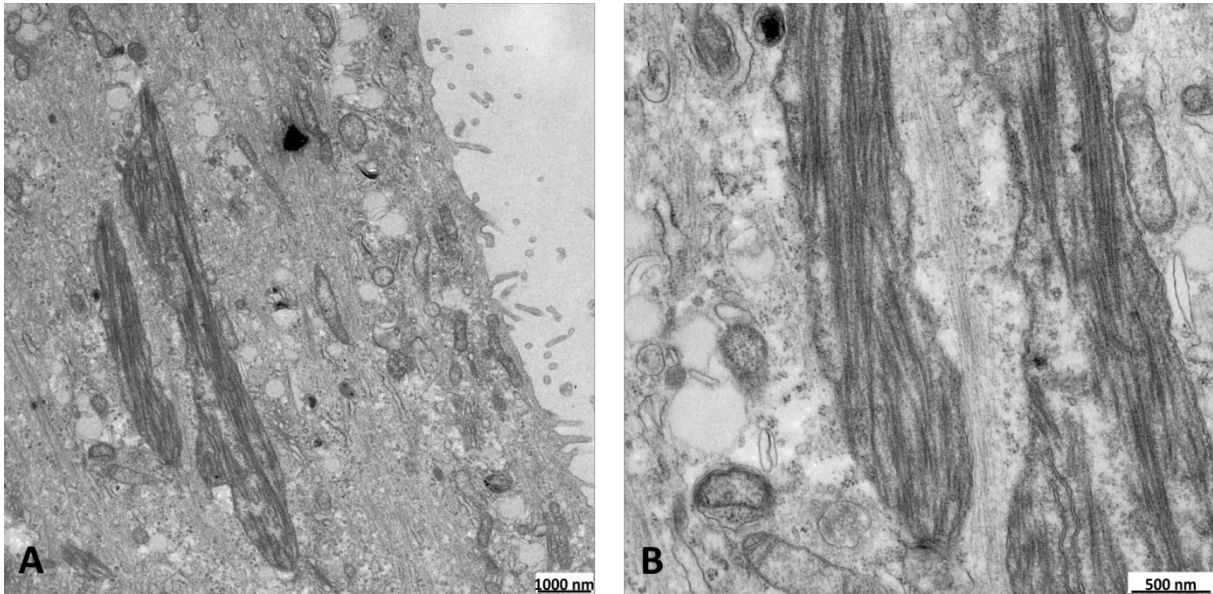


Abb. 22: Die Morphologie der FAP2_{MUT}-Zellen war massiv verändert. Die Zellen waren gefüllt mit filamentartigen Strukturen.

Auch hier waren sowohl die Doppelmembran als auch vereinzelte Cristae erkennbar. Allerdings war die Morphologie der Mitochondrien stark verändert verglichen mit induzierten FAP2_{WT}- oder nicht-induzierten bzw. VEK-Zellen.

Die nicht-induzierten Zellen zeigten sowohl für FAP2_{WT}- als auch für FAP2_{MUT}-Zellen keine Veränderung der Mitochondrienmorphologie (Abb. 23).

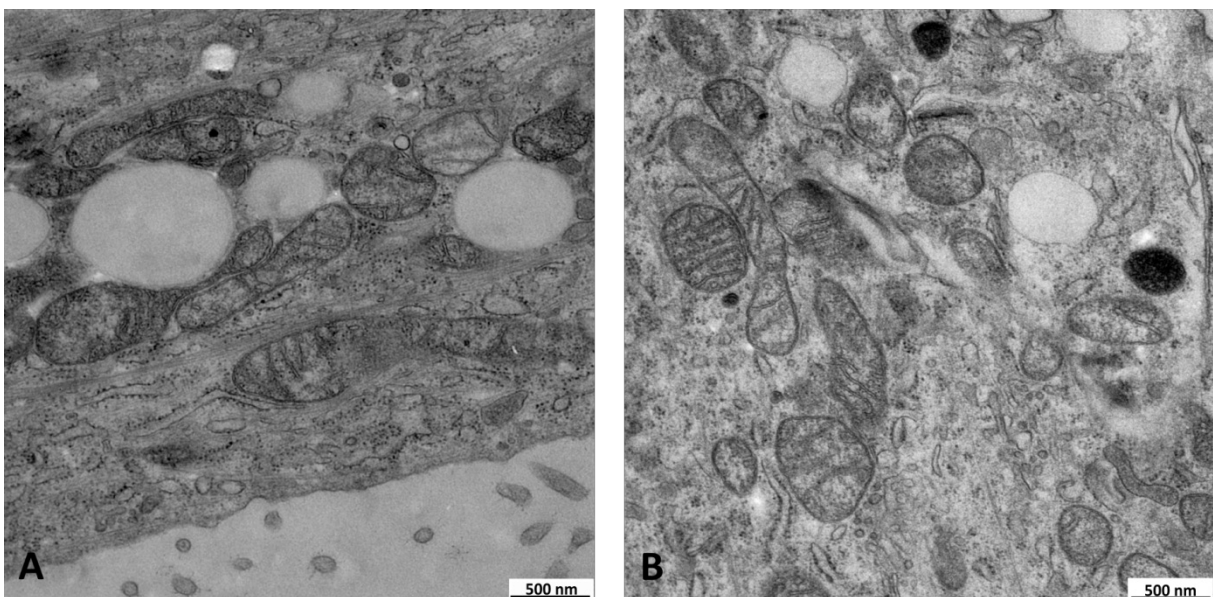


Abb. 23: Die Mitochondrien nicht-induzierter FAP2_{WT}-Zellen (Abbildung A) und nicht-induzierter FAP2_{MUT}-Zellen (Abbildung B) zeigten keinerlei Auffälligkeiten.

VEK-Zellen hatten sowohl bei Behandlung mit als auch ohne Tetrazyklin keine veränderte Morphologie. Daraus lässt sich schließen, dass die Veränderungen durch die Expression des jeweiligen Gens verursacht wurden und kein Tetrazyklin-vermittelter Effekt waren (Daten nicht gezeigt).

4.2.2.3 Untersuchung der Halbwertszeit der intramitochondrialen Filamente

In einem weiteren Experiment sollte untersucht werden, ob die Zellen in der Lage sind, das überexprimierte Protein wieder abzubauen. Zu diesem Zweck wurden die Zellen zunächst zwei Wochen mit Tetrazyklin stimuliert. Anschließend wurde die Hälfte der Zellen mit normalem Medium ohne Tetrazyklin weiterkultiviert.

Nach zwei Wochen Induktion erkennt man wieder deutlich die elongierten Mitochondrien, die sich teilweise um den Zellkern anordnen (Abb. 24).

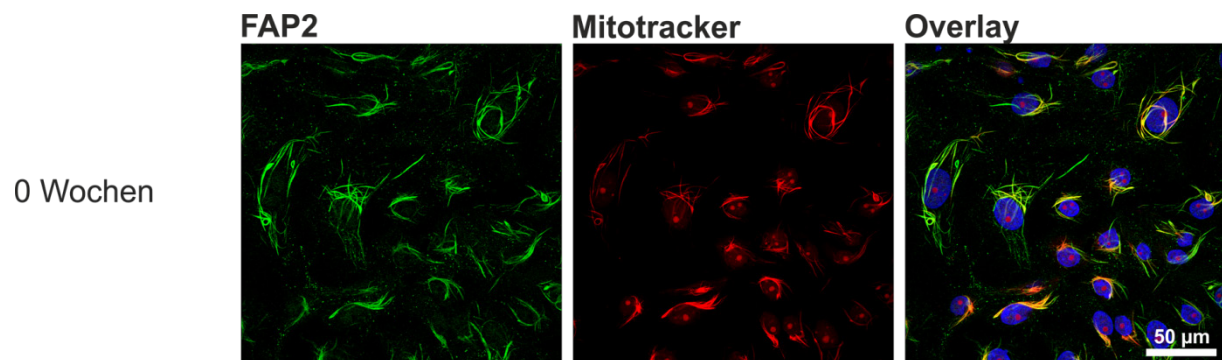


Abb. 24: FAP2 (grün) zeigte eine mitochondriale Expression, erkennbar durch die gelben Bereiche im Overlay

Nach weiteren acht Wochen Stimulation war das mutierte Protein unverändert vorhanden (Abb. 25). Die Mitochondrien schienen sich im Verlauf des Experiments aufzublähen, da immer wieder Ausbeulungen aus den Fasern zu erkennen waren. Es waren auch weiterhin stark verlängerte Mitochondrien erkennbar. Es hatte jedoch den Anschein, dass die Länge der Mitochondrien nicht mehr zunimmt sondern nur die Dicke.

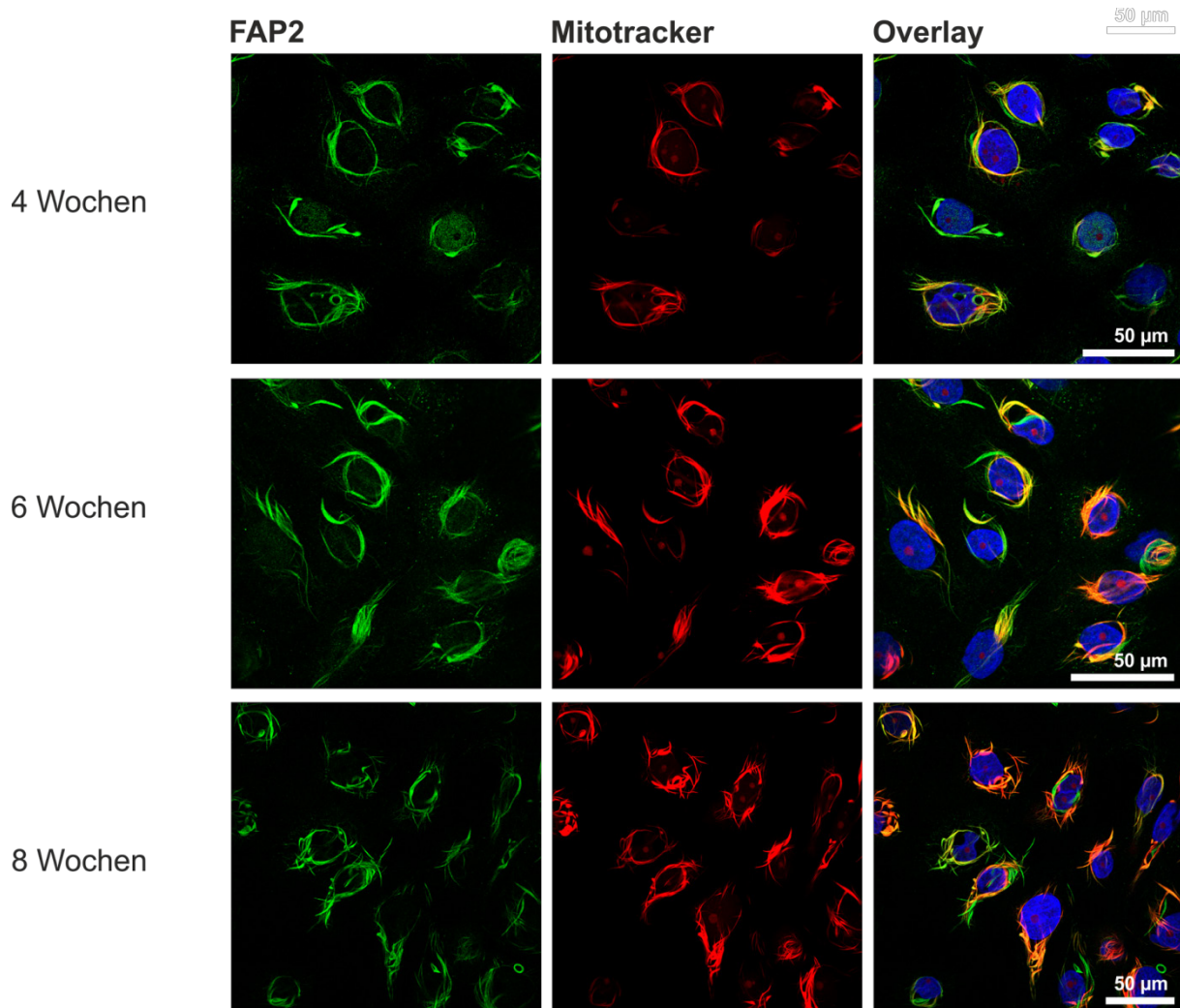


Abb. 25: Die Überexpression von FAP2 (grün) kann durch konstante Zugabe von Tetrazyklin aufrechterhalten werden. Die Morphologie der Mitochondrien (rot) verändert sich beständig innerhalb von 8 Wochen Induktion. Es waren weiterhin lange Mitochondrien erkennbar, aber auch „ausgebeulte“ Mitochondrien.

Die Zellen, die nach zwei Wochen Induktion wieder ohne Tetrazyklin kultiviert wurden, zeigten nach acht Wochen ohne Tetrazyklin immer noch eine positive Färbung auf das mutierte Protein (Abb. 26). Die Mitochondrien waren jedoch nicht mehr im gleichen Ausmaß verändert wie bei den durchgehend induzierten Zellen. Die Mitochondrien behielten ihre elongierte Form, schienen sich jedoch nicht im gleichen Maße aufzublähen wie in den permanent induzierten FAP2_{MUT}-Zellen.

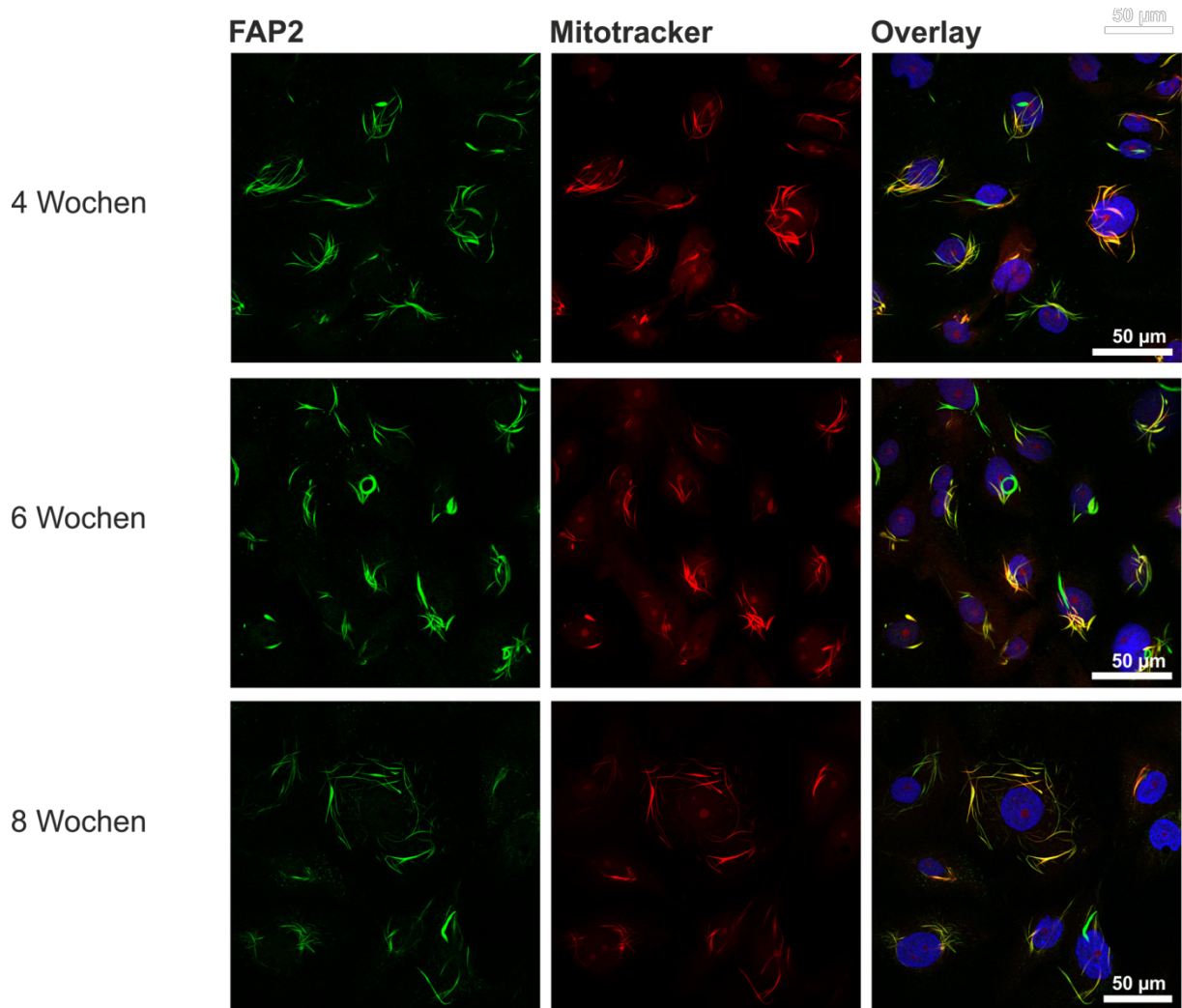


Abb. 26: FAP2 (grün) konnte auch acht Wochen nach Ende der Stimulation weiter nachgewiesen werden. Die Mitochondrien (rot) änderten ihre Morphologie jedoch nicht so stark wie in den permanent induzierten Zellen.

4.2.2.4 Immuno-Gold-Färbung auf FAP2 an induzierten LLC-PK1-Zellen

Um zu untersuchen, ob FAP2_{MUT} am Aufbau der intramitochondrialen Filamente beteiligt war, wurde eine Immuno-Gold-Färbung der induzierten Zellen am Elektronenmikroskop untersucht.

FAP2_{WT} konnte nahe an der inneren Mitochondrienmembran nachgewiesen werden. Die Goldpartikel lagen innerhalb der Mitochondrienmatrix (Abb. 27, weiße Pfeile). Im Zytoplasma sowie außerhalb der Mitochondrien waren vereinzelt schwarze Partikel zu erkennen. Dies ist jedoch auf unspezifische Bindungen zurückzuführen.

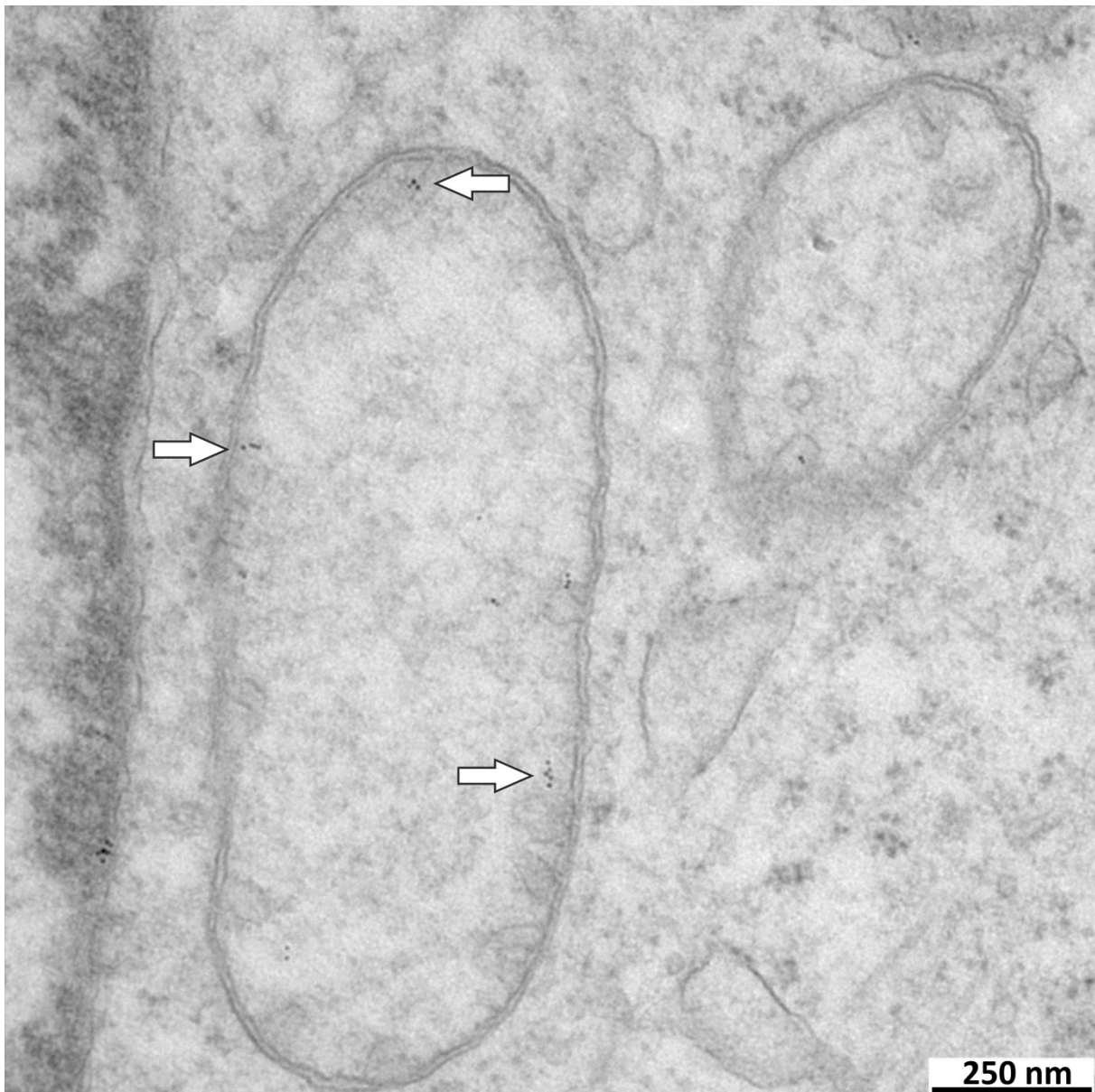


Abb. 27: Immuno-Markierung von FAP2_{WT}-Zellen in der Elektronenmikroskopie. An der inneren Mitochondrienmembran sind eindeutig schwarze Punkte erkennbar, welche die mit Antikörper beschichteten Goldpartikel darstellen (weiße Pfeile)

In FAP2_{MUT}-Zellen waren die Filamente deutlich zu erkennen. Auf den filamentartigen Fasern lag eine Vielzahl von Goldpartikeln auf (Abb. 28, weiße Pfeile). Im Gegensatz zu den Wildtyp-Zellen waren kaum Goldpartikel an der inneren Mitochondrienmembran zu finden. Im Zytoplasma waren ebenfalls keine schwarzen Partikel zu erkennen. FAP2_{MUT} scheint also tatsächlich ein Bestandteil der filamentartigen Strukturen zu sein.

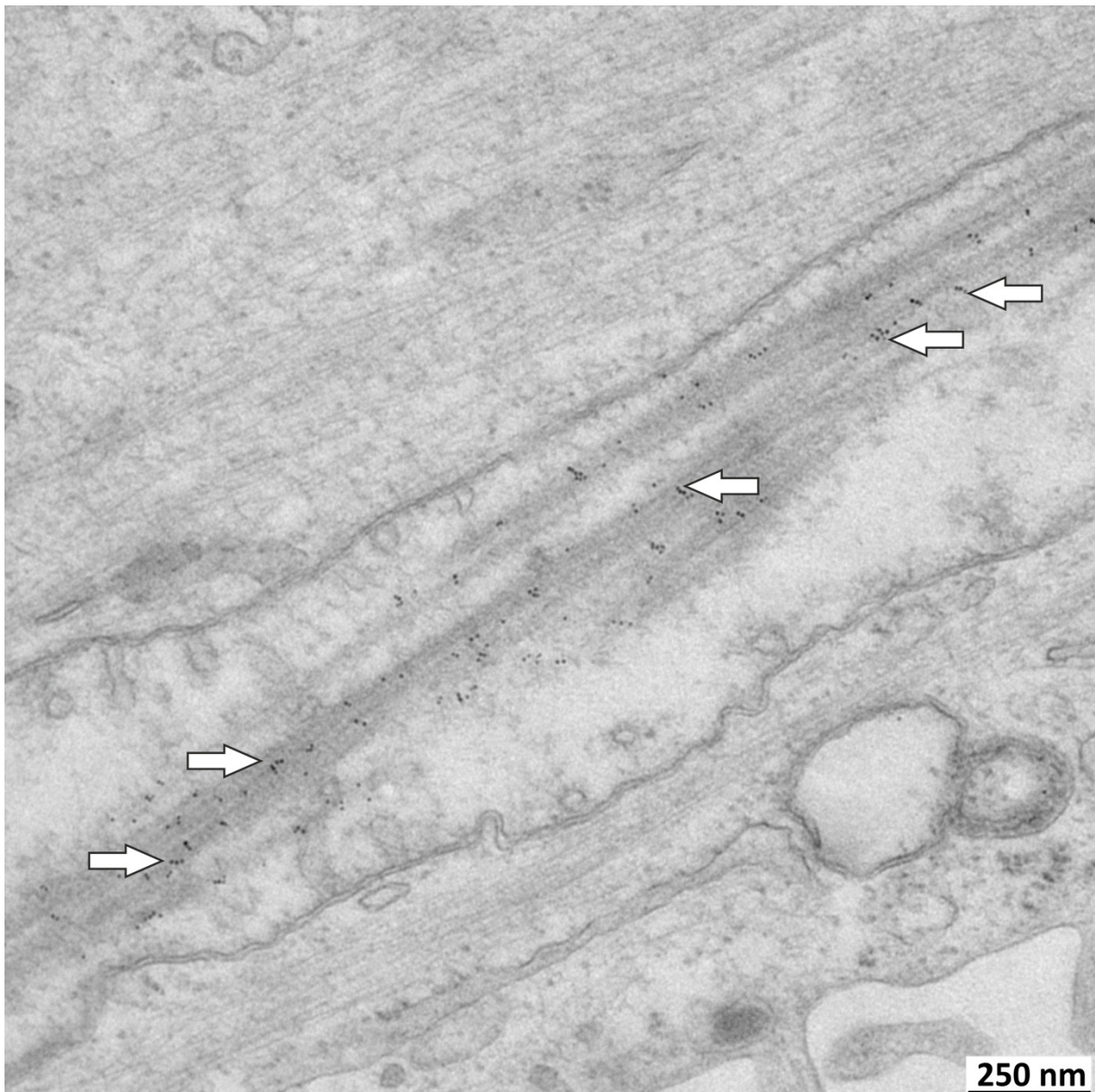


Abb. 28: Immuno-Markierung von FAP2_{MUT}-Zellen. Die schwarzen Punkte (weiße Pfeile) waren ausschließlich auf den Filamenten zu finden.

4.2.3 Funktionelle Untersuchung der FAP2-Zellen

Da die Morphologie der Mitochondrien stark verändert war, sollte untersucht werden, ob dies einen Einfluss auf die respiratorische Funktion der Mitochondrien hatte. Zu diesem Zweck wurde die Aktivität der Atmungskette mit Hilfe der hochauflösenden Respirometrie gemessen.

Die Messung des Sauerstoffverbrauchs von einer Woche lang stimulierten FAP2_{WT} bzw. FAP2_{MUT}-Zellen ergab unterschiedliche Ergebnisse je nach Standardisierung. Bei einer Standardisierung auf die Aktivität der Citratsynthase als Mass des Mitochondrienvolumens zeigten FAP2_{WT}-Zellen einen erhöhten O₂-Verbrauch verglichen mit VEK-Zellen (Abb. 29 A). FAP2_{MUT}-Zellen unterschieden sich weder in der Grundatmung noch unter Zugabe des Entkopplers FCCP von VEK-Zellen. Bei der Stimulation von Komplex I+II war hier ein Unterschied erkennbar. Allerdings lag der O₂-Verbrauch unter dem der FAP2_{WT}-Zellen. Wenn die Ergebnisse auf den DNA-Gehalt der Proben standardisiert

wurden, ergab sich das inverse Ergebnis. FAP2_{WT}-Zellen zeigten nun einen erniedrigten O₂-Verbrauch (Abb. 29 B) verglichen mit VEK-Zellen. FAP2_{MUT}-Zellen zeigten nur bei Stimulation von Komplex I+II einen veränderten O₂-Verbrauch verglichen mit VEK-Zellen.

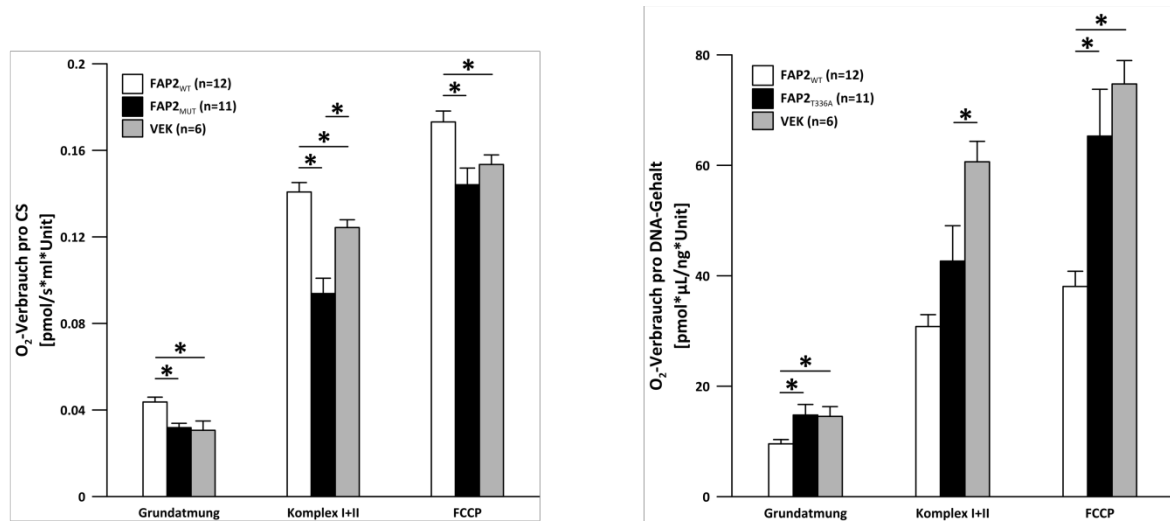
**(A)****(B)**

Abb. 29: Respirometrische Untersuchung der stimulierten FAP2-Zellen. (A) Standardisierung der Ergebnisse auf die Aktivität der Citratsynthase. (B) Standardisierung der Ergebnisse auf den DNA-Gehalt der Proben.

Diese Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass der Import des überexprimierten Wildtyp-Proteins die Mitochondrienfunktion änderte, da der O₂-Verbrauch der FAP2_{MUT}-Zellen näher an dem der VEK-Zellen lag als der O₂-Verbrauch der FAP2_{WT}-Zellen.

Die Aktivität der Citratsynthase wird als Maß für die Mitochondrienmasse verwendet. In unserem Zellmodell schienen jedoch die Mitochondrien der FAP2_{MUT}-Zellen immer weiter zu fusionieren. Daher wurde für die Proben die Aktivität der Citratsynthase pro DNA-Gehalt bestimmt (Abb. 30). FAP2_{WT}-Zellen wiesen eine geringere Citratsynthase-Aktivität auf als FAP2_{MUT}-und VEK-Zellen, die vergleichbare Werte hatten.

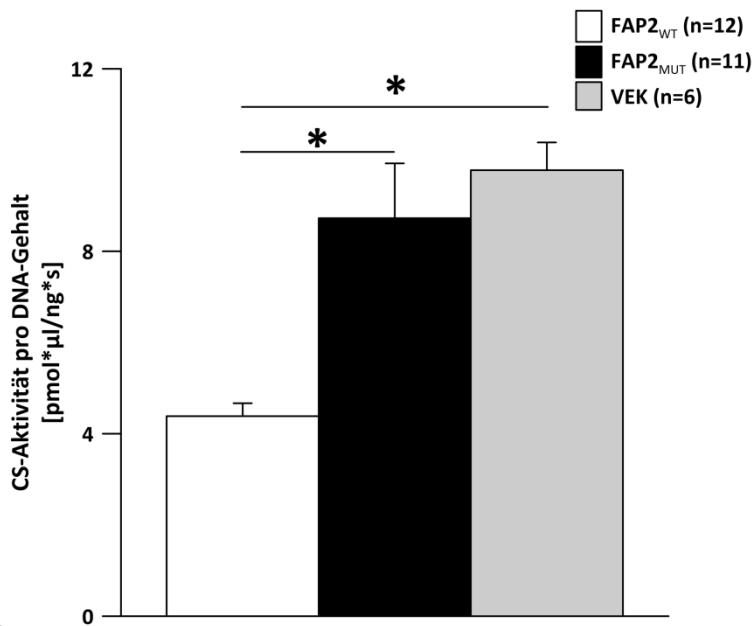


Abb. 30: Bestimmung der CS-Aktivität pro DNA-Gehalt. FAP2_{WT}-Zellen wiesen eine niedrigere Ratio auf als FAP2_{MUT}- und VEK-Zellen, zwischen denen kein Unterschied vorlag.

4.2.4 Histologische Untersuchung einer Patientenbiopsie

Zusätzlich zum Zellmodell konnte noch eine Patientenbiopsie untersucht werden, die von Prof. Kleta zur Verfügung gestellt wurde. Die Biopsie wurde in den 60er Jahren entnommen und in Paraffin eingebettet aufbewahrt. Die untersuchte Patientenbiopsie stammt von einem Patienten, der ebenfalls die T336A-Mutation trug. Als Kontrolle wurden die entsprechenden Färbungen auch auf Schnitten von Gewebeproben durchgeführt, die als peritumorales Gewebe bei Tumorentfernungen mit entnommen wurden. Das peritumorale Gewebe wurde von Dr. Stefan Reinhold (Innere Medizin II, Universitätsklinikum Regensburg) in Paraffin eingebettet zur Verfügung gestellt.

4.2.4.1 Evaluation der Histologie mittels Hämalaun/Eosin-Färbung

Zunächst wurde die Qualität der Probe bzw. der Erhalt des Gewebes mit Hilfe einer Hämalaun/Eosin-Färbung untersucht. In der Patientenbiopsie waren die Glomeruli noch intakt (Abb. 31). Der Bürstensaum des proximalen Tubulus war mit dieser Färbemethode nicht erkennbar, was jedoch ein generelles Problem bei solchen Nierenschnitten darstellt. Die Zellen des proximalen Tubulus hatten eine variable Dicke, während die Zellen des Sammelrohrs noch gut erhalten schienen. Teilweise hatten sich die Zellen des proximalen Tubulus von der Basalmembran abgelöst und waren im Tubuluslumen erkennbar.

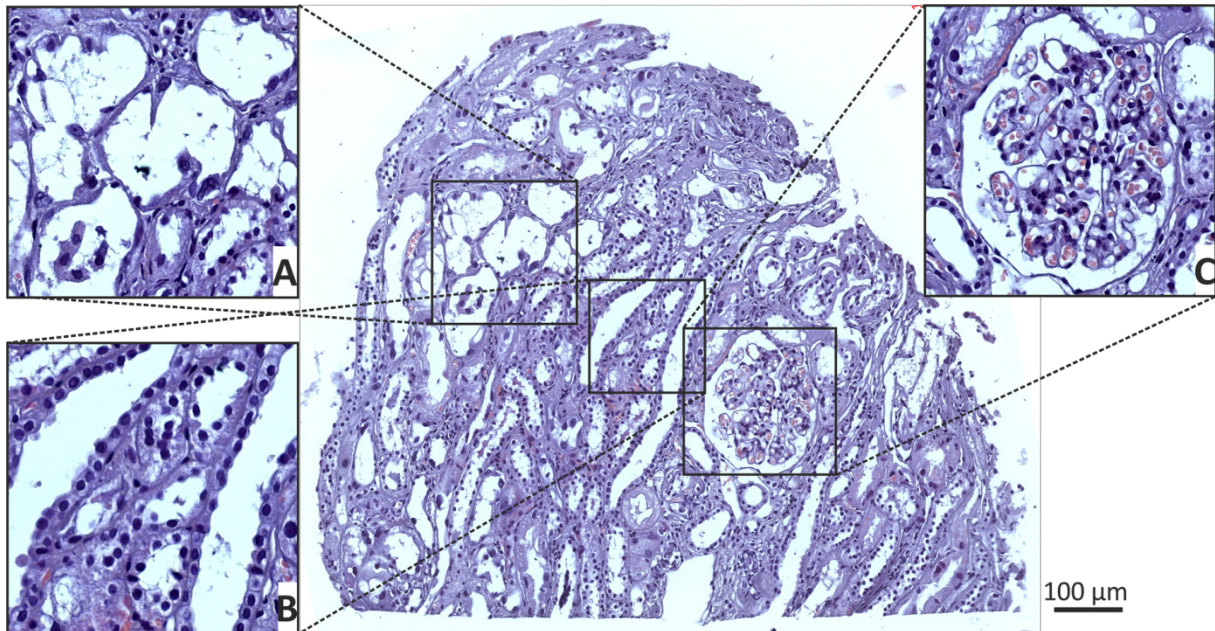


Abb. 31: H/E-Färbung einer Patientenbiopsie. Glomeruli (Abb. C) und distale Segmente (Abb. B) erschienen weitgehend intakt. Die proximalen Tubuli wiesen ein unterschiedlich dickes Epithel auf (Abb. A).

Die H/E-Färbung der Kontrollniere zeigte keine Auffälligkeiten (Abb. 32). Auch hier waren die Glomeruli intakt. Die proximalen Tubuli waren besser erhalten und das Epithel ist dicker. Allerdings war auch hier der Bürstensaum nicht mehr erhalten. Das Lumen war verschlossen, was jedoch dadurch zustande kommt, dass die Proben immersionsfixiert sind.

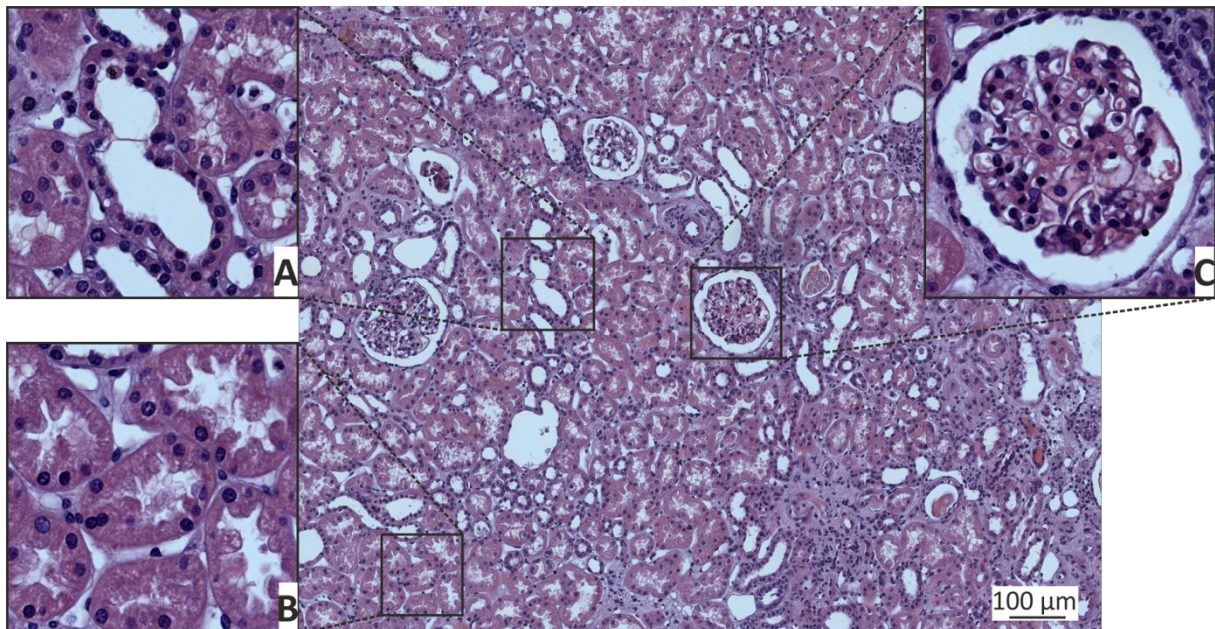


Abb. 32: H/E-Färbung einer Kontrollniere. Die Glomeruli sind weitgehend intakt (Abb. C). Die proximalen Tubuli schienen besser erhalten (Abb. B). Die distalen Bereiche waren morphologisch unauffällig (Abb. A).

4.2.4.2 Untersuchung auf Bindegewebe mittel Masson-Goldner-Färbung

Im nächsten Schritt wurde eine Masson-Goldner-Färbung durchgeführt, um fibrotisches Gewebe erkennen zu können. Bei dieser Methode wird Bindegewebe, das den Großteil fibrotischen Gewebes ausmacht, türkis angefärbt. Die Zellkerne werden braun angefärbt, das Zytoplasma rot. Die Patienten

erleiden im Verlauf der Erkrankung ein terminales Nierenversagen, welches mit einer Nierenfibrose einhergeht.

In der Patientenbiopsie waren klare türkise Bereiche erkennbar, was auf Bindegewebe hindeutete (Abb. 33). Allerdings ließ die geringe Größe der Probe keine Rückschlüsse darüber zu, ob die Niere insgesamt fibrotisch war.

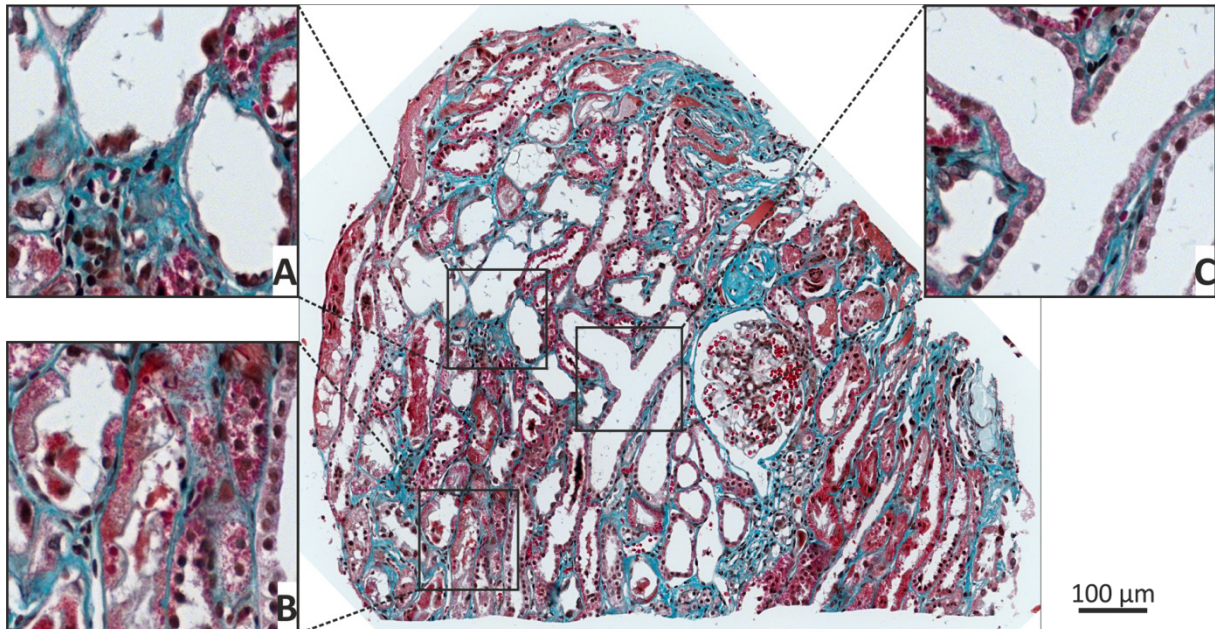


Abb. 33: Masson-Goldner-Färbung auf Bindegewebe. Es sind türkise, bindegewebige Bereiche erkennbar.

In der Kontrollniere waren ebenfalls Bereiche erkennbar, die positiv für Bindegewebe waren (Abb. 34). Allerdings war das Verhältnis von normalem Nierengewebe zu Bindegewebe nicht verändert im Vergleich zur Patientenbiopsie.

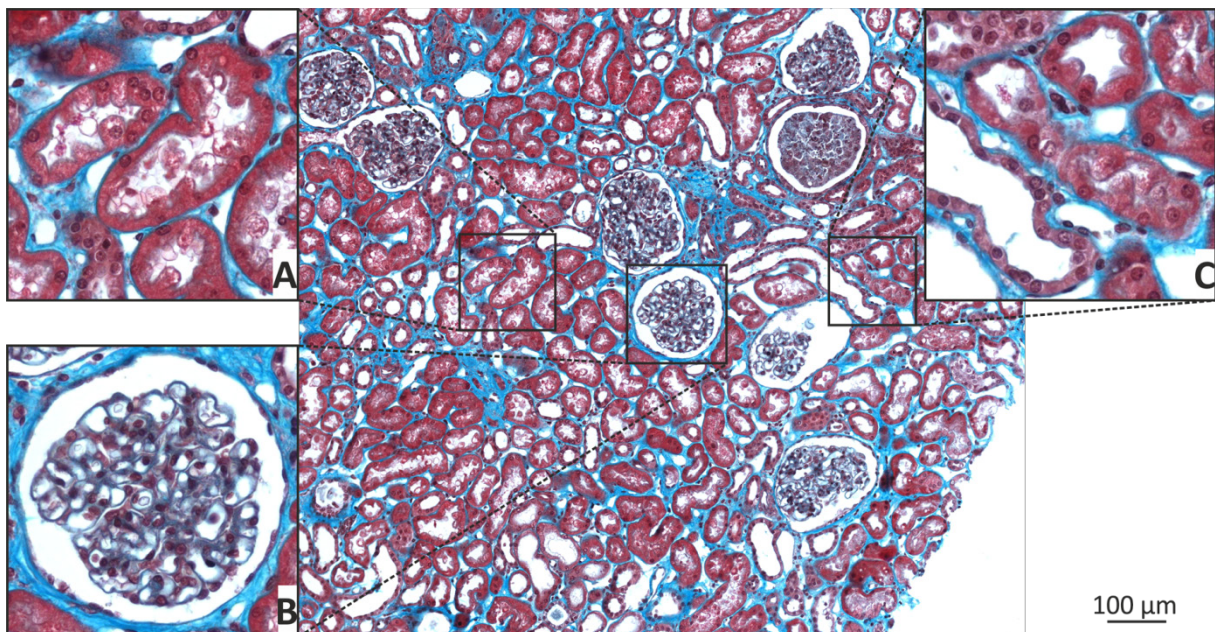


Abb. 34: Masson-Goldner-Färbung der Kontrollniere. Es sind relativ große Bereiche positiv (türkis) für Bindegewebe.

4.2.4.3 Untersuchung der FAP2-Lokalisation in der Patientenbiopsie mittels Immunfluoreszenz

Zuletzt wurde die Biopsie noch immunhistochemisch auf FAP2 untersucht. Obwohl die Nierenbiopsie vor über 40 Jahren entnommen wurde, hatte das Gewebe immer noch seine Antigenität bewahrt. Distale Tubulussegmente (Abb. 35 A) sowie die Sammelrohre (Abb. 35 B) waren negativ für FAP2, ebenso wie die Glomeruli (Abb. 35C). Wie in Abb. 15 gezeigt waren auch hier die proximalen Tubuli positiv für FAP2.

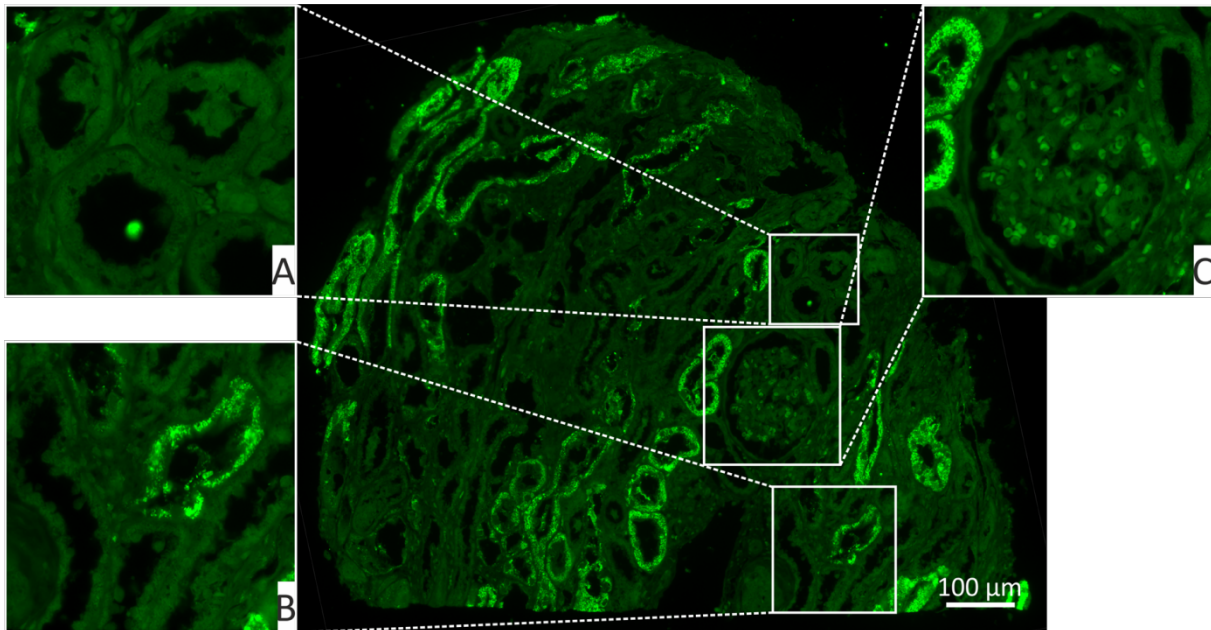


Abb. 35: Immunfluoreszenz auf FAP2. Glomeruli (Abb. C) und distale Segmente (Abb. A) waren negativ für FAP2. Eine FAP2-Färbung war nur in den proximalen Tubuli sichtbar (Abb. B).

Es waren eindeutig FAP2-positive proximale Tubuli erkennbar (Abb. 36B, C). Allerdings war auffällig, dass die Zelltrümmer, die das Lumen verstopfen, ebenfalls positiv für FAP2 waren (Abb. 36A). Es schien sich um proximale Tubuluszellen zu handeln, die sich aus dem Epithel gelöst hatten und das Lumen blockierten. Allerdings kann es auch sein, dass es sich hierbei um ein Fixierungsartefakt handelt, da proximale Tubuluszellen extrem empfindlich für Hypoxie sind und als erstes die Struktur (vor allem den Bürstensaum) verlieren, wenn das Gewebe nach der Entnahme nicht schnell genug fixiert wird.

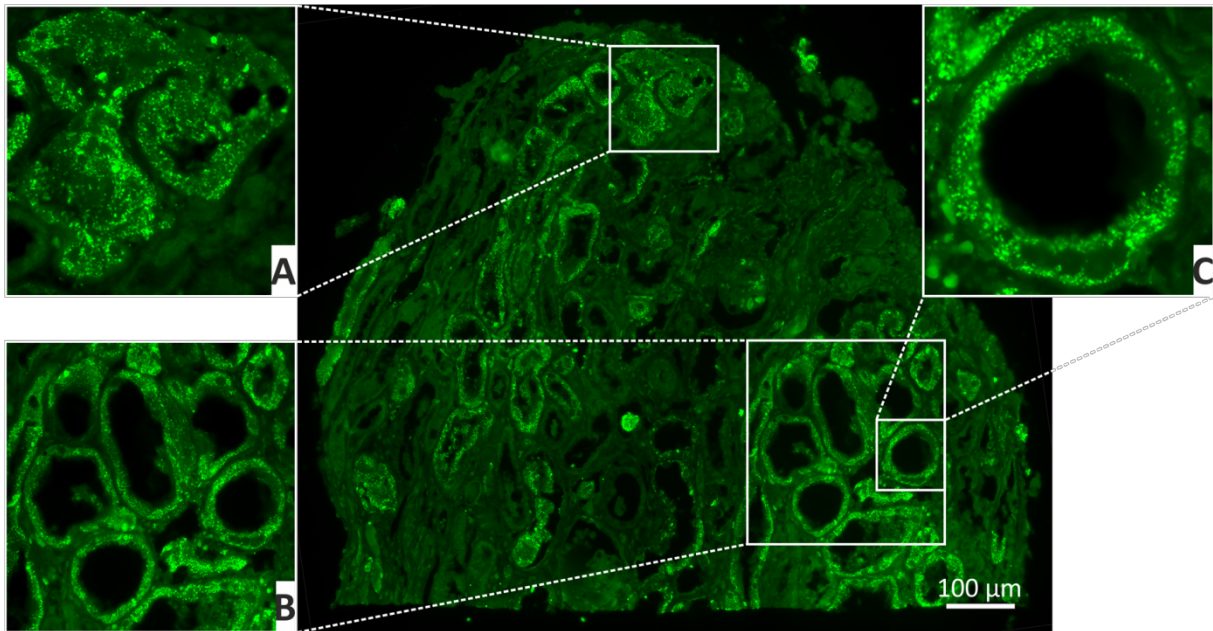


Abb. 36: Immunfluoreszenz auf FAP2. Die proximalen Tubuli waren positiv, ebenso wie Zelltrümmern im Lumen.

Betrachtet man die Schnitte in einer höheren Vergrößerung, konnte man erkennen, dass die Epithelzellen positiv für FAP2 waren, welches fragmentiert in der gesamten Zelle verteilt war (Abb. 37). Allerdings waren auch Zelltrümmern oder ganze Zellen zu sehen, die scheinbar im Lumen lagen und positiv für FAP2 waren.

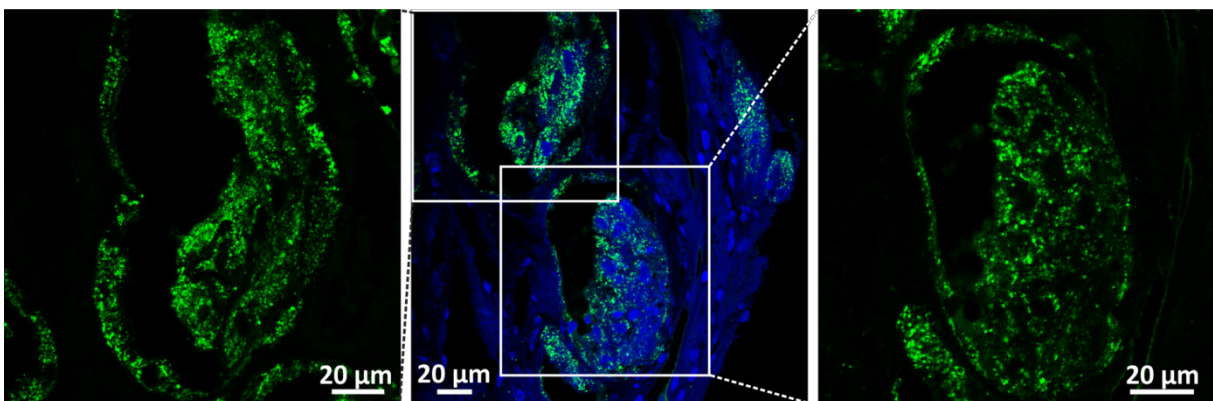


Abb. 37: Vergrößerte Aufnahmen eines proximalen Tubulus. Innerhalb des Lumens waren FAP2-positive Zelltrümmern in grün zu erkennen. Die Zellkerne sind in blau dargestellt.

Zudem waren immer wieder Tubulusabschnitte erkennbar, in denen es zur Ausbildung von ringförmigen Strukturen kam, die positiv für FAP2 waren (Abb. 38). Zudem schienen die Mitochondrien stark fragmentiert zu sein. Die gefiederte Expression, die charakteristisch für mitochondriale Proteine ist, war nicht erkennbar.

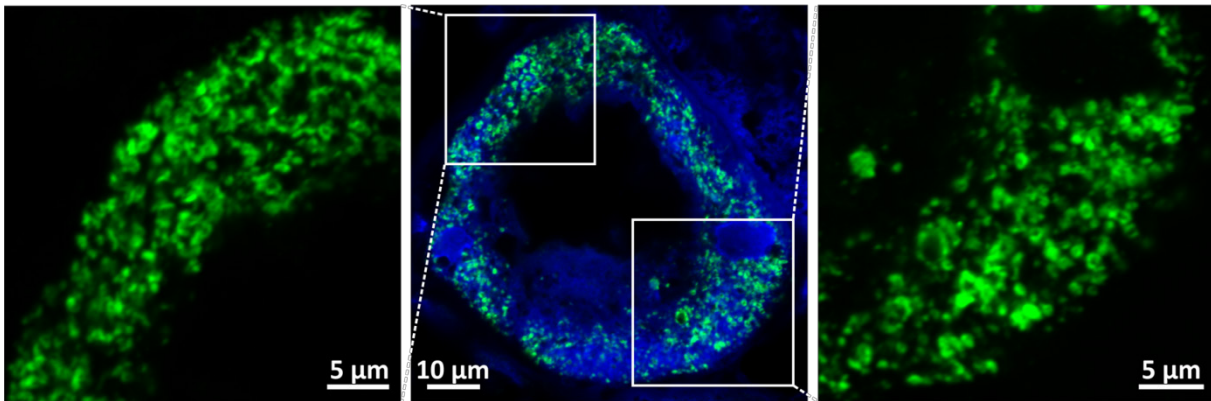


Abb. 38: Vergrößerte Aufnahme eines proximalen Tubulus. Die Mitochondrien erschienen fragmentiert und bildeten variable Strukturen aus.

Die FAP2-Expression in der Kontrollniere war auf den proximalen Tubulus beschränkt. Glomeruli und distale Nephronsegmente waren negativ (Abb. 15). Zudem war die gefiederte Struktur sehr gut erkennbar, die charakteristisch ist für palisadenförmige Anordnung der Mitochondrien an der basolateralen Seite des proximalen Tubulus (Abb. 39).

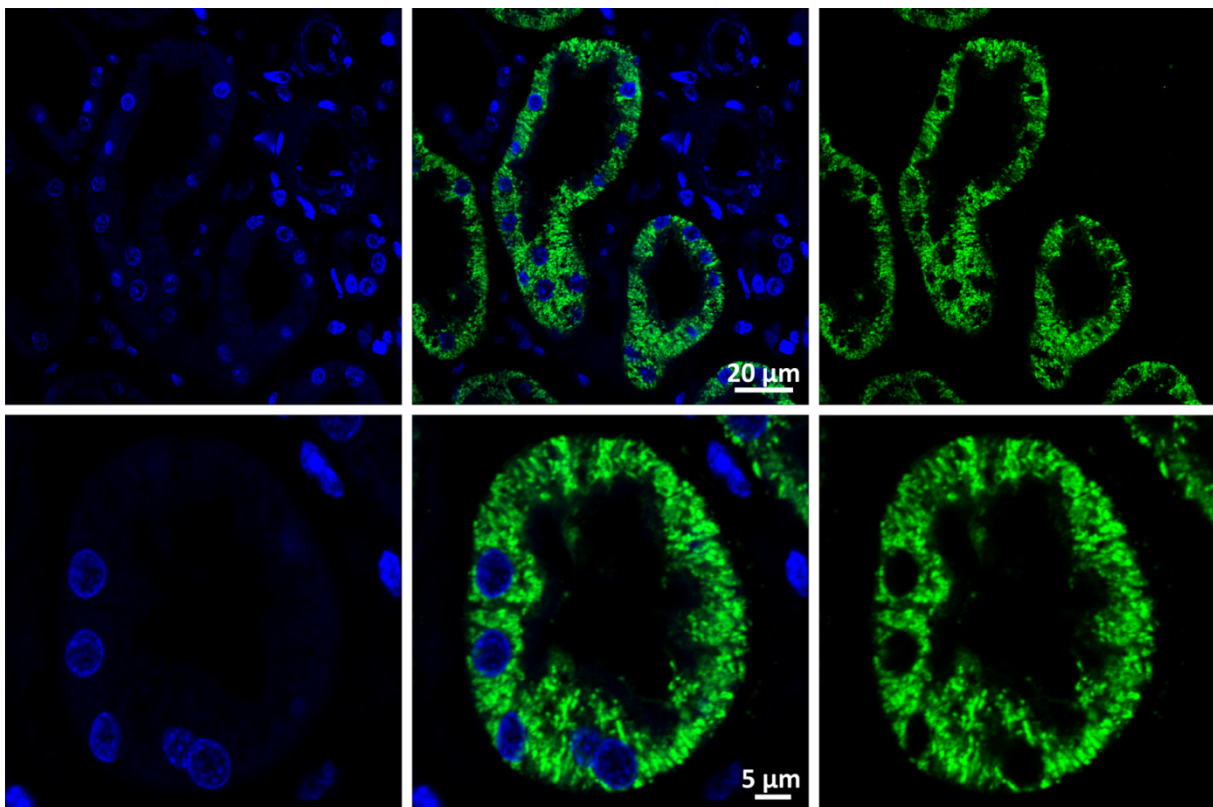


Abb. 39: Immunfluoreszenz der Kontrollniere. FAP2 (grün) war nur im proximalen Tubulus exprimiert. Die Zellkerne sind in blau markiert. Die FAP2-Färbung der Zellen erscheint durch die Anordnung der Mitochondrien gefiedert.

4.2.4.4 Elektronenmikroskopische Untersuchung der Patientenbiopsie

Um die Gewebestruktur im Detail bewerten zu können, wurde zudem ein Teil der Biopsie ausgestanzt, entparaffiniert und in Epon eingebettet, um elektronenmikroskopisch untersucht zu werden.

Die Glomeruli erschienen morphologisch unauffällig (Abb. 40). Die Kapillarschlingen waren noch erkennbar, ebenso wie Erythrozyten in den Kapillaren. Die Bowman-Kapsel erschien ebenfalls intakt zu sein. Die Bestandteile des glomerulären Filters wie Fußfortsätze der Podozyten und Kapillarendothel zeigten ebenfalls keine Auffälligkeiten.

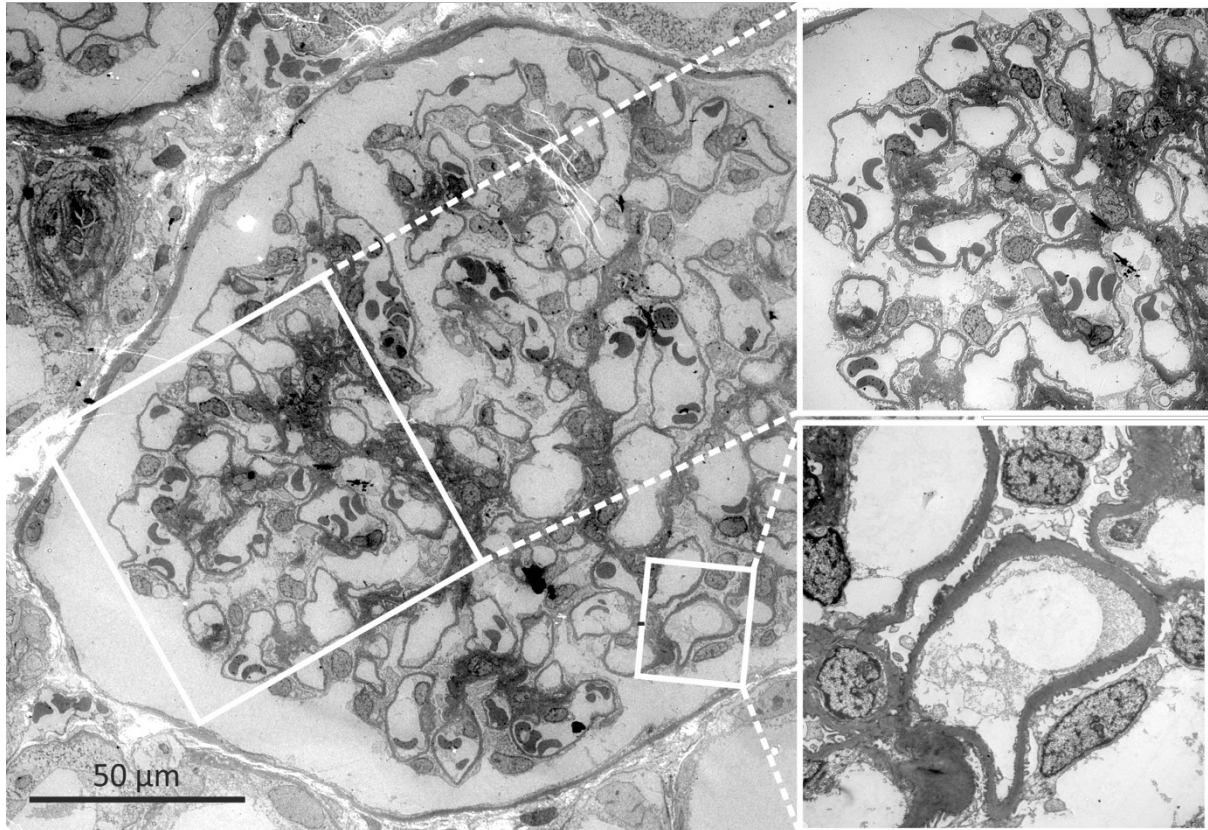


Abb. 40: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Glomerulus. Der Glomerulus erschien morphologisch unauffällig.

Betrachtete man die Tubuli, waren in allen Tubulussegmenten blasenartige Einschlüsse zu erkennen. Hierbei handelte es sich vermutlich um verschiedene Zellorganellen, unter anderem auch Mitochondrien. In den proximalen Tubuluszellen waren außerdem stark vergrößerte Mitochondrien erkennbar, die in den nicht-proximalen Abschnitten nicht vorkamen. Weiterhin war auch noch der Bürstensaum (Abb. 41, schwarzer Pfeil) erkennbar, so dass man diese Zellen eindeutig als proximale Tubuluszellen identifizieren konnte. Ferner sprach das Vorhandensein eines Bürstensaums für einen guten Erhalt bzw. für eine gute Fixierung des Gewebes nach der Entnahme (s.o.).

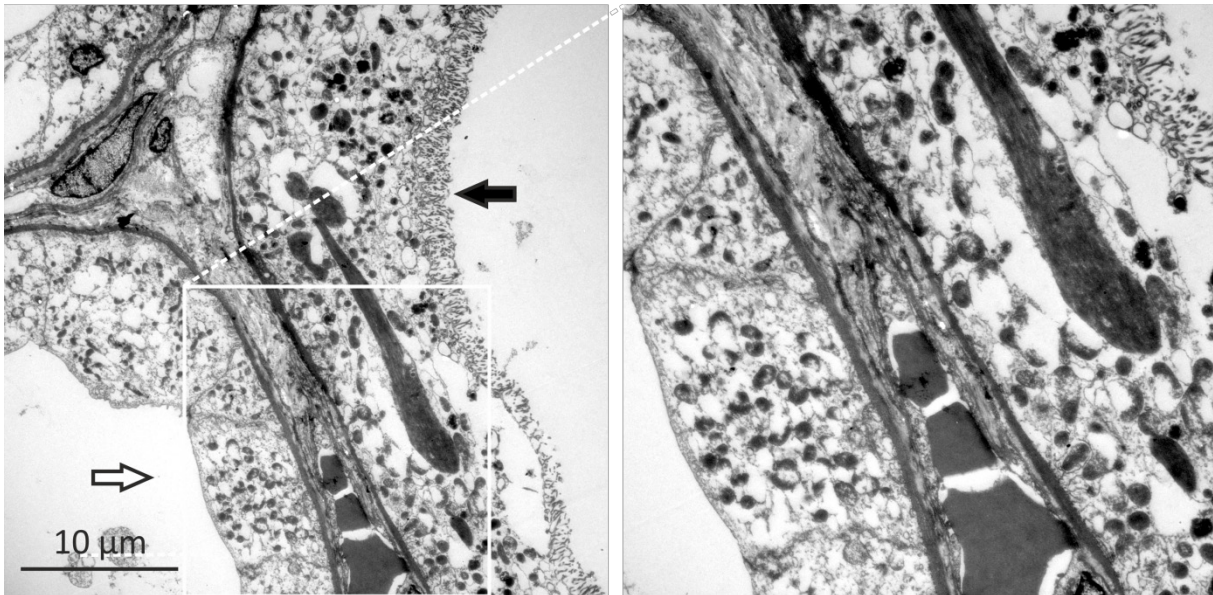


Abb. 41: Elektronenmikroskopische Aufnahme zweier Tubuli. In beiden Epithelien sind blasenartige Einschlüsse erkennbar. Im proximalen Tubulus ist noch einen Teil des Bürstensaums erhalten (schwarzer Pfeil). Nicht-proximale Tubuli (weißer Pfeil) hatten keinen Bürstensaum. In diesen Tubulussegmenten waren keine morphologisch veränderten Mitochondrien erkennbar.

Wie im Zellmodell waren auch in nativen proximalen Tubuluszellen vergrößerte Mitochondrien erkennbar, welche filamentartige Einschlüsse aufwiesen (Abb. 42).

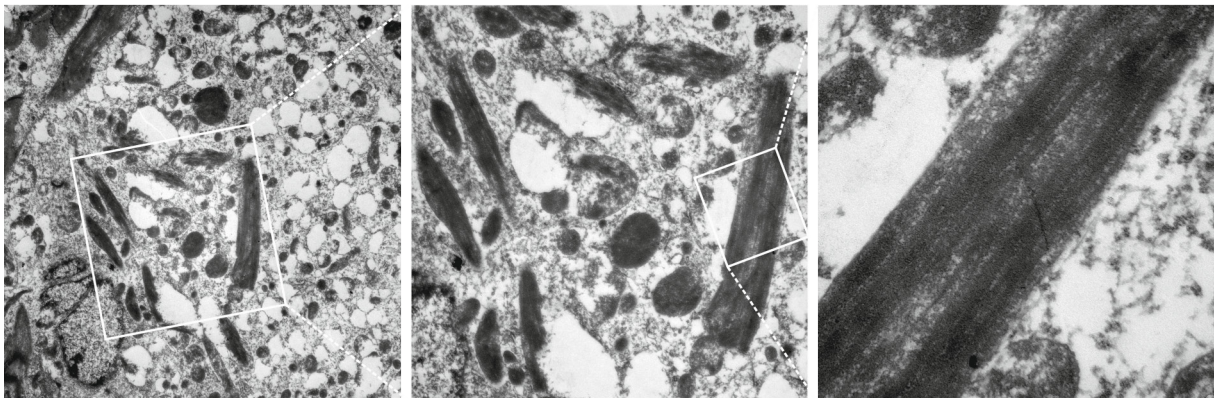


Abb. 42: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer proximalen Tubuluszelle. Es waren vergrößerte Mitochondrien mit filamentartigen Einschlüssen erkennbar.

5. Diskussion

5.1 EHHADH_{MUT}-Mistargeting als Ursache eines renalen Fanconi-Syndroms

Das renale Fanconi-Syndrom kann vielfältige Ursachen haben. Bei der von Klootwijk et. al. beschriebenen Familie ist der fehlerhafte Import des mutierten EHHADH in die Mitochondrien ursächlich für das Auftreten der Erkrankung. Dies führt zu einer Einschränkung der mitochondrialen Funktion und letzten Endes zur verminderten Resorption im proximalen Tubulus.

Die Expression von EHHADH im spät-proximalen Tubulus wurde bereits mit Hilfe eines eigens hergestellten Antikörpers untersucht (Abb. 4), wo es vermutlich in den Peroxisomen lokalisiert ist. Um diesen Befund zu bestätigen, wurden weitere Schnitte mit einem kommerziell erhältlichen Antikörper gegen EHHADH gefärbt (Abb. 8, 10), sowie mit einem Antikörper gegen das peroxisomale Protein D-Amino acid Oxidase (Abb. 9, 11). Ich konnte bei allen drei Färbungen dasselbe Expressionsmuster erkennen, nämlich eine granuläre Verteilung überwiegend im corticalen Bereich der Niere. In den distalen Tubulussegmenten sowie in den Glomeruli waren nur wenige Peroxisomen vorhanden. Dies ist konsistent mit der in der Literatur beschriebenen Verteilung der Peroxisomen in der Niere [66;67]. Die Verteilung innerhalb des proximalen Tubulus war nicht gleichmäßig. Sowohl in der Maus als auch im Menschen war die Expression im Wesentlichen auf den späten proximalen Tubulus (S2-/S3-Segment) beschränkt.

In Vorarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass EHHADH_{MUT} tatsächlich nicht nur in die Peroxisomen importiert wird, sondern auch in die Mitochondrien, da durch die Mutation ein mitochondriales Targeting Signal generiert wird (Abb. 5). Die Beurteilung der genauen Lokalisation von EHHADH_{MUT} im Mitochondrium war mit der Immunfluoreszenz jedoch nicht möglich. Um dies zu untersuchen wurde die ReAsH-Methode gewählt. Die transiente Transfektion von LLC-PK1-Zellen mit entsprechend modifizierten EHHADH_{WT}- bzw. EHHADH_{MUT}-Plasmiden ergab eine rein peroxisomale Expression von EHHADH_{WT} (Abb. 12). In den Mitochondrien war keine Expression erkennbar. Im Gegensatz dazu wurde das mutierte Protein sowohl in Peroxisomen als auch in Mitochondrien importiert (Abb. 13). Dabei schien die Expression auf die mitochondriale Matrix beschränkt.

In weiteren Experimenten konnte von Klootwijk et. al. mittels Co-Immunopräzipitation gezeigt werden, dass EHHADH mit HADHA und HADHB, den beiden Enzymen des mitochondrialen trifunktionellen Proteins, co-präzipitiert [60]. Dies deutet darauf hin, dass das mutierte Protein anstelle von HADHA in den Heterooktamer des mitochondrialen trifunktionellen Proteins (MTP) inkorporiert wird. EHHADH und HADHA haben eine 30-prozentige Homologie der

Aminosäuresequenz, was diesen Austausch möglich erscheinen lässt. Dieser Austausch von HADHA gegen EHHADH_{MUT} führt dann vermutlich dazu, dass die Funktion des MTP eingeschränkt ist.

Diese Hypothese konnte im Zellmodell erhärtet werden, wenn den Zellen Palmitat als Substrat der mitochondrialen β -Oxidation angeboten wurde. Die mutierten Zellen waren nicht in der Lage, Palmitat im gleichen Maße abzubauen wie die Wildtyp-Zellen (Assmann et. al., Daten noch nicht veröffentlicht). In der Folge kam es zu einer Akkumulation von Intermediaten der mitochondrialen β -Oxidation im Überstand der kultivierten EHHADH_{MUT}-Zellen verglichen mit Wildtyp-Zellen. Dies ist charakteristisch für Erkrankungen, die die mitochondriale β -Oxidation beeinträchtigen [70].

Die Fähigkeit des proximalen Tubulus zur Energiegewinnung ist von elementarer Bedeutung für die Aufrechterhaltung der dort ablaufenden Transportvorgänge. Ca. 95% des für die Funktion der Na⁺/K⁺-ATPase benötigten ATPs werden dabei in der oxidativen Phosphorylierung generiert [1;2;26]. Zugleich produzieren die Mitochondrien jedoch nahe ihrer maximalen Kapazität ATP. Das bedeutet, dass ein Abfall in der ATP-Produktion gravierende Auswirkungen auf die Resorptionsleistung im proximalen Tubulus hat [3]. Durch die eingeschränkte mitochondriale β -Oxidation steht dem Citratzyklus weniger Acetyl-CoA zur Verfügung. Infolgedessen werden im Citratzyklus auch weniger NADH/H⁺ und FADH₂ generiert, die als Elektronendonoren für die Atmungskette benötigt werden. Gleichzeitig stellt FADH₂, welches in der β -Oxidation selbst entsteht, ebenfalls Elektronen für die Atmungskette zur Verfügung. In Summe fließen also bei den betroffenen Patienten weniger Elektronen in die Atmungskette ein. Dadurch ist die ATP-Produktion bei der oxidativen Phosphorylierung eingeschränkt. Dies führt in letzter Konsequenz über eine verringerte Aktivität der Na⁺/K⁺-ATPase zu einer eingeschränkten Transportkapazität im proximalen Tubulus.

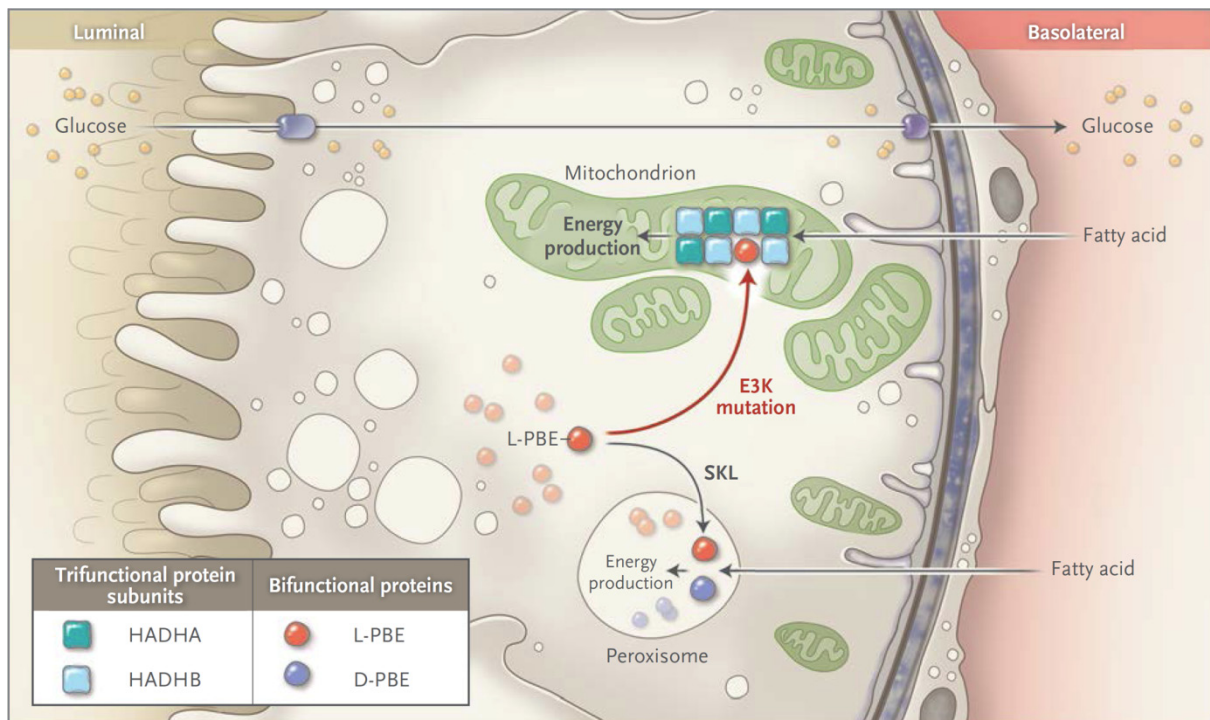


Abb. 43: Schematische Darstellung des Pathomechanismus des renalen Fanconi-Syndroms (Aus: Klotwijk et al., NEJM 2014)

Die Störung der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien habe ich bereits in früheren Experimenten im Rahmen meiner Diplomarbeit nachgewiesen. Der O_2 -Verbrauch der $EHHADH_{MUT}$ -Zellen lag etwa 20% niedriger als bei $EHHADH_{WT}$ -Zellen bei maximaler Stimulation aller Komplexe der Atmungskette. Dieser Befund war noch stärker ausgeprägt, wenn zusätzlich Octanoyl-Carnitin als Substrat der mitochondrialen β -Oxidation zugegeben wurde. In diesem Fall lag der O_2 -Verbrauch 35% niedriger bei den Zellen, die das mutierte Protein exprimieren.

Die Auswirkungen der Mutation auf die Transportkapazität der Zellen wurde untersucht durch die Zugabe von α -MDG, einem Glucose-Derivat, das von Zellen mittels der Na^+ -abhängigen Glucosetransporter SGLT1 und SGLT2 transportiert wird, aber nicht metabolisiert werden kann. Die für dieses Experiment stabil transfizierten LLC-PK1-Zellen stammen ursprünglich aus dem proximalen Tubulus des Schweins. Da einige Eigenschaften des proximalen Tubulus, wie etwa der Transport von Substraten, bei LLC-PK1-Zellen erhalten geblieben sind, eignen sie sich als Modell für die Transportvorgänge des proximalen Tubulus [71-73;73;74]. Dabei zeigte sich, dass $EHHADH_{MUT}$ -Zellen eine geringere Transportkapazität haben als $EHHADH_{WT}$ -Zellen (Abb. 14).

Obwohl im proximalen Tubulus die filtrierte Glucose nahezu komplett resorbiert wird, wird die Glucose nicht zur Energiegewinnung verwendet. Die Energie, die der proximale Tubulus für die Transportprozesse benötigt, wird zum großen Teil durch den Abbau von Fettsäuren in der mitochondrialen β -Oxidation gewonnen [12]. Daher ist der fehlerhafte Import von $EHHADH_{MUT}$ in die Mitochondrien und die darauf folgende Interaktion mit dem MTP der Auslöser des renalen Fanconi-Syndroms. Die gestörte β -Oxidation und die daraus resultierende verminderte ATP-Produktion

führen zum renalen Verlust von Substraten wie Glucose und Phosphat, die normalerweise im proximalen Tubulus reabsorbiert würden.

5.2 Charakterisierung einer FAP2-Mutation

5.2.1 Lokalisation und intramitochondriale Verteilung von FAP2

FAP2 ist in der Niere beschrieben an der Kreatin-Synthese beteiligt. In Immunfärbungen war FAP2 ausschließlich im frühen proximalen Tubulus lokalisiert (S1/2-Segment (Abb. 15)). Die Zellen zeigten ein gefiedertes Färbemuster auf der basolateralen Seite der Tubuluszellen (Abb. 16), welches typisch ist für eine mitochondriale Lokalisation. Diese Befunde waren sowohl in der Maus (Abb. 17, 18) als auch in humanen Proben sichtbar. In den spät-proximalen Segmenten, die ebenfalls positiv für den Bürstensaummarker f-Actin waren, war keine Färbung erkennbar. Im distalen Nephron war keinerlei Expression von FAP2 zu finden (Abb. 15).

Um die subzelluläre Lokalisation näher zu untersuchen, wurde auch für dieses Projekt ein induzierbares Zellmodell verwendet. Die stabil transfizierten LLC-PK1-Zellen überexprimieren nach Induktion mit Tetrazyklin entweder das Wildtypprotein (FAP2_{WT}) oder das mutierte Protein (FAP2_{MUT}). Die Lokalisation des Wildtyp- und des mutierten Proteins wurde mit Hilfe der Immunfluoreszenz untersucht. Hierbei zeigten die FAP2_{WT}-Zellen einen relativ milden Phänotyp (Abb. 19). Die Expression des Proteins war auf die Mitochondrien beschränkt, was durch Markierung der Mitochondrien mit dem fluoreszierenden Farbstoff Mitotracker nachgewiesen werden konnte. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der FAP2_{WT}-Zellen ergaben jedoch geschwollene Mitochondrien, deren Cristae weniger stark ausgeprägt waren (Abb. 21) als bei Kontrollzellen, die kein nachgeschaltetes Gen überexprimierten (Daten nicht gezeigt). Die Volumenzunahme der Mitochondrien ist vermutlich der massiven FAP2-Überexpression und dem daraus resultierenden Import des Proteins in die Mitochondrien geschuldet, da die Mitochondrien nicht induzierter Zellen keinerlei morphologische Auffälligkeiten aufwiesen (Abb. 23). Eine veränderte Mitochondrienmorphologie auf Grund der Behandlung der Zellen mit Tetrazyklin kann ebenso ausgeschlossen werden, da als Kontrolle native LLC-PK1-Zellen (VEK-Zellen) mit dem Tet-on-System ohne nachgeschaltetes Gen untersucht wurden. Diese Zellen wurden analog mit Tetrazyklin behandelt und zeigten keine morphologischen Auffälligkeiten der Mitochondrien (Daten nicht gezeigt).

FAP2_{MUT}-Zellen hingegen enthielten stark veränderte Mitochondrien, die elongiert waren und sich durch die gesamte Zelle zogen (Abb. 20). Dabei war sowohl die Morphologie der Mitochondrien stark verändert als auch ihre Anzahl verringert. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen von induzierten FAP2_{MUT}-Zellen waren innerhalb der Mitochondrien filamentartige Einlagerungen erkennbar (Abb.

21). Zwar besaßen die Mitochondrien weiterhin ihre charakteristische Doppelmembran, allerdings waren nur noch wenige Cristae erkennbar.

Die genaue intramitochondriale Lokalisation von FAP2 wurde elektronenmikroskopisch mit Hilfe einer Immuno-Gold-Markierung ermittelt. Dabei wurden die Ultradünnschnitte, die für die Elektronenmikroskopie angefertigt wurden, mit dem Antikörper gegen FAP2 als primären Antikörper behandelt. Der sekundäre Antikörper war jedoch nicht an ein Fluorophor gekoppelt, sondern an Goldkugeln gebunden, die im Elektronenmikroskop als schwarze Punkte am Expressionsort erkennbar sind. FAP2_{WT} erschien dabei nahe der inneren Mitochondrienmembran in der Matrix zu liegen (Abb. 27).

FAP2_{MUT} hingegen schien Bestandteil der intramitochondrialen Filamente zu sein (Abb. 28). Ob FAP2_{MUT} alleine am Aufbau der Filamente beteiligt ist oder ob andere Bestandteile noch hinzukommen, kann mit dieser Methode nicht ermittelt werden. Zu diesem Zweck sind weitere Experimente geplant unter Mithilfe des Instituts für funktionelle Genomik.

Die Lokalisation von FAP2 wurde nicht nur im Zellmodell und in murinen Nierenproben untersucht. Es stand auch eine Patientenbiopsie zur Verfügung, die licht- und elektronenmikroskopisch untersucht wurde. Die Untersuchung der Patientenbiopsie mit Hilfe der Immunfluoreszenz ergab das gleiche Bild für die Expression von FAP2. Die Glomeruli und die distalen Nephronsegmente waren negativ für FAP2 (Abb. 35). Im proximalen Tubulus war eine starke Expression erkennbar (Abb. 36). Auch im Lumen der proximalen Tubuli lagen abgelöste Zellen oder Zelltrümmer, die positiv für FAP2 waren (Abb. 37). Dies deutete darauf hin, dass sich die Zellen von der Basalmembran gelöst hatten und ins Lumen gelangt waren. Zudem schienen die Mitochondrien fragmentiert zu sein (Abb. 38) und waren nicht mehr palisadenartig an den Einfaltungen der Basalmembran entlang aufgereiht, wie es für Mitochondrien im proximalen Tubulus charakteristisch ist.

Weitere morphologische Hinweise auf eine mögliche Schädigung der Niere sollten mit Hilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen der Biopsie dokumentiert werden. Die Glomeruli erschienen dabei morphologisch unauffällig. Die Bowmankapsel sowie die Filtrationsbarriere schienen noch intakt zu sein, ebenso wie die Kapillarschlingen (Abb. 40). Die proximalen Tubuli zeigten analog zum Zellmodell die Bildung von spindelförmigen Mitochondrien in Epithelzellen (Abb. 41). Diese waren weder in den Glomeruli noch in distalen Nephronsegmenten erkennbar. In höheren Vergrößerungen waren zudem in den Zellen des proximalen Tubulus filamentartige Einschlüsse in den Riesenmitochondrien erkennbar (Abb. 42). Dies lässt den Schluss zu, dass die Ausbildung der Filamente kein Zellkultur-Artefakt ist, das im Zellmodell aufgrund der Überexpression des mutierten Proteins entsteht. Vielmehr treten die Filamente auch *in vivo* auf und tragen vermutlich zum Pathomechanismus der Erkrankung bei.

5.2.2 Charakterisierung des FAP2-knockouts

Als Modell für den vollständigen Funktionsverlust wurde zudem eine FAP2-knockout-Maus untersucht. Im Wesentlichen zeigten die knockout-Tiere ein verringertes Körpergewicht sowie einen niedrigeren Gehalt an Fettgewebe. Die knockout-Mäuse zeigten außerdem eindeutige Symptome eines Kreatinmangels (Daten nicht gezeigt). Diese Symptome sind bei unseren Patienten nicht vorhanden. Die renalen Symptome werden daher also nicht durch Haploinsuffizienz, also das Fehlen von FAP2, verursacht sondern vermutlich durch einen gänzlich anderen Pathomechanismus.

5.2.3 Funktionelle Untersuchung des Zellmodells

Aufgrund der stark veränderten Mitochondrienmorphologie erscheint es plausibel, dass die Funktion der Mitochondrien beeinträchtigt ist. Um dies zu untersuchen wurden sowohl FAP2_{WT} als auch FAP2_{MUT}-Zellen nach einer Woche Induktion mit Tetrazyklin im Oxygraphen vermessen. Als Kontrolle wurden LLC-PK1-Zellen verwendet, die nur das Tet-on-System integriert hatten ohne nachgeschaltetes Gen. Diese Kontrollzellen wurden ebenfalls eine Woche lang mit Tetrazyklin behandelt. Wenn die Messungen auf die Aktivität der Citratsynthase standardisiert wurden, sah es zunächst so aus, als ob die FAP2_{WT}-Zellen einen höheren O₂-Verbrauch aufwiesen als VEK-Zellen (Abb. 29 A), wohingegen FAP2_{MUT}-Zellen sich in der Grundatmung und unter Zugabe des Entkopplers FCCP wie VEK-Zellen verhielten. Bei Stimulation von Komplex I+II war der O₂-Verbrauch der FAP2_{MUT}-Zellen erniedrigt bezogen auf VEK-Zellen. Bei Standardisierung auf den DNA-Gehalt der Proben war das Bild genau umgekehrt (Abb. 29 B). Hier schien die Mutante mehr O₂ zu verbrauchen als der Wildtyp. Zwischen FAP2_{MUT}-Zellen und VEK-Zellen bestand kein Unterschied im O₂-Verbrauch.

In der Immunfluoreszenz hatte es den Anschein, als ob die Mitochondrien der FAP2_{WT}-Zellen stärker fragmentiert waren als die Mitochondrien von Kontrollzellen. Um zu überprüfen, ob sich dies auf das Mitochondrienvolumen auswirkte, wurde das Verhältnis aus der Citratsynthase-Aktivität und der DNA-Menge gebildet. Zwischen FAP2_{MUT}-Zellen und VEK-Zellen bestand kein Unterschied, wohingegen das Verhältnis bei FAP2_{WT}-Zellen im Vergleich erniedrigt war (Abb. 30). Es ist denkbar, dass die Überexpression von FAP2 und der damit einhergehende Import von FAP2 in die Mitochondrien den Import anderer mitochondrialer Proteine wie etwa der Citratsynthase stören. Dies wäre eine Erklärung für die erniedrigte Atmung der FAP2_{WT}-Zellen bei Standardisierung auf die Aktivität der Citratsynthase. Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Import des überexprimierten Proteins bereits durch die Änderung der mitochondrialen Morphologie zu einer Veränderung der Mitochondrienfunktion führt, unabhängig von FAP2 selbst. Dies legt den Schluss nahe, dass bei funktionellen Messungen von FAP2_{MUT}-Zellen die VEK-Zellen als Bezugspunkt betrachtet werden müssen, da die Überexpression von FAP2_{WT} ebenfalls zu einer Änderung des Phänotyps führt.

Eine massive Veränderung der Mitochondrienmorphologie muss nicht zwangsläufig mit einer gestörten mitochondrialen Funktion einhergehen. Im Falle der Methylmalonyl-Azidämie, die zumeist durch Mutationen im Gen der Vitamin B12-abhängigen Methylmalonyl-CoA-Mutase ausgelöst wird, kommt es Verlaufe der Erkrankung zu einer tubulären Dysfunktion gefolgt von tubulointerstitieller Nephritis und schlussendlich zum terminalen Nierenversagen. Dabei ist auffällig, dass bei betroffenen Patienten sogenannte Megamitochondrien in proximalen Tubuluszellen entstehen. In einem Mausmodell der Erkrankung konnte jedoch kein Unterschied in der Aktivität der Atmungskettenkomplexe zwischen heterozygoten Tieren und leberspezifischen knockout-Tieren festgestellt werden [75]. In einem herkömmlichen knockout-Modell wurde hingegen eine erniedrigte Aktivität der Komplexe I+II, II+III und IV in Leberproben gemessen bei einer erhöhten Aktivität der Citrat-Synthase. Für die Nierenproben konnte kein Unterschied ermittelt werden. Dies ist allerdings möglicherweise darauf zurückzuführen, dass für die Messung Gesamtniere verwendet wurde, der proximale Tubulus aber als einziges Tubulussegment morphologisch veränderte Mitochondrien hat [76]. Allerdings konnte in Nierenbiopsien einer betroffenen Patientin histopathologisch eine erniedrigte Aktivität von COX- und NADH-Enzymen nachgewiesen werden, die auf eine Beeinträchtigung der Elektronentransportkette schließen lassen [77].

5.2.4 Mögliche Pathomechanismen

Aufgrund der bisher erhobenen Daten ist keine Aussage über die Ursachen der Erkrankung zu treffen. Zwar zeigen die Mitochondrien massive morphologische Veränderungen, allerdings scheint dies keinerlei Auswirkungen auf ihre Funktion zu haben. Dies gilt jedoch nur für den in dieser Arbeit untersuchten Zeitraum. Der Krankheitsverlauf beginnt zunächst mit dem renalen Fanconi-Syndrom und endet mit einem terminalen Nierenversagen. Die Progression der Erkrankung in vivo verläuft jedoch über einen Zeitraum, der mit unserem Zellmodell möglicherweise nicht mehr nachgestellt werden kann. Weiterführende Versuche sind daher notwendig, um die Pathomechanismen dieser Erkrankung aufzuklären.

5.2.4.1 Mitochondriale Dysfunktion als Ursache von Nierenerkrankungen

Mitochondrien sind hoch dynamische Zellorganellen, die je nach Energiebedarf der Zelle fusionieren oder sich wieder teilen. Wenn die Zellen einen hohen Energiebedarf haben, fusionieren die Mitochondrien, bei einem niedrigen Energiebedarf teilen sie sich wieder. Zudem dienen diese Vorgänge der Qualitätskontrolle, um beschädigte Mitochondrien oder schadhafte mtDNA durch Abschnüren und anschließende Mitophagie abbauen zu können. Neben den in Tabelle 1 beschriebenen Formen des renalen Fanconi-Syndroms [49-54;60] gibt es eine Reihe weiterer Nierenerkrankungen, deren Auftreten durch eine Störung der Mitochondrienfunktion ausgelöst wird.

Mutationen der mitochondrialen DNA führen im Allgemeinen zu Erkrankungen, bei denen die extrarenale Symptome im Vordergrund stehen. Renale Symptome werden nur in seltenen Fällen berichtet. Dazu gehören etwa eine fokale segmentale Glomerulosklerose (FSGS) oder tubulointerstitielle Nephropathie als Folge einer Punktmutation im tRNA(Leu)-Gen, die als Ursache für das MELAS-Syndrom gilt (Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, stroke-like episodes) [78]. Zudem wurde 2003 eine Punktmutation im tRNA(Tyr)-Gen beschrieben, die ebenfalls zur Ausprägung von FSGS führte.

Deletionsmutationen der mitochondrialen DNA haben dagegen meist eine Tubulopathie zur Folge. Für Patienten, die am Kearns-Sayre-Syndrom oder am Pearson-Syndrom leiden, sind verschiedene tubuläre Einschränkungen beschrieben, unter anderem Bartter-ähnliche Symptome [25] oder ein Fanconi-Syndrom [79;80].

Störungen in der mitochondrialen Fusions- und Fissionsmaschinerie stehen seit längerem im Verdacht, an der Ausbildung von Nierenerkrankungen beteiligt zu sein. So konnte an einem Modell für akutes Nierenversagen gezeigt werden, dass eine Drp1, ein Mediator der mitochondrialen Fission, aktiviert ist, was zu einer gesteigerten mitochondrialen Fragmentierung führt [81]. Dabei konnte ausgeschlossen werden, dass die mitochondriale Fragmentierung durch die Aktivierung proapoptotischer Faktoren ausgelöst wird, da sich die Mitochondrien trotz Hemmung von Caspasen weiterhin teilen. Bei Transfektion der Zellen mit einem dominant-negativen Drp1 wurde die mitochondriale Fragmentierung teilweise aufgehoben. Zudem konnte die mitochondriale Fragmentierung nach Ischämie oder Cisplatin-Behandlung durch Zugabe des Drp1-Hemmstoffes mdivi-1 gehemmt werden. In unserem Zellmodell scheinen die Mitochondrien immer weiter zu fusionieren, so dass das Gleichgewicht zwischen Fusion und Fission in Richtung Fusion verschoben sein könnte. Zugleich ist es jedoch auch denkbar, dass die intramitochondrialen Filamente mechanisch so stabil sind, dass die Mitochondrien an der Fission gehindert werden. Dadurch wäre auch der Abbau von beschädigten Mitochondrien nicht mehr möglich.

Ähnliche Beobachtungen konnten auch in Modellen für chronisches Nierenversagen gemacht werden [82]. ROCK1 fördert über Phosphorylierung die Rekrutierung von Drp1 und stimuliert so die Fission von Mitochondrien. ROCK1 knockout-Mäuse zeigten eine verringerte mitochondriale Fragmentierung unter Gabe von Hoch-Glucose-Futter als Modell einer diabetischen Nephropathie (DN), wohingegen Nieren von Wildtyp-Mäusen stark fragmentierte Mitochondrien enthielten.

Mitochondrien sind in der diabetischen Nephropathie zudem auf andere Art impliziert. Es wird vermutet, dass der Mitophagie eine renoprotektive Rolle zukommt [83]. Mitochondrien sind neben ihrer Funktion als Energielieferant wesentlich an apoptotischen Prozessen beteiligt [84]. Aufgrund extrinsischer Stimuli wie FasL oder TNF α bzw. intrinsischer Stimuli, die etwa eine Schädigung der Zelle zur Folge haben, wird Cytochrom c aus den Mitochondrien freigesetzt, was zur Bildung eines

Apoptosoms führt. Dieses Apoptosom wiederum setzt eine proteolytische Kaskade in Gang, die zur Aktivierung weiterer Caspasen führt. In der Folge werden unter anderem das Zytoskelett, die Mitochondrien sowie die Nuklei fragmentiert. In der diabetischen Nephropathie kommt es zu einer Störung der mitochondrialen Funktion und daraus folgend zu einer gesteigerten Produktion von ROS, die wiederum zu einer weiteren Beeinträchtigung der Mitochondrienfunktion durch eine erhöhte Mutationsrate im mitochondrialen Genom führen. Als Schutzmechanismus wird daher der Abbau von beschädigten Mitochondrien durch die Mitophagie gesteigert.

In unserem Zellmodell konnten die elongierten Mitochondrien nach Überexpression von FAP2_{MUT} nicht mehr abgebaut werden (Abb. 25), selbst nachdem die Induktion der Expression bereits acht Wochen zuvor beendet worden war (Abb. 26). Die Mitochondrien waren bis acht Wochen nach Absetzen des Tetrazyklins immer noch sichtbar in der Immunfluoreszenz. In ersten Untersuchungen an FAP2_{WT}-Zellen hatte es den Anschein, dass die Mitochondrien hier schneller abgebaut werden.

Es ist denkbar, dass die massiv elongierten Mitochondrien nicht mehr von Autophagosomen abgebaut werden können. Damit die beschädigten Mitochondrien abgebaut werden können, müssen sie zunächst fragmentiert werden. Möglicherweise sind die intramitochondrialen Filamente mechanisch zu stabil, so dass die Mitochondrien nicht mehr fragmentiert werden können. Dies würde auch dazu führen, dass die mitochondriale „Qualitätskontrolle“ nicht mehr durchgeführt werden kann und so Mutationen in der mtDNA sowie beschädigte Proteine in den Mitochondrien akkumulieren. In der Folge würde es zu einer Schädigung der Zellen kommen und langfristig zum Zelltod.

5.2.4.2 Mechanismen der renalen Fibrose

Die betroffenen Patienten erleiden im Verlauf der Erkrankung ein terminales Nierenversagen mit einhergehender Nierenfibrose. Bei den meisten chronischen Nierenerkrankungen tritt im Verlauf der Erkrankung eine Fibrose der Niere ein [86]. Die Gründe für das Eintreten der Fibrogenese sind vielfältig. Die zugrundeliegenden Mechanismen zielen zunächst darauf ab, beschädigtes Gewebe zu heilen oder zu ersetzen. In der Niere kommt es zu zwei verschiedenen Arten der Fibrose. Zum einen kann eine Glomerulosklerose entstehen, bei der es zur Einwanderung von inflammatorischen Zellen in den Glomerulus, zur Aktivierung von Myofibroblasten und zur Umwandlung von epithelialen zu mesenchymalen Zellen kommt. Zum anderen besteht die Möglichkeit einer tubulointerstitiellen Fibrose. In diesem Fall sind die Einwanderung inflammatorischer Zellen, die Aktivierung von Fibroblasten sowie die Bildung einer extrazellulären Matrix die entscheidenden Faktoren für die Entstehung der Fibrose. Wesentliche profibrotische Faktoren sind hierbei Angiotensin II und TGF- β . Eine erhöhte Expression dieser fibrogenen Faktoren führt zu einer Aktivierung der Transkription von Collagen und Fibronectin, zwei Bestandteilen der extrazellulären Matrix. Die Stabilität der Matrix wird dadurch verursacht, dass die Proteine untereinander verknüpft werden [87-89]. Dieser Vorgang

ist zunächst noch reversibel, das heißt die extrazelluläre Matrix kann von proteolytischen Enzymen abgebaut werden. Je weiter die Fibrose voranschreitet, desto stärker werden die Bestandteile der Matrix modifiziert, so dass sie nicht mehr ohne weiteres degradiert werden können. Die Progression der Fibrose kann zudem abgemildert werden, wenn die Verknüpfung der Matrixkomponenten gehemmt wird [90;91].

Mit Hilfe der Masson-Goldner-Färbung wurde die Biopsie eines betroffenen Patienten auf Bindegewebe untersucht (Abb. 33). Fibrotisches Gewebe, das im Verlaufe einer tubulointerstitiellen Fibrose entsteht, besteht zum Teil aus Collagen, dem Hauptbestandteil von Bindegewebe. Eine genaue Aussage über das Ausmaß einer eventuell vorhandenen Fibrose ist jedoch nur schwer möglich, da die Biopsie zu klein ist. Die entnommene Biopsie hat nur etwa die Größe eines Stecknadelkopfes. Aufgrund des sehr kleinen untersuchten Ausschnittes sind Rückschlüsse auf das Ausmaß von Schädigungen in der gesamten Niere nur sehr eingeschränkt und mit gebührender Vorsicht möglich. Verglichen mit der Kontrollniere (Abb. 34) schien aber ohnehin kein relevanter Unterschied im Verhältnis von Bindegewebe zu Nierenfunktionsgewebe erkennbar zu sein. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen lassen jedoch darauf schließen, dass der proximale Tubulus das Nephronsegment ist, das am stärksten beschädigt war (Abb. 41, Abb. 42).

Im proximalen Tubulus wird der Großteil der filtrierte Substanzen wieder resorbiert. Es ist denkbar, dass der renale Verlust von Stoffen wie Glucose und Phosphat auch dadurch zustande kommt, dass die Zellen des proximalen Tubulus derart beschädigt sind, dass sie nicht mehr in der Lage sind, die Transportprozesse durchzuführen bzw. aufrechtzuerhalten.

5.3 Mitochondriale Beteiligung am renalen Fanconi-Syndrom

Obwohl die beiden hier untersuchten Gene zumindest zu Beginn der Erkrankung die gleichen Symptome auslösen, sind die zu Grunde liegenden Mechanismen sehr verschieden.

EHHADH als ursprünglich peroxisomales Protein wird auf Grund der gefundenen Mutation fälschlicherweise zusätzlich in die Mitochondrien importiert, wo es in der Folge die mitochondriale β -Oxidation beeinträchtigt. Die daraus resultierende erniedrigte ATP-Produktion führt zu einer verminderten Resorptionsleistung im proximalen Tubulus der Niere und schlussendlich zur Ausprägung des Fanconi-Syndroms. Der Krankheitsverlauf ist in diesem Fall vergleichsweise milde, da es sich offensichtlich um eine isolierte Minderung der Transportkapazität handelt, die Zellen aber nicht tiefgreifend geschädigt zu sein scheinen und die Patienten daher keine weiteren renalen Symptome zeigen.

Bei den Patienten, die die FAP2-Mutation tragen, stellt sich ein anderes Bild dar. Auch hier kommt es zunächst zur Ausbildung einer Transportstörung im Sinne eines renalen Fanconi-Syndroms. Allerdings verläuft die Erkrankung im weiteren Verlauf progressiv bis zum terminalen Nierenversagen. Der

genaue Pathomechanismus ist bis dato noch unbekannt. Allerdings deutet die Anwesenheit der intramitochondrialen Filamente in der Patientenbiopsie wie auch im Zellmodell darauf hin, dass die Filamente zu einer so gravierenden Störung der Mitochondrien oder der mitochondrialen Signalwege führen, dass die zelluläre Schädigung die bei EHHADH-Patienten beobachtete bei weitem übersteigt.

6. Zusammenfassung

Das renale Fanconi-Syndrom wird definiert als Einschränkung des proximal tubulären Transports und kann durch eine Vielzahl von Faktoren ausgelöst werden. Neben sogenannten sekundären Formen als Folge einer anderen Erkrankung oder als Nebenwirkung einer therapeutischen Behandlung gibt es auch primäre Formen, die als direkte Konsequenz einer Mutation auftreten. In dieser Arbeit sollten zwei dieser Formen untersucht werden, die beide autosomal dominant vererbt werden. Zum einen handelt es sich dabei um das peroxisomale Protein EHHADH, das dort an der β -Oxidation beteiligt ist. Zum anderen um FAP2, einen Bestandteil der Kreatin-Synthese.

Für EHHADH war bereits bekannt, dass es im späten proximalen Tubulus der Niere exprimiert wird. Dieses Ergebnis wurde mit Hilfe zweier weiterer Antikörper bestätigt. Sowohl die Immunfluoreszenz mit einem weiteren Antikörper gegen EHHADH als auch mit einem Antikörper gegen das peroxisomale Protein D-Amino acid oxidase ergab ein Signal im corticalen Bereich der Niere im spätproximalen Tubulus (S2/S3-Segment). Die beobachtete granuläre Verteilung stand im Einklang mit der Verteilung der Peroxisomen. Dies ließ den Schluss zu, dass EHHADH in den Peroxisomen des spätproximalen Tubulus exprimiert wird. In Vorarbeiten konnte nachgewiesen werden, dass mutiertes EHHADH zusätzlich in die Mitochondrien importiert wird. Die genaue intramitochondriale Lokalisation wurde elektronenmikroskopisch mit Hilfe der ReAsH-Methode untersucht. Bei den mit EHHADH_{WT} transfizierten Zellen waren nur die Peroxisomen positiv. In den Mitochondrien war kein Niederschlag erkennbar. Im Gegensatz dazu hatten mit EHHADH_{MUT} transfizierte Zellen sowohl positive Peroxisomen als auch Mitochondrien. In meiner Diplomarbeit habe ich festgestellt, dass der mitochondriale Import von EHHADH eine Beeinträchtigung der oxidativen Phosphorylierung zur Folge hat. Um zu überprüfen, ob sich dies analog zu den Fanconi-Patienten tatsächlich auf den transzellulären Transport auswirkt, wurde auf Filtern gewachsenen Zellen das Glucose-Derivat α -D-Methylglucosid angeboten. Dies wird von Na⁺-Glucose-Cotransportern transportiert, in den Zellen jedoch nicht umgesetzt. Dabei zeigte sich, dass die EHHADH_{MUT}-Zellen nur rund ein Viertel der Transportkapazität der Wildtypzellen hatten.

Diese Daten erlauben nun neue Einblicke in die Pathogenese dieses speziellen Fanconi-Syndroms. EHHADH_{MUT} wird fälschlicherweise in die Mitochondrien importiert, wo es die mitochondriale β -Oxidation beeinträchtigt. Dies führt schlussendlich zu einer verringerten ATP-Synthese und einer erniedrigten Transportkapazität im proximalen Tubulus der betroffenen Patienten.

Bei FAP2 handelt es sich im Gegensatz zu EHHADH um ein genuines mitochondriales Protein. Die Lokalisation in der Niere konnte auf den frühen proximalen Tubulus eingegrenzt werden, wo es in den Mitochondrien lokalisiert war. Spätproximale Tubuli sowie medulläre Segmente waren negativ für FAP2. Mit Hilfe einer stabil transfizierten Zelllinie wurde eine Mutation im FAP2-Gen näher

untersucht. Zellen, welche FAP_{WT} überexprimierten, wiesen einen relativ milden Phänotyp auf. Die Mitochondrien erschienen fragmentiert und geschwollen, was in der Elektronenmikroskopie bestätigt wurde. Dies ist vermutlich der Überexpression von FAP_{WT} und dem damit verbundenen vermehrten Import von FAP_{WT} in die Mitochondrien geschuldet. Zellen, die FAP_{MUT} überexprimierten, enthielten massiv veränderte Mitochondrien. Die Mitochondrien waren stark elongiert und durchzogen die gesamte Zelle. In der Elektronenmikroskopie waren in den Mitochondrien der FAP_{MUT}-Zellen filamentartige Strukturen erkennbar. Mit Hilfe der Immuno-Gold-Markierung konnte die Beteiligung von FAP_{MUT} am Aufbau der Filamente nachgewiesen werden. Die Halbwertszeit des mutierten FAP2-Proteins war drastisch verlängert. Dies deutet darauf hin, dass das in Filamenten befindliche FAP_{MUT}-Protein nicht mehr normal degradiert werden konnte. Trotz der massiv veränderten Mitochondrienmorphologie konnte in respiratorischen Messungen der oxidativen Phosphorylierung kein deutlicher Unterschied zwischen FAP_{WT}- und FAP_{MUT}-Zellen beobachtet werden. Das Fanconi-Syndrom scheint bei diesen Patienten also nicht durch eine Einschränkung der Energiebereitstellung verursacht zu werden.

Zudem konnte eine Biopsie einer Patientenniere untersucht werden. Eine Hämalaun/Eosin-Färbung ergab gut erhaltene distale Segmente und Glomeruli. Die proximalen Abschnitte zeigten Zeichen einer tubulären Schädigung. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen waren in den proximalen Tubuluszellen ebenfalls Riesenmitochondrien erkennbar, die filamentartige Einschlüsse enthielten. Diese Befunde legen nahe, dass das Auftreten der intramitochondrialen Ablagerungen kein Zellkulturartefakt ist, sondern diese filamentartigen Strukturen auch in vivo am Entstehen der Erkrankung beteiligt sind. Das beobachtete Fanconi-Syndrom sowie die Niereninsuffizienz scheinen jedoch nicht die Folge einer beeinträchtigten oxidativen Phosphorylierung zu sein. Der zu Grunde liegende Pathomechanismus konnte jedoch noch nicht aufgeklärt werden.

Die in dieser Arbeit untersuchten Formen des renalen Fanconi-Syndroms entstehen beide in Folge einer Mitochondriopathie. Während im Falle der EHHADH-Mutation eine verminderte Energiebereitstellung krankheitsauslösend zu sein scheint, sind die Pathomechanismen bei FAP2 komplexer und bedürfen weiterführender Untersuchungen, für die die hier dargestellten Befunde eine Ausgangsbasis bilden.

7. Literaturverzeichnis

- [1] Balaban RS & Mandel LJ (1980) Coupling of aerobic metabolism to active ion transport in the kidney. *J. Physiol*, **304**, 331-348.
- [2] Epstein FH (1997) Oxygen and renal metabolism. *Kidney Int.*, **51**, 381-385.
- [3] Beck JS, Breton S, Mairbaurl H, Laprade R, & Giebisch G (1991) Relationship between sodium transport and intracellular ATP in isolated perfused rabbit proximal convoluted tubule. *Am. J. Physiol*, **261**, F634-F639.
- [4] Kanai Y, Lee WS, You G, Brown D, & Hediger MA (1994) The human kidney low affinity Na⁺/glucose cotransporter SGLT2. Delineation of the major renal reabsorptive mechanism for D-glucose. *J. Clin. Invest*, **93**, 397-404.
- [5] Hirayama BA, Lostao MP, Panayotova-Heiermann M, Loo DD, Turk E, & Wright EM (1996) Kinetic and specificity differences between rat, human, and rabbit Na⁺-glucose cotransporters (SGLT-1). *Am. J. Physiol*, **270**, G919-G926.
- [6] Beck L, Karaplis AC, Amizuka N, Hewson AS, Ozawa H, & Tenenhouse HS (1998) Targeted inactivation of Npt2 in mice leads to severe renal phosphate wasting, hypercalciuria, and skeletal abnormalities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **95**, 5372-5377.
- [7] Kanai Y & Hediger MA (1992) Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature*, **360**, 467-471.
- [8] Zerangue N & Kavanaugh MP (1996) Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature*, **383**, 634-637.
- [9] Broer A, Klingel K, Kowalczyk S, Rasko JE, Cavanaugh J, & Broer S (2004) Molecular cloning of mouse amino acid transport system B0, a neutral amino acid transporter related to Hartnup disorder. *J. Biol. Chem.*, **279**, 24467-24476.
- [10] Romeo E, Dave MH, Bacic D, Ristic Z, Camargo SM, Loffing J, Wagner CA, & Verrey F (2006) Luminal kidney and intestine SLC6 amino acid transporters of B0AT-cluster and their tissue distribution in *Mus musculus*. *Am. J. Physiol Renal Physiol*, **290**, F376-F383.
- [11] Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, & Young IG (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, **290**, 457-465.
- [12] Balaban RS & Mandel LJ (1988) Metabolic substrate utilization by rabbit proximal tubule. An NADH fluorescence study. *Am. J. Physiol*, **254**, F407-F416.
- [13] Schmidt U & Guder WG (1976) Sites of enzyme activity along the nephron. *Kidney Int.*, **9**, 233-242.
- [14] Guder WG & Ross BD (1984) Enzyme distribution along the nephron. *Kidney Int.*, **26**, 101-111.
- [15] Wirthensohn G & Guder WG (1986) Renal substrate metabolism. *Physiol Rev.*, **66**, 469-497.

- [16] Zhang J, Frerman FE, & Kim JJ (2006) Structure of electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase and electron transfer to the mitochondrial ubiquinone pool. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **103**, 16212-16217.
- [17] Zeviani M & Di DS (2004) Mitochondrial disorders. *Brain*, **127**, 2153-2172.
- [18] Hall AM & Unwin RJ (2007) The not so 'mighty chondrion': emergence of renal diseases due to mitochondrial dysfunction. *Nephron Physiol*, **105**, 1-10.
- [19] Debray FG, Merouani A, Lambert M, Brochu P, Bernard C, Robinson BH, & Mitchell GA (2008) Acute tubular dysfunction with Fanconi syndrome: a new manifestation of mitochondrial cytopathies. *Am. J. Kidney Dis.*, **51**, 691-696.
- [20] Niaudet P (1998) Mitochondrial disorders and the kidney. *Arch. Dis. Child*, **78**, 387-390.
- [21] Wang LC, Lee WT, Tsai WY, Tsau YK, & Shen YZ (2000) Mitochondrial cytopathy combined with Fanconi's syndrome. *Pediatr. Neurol.*, **22**, 403-406.
- [22] Mochizuki H, Joh K, Kawame H, Imadachi A, Nozaki H, Ohashi T, Usui N, Eto Y, Kanetsuna Y, & Aizawa S (1996) Mitochondrial encephalomyopathies preceded by de-Toni-Debre-Fanconi syndrome or focal segmental glomerulosclerosis. *Clin. Nephrol.*, **46**, 347-352.
- [23] Munnich A, Rustin P, Rotig A, Chretien D, Bonnefont JP, Nuttin C, Cormier V, Vassault A, Parvy P, Bardet J, & . (1992) Clinical aspects of mitochondrial disorders. *J. Inherit. Metab Dis.*, **15**, 448-455.
- [24] Kurogouchi F, Oguchi T, Mawatari E, Yamaura S, Hora K, Takei M, Sekijima Y, Ikeda S, & Kiyosawa K (1998) A case of mitochondrial cytopathy with a typical point mutation for MELAS, presenting with severe focal-segmental glomerulosclerosis as main clinical manifestation. *Am J Nephrol.*, **18**, 551-556.
- [25] Emma F, Pizzini C, Tessa A, Di GS, Onetti-Muda A, Santorelli FM, Bertini E, & Rizzoni G (2006) "Bartter-like" phenotype in Kearns-Sayre syndrome. *Pediatr. Nephrol.*, **21**, 355-360.
- [26] Mandel LJ & Balaban RS (1981) Stoichiometry and coupling of active transport to oxidative metabolism in epithelial tissues. *Am. J. Physiol*, **240**, F357-F371.
- [27] Lignac G (1924) Über Störung des Cystinstoffwechsels bei Kindern. *Dtsch Arch Klin Med*, **145**, 139-150.
- [28] Debre,R., Marie,J. ,Cleret,F., Messimy,R. (1934) Rachitisme tardif coexistant ave une nephrite chronique etune glycosurie. *Arch Med Enf*, **37**, 597-606.
- [29] DeToni G (1933) Remarks on the relations between renal rickets (renal dwarfism) and renal diabetes. *Acta Paediatr*, **16**, 479-484.
- [30] Fanconi G (1936) Der frühinfantile nephrotisch-glycosurische Zwergwuchs mit hypophosphatämischer Rachitis. *Jahrbuch Kinderheilkd*, **147**, 299-305.
- [31] McCune,D.J., Mason,H.H., Clarke,H.T. (1943) Intractable hypophosphatemic rickets with renal glycosuria and acidosis (the Fanconi syndrome). *Am J Dis Child*, **65**, 81-146.

- [32] van't Hoff WG, Ledermann SE, Waldron M, & Trompeter RS (1995) Early-onset chronic renal failure as a presentation of infantile nephropathic cystinosis. *Pediatr. Nephrol.*, **9**, 483-484.
- [33] Nesterova G & Gahl W (2008) Nephropathic cystinosis: late complications of a multisystemic disease. *Pediatr. Nephrol.*, **23**, 863-878.
- [34] Monnens L & Levtchenko E (2008) Evaluation of the proximal tubular function in hereditary renal Fanconi syndrome. *Nephrol. Dial. Transplant.*, **23**, 2719-2722.
- [35] Servais A, Moriniere V, Grunfeld JP, Noel LH, Goujon JM, Chadeaux-Vekemans B, & Antignac C (2008) Late-onset nephropathic cystinosis: clinical presentation, outcome, and genotyping. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, **3**, 27-35.
- [36] Morris RC, Jr. (1968) An experimental renal acidification defect in patients with hereditary fructose intolerance. I. Its resemblance to renal tubular acidosis. *J. Clin. Invest*, **47**, 1389-1398.
- [37] Bosch AM (2006) Classical galactosaemia revisited. *J. Inherit. Metab Dis.*, **29**, 516-525.
- [38] Zetterstroem R (1963) Tyrosinosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **111**, 220-226.
- [39] Halvorsen S, Pande H, Loken AC, & Gjessing LR (1966) Tyrosinosis. A study of 6 cases. *Arch. Dis. Child*, **41**, 238-249.
- [40] Morgan HG, Stewart WK, Lowe KG, Stowers JM, & Johnstone JH (1962) Wilson's disease and the Fanconi syndrome. *Q. J. Med.*, **31**, 361-384.
- [41] Manz F, Bickel H, Brodehl J, Feist D, Gellissen K, Gescholl-Bauer B, Gilli G, Harms E, Helwig H, Nutzenadel W, & . (1987) Fanconi-Bickel syndrome. *Pediatr. Nephrol.*, **1**, 509-518.
- [42] Santer R, Schneppenheim R, Dombrowski A, Gotze H, Steinmann B, & Schaub J (1997) Mutations in GLUT2, the gene for the liver-type glucose transporter, in patients with Fanconi-Bickel syndrome. *Nat. Genet.*, **17**, 324-326.
- [43] Kitanaka S, Takeyama K, Murayama A, Sato T, Okumura K, Nogami M, Hasegawa Y, Niimi H, Yanagisawa J, Tanaka T, & Kato S (1998) Inactivating mutations in the 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase gene in patients with pseudovitamin D-deficiency rickets. *N. Engl. J. Med.*, **338**, 653-661.
- [44] Brooks MH, Bell NH, Love L, Stern PH, Orfei E, Queener SF, Hamstra AJ, & DeLuca HF (1978) Vitamin-D-dependent rickets type II. Resistance of target organs to 1,25-dihydroxyvitamin D. *N. Engl. J. Med.*, **298**, 996-999.
- [45] Charnas LR, Bernardini I, Rader D, Hoeg JM, & Gahl WA (1991) Clinical and laboratory findings in the oculocerebrorenal syndrome of Lowe, with special reference to growth and renal function. *N. Engl. J. Med.*, **324**, 1318-1325.
- [46] Dent CE & Friedman M (1964) Hypercalciuric rickets associated with renal tubular damage. *Arch. Dis. Child*, **39**, 240-249.
- [47] Wrong OM, Norden AG, & Feest TG (1994) Dent's disease; a familial proximal renal tubular syndrome with low-molecular-weight proteinuria, hypercalciuria, nephrocalcinosis,

- metabolic bone disease, progressive renal failure and a marked male predominance. *QJM.*, **87**, 473-493.
- [48] Hoopes RR, Jr., Shrimpton AE, Knohl SJ, Hueber P, Hoppe B, Matyus J, Simckes A, Tasic V, Toenshoff B, Suchy SF, Nussbaum RL, & Scheinman SJ (2005) Dent Disease with mutations in OCRL1. *Am. J. Hum. Genet.*, **76**, 260-267.
- [49] de LP, Valnot I, Barrientos A, Gorbatyuk M, Tzagoloff A, Taanman JW, Benayoun E, Chretien D, Kadhom N, Lombes A, de Baulny HO, Niaudet P, Munnich A, Rustin P, & Rotig A (2001) A mutant mitochondrial respiratory chain assembly protein causes complex III deficiency in patients with tubulopathy, encephalopathy and liver failure. *Nat. Genet.*, **29**, 57-60.
- [50] Ramos-Arroyo MA, Hualde J, Ayechu A, De ML, Seneca S, Nadal N, & Briones P (2009) Clinical and biochemical spectrum of mitochondrial complex III deficiency caused by mutations in the BCS1L gene. *Clin. Genet.*, **75**, 585-587.
- [51] Van Biervliet JP, Bruinvis L, Ketting D, De Bree PK, Van der Heiden C, & Wadman SK (1977) Hereditary mitochondrial myopathy with lactic acidemia, a De Toni-Fanconi-Debre syndrome, and a defective respiratory chain in voluntary striated muscles. *Pediatr. Res.*, **11**, 1088-1093.
- [52] DiMauro S, Mendell JR, Sahenk Z, Bachman D, Scarpa A, Scofield RM, & Reiner C (1980) Fatal infantile mitochondrial myopathy and renal dysfunction due to cytochrome-c-oxidase deficiency. *Neurology*, **30**, 795-804.
- [53] Szabolcs MJ, Seigle R, Shanske S, Bonilla E, DiMauro S, & D'Agati V (1994) Mitochondrial DNA deletion: a cause of chronic tubulointerstitial nephropathy. *Kidney Int.*, **45**, 1388-1396.
- [54] Ogier H, Lombes A, Scholte HR, Poll-The BT, Fardeau M, Alcardi J, Vignes B, Niaudet P, & Saudubray JM (1988) de Toni-Fanconi-Debre syndrome with Leigh syndrome revealing severe muscle cytochrome c oxidase deficiency. *J. Pediatr.*, **112**, 734-739.
- [55] Hoeffler G, Forstner M, McGuinness MC, Hulla W, Hiden M, Krisper P, Kenner L, Ried T, Lengauer C, Zechner R, & . (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.
- [56] Fukuda S, Suzuki Y, Shimosawa N, Zhang Z, Orii T, Aoyama T, Hashimoto T, & Kondo N (1998) Amino acid and nucleotide sequences of human peroxisomal enoyl-CoA hydratase: 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase cDNA. *J. Inherit. Metab Dis.*, **21**, 23-28.
- [57] Kasaragod P, Venkatesan R, Kiema TR, Hiltunen JK, & Wierenga RK (2010) Crystal structure of liganded rat peroxisomal multifunctional enzyme type 1: a flexible molecule with two interconnected active sites. *J. Biol. Chem.*, **285**, 24089-24098.
- [58] Qi C, Zhu Y, Pan J, Usuda N, Maeda N, Yeldandi AV, Rao MS, Hashimoto T, & 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.
- [59] Jia Y, Qi C, Zhang Z, Hashimoto T, Rao MS, Huyghe S, Suzuki Y, Van Veldhoven PP, Baes M, & 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.
- [60] Klootwijk ED, Reichold M, Helip-Wooley A, Tolaymat A, Broeker C, Robinette SL, Reinders J, Peindl D, Renner K, Eberhart K, Assmann N, Oefner PJ, Dettmer K, Sterner C, Schroeder J, Zorger N, Witzgall R, Reinhold SW, Stanescu HC, Bockenhauer D, Jaureguiberry G, Courtneidge H, Hall AM, Wijeyesekera AD, Holmes E, Nicholson JK, O'Brien K, Bernardini I, Krasnewich DM, Arcos-Burgos M, Izumi Y, Nonoguchi H, Jia Y, Reddy JK, Ilyas M, Unwin RJ, Gahl WA, Warth R, & Kleta R (2014) Mistargeting of peroxisomal EHHADH and inherited renal Fanconi's syndrome. *N. Engl. J. Med.*, **370**, 129-138.
- [61] Tolaymat A, Sakarcan A, & Neiberger R (1992) Idiopathic Fanconi syndrome in a family. Part I. Clinical aspects. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **2**, 1310-1317.
- [62] 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.
- [63] Stadlmann S, Renner K, Pollheimer J, Moser PL, Zeimet AG, Offner FA, & Gnaiger E (2006) Preserved coupling of oxidative phosphorylation but decreased mitochondrial respiratory capacity in IL-1beta-treated human peritoneal mesothelial cells. *Cell Biochem. Biophys.*, **44**, 179-186.
- [64] Gnaiger E (2001) Bioenergetics at low oxygen: dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply. *Respir. Physiol*, **128**, 277-297.
- [65] Renner K, Kofler R, & Gnaiger E (2002) Mitochondrial function in glucocorticoid triggered T-ALL cells with transgenic bcl-2 expression. *Mol. Biol. Rep.*, **29**, 97-101.
- [66] Litwin JA, Volkl A, Muller-Hocker J, & Fahimi HD (1988) Immunocytochemical demonstration of peroxisomal enzymes in human kidney biopsies. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.*, **54**, 207-213.
- [67] Litwin JA, Volkl A, Stachura J, & Fahimi HD (1988) Detection of peroxisomes in human liver and kidney fixed with formalin and embedded in paraffin: the use of catalase and lipid beta-oxidation enzymes as immunocytochemical markers. *Histochem. J.*, **20**, 165-173.
- [68] Adams SR, Campbell RE, Gross LA, Martin BR, Walkup GK, Yao Y, Llopis J, & Tsien RY (2002) New biarsenical ligands and tetracysteine motifs for protein labeling in vitro and in vivo: synthesis and biological applications. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 6063-6076.
- [69] Martin BR, Giepmans BN, Adams SR, & Tsien RY (2005) Mammalian cell-based optimization of the biarsenical-binding tetracysteine motif for improved fluorescence and affinity. *Nat. Biotechnol.*, **23**, 1308-1314.
- [70] Rinaldo P, Cowan TM, & Matern D (2008) Acylcarnitine profile analysis. *Genet. Med.*, **10**, 151-156.
- [71] Nielsen R, Birn H, Moestrup SK, Nielsen M, Verroust P, & Christensen EI (1998) Characterization of a kidney proximal tubule cell line, LLC-PK1, expressing endocytotic active megalin. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **9**, 1767-1776.

- [72] Amsler K & Cook JS (1982) Development of Na⁺-dependent hexose transport in a cultured line of porcine kidney cells. *Am J Physiol*, **242**, C94-101.
- [73] Cantiello HF, Scott JA, & Rabito CA (1987) Conductive Na⁺ transport in an epithelial cell line (LLC-PK1) with characteristics of proximal tubular cells. *Am. J. Physiol*, **252**, F590-F597.
- [74] Kempson SA, Ying AL, McAteer JA, & Murer H (1989) Endocytosis and Na⁺/solute cotransport in renal epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, **264**, 18451-18456.
- [75] Manoli I, Sysol JR, Li L, Houillier P, Garone C, Wang C, Zerfas PM, Cusmano-Ozog K, Young S, Trivedi NS, Cheng J, Sloan JL, Chandler RJ, Abu-Asab M, Tsokos M, Elkahloun AG, Rosen S, Enns GM, Berry GT, Hoffmann V, DiMauro S, Schnermann J, & Venditti CP (2013) Targeting proximal tubule mitochondrial dysfunction attenuates the renal disease of methylmalonic acidemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **110**, 13552-13557.
- [76] Chandler RJ, Zerfas PM, Shanske S, Sloan J, Hoffmann V, DiMauro S, & Venditti CP (2009) Mitochondrial dysfunction in mut methylmalonic acidemia. *FASEB J.*, **23**, 1252-1261.
- [77] Zsengeller ZK, Aljinovic N, Teot LA, Korson M, Rodig N, Sloan JL, Venditti CP, Berry GT, & Rosen S (2014) Methylmalonic acidemia: A megamitochondrial disorder affecting the kidney. *Pediatr. Nephrol.*
- [78] Guery B, Choukroun G, Noel LH, Clavel P, Rotig A, Lebon S, Rustin P, Bellane-Chantelot C, Mougnot B, Grunfeld JP, & Chauveau D (2003) The spectrum of systemic involvement in adults presenting with renal lesion and mitochondrial tRNA(Leu) gene mutation. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **14**, 2099-2108.
- [79] Majander A, Suomalainen A, Vettenranta K, Sariola H, Perkkio M, Holmberg C, & Pihko H (1991) Congenital hypoplastic anemia, diabetes, and severe renal tubular dysfunction associated with a mitochondrial DNA deletion. *Pediatr. Res.*, **30**, 327-330.
- [80] Liu HM, Tsai LP, Chien YH, Wu JF, Weng WC, Peng SF, Wu ET, Huang PH, Lee WT, Tsai IJ, Hwu WL, & Lee NC (2012) A novel 3670-base pair mitochondrial DNA deletion resulting in multi-systemic manifestations in a child. *Pediatr. Neonatol.*, **53**, 264-268.
- [81] Brooks C, Wei Q, Cho SG, & Dong Z (2009) Regulation of mitochondrial dynamics in acute kidney injury in cell culture and rodent models. *J. Clin. Invest*, **119**, 1275-1285.
- [82] Wang W, Wang Y, Long J, Wang J, Haudek SB, Overbeek P, Chang BH, Schumacker PT, & Danesh FR (2012) Mitochondrial fission triggered by hyperglycemia is mediated by ROCK1 activation in podocytes and endothelial cells. *Cell Metab*, **15**, 186-200.
- [83] Higgins GC & Coughlan MT (2014) Mitochondrial dysfunction and mitophagy: the beginning and end to diabetic nephropathy? *Br. J. Pharmacol.*, **171**, 1917-1942.
- [84] Taylor RC, Cullen SP, & Martin SJ (2008) Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 231-241.
- [85] Price JC, Guan S, Burlingame A, Prusiner SB, & Ghaemmaghami S (2010) Analysis of proteome dynamics in the mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **107**, 14508-14513.
- [86] Liu Y (2011) Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nat. Rev. Nephrol.*, **7**, 684-696.

- [87] Mosher DF (1984) Cross-linking of fibronectin to collagenous proteins. *Mol. Cell Biochem.*, **58**, 63-68.
- [88] Kleman JP, Aeschlimann D, Paulsson M, & van der Rest M (1995) Transglutaminase-catalyzed cross-linking of fibrils of collagen V/XI in A204 rhabdomyosarcoma cells. *Biochemistry*, **34**, 13768-13775.
- [89] Shweke N, Boulos N, Jouanneau C, Vandermeersch S, Melino G, Dussaule JC, Chatziantoniou C, Ronco P, & Boffa JJ (2008) Tissue transglutaminase contributes to interstitial renal fibrosis by favoring accumulation of fibrillar collagen through TGF-beta activation and cell infiltration. *Am. J. Pathol.*, **173**, 631-642.
- [90] Huang L, Haylor JL, Hau Z, Jones RA, Vickers ME, Wagner B, Griffin M, Saint RE, Coutts IG, El Nahas AM, & Johnson TS (2009) Transglutaminase inhibition ameliorates experimental diabetic nephropathy. *Kidney Int.*, **76**, 383-394.
- [91] Fisher M, Jones RA, Huang L, Haylor JL, El NM, Griffin M, & Johnson TS (2009) Modulation of tissue transglutaminase in tubular epithelial cells alters extracellular matrix levels: a potential mechanism of tissue scarring. *Matrix Biol.*, **28**, 20-31.

8. Anhang

8.1 Kongressbeiträge

„*Mitochondrial malfunction caused by protein mistargeting*“ - Poster

93rd Annual Meeting of the German Physiological Society, 13. - 15.03.2014, Mainz, Deutschland

„*Funktionelle Untersuchungen an einem Zellmodell für das renale Fanconi-Syndrom*“ - Poster

5. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, 05 - 08.10. 2013, Berlin

„*Pathological mitochondrial respiration in a model for renal Fanconi syndrome*“ - Poster

92nd Annual Meeting of the German Physiological Society, 02. - 05.03.2013, Heidelberg, Deutschland

„*Mitochondriales Mistargeting als Ursache eines renalen Fanconi Syndroms*“ - Poster

4. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, 06 - 09.10. 2012, Hamburg

„An autosomal dominant renal Fanconi syndrome caused by mitochondrial mistargeting“ - Vortrag

91st Annual Meeting of the German Physiological Society, 22. - 25.03.2013, Dresden, Deutschland

8.2 Publikationen

8.2.1 Veröffentlichte Publikationen

Klootwijk,E.D.; Reichold,M.; Helip-Wooley,A.; Tolaymat,A.; **Broeker,C.**; Robinette,S.L.; Reinders,J.; Peindl,D.; Renner,K.; Eberhart,K.; Assmann,N.; Oefner,P.J.; Dettmer,K.; Sterner,C.; Schroeder,J.; Zorger,N.; Witzgall,R.; Reinhold,S.W.; Stanescu,H.C.; Bockenbauer,D.; Jaureguiberry,G.; Courtneidge,H.; Hall,A.M.; Wijeyesekera,A.D.; Holmes,E.; Nicholson,J.K.; O'Brien,K.; Bernardini,I.; Krasnewich,D.M.; Arcos-Burgos,M.; Izumi,Y.; Nonoguchi,H.; Jia,Y.; Reddy,J.K.; Ilyas,M.; Unwin,R.J.; Gahl,W.A.; Warth,R.; Kleta,R. (2014)

Mistargeting of peroxisomal EHHADH and inherited renal Fanconi's syndrome

N. Engl. J. Med., **370**, 129-138

8.2.2 Eingereichte Publikationen

Assmann N., Broeker C., Dettmer K., Nuernberger N., Klootwijk E.D., Renner-Sattler K., Kleita R., Oefner P.J., Reichold M., Reinders J. (2014)

Unravelling the pathomechanism of a Fanconi's Syndrome: a mitochondriopathy caused by mistargeting of a peroxisomal protein.

JASN

8.3 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Die im Methodenteil und in der Danksagung aufgeführten Personen haben mir in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Diese Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 14.11.2014

Carsten Broecker

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Als erstes ist hier natürlich Prof. Richard Warth zu nennen, der mir die Bearbeitung dieser beiden hochspannenden Themen ermöglicht hat. Mit seiner menschlichen Art und seinem Interesse an meiner Arbeit hat er stets dafür gesorgt, dass ich hochmotiviert an den Projekten gearbeitet habe.

Ein großer Dank gilt auch Dr. Markus Reichold für die umfassende Betreuung sowie die Korrektur der Arbeit. Dank seiner kompetenten Ratschläge und steten Unterstützung war es immer eine Freude, für ihn zu arbeiten.

Besonders bedanken möchte ich mich auch beim gesamten Lehrstuhl medizinische Zellbiologie, Sascha, Ines, Christina, Philipp, David, Maria, große Julia, kleine Julia und Sara für das angenehme Arbeitsklima und die stete Hilfsbereitschaft. Dies gilt besonders für die kleine Julia, die mir einen nicht unwesentlichen Teil der Bildbearbeitung abgenommen hat.

Großer Dank geht an Prof. Robert Kleta (University College London), der die betroffenen Patienten untersucht und die Gene identifiziert hat. Zudem hat er die Patientenbiopsie zur Verfügung gestellt, die in dieser Arbeit untersucht wurde. Ebenso möchte ich mich bei Dr. Enriko Klootwijk bedanken, der die stabil transfizierten Zelllinien generiert und uns überlassen hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei Helga Schmidt, Christine Meese und Cornelia Niemann vom Institut für Anatomie sowie Josef Schröder vom Institut für Pathologie, die die Proben für die Elektronenmikroskopie aufbereiteten sowie die Aufnahmen anfertigten.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Stefan Reinhold für die Überlassung der Nierengewebeproben.

Dr. Katja Dettmer möchte ich danken für die Vermessung der Proben im Massenspektrometer.

Zu guter Letzt möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern bedanken, die mich immer unterstützt haben sowohl in finanzieller als auch in moralischer Hinsicht und mir so das Studium und die Promotion ermöglicht haben. Auch meinem Bruder Alan möchte ich danken für aufmunternde Worte und moralische Unterstützung.