

**Mutationen des Fanconi-assoziierten Proteins 2
(FAP2) als Ursache einer erblichen renalen
Tubulopathie**

DISSERTATION

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



vorgelegt von
Julia Wiesner aus Landshut
April 2017

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Mai 2014 bis April 2017 unter der Anleitung von Herr Prof. Dr. med. Richard Warth am Lehrstuhl für Medizinische Zellbiologie/Institut für Physiologie der Universität Regensburg.

Promotionsgesuch eingereicht am: 31.03.2017

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

Prüfungsausschuss:

| | |
|---------------------------------------|-----------------------|
| Prof. Dr. rer. nat. Charlotte Wagner | (Vorsitzende) |
| Prof. Dr. med. Richard Warth | (1. Gutachter/Prüfer) |
| Prof. Dr. rer. nat. Wolf Hayo Castrop | (2. Gutachter/Prüfer) |
| Prof. Dr. med. Ralph Witzgall | (3. Prüfer) |
| Prof. Dr. rer. nat. Stephan Schneuwly | (Ersatzprüfer) |

Unterschrift

(Julia Wiesner)

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Inhaltsverzeichnis..... | 1 |
| 1. Einleitung | 4 |
| 1.1 Klinik und Genetik | 4 |
| 1.2 Vorarbeiten | 5 |
| 1.3 Die Niere..... | 10 |
| 1.4 Der proximale Tubulus | 11 |
| 1.5 Aufbau und Funktion von Mitochondrien | 12 |
| 1.6 Renales Fanconi-Syndrom..... | 15 |
| 1.7 Nierenfibrose..... | 17 |
| 1.8 Expression und Funktion des Fanconi-assoziierten Proteins 2..... | 18 |
| 2. Zielsetzung | 19 |
| 3. Material und Methoden | 20 |
| 3.1 Material | 20 |
| 3.1.1 Geräte | 20 |
| 3.1.2 Verbrauchsmaterial | 21 |
| 3.1.3 Chemikalien | 21 |
| 3.1.4 Substanzen, Enzyme, Kits..... | 24 |
| 3.1.5 Software | 25 |
| 3.1.6 Oligonukleotide | 25 |
| 3.1.7 PCR-Programme..... | 27 |
| 3.1.8 Antikörper..... | 29 |
| 3.1.9 Puffer und Lösungen | 30 |
| 3.1.10 Zellkultur-Medium..... | 34 |
| 3.2 Methoden..... | 35 |
| 3.2.1 Zellkultur | 35 |
| 3.2.2 Histologische Methoden | 40 |
| 3.2.3 Molekularbiologische Methoden | 43 |
| 3.2.4 Mäuse | 48 |
| 3.2.5 Primärkultur von Nierenzellen | 50 |
| 3.2.6 Statistik | 51 |
| 4. Ergebnisse | 52 |
| 4.1 Untersuchungen am Zellmodell von FAP2 | 52 |
| 4.1.1 FAP2-Expression in induzierbaren LLC-PK1 Zellen | 52 |
| 4.1.2 Untersuchung der Abbaubarkeit von FAP2 _{WT} | 55 |

| | |
|---|------------|
| 4.2 Histologische Untersuchungen von Patientennieren | 57 |
| 4.2.1 Histologie einer Patientenbiopsie | 57 |
| 4.2.2 Pathophysiologie einer <i>post mortem</i> entnommenen Patientennieren | 59 |
| 4.3 Untersuchungen auf Fibrose im FAP2-Zellmodell | 73 |
| 4.3.1 Gen-Expressionsanalyse am FAP2-Zellmodell..... | 73 |
| 4.3.2 Untersuchungen zur Protein-Expression von Interleukin-18 (IL-18)..... | 75 |
| 4.3.3 Untersuchung auf Protein-Expression von Fibronektin (FN1) | 77 |
| 4.4 Funktionelle Untersuchung an FAP2-Zellen | 77 |
| 4.5 Untersuchung des Nieren-Phänotyps von FAP2 Knockout Mäusen | 79 |
| 4.5.1 Expression von FAP2 mRNA im FAP2 Knockout Maus-Modell | 79 |
| 4.5.2 Histologische-Untersuchungen der FAP2 Knockout Maus..... | 80 |
| 4.5.3 Urin-Untersuchungen der FAP2 Knockout Maus | 84 |
| 4.6 Fütterungsexperimente | 88 |
| 4.6.1 Arginin-Versuch..... | 88 |
| 4.6.2 Kreatin-Versuch | 89 |
| 4.7 Untersuchung des Nieren-Phänotyps von FAP2 Knockin Mäusen | 90 |
| 4.7.1 Expression von FAP2..... | 91 |
| 4.7.2 Elektronenmikroskopie von FAP2 Knockin Mäusen..... | 93 |
| 4.7.3 Urin-Analyse von FAP2 Knockin Mäusen | 94 |
| 4.7.4 Untersuchung auf Fibrose-Marker in FAP2 Knockin Mäusen | 96 |
| 4.8 Untersuchungen zur Agglomerat-Bildung von murinem FAP2..... | 97 |
| 4.8.1 Transfektion in porcine LLC-PK1 Zellen | 98 |
| 4.8.2 Transfektion in murine Primärkulturzellen..... | 99 |
| 4.8.3 Transfektionsexpmerimente mit humanisiertem <i>mFAP2_{MUT2}</i> | 101 |
| 5. Diskussion..... | 103 |
| 5.1 FAP2-Expression in induzierbaren LLC-PK1 Zellen | 103 |
| 5.2 Nierenphänotyp einer FAP2 Knockout Maus..... | 104 |
| 5.3 Stabilität von FAP2 _{WT} | 107 |
| 5.4 Gen-Expressionsanalyse am FAP2-Zellmodell | 108 |
| 5.5 Respirometrische Untersuchungen der LLC-PK1 Zellen | 110 |
| 5.6 Untersuchung von humanem Patientengewebe | 111 |
| 5.6.1 FAP2-Patient 1 (Nierenbiopsie)..... | 111 |
| 5.6.2 FAP2-Patient 2 (<i>post mortem</i> entnommene Niere)..... | 112 |
| 5.7 Phänotypische Untersuchung einer FAP2 Knockin Maus..... | 114 |
| 5.8 Vermuteter Pathomechanismus des vorliegenden Fanconi-Syndroms..... | 117 |
| 5.9 Therapieoptionen | 122 |
| 6. Zusammenfassung | 124 |

| | |
|---|------------|
| 7. Literaturverzeichnis | 125 |
| 8. Abbildungsverzeichnis | 133 |
| 9. Tabellenverzeichnis | 135 |
| 10. Abkürzungsverzeichnis | 136 |
| 11. Anhang | 139 |
| 11.1 Eigene Veröffentlichungen | 139 |
| 11.1.1 Publikationen in Vorbereitung..... | 139 |
| 11.1.2 Kongressbeiträge | 139 |
| 11.2 Eidesstattliche Erklärung..... | 140 |
| 12. Danksagung | 141 |

1. Einleitung

1.1 Klinik und Genetik

In Zusammenarbeit mit Prof. Robert Kleta aus London wurde in der vorliegenden Arbeit eine neuartige und dominant vererbte Form eines renalen Fanconi-Syndroms untersucht. Durch genetische Kopplungsanalysen wurde ein Gen identifiziert (Genprodukt wird als Fanconi-assoziiertes Protein FAP2 bezeichnet), dessen Mutation die Erkrankung in insgesamt fünf Familien verursacht.

Die Patienten entwickeln in ihrer Kindheit zunächst ein renales Fanconi-Syndrom. Das renale Fanconi-Syndrom beschreibt ganz generell eine gestörte Funktion des proximalen Tubulus der Niere und geht mit einem renalen Verlust von Stoffen einher, die normalerweise in diesem Segment rückresorbiert werden. Im Detail handelte es sich um Glucosurie, Hyperphosphaturie, generelle Hyperaminoacidurie, „low-molecular-weight“ Proteinurie und zudem eine metabolische Azidose. Schwerwiegendere Symptome, wie sie bei gravierenderen Verläufen beobachtet werden, z.B. Rachitis oder Knochendeformationen zeigten sich hierbei nicht. In fortschreitendem Alter führt die Mutation in FAP2 zusätzlich zu einem terminalen Nierenversagen, sodass die Patienten Dialyse bzw. eine Nierentransplantation benötigen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Pathophysiologie dieser neuartigen Erkrankung zu erforschen.

Bei Prof. Kleta wurden Patienten aus insgesamt fünf Familien vorgestellt, die ein renales Fanconi-Syndrom aufwiesen. Bei den betroffenen Personen handelte es sich sowohl um Männer als auch um Frauen. In genetischen Untersuchungen konnten vier unterschiedliche Mutationen von FAP2 gefunden werden, die autosomal dominant vererbt werden und bereits bei allen heterozygoten Patienten zur vollen Penetranz führen.

Die ersten milden Symptome eines renalen Fanconi-Syndroms traten bei den betroffenen Patienten bereits in früher Kindheit auf (jüngster Patient 18 Monate).

Der Plasmawert an Kreatinin lag im Kindesalter in einem normalen Bereich (ca. 35 - 62 $\mu\text{mol/L}$ bei Kindern bis 3 Jahre). Mit steigendem Alter stiegen allerdings die Plasmawerte an Kreatinin über den Normwert an (Normbereich ca. 44 – 106 $\mu\text{mol/l}$ für Männer, 44 – 88 $\mu\text{mol/l}$ für Frauen), was mit dem progressiven Verlust der Nierenfunktion inklusive Nierenfibrose erklärt werden kann. Der Großteil der Nierentransplantationen war im Alter von 45 – 50 Jahren.

1.2 Vorarbeiten

In der vorangegangenen Dissertation von Dr. Carsten Broeker (2014) wurde bereits die Expression von FAP2 in humanem und murinem Gewebe untersucht. FAP2 zeigt eine starke Expression in der Niere und ist dort ausschließlich im proximalen Tubulus lokalisiert.

Bei höheren Vergrößerungen war erkennbar, dass die Expression auf den frühproximalen Teil des proximalen Tubulus beschränkt war, da die Immunfluoreszenzfärbung von FAP2 bereits am Harnpol des Nephrons begann und im Verlauf des proximalen Tubulus abnahm (Abb. 1).

Murine und humane Proben zeigten diesbezüglich eine identische Lokalisation von FAP2.

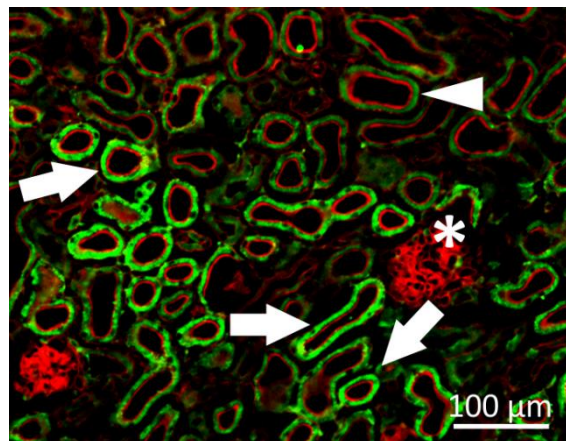


Abbildung 1: Lokalisation der FAP2-Expression in der Maus-Niere

In der Immunfluoreszenz-Färbung einer murinen Niere war zu erkennen, dass die FAP2-Expression (grün) direkt am Harnpol (weißer Stern) begann und auf den frühproximalen Teil des proximalen Tubulus (weiße Pfeile) beschränkt war. Spätproximale Tubulussegmente waren weitgehend FAP2-negativ (weiße Pfeilspitzen). Als Marker für den Bürstensaum des proximalen Tubulus wurde fluoreszenzmarkiertes Phalloidin (rot) gefärbt. Dieses bindet an f-Aktin. Die Abbildung stammt aus der Doktorarbeit von Dr. Carsten Broeker (2014) ¹.

Auffällig war das gefiederte Muster der Fluoreszenzfärbung an der basolateralen Seite der Tubuluszellen (Abb. 2). Durch die palisadenartige Anordnung der Mitochondrien in den basolateralen Membraneinfaltungen des proximalen Tubulus ist dieses Muster charakteristisch für mitochondriale Proteine.

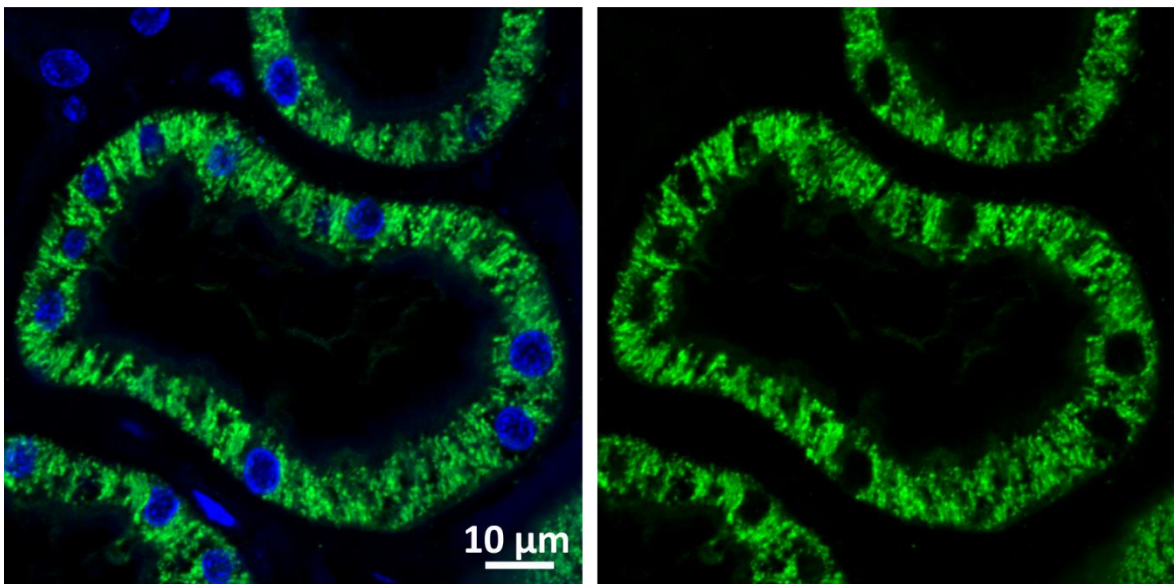


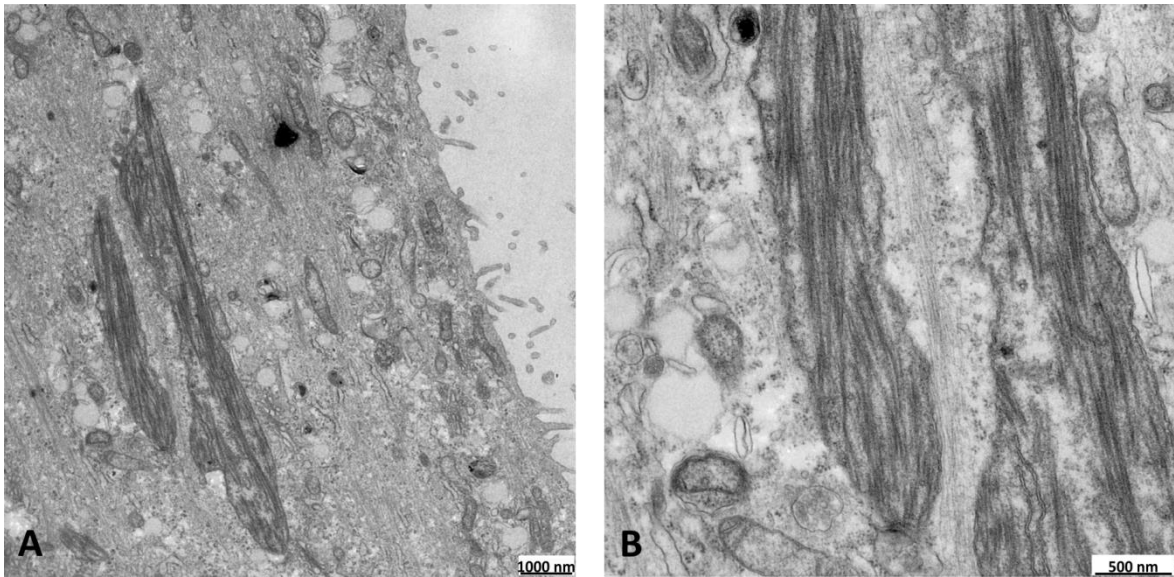
Abbildung 2: FAP2-Immunfluoreszenz-Färbung in der humanen Niere

In hoher Vergrößerung war das charakteristische Muster der FAP2-Immunfluoreszenz-Färbung (grün) gut zu erkennen, welches weitgehend identisch zur Lokalisation von FAP2 in der Mausniere war. In blau wurden die Zellkerne mit HOE33342 angefärbt. Die Abbildung stammt aus der Doktorarbeit von Dr. Carsten Broeker (2014) ¹.

Zudem wurde die genaue intrazelluläre Lokalisation von FAP2 mit Hilfe des induzierbaren Zellmodells untersucht. Dazu wurden die stabil transfizierten, mittels Tetrazyklin induzierbaren, LLC-PK1 Zellen als Modell für proximale Tubuluszellen verwendet. Diese LLC-PK1 Zellen haben einige ihrer ursprünglichen Eigenschaften erhalten, zum Beispiel ihre Transportfähigkeit und die Expression spezifischer Marker für proximale Tubuluszellen ²⁻⁴ und eignen sich deshalb gut als Zellkulturmodell für unsere Untersuchungen.

Dabei zeigten induzierte LLC-PK1 Zellen, die das FAP2-Wildtyp Protein exprimieren (LLC-PK1_{WT}), in Immunfluoreszenz-Färbungen eine unauffällige mitochondriale Morphologie (Abb. 12 A). Induzierte LLC-PK1 Zellen, die ein mutiertes FAP2 Protein exprimieren (LLC-PK1_{MUT1}), hingegen zeigten Mitochondrien, die stark elongiert waren und spindelförmig die ganze Zelle durchzogen (Abb. 12 B).

In elektronenmikroskopischen Aufnahmen induzierter LLC-PK1_{MUT1} Zellen waren diese verlängerten Mitochondrien ebenfalls gut erkennbar. Auffällig in diesen Mitochondrien war, dass deren Matrixraum voll von filamentartigen Einschlüssen war (Abb. 3 A, B Vergrößerung), welche in normalen Mitochondrien nicht beobachtet werden konnten.

**Abbildung 3: Elektronenmikroskopie von induzierten LLC-PK1_{MUT1} Zellen**

In elektronenmikroskopischen Aufnahmen von induzierten LLC-PK1_{MUT1} Zellen waren deutlich die verlängerten Mitochondrien erkennbar (A). Die Vergrößerung zeigt, dass deren Matrixraum voll mit filamentartigen Ablagerungen war (B). Die Abbildung stammt aus der Doktorarbeit von Dr. Carsten Broeker (2014) ¹.

Mit Hilfe von Immunogold-Färbungen auf diesen Zellen konnte eine Beteiligung von mutiertem FAP2 am Aufbau dieser Ablagerungen nachgewiesen werden (Abb. 4 B, weiße Pfeile). In LLC-PK1_{WT} Zellen hingegen wurde FAP2_{WT} nur an die innere Mitochondrienmembran assoziiert nachgewiesen (Abb. 4 A, weiße Pfeile), wie es auch in der Literatur beschrieben wurde ⁵.

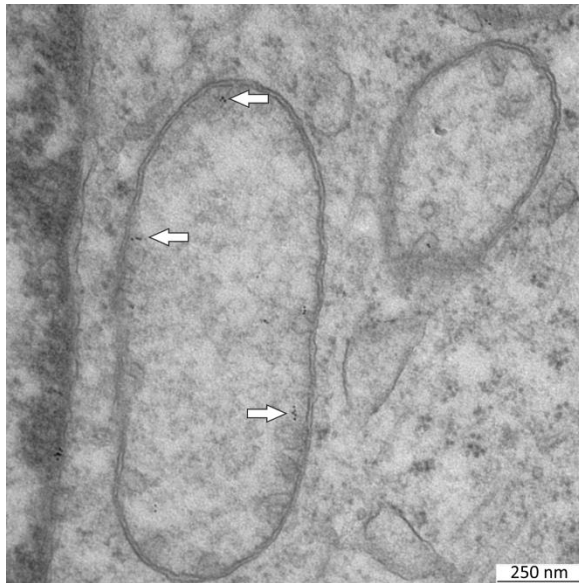
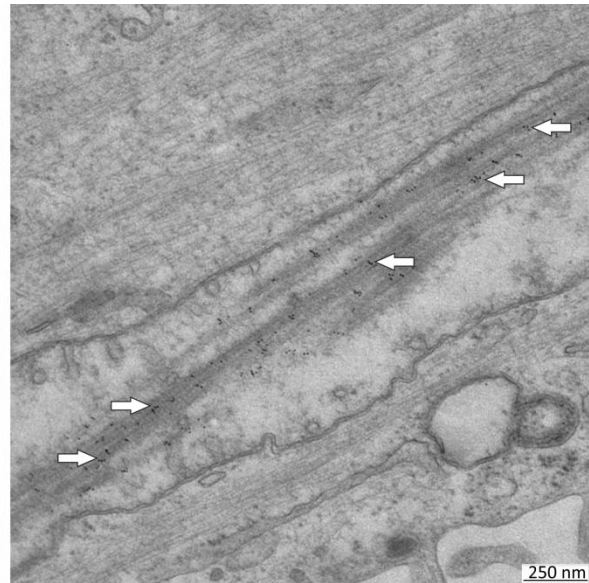
A: LLC-PK1_{WT}B: LLC-PK1_{MUT1}

Abbildung 4: Immunogold-Färbung bei induzierte LLC-PK1 Zellen

FAP2 wurde mittels Immunogoldfärbung markiert. Die schwarzen Punkte stammen von den Goldpartikeln, an die der sekundäre Antikörper gekoppelt war. FAP2 scheint ein Bestandteil der filamentartigen Ablagerungen in den Mitochondrien zu sein, da die als schwarze Punkte dargestellten Goldpartikel hauptsächlich auf den Filamenten zu sehen waren (B, weiße Pfeile). In Zellen, die FAP2_{WT} exprimierten, waren die Markierungen nur an der inneren Mitochondrienmembran zu erkennen (A, weiße Pfeile). Die Abbildungen stammen aus der Doktorarbeit von Dr. Carsten Broeker (2014) ¹.

Weiterhin wurde in einem Zellkultur-Experiment die Abbaubarkeit dieser verlängerten Mitochondrien untersucht, da es in der Literatur Hinweise gibt, wonach pathologisch vergrößerte Mitochondrien nicht oder nur schwer über Mitophagie abgebaut werden können ⁶.

Nach zweiwöchiger Induktion mit Tetrazyklin wurden LLC-PK1_{MUT1} Zellen für weitere acht Wochen ohne eine weitere Induktion kultiviert. Trotz fehlender Induktion war in den Zellen auch nach acht Wochen noch eine unverminderte Anzahl an vergrößerten Mitochondrien zu erkennen (Abb. 5). Die Zellen waren offensichtlich nicht mehr in der Lage, die veränderten Mitochondrien abzubauen. In der Literatur finden sich Angaben für die Halbwertszeit von mitochondrialen Proteinen zwischen 5,9 Tagen ⁷ bis 11,6 Tagen ⁸. Proteine der äußeren mitochondrialen Membran wiesen eine Halbwertszeit von 4,2 Tagen auf, Proteine der inneren Membran 12,6 Tage ⁸. Für ganze Mitochondrien sprechen die Literaturwerte von 8,6 Tagen ⁷, 10,3 Tagen ⁹ oder 6,7 bis 12,2 Tagen ⁸.

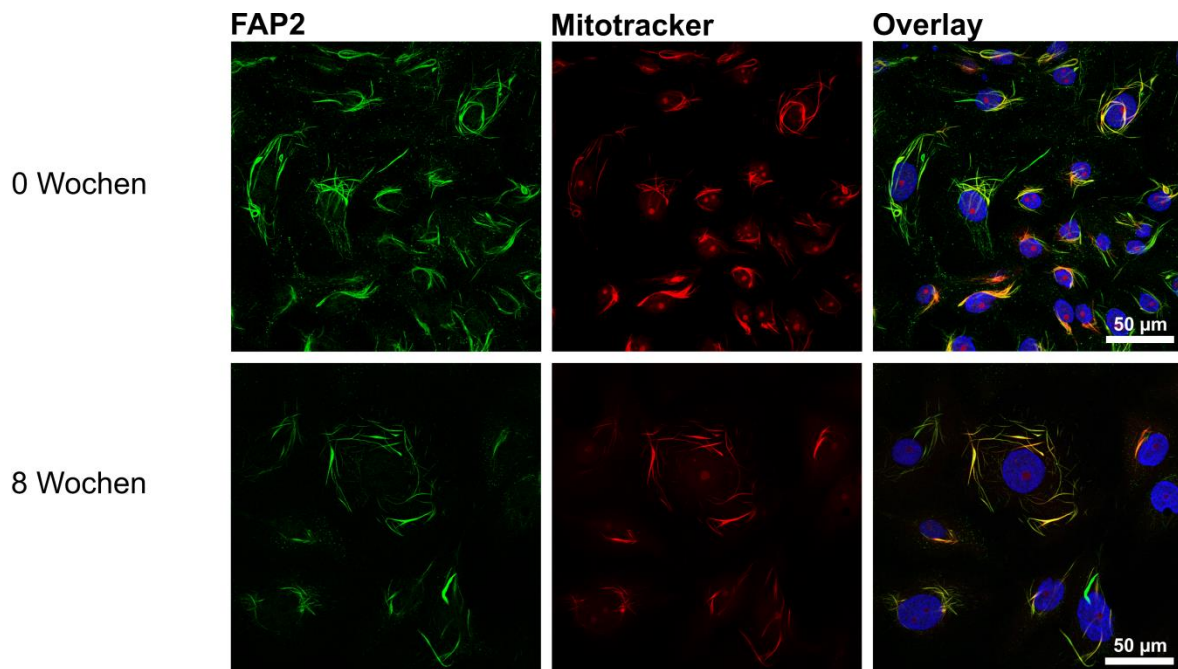


Abbildung 5: Abbaubarkeit von veränderten Mitochondrien in LLC-PK1_{MUT1} Zellen
 LLC-PK1_{MUT1} Zellen wurden zunächst für zwei Wochen mit Tetrazyklin induziert und auf FAP2 gefärbt (0 Wochen). Die verlängerten Mitochondrien sind in allen Zellen zu erkennen. Die folgenden acht Wochen wurden die Zellen ohne Induktion weiter kultiviert und in regelmäßigen Abständen auf FAP2 gefärbt. Obwohl die Zellen kein neues FAP2 mehr exprimieren konnten, waren noch die elongierte Mitochondrien zu sehen. Die Abbildung stammt aus der Doktorarbeit von Dr. Carsten Broeker (2014) ¹.

Zusätzlich zur induzierbaren Zelllinie wurde uns von Prof. Kleta die Nierenbiopsie eines FAP2-Patienten zur Verfügung gestellt. Der Patient trug Mutation 1 (hFAP2 c1006A→G) und war zum Zeitpunkt der Biopsie 21 Jahre alt.

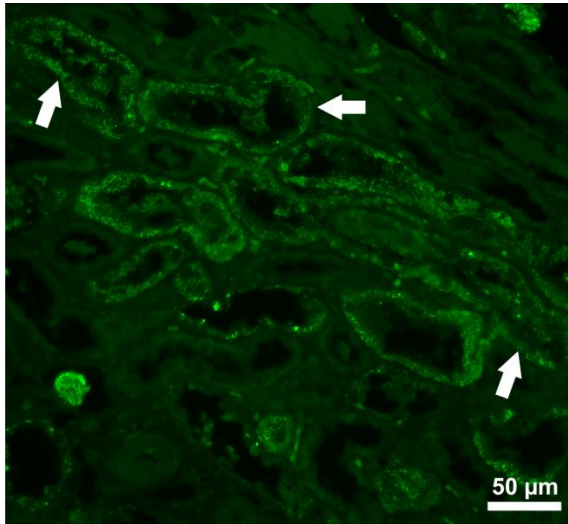
In ersten histologischen Untersuchungen wurde der Erhalt des Gewebes mit einer Hämalaun/Eosin (H/E) Färbung, die Menge an Bindegewebe mit einer Masson-Goldner Färbung und die Expression von FAP2 mit Immunfluoreszenz-Färbungen untersucht.

In der H/E Färbung zeigte das Epithel der proximalen Tubuli deutliche pathologische Veränderungen. Die Epithelhöhe war sehr uneinheitlich und schien an manchen Stellen von der Basalmembran abgelöst zu sein. Ferner waren im Tubuluslumen Zellfragmente zu erkennen, welche in der Immunfluoreszenz FAP2-positiv waren (Abb. 6 A, weiße Pfeile). Vermutlich kam es also zu einem Zelluntergang von proximalen Tubuluszellen mit einem nachfolgenden Abschwemmen der Zellen in einen späteren Tubulusabschnitt. Solche Zellfragmente waren in den proximalen Tubuli der Kontroll-Niere nicht zu sehen (Abb. 6 B).

Bezüglich der Menge an Bindegewebe, welche mit einer Masson-Goldner Färbung bestimmt wurde, konnte in der Biopsie kein Unterschied zu einer gefärbten Kontroll-Niere beobachtet werden.

Allerdings konnten aufgrund der Größe der Biopsie keine Rückschlüsse auf eine eventuell bestehende Fibrose gemacht werden, da fibrotische Veränderungen der Niere zu Beginn einer solchen Erkrankung zunächst nur auf bestimmte Bereiche beschränkt sind und nicht gleichzeitig an allen Stellen entstehen.

A: Patientenbiopsie



B: Kontrolle

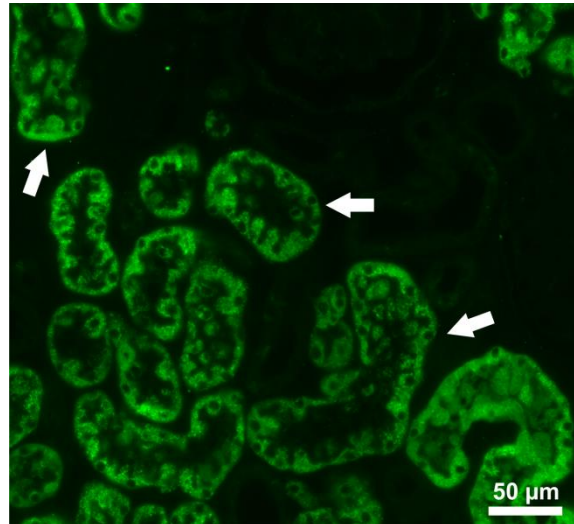


Abbildung 6: Histologische Voruntersuchungen der Patientenbiopsie

Diese Nierenbiopsie (A) stammt von einem 21jährigen Patienten mit Fanconi-Syndrom. Sowohl in der Nierenbiopsie (A) als auch in der Kontroll-Niere (B) waren FAP2-positive proximale Tubuli zu erkennen (weiße Pfeile). In der Patientenbiopsie waren in diesen Tubuli FAP2-positive Zelltrümmer zu erkennen (A), die in der Kontroll-Niere (B) nicht zu sehen waren. Die Abbildungen stammen aus der Doktorarbeit von Dr. Carsten Broecker (2014) ¹.

In elektronenmikroskopische Aufnahmen der Nierenbiopsie konnten die in Zellkultur-Experimenten bereits entdeckten filamentartigen Strukturen in den Mitochondrien auch in den Mitochondrien von proximalen Tubuluszellen beobachtet werden. Zur weiteren Untersuchung des Aufbaus dieser Strukturen wurde in der vorliegenden Arbeit eine Immunogold-Färbung auf die Nierenbiopsie durchgeführt.

1.3 Die Niere

Die Nieren sind ein paarig angelegtes Organ, das eingebettet in Bauchfett auf Höhe des elften Brustwirbels bis zum zweiten Lendenwirbel im Retroperitonealraum liegt. Aufgrund des hohen Energiebedarfs durch die stattfindenden Transportvorgänge sind die Nieren das am stärksten durchblutete Organ mit 25% des Herz-Zeit-Volumens. Zu den Aufgaben der Nieren gehören die Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes, des Blutdruckes, des Säure-Basen-Haushaltes, die Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen sowie die Produktion von Hormonen, wie Erythropoetin und Renin. Makroskopisch betrachtet besteht die Niere aus einer Bindegewebskapsel, dem Cortex und der Medulla.

Die funktionelle Einheit der Niere bildet das Nephron, von denen die menschlichen Nieren ungefähr 1,2 Millionen enthalten. Zu Beginn eines Nephrons sitzt der Glomerulus, der die Aufgabe der Blutfiltration übernimmt. Über das gefensterte Endothel der Kapillarschlingen, eine dreischichtige Basalmembran und die Schlitzmembran zwischen den Fußfortsätzen der Podozyten werden ungefähr 20% des renalen Plasmaflusses in den Raum der Bowman Kapsel filtriert. Der Aufbau des Filters definiert die Eigenschaften der Teilchen, die aus dem Plasma filtriert werden können. Teilchen mit einer Größe von bis zu 6 kDa können frei filtriert werden, bis zu einer Größe von 50 – 60 kDa nimmt die Filtrierbarkeit ab, während größere Teilchen nicht mehr passieren können. Weiterhin bestimmt auch die Ladung der Teilchen ihre Filtrierbarkeit, da die Schlitzmembran mit einer negativ geladenen Glykokalix ausgekleidet ist und so positiv geladene Kationen leichter passieren können als negativ geladene Anionen.

1.4 Der proximale Tubulus

Nach der Filtration des Primärharns aus dem Plasma schließt sich ein Tubulussystem an, in dem alle Stoffe aus dem Primärharn rückresorbiert werden, die noch vom Körper benötigt werden. Der erste Teil dieses Tubulussystems ist der proximale Tubulus als längster Teil des Nephrons. Im proximalen Tubulus findet der Großteil der in der Niere stattfindenden Resorption statt. Der Cortex weist, im Gegensatz zur Medulla, eine gute O₂-Versorgung auf, die die Transportvorgänge unter ATP-Verbrauch ermöglicht¹⁰. Es werden ca. 70% des filtrierten Wassers und Kochsalzes, 100% der filtrierten Glucose, 80% des filtrierten Bicarbonates, 60 – 80% des filtrierten Phosphates und 100% der filtrierten Aminosäuren über transzelluläre und parazelluläre Wege rückresorbiert.

Um diese energieaufwändigen Transportmechanismen durchzuführen, werden hauptsächlich Na⁺-gekoppelte Transportvorgänge genutzt. Dafür nötig ist eine konstant niedrige intrazelluläre Na⁺-Konzentration. Ermöglicht wird dies durch die basolateral lokalisierte Na⁺/K⁺-ATPase, die entgegen des Konzentrationsgefälles unter ATP-Verbrauch im Antiport 3 Na⁺ aus und 2 K⁺ in die Zelle pumpt. Da hierbei ein elektrogener Transport vorliegt, generiert die Na⁺/K⁺-ATPase neben dem chemischen auch einen elektrischen Gradienten. Um die Funktion der Na⁺/K⁺-ATPase aufrecht zu erhalten, werden 95% des in den Mitochondrien gebildeten ATPs verbraucht^{10,11}. Aufgrund dieses hohen Energieaufwandes für die Transportvorgänge weisen die Zellen des proximalen Tubulus eine charakteristische Zellmorphologie auf. Apikal befindet sich der Bürstensaum, der eine Vergrößerung der Oberfläche für die Transporter ermöglicht. Basolateral gibt es tiefe Einfaltungen der Zellmembran, in denen die Mitochondrien palisadenartig aufgereiht liegen und sich somit in räumlicher Nähe zur Na⁺/K⁺-ATPase befinden.

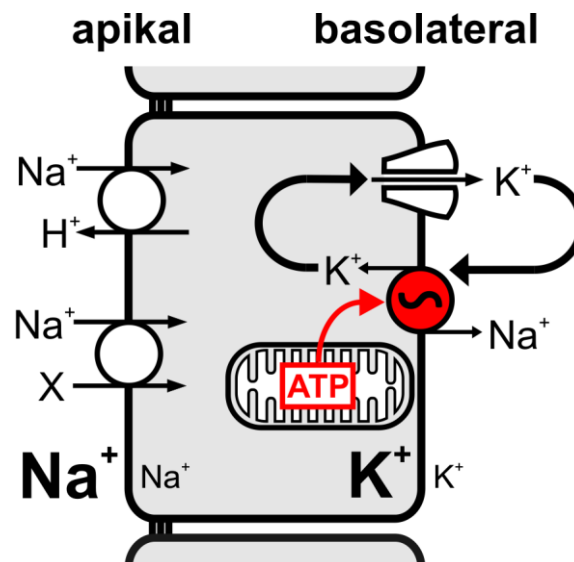


Abbildung 7: Schematischer Aufbau einer Zelle des proximalen Tubulus

Apikal liegen die Transporter für den Massentransport im proximalen Tubulus. Um die niedrige intrazelluläre Na^+ -Konzentration aufrecht zu erhalten, befinden sich basolateral Na^+/K^+ -ATPasen, die Na^+ im Antiport mit K^+ tauschen und dabei ATP verbrauchen. In basolateralen Einstülpungen der Zellmembran befinden sich Mitochondrien, die 95% ihres gebildeten ATPs an die Na^+/K^+ -ATPase geben. Das Bild wurde von PD Dr. rer. nat. Markus Reichold zur Verfügung gestellt.

Die konstant geringe Konzentration an Na^+ im Zytoplasma wird auch benutzt, um sekundär-aktive Transporter anzutreiben. Diese Transporter nutzen chemischen Gradienten von Na^+ , um weitere Substanzen wie Protonen (Antiporter NHE3¹²), Glucose (Symporter SGLT1 und SGLT2^{13,14}), Phosphat (Symporter¹⁵) oder verschiedene Aminosäuren, wie zum Beispiel Glutamat (EAAC1¹⁶), entgegen ihres Konzentrationsgefälles in die Zelle zu transportieren.

Die Rückresorption des Wassers erfolgt im proximalen Tubulus überwiegend parazellulär über einen osmotischen Gradienten, der aus der Rückresorption von Salzen resultiert. Mit dem Wasserstrom werden zudem weitere Ionen mitgezogen, was als „solvent drag“ bezeichnet wird. Neben der Rückresorption von Stoffen werden im proximalen Tubulus auch noch Substanzen aktiv aus dem Blut in den Urin sezerniert. Hierzu gehören bestimmte Medikamente, sowie einige organische Anionen und Kationen.

1.5 Aufbau und Funktion von Mitochondrien

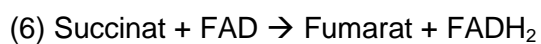
Bei Mitochondrien handelt es sich um dynamische Zellorganellen, die von einer Doppelmembran umgeben sind und ihr eigenes Genom enthalten¹⁷. Neben der Energiebereitstellung in Form von ATP sind sie an weiteren zellulären Vorgängen beteiligt, wie zum Beispiel der β -Oxidation von mittleren und kurzkettigen Fettsäuren, einigen Schritten der Steriodbiosynthese und dem Citratzyklus. Außerdem dienen sie der Zelle als Ca^{2+} -Speicher und spielen eine Rolle bei zellulärer Apoptose¹⁸.

Interessanterweise führen Zellen des proximalen Tubulus keine Glykolyse durch, obwohl die gesamte Menge der filtrierten Glukose (ca. 150 g/d) hier rückresorbiert wird¹⁹⁻²¹.

Die Verteilung der Mitochondriendichte entlang des Nephrons folgt der Sauerstoffversorgung des jeweiligen Nephron-Teils²¹. Je nach Energiebedarf der Zelle wechselt die mitochondriale Dynamik zwischen Fusion und Fission um die Versorgung mit ATP entsprechend zu ermöglichen²².

1.5.1 Citratzyklus

Die wohl bekannteste Aufgabe von Mitochondrien ist die Bereitstellung von Energie in Form von ATP. Hierzu wird zunächst Acetyl-CoA, welches beim Abbau von Glukose, von Fettsäuren oder von Aminosäuren entsteht, im Citratzyklus komplett zu CO₂, GTP und NADH/H⁺ oder FADH₂ als Reduktionsäquivalente abgebaut. Diese Reduktionsäquivalente nehmen Protonen und Elektronen bei den Reaktionsschritten 3, 4, 6 und 8 des Citratzyklus auf, um die Elektronen später in die Atmungskette einzuspeisen und so das Ausschleusen von Protonen aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum anzutreiben.



Der Reaktionsschritt (6) wird vom Enzym Succinat-Dehydrogenase katalysiert, welches als Komplex II auch an der Atmungskette beteiligt ist. Im Gegensatz zu NADH/H⁺ verbleibt FADH₂ aus Schritt (6) als Co-Faktor eines „Electron transferring Flavoprotein“ (EFT) im Enzymkomplex, die aufgenommenen Elektronen werden über das EFT in die Atmungskette transferiert²³.

1.5.2 Oxidative Phosphorylierung

Die tatsächliche Bildung von ATP geschieht durch die oxidative Phosphorylierung. Um die Energie für die Bildung von ATP durch die ATP-Synthase zu generieren, wird ein chemiosmotisches und ein elektrochemisches Potential über die innere Mitochondrienmembran aufgebaut. Das elektrische Potential mit einem Beitrag von 180 bis 200 mV entsteht durch den aktiven Transport von Protonen aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum.

Elektronen aus den Reduktionsäquivalenten NADH/H⁺ bzw. FADH₂ werden auf Komplex I (NADH-Q-Reduktase) bzw. Komplex II (Succinat-Dehydrogenase) übertragen und schließlich von Komplex IV (Cytochrom C-Oxidase) dazu benutzt, um O₂ zu H₂O zu reduzieren. Durch die Protonenpumpen Komplex I, Komplex III (Cytochrom C-Reduktase)

und Komplex IV werden Protonen in den Intermembranraum gepumpt und es wird ein Konzentrations- und Ladungsgradient aufgebaut. Die Synthese von ATP durch Komplex V (ATP-Synthase) kann nun durch den Wiedereintritt der Protonen in die Matrix angetrieben werden.

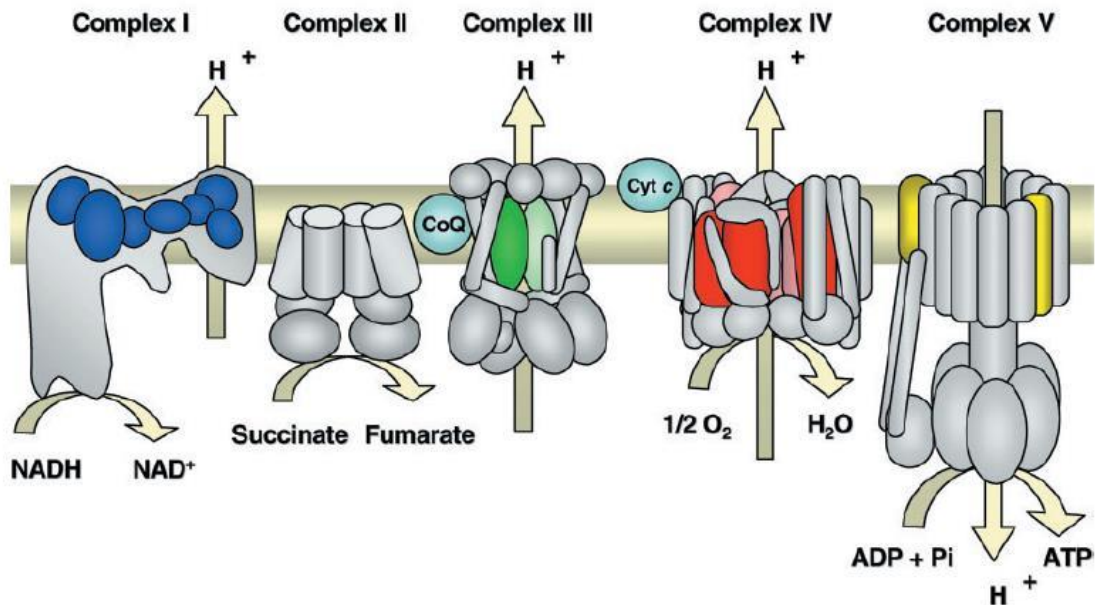


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Atmungskette

Schematische Darstellung der fünf Komplexe der Atmungskette in der inneren Mitochondrienmembran. Elektronenakzeptoren sind Komplex I (NADH-Q-Reduktase) und Komplex II (Succinat-Dehydrogenase). Durch die Protonenpumpen Komplex I, Komplex III (Cytochrom C-Reduktase) und Komplex IV (Cytochrom C-Oxidase) werden Protonen in den Intermembranraum gepumpt und es kommt zum Aufbau eines Konzentrations- und Ladungsgradienten. Komplex V (ATP-Synthase) nutzt diese Gradienten für die Synthese von ATP. (die Abbildung stammt aus Zeviani, 2004²⁴).

Der aktive Transport von Substanzen, vor allem im proximalen (und auch distalen) Tubulus, ist abhängig von einer ausreichenden Bereitstellung von Sauerstoff und somit von ATP¹¹. Eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Atmungskette zeigt sich vor allem in Geweben, die einen hohen Energieumsatz aufweisen, wie zum Beispiel Herz- und Skelettmuskelzellen, das zentrale Nervensystem (ZNS) oder auch proximale Tubuli²⁴⁻²⁶. Daher ist es nicht verwunderlich, dass sich eine Störung der mitochondrialen Funktion in Optikusatrophie, Ophthalmoplegie, Cardiomyopathie, Muskelschwäche, Störungen des ZNS oder Nierenfunktionsstörungen bemerkbar machen kann²⁴⁻²⁹. In den letzten Jahren wurde in der Literatur gezeigt, dass Defekte der mitochondrialen Funktion auch in Verbindung mit renalen Erkrankungen stehen^{25,30-32}. Bei einer früheren, in Zusammenarbeit mit Prof. Kleta untersuchten Form des Fanconi-Syndroms, bei der eine Mutation im peroxisomalen Protein EHHADH vorliegt, wurde eine Störung der oxidativen Phosphorylierung durch eine eingeschränkte mitochondriale β -Oxidation als Auslöser zur Entstehung eines Fanconi-Syndroms entdeckt³⁰.

1.6 Renales Fanconi-Syndrom

Ein renales Fanconi-Syndrom beschreibt eine generelle Funktionsstörung des proximalen Tubulus. Dabei kommt es zum renalen Verlust von Phosphat, Bikarbonat, Glucose, niedermolekularen Proteinen und Aminosäuren. Als Debré-de Toni-Fanconi-Syndrom oder kurz Fanconi-Syndrom wurde das Krankheitsbild erstmals 1943 bezeichnet, da die nähere Charakterisierung durch Debré, de Toni und Fanconi in den dreißiger Jahren³³⁻³⁵ erfolgte. Zuerst wurde dieses Krankheitsbild 1924 von Lignac beschrieben³⁶.

Die vermehrte Ausscheidung von Glucose und Proteinen mit dem Urin hat unter normalen Umständen keine schwerwiegenden klinischen Folgen. Der renale Verlust von Phosphat hat hingegen gravierende Auswirkungen, da er zu einer verzögerten Mineralisierung bzw. zu einer Entmineralisierung der Knochen führt. Bei Kindern kann dies zur Entwicklung einer Vitamin D-resistenten Rachitis und zu Minderwuchs führen, bei Erwachsenen zu Osteoporose oder Osteomalazie. Bekannt sind Fälle, in denen Patienten mit zunächst diagnostizierter mitochondrialen Myopathie wie Kearns-Sayre Syndrom oder MELAS (mitochondriale **M**yopathie, **E**ncephalopathie, **L**actic **A**cidosis, **S**troke-like Episodes) im weiteren Verlauf der Erkrankung noch ein renales Fanconi-Syndrom entwickelten^{27-29,37}. Eine weitere, nicht mitochondriale Erkrankung in deren Verlauf es zu einem renalen Fanconi-Syndrom kommen kann, ist eine Zystinose. Bei solchen Patienten kommt es in der Regel später zusätzlich zu einem terminalen Nierenversagen³⁷⁻³⁹.

Als Ursache für ein Fanconi-Syndrom werden zwei unterschiedliche Pathomechanismen postuliert. Zum einen gibt es ein primäres Fanconi-Syndrom, das durch die Vererbung einer Mutation entsteht, oftmals im mitochondrialen Genom^{25,27,28,37,40,41}. Zum anderen gibt es ein sekundäres Fanconi-Syndrom, das im Rahmen einer Stoffwechselerkrankung oder durch Medikamente erworben wird. Bekannt ist die Entstehung eines sekundären Fanconi-Syndroms beispielsweise durch die Einnahme von Tenofovir oder Adenovir bei Behandlung einer retroviralen Infektion. Auch das als Antiepileptikum verschriebene Valproat kann zu einem renalen Fanconi-Syndrom führen⁴²⁻⁴⁴. Bei einem primären Fanconi-Syndrom wird zwischen autosomal-rezessiver oder X-chromosomal-rezessiver Vererbung unterschieden.

In Zusammenarbeit mit Prof. Kleta wurde kürzlich beobachtet, dass eine Mutation im peroxisomalen Protein EHHADH (L-3-Enoyl-CoA-Hydratase/L-3-Hydroxy-Acyl-CoA-Dehydrogenase) zur Entstehung eines Fanconi-Syndroms führt. Diese Mutation wird im Gegensatz zu bisher untersuchten Mutationen, die ein Fanconi-Syndrom auslösen, autosomal dominant vererbt³⁰. Darüber hinaus konnte Prof. Kleta Mutationen in einem weiteren Gen (Fanconi-assoziiertes Protein 2, kurz FAP2) identifizieren, das ebenfalls zur

Entstehung eines renalen Fanconi-Syndroms führt und auch autosomal dominant vererbt wird.

| Erkrankung | OMIM | Gen | Hauptsymptome |
|---|-------------------------------------|-------------------------------|---|
| Autosomal-rezessive Vererbung | | | |
| Akkumulation toxischer Metabolite | | | |
| Fanconi-Bickel-Syndrom ^{3,44} | 227810 | GLUT2 | Beeinträchtigung des Glucose-Transportes, Glykogenspeicherung, Wachstumsstörung |
| Galaktosämie ⁴⁵ | 230400 | GALT | Leberfunktionsstörung, Ikterus, Sepsis |
| Hereditäre Fructoseintoleranz ⁴⁶ | 229600 | ALDOB | Leberinsuffizienz, Hepatomegalie, Ikterus, Leberversagen |
| Morbus Wilson ⁴⁷ | 277900 | ATP7B | Chronische Kupferspeicherung, Hepatitis, akutes Nierenversagen |
| Tyrosinämie Typ I ^{48,49} | 276700 | FAA | Lebervergrößerung, -versagen, renal-tubuläre Azidose, eingeschränkte GFR |
| Zystinose <ul style="list-style-type: none"> • Infantil^{38,50} • Juvenil^{39,51} | 219800 | CTNS | Lysosomale Akkumulation von Cystin, chronisches Nierenversagen |
| Autosomal-rezessive Vererbung | | | |
| Mitochondriopathie (eingeschränkte Energiebereitstellung) | | | |
| Chronisch tubulointerstitielle Nephropathie ⁵² | 551200 | mtDNA Deletion, Punktmutation | Cytochrom C-Oxidase Mangel |
| Komplex-III-Mangel ^{53,54} | 124000 | UQCRB, UQCRQ, BCS1L | Cytochrom C-Reduktase Mangel |
| Komplex-IV-Mangel ^{55,56} | 220110 | Verschiedene | Cytochrom C-Oxidase Mangel |
| Leigh-Syndrom mit Fanconi Symptomatik ⁵⁷ | 256000, auch X-chromosomal-rezessiv | Verschiedene | Alle Komplexe der Atmungskette |
| X-Chromosomal-rezessiv | | | |
| Dent-Syndrom (Dent disease I) ^{58,59} | 300009 | CICN5 | Endosomendysfunktion, low-molecular-weight Proteinurie, chronisches Nierenversagen |
| Lowe-Syndrom (Okulozerebro-renales Syndrom) ⁶⁰ | 309000 | OCRL | Endosomendysfunktion, low-molecular-weight Proteinurie, chronisches Nierenversagen, verzögerte Entwicklung |
| Isolierte renale Fanconi-Syndrome | | | |
| Fanconi renotubuläres Syndrom (FRTS) 1 | 134600 | FAP2 | Fanconi-Syndrom mit terminalem Nierenversagen, Autosomal-dominante Vererbung |
| Fanconi renotubuläres Syndrom (FRTS) 2 ^{61,62} | 613388 | SLC3A1 | Mutation in Phosphat-Transporter NaPi-IIa (loss-of-function), Fanconi-Syndrom mit dominierender Phosphaturie, Rachitis, Nierenversagen, Autosomal-rezessive Vererbung |
| Fanconi renotubuläres Syndrom (FRTS) 3 ³⁰ | 315605 | EHHADH | Fanconi-Syndrom ohne Nierenversagen, Autosomal-dominante Vererbung |

Tabelle 1: Häufigste genetische Erkrankungen mit Fanconi-Syndrom

1.7 Nierenfibrose

Als Fibrose wird eine pathologische Veränderung von Gewebe verstanden. Hierbei kommt es zur Akkumulation von Bindegewebe-produzierenden Zellen in betroffenen Gewebereichen und einer vermehrten Produktion von extrazellulärer Matrix (ECM). Dies geschieht vor allem bei Gewebeerkrankungen und ist ein wichtiger Mechanismus zur Heilung des geschädigten Gewebes. Durch ein Gleichgewicht von ECM-Produktion und – Abbau durch Proteasen wird normalerweise eine Überproduktion verhindert. Bei andauerndem Stimulus zur Infiltration von Immunzellen und Produktion von ECM kommt es allerdings zur Fibrose und der Schädigung des Gewebes^{63,64}.

In fast allen Fällen von chronischen Nierenerkrankungen (CKD) kommt es am Ende zu renaler Fibrose^{64–67}. Die Untersuchung der bereitgestellten Gewebeproben von FAP2-Patienten ergab eine starke Fibrose der Nieren mit darauffolgendem Nierenversagen. Durch eine Schädigung des Gewebes kommt es zunächst zur Freisetzung proinflammatorischer Cytokine, die zu einer Infiltration von inflammatorischen Zellen führt. Durch die Freisetzung profibrotischer Cytokine werden Fibroblasten aktiviert, die extrazelluläre Matrixproteine produzieren und sezernieren. Dauern die Stimuli für die Fibrose an und es kommt zu einer chronischen Verletzung des Gewebes, kommt es zu einer extremen Produktion und Akkumulation von extrazellulärer Matrix (ECM)^{63,64,66–69}.

In der Niere wird zwischen zwei unterschiedlichen Arten von Fibrose unterschieden, zum einen in eine Glomerulosklerose, zum anderen in eine tubulointerstitielle Fibrose. Bei beiden Fällen kommt es zur Infiltration inflammatorischer Zellen, der Aktivierung und Vermehrung von Myofibroblasten und zu epithelialer-mesenchymaler Umwandlung (epithelial to mesenchymal transition, EMT)^{63,64,67,70}. Dabei verlieren polarisierte, epitheliale Zellen ihren ursprünglichen Phänotyp und zeigen Merkmale eines mesenchymalen Phänotyps, zum Beispiel die Bildung von ECM-Proteinen^{71–73}. Bei tubulointerstitieller Fibrose kommt es nach der Einwanderung inflammatorischer Zellen in das Interstitium zusätzlich zu einer Aktivierung von interstitiellen Fibroblasten und zur Produktion großer Mengen an extrazellulärer Matrix. Als wichtige profibrotische Faktoren sind Angiotensin II und TGF- β bekannt, die die Transkription von Bestandteilen der extrazellulären Matrix, Fibronectin und Collagen, aktivieren^{63,64,66,67,69}. Durch Verknüpfung der ECM-Proteine untereinander erhält die Matrix ihre Stabilität^{65,70,74,75}, kann aber über proteolytische Enzyme wie Matrix Metalloproteinasen (MMPs), wieder abgebaut werden^{67,76}. Normalerweise sollen diese Mechanismen zerstörtes Gewebe heilen und ersetzen. Ist die Schädigung der Zellen allerdings chronisch, schreitet die Fibrose weiter voran, die Matrixproteine werden modifiziert, was eine Degradation erschwert und zur Entstehung von fibrotischen Erkrankungen führen kann^{64,67,74,76}.

1.8 Expression und Funktion des Fanconi-assoziierten Proteins 2

Prof. Robert Kleta konnte neben dem bereits untersuchten *EHHADH*-Gen ein weiteres Gen identifizieren, dessen Mutationen zur Ausbildung eines Fanconi-Syndroms führen. Dieses Gen kodiert für das Fanconi-assoziierte Protein 2 (FAP2). Exprimiert wird FAP2 hauptsächlich im proximalen Tubulus in der Niere, sowie in den α -Zellen des Pankreas und auch in Leber-Hepatozyten⁵. Das Protein besteht aus 386 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 46 kDa^{77,78}. Das Gleichgewicht zwischen Monomer- und Dimer-Bildung liegt auf Seite der Monomere⁷⁹. Subzellulär befindet sich FAP2 in den Mitochondrien, genauer an der inneren Mitochondrien-Membran⁵ und ist dort in den Kreatin-Stoffwechsel involviert.

Bei der Kreatin-Synthese wird in einem ersten, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt eine Amidinogruppe von L-Arginin auf Glycin übertragen. Diese Reaktion wurde erstmals 1940 von Borsook und Dubnoff in Nieren-Homogenaten festgestellt⁸⁰. Das dabei entstehende Guanidinoacetat wird im zweiten Schritt mit Hilfe von aktivem Methionin (S-Adenosylmethionin, SAM) methyliert und es entsteht Kreatin. Kreatin wird in Skelettmuskeln und in das Gehirn importiert und dort gelagert⁸¹. Dort kann es über einen von der Kreatin-Kinase katalysierten Schritt phosphoryliert werden und dient dann als schnell verfügbarer Energiespeicher bzw. -puffer, da die Phosphatgruppe bei Bedarf wieder zurück auf ADP übertragen werden kann und somit wieder ATP entsteht. Der Abbau erfolgt über den spontanen Zerfall von Kreatin oder Kreatin-Phosphat zu Kreatinin, welches in der Niere frei filtriert und ausgeschieden wird⁸¹.

Durch seine Eigenschaft als kurzfristiger Energiespeicher ist Kreatin-Phosphat (PCr) wichtig für Gewebe mit hohem Energieverbrauch, wie zum Beispiel Gehirn oder Muskeln, wo PCr dephosphoryliert und dabei Energie in Form von ATP bereitgestellt wird. Diese Dephosphorylierung wird von „Brain Kreatin-Kinasen“ (B-CK) und „Muskel Kreatin-Kinasen“ (M-CK) katalysiert⁸¹, die sich im Zytoplasma befinden. Die Phosphorylierung von Kreatin erfolgt direkt im Mitochondrium⁸¹ durch mitochondriale Kreatin-Kinasen (Mi-CK).

Prof. Robert Kleta konnte durch Kopplungsanalysen vier unterschiedliche Mutationen im Gen für FAP2 identifizieren, die sich alle an der Oberfläche des Proteins befinden und weit vom katalytischen Zentrum entfernt sind. Diese Form des Fanconi-Syndroms wird autosomal dominant vererbt. Im Gegensatz zu *EHHADH*-Patienten³⁰ entwickeln FAP2-Patienten im Verlauf der Erkrankung aber immer ein terminales Nierenversagen.

2. Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollte ein Gen untersucht werden, dessen Mutation zu einer neuartigen, autosomal dominant vererbten Form eines renalen Fanconi-Syndroms führt. Zusätzlich kommt es bei allen Patienten im Erwachsenenalter zu einer Nierenfibrose mit terminalem Nierenversagen. Über Kopplungsanalysen konnte unser Kooperationspartner Prof. Robert Kleta (University College London) in den fünf betroffenen Familien vier unterschiedliche Mutationen in einem Gen identifizieren, das für das Fanconi-assoziierte Protein 2 (FAP2) codiert. Die Mutationen dieses in den Mitochondrien lokalisierten Proteins liegen alle entfernt vom aktiven Zentrum an der Oberfläche des Proteins.

In Vorarbeiten wurde die Lokalisation von FAP2 sowohl beim Menschen, als auch bei der Maus in Mitochondrien des frühproximalen Tubulus bereits mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Färbungen bestätigt. Weiterhin konnte in Immunfluoreszenz-Experimenten an einer stabil transfizierten, induzierbaren Zelllinie (Tet-on System) beobachtet werden, dass die Überexpression von mutiertem FAP2 zur Ausbildung riesiger, spindelförmiger Mitochondrien führt. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen an diesen Zellen wurden innerhalb der riesigen Mitochondrien lange filamentartige Strukturen beobachtet, welche in normalen Mitochondrien nicht vorhanden sind. Über Immunogold-Färbungen konnte beobachtet werden, dass FAP2_{MUT} am Aufbau dieser Strukturen beteiligt ist. Da Mitochondrien mit diesen FAP2_{MUT} Filamenten nicht abgebaut werden können, sollte auch die Abbaubarkeit von Mitochondrien mit FAP2_{WT} untersucht werden. Außerdem sollte in respirometrischen Messungen geklärt werden, ob die Ausbildung der riesigen Mitochondrien zu einer Veränderung der respiratorischen Funktion der Zellen führt, was die Entstehung des Fanconi-Syndroms erklären könnte.

Als erstes *in vivo* Modell für die Entstehung des vorliegenden Fanconi-Syndroms wurde eine FAP2 Knockout Maus benutzt. Durch die Untersuchung des Nierenphänotyps dieser Maus sollte eine Haploinsuffizienz als mögliche Ursache zur Krankheitsentstehung untersucht werden. Weiterführende Untersuchungen an der Nierenbiopsie eines Fanconi Patienten sollten klären, ob die dort entdeckten pathologischen Filamente ebenfalls aus FAP2_{MUT} aufgebaut sind. Außerdem wurde die *post mortem* Nierenprobe eines zweiten Patienten untersucht. Da diese Gewebeprobe deutliche Anzeichen einer Nierenfibrose zeigte, wurde die Expression von Genen untersucht, welche bei anderen Arten der Nierenfibrose reguliert sind, sowohl im Zellkultur-System, als auch in einem FAP2 Knockin Mausmodell. Diese FAP2 Knockin Maus trägt die Mutation eines der Patienten und sollte phänotypisch auf typische Symptome eines Fanconi-Syndroms und auf Anzeichen eines terminalen Nierenversagens hin untersucht werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

| Gerät | Hersteller |
|--|--|
| Analysenwaage GR-120 | A&D Instruments Ltd, Tokio, J |
| Augenscherere und weitere chirurgische Instrumente | FST, Bad Oeynhausen, D |
| Autoklav | Tuttnauer 2540ELC, biomedics GmbH, Gießen, D |
| Brutschrank (Hypoxie-geeignet) | Binder GmbH, Tuttlingen, D |
| Gasmischanlage für Isofluran-Verdampfer | MFI Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim, D |
| Invertmikroskop Observer Z.1 | Zeiss, Jena, D |
| Konfokales Mikroskop LSM 710 | Zeiss, Jena, D |
| Kryostat Leica CM3050 | Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, D |
| LightCycler LC480 | Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, D |
| 550 Microplate Reader | Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, C, USA |
| Mikrotom (Rotationsmikrotom RM2165) | Leica, Wetzlar, D |
| Mikrozentrifuge | Hettich, Tuttlingen, D |
| Milli-Q-Anlage (Biocel A10) | Millipore, Schwalbach/Ts., D |
| Nanodrop 2000 | PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D |
| NOVOstar Microplate Reader | BMG Labtech, Ortenberg, D |
| OSMOMAT 030 | Gonotec GmbH, Berlin, D |
| Oxygraph-2k | Oroboros Instruments GmbH, Innsbruck, A |
| pH-Meter | Schott Geräte, Mainz, D |
| Pipetten | Eppendorf, Hamburg, D |
| Pipetten | Gilson, Middleton, USA |
| Seahorse XFp | Agilent Technologies, Santa Clara, USA |
| 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 |
| Mini Trans-Blot® Cell | Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, C, USA |
| Zentrifuge ZK 364 | Hermle, Wehingen, D |

3.1.2 Verbrauchsmaterial

| Produkt | Hersteller |
|--|---|
| Cluster Plates (6-well, 12-well, 24-well) | Nuclon Surface, Nunc A/S, Roskilde, DK |
| 6x DNA Loading Dye | MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D |
| DEPEX Mounting Medium | Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D |
| Eppendorf Tubes (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml) | Eppendorf AG, Hamburg, D |
| Einwegpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml) | Sarstedt, Nümbrecht, D |
| Filterpapier | GE Healthcare Life Sciences, Buckinhamshire, UK |
| GeneRuler™ DNA Ladder (50 bp, 100 bp, 1 kb) | MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D |
| Glasdeckplättchen für Zellfärbungen | Hartenstein, Würzburg, D |
| Glycergel mounting medium, fluoreszenzfrei | DakoCytomation, Dakato North America Inc., Carpinteria, USA |
| 0,5 ml Insulin-Spritzen | BD Micro-Fine+, BD Consumer Healthcare, Heidelberg, D |
| Kulturflaschen T-25, T-75 | Nuclon Surface, Nunc A/S, Roskilde, DK |
| 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 (96-well) | 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 |
| PVDF Blotting Membran | GE Healthcare Life Sciences, Buckinhamshire, UK |
| Tissue Tek OCT-Medium | Sakura Finetek, Zoeterwoude, NL |
| Tubes (15 ml, 50 ml) | Greiner bio-one, Frickenhausen, D |

3.1.3 Chemikalien

| Produkt | Hersteller |
|--------------------------|-------------------------------------|
| Agarose | AppliChem, Darmstadt, D |
| Acetyl-CoA | Sigma, Taufkirchen, D |
| Acrylamid | Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, D |
| ADP | Sigma, Taufkirchen, D |
| Ammoniumacetat | Merck, Darmstadt, D |
| Ammonium Persulfat (APS) | Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, D |
| Ampicillin | Sigma, Taufkirchen, D |
| Antimycin A | Sigma, Taufkirchen, D |
| L-Arginin HCl Pulver | wake-up-easy, Berlin, D |
| Ascorbat | Sigma, Taufkirchen, D |
| Aqua ad iniectabilia | Braun, Melsungen, D |

| | |
|--|---|
| Bacto pepton | BD GmbH, Heidelberg, D |
| Bacto yeast extract | BD GmbH, Heidelberg, D |
| Benzonase (25 U/μl) | Sigma, Taufkirchen, D |
| Bradford Reagenz | Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, C, USA |
| Bromophenol Blue | Sigma, Taufkirchen, 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 |
| Creapure® Creatine | Biomenta® Sport Nutrition, Koblenz, D |
| Collagen from calf skin | Sigma, Taufkirchen, D |
| Cytochrom c | Sigma, Taufkirchen, D |
| Digitonin | Sigma, Taufkirchen, D |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Merck, Darmstadt, D |
| DMEM (Dulbecco`s modified eagle Medium) | Gibco Cell Culture Systems – Invitrogen, Karlsruhe, 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 (EtOH) | J. T. Baker, Deventer, NL |
| FCS (Fetales 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 |
| Heparin-Lösung Liquemin N (25000 I.E./5 ml) | Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, D |
| IGEPAL® CA-630 | Sigma, Taufkirchen, D |
| Isofluran | Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, D |
| Isopropanol | Merck, Darmstadt, D |
| 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 |
| Laemmli Sample Puffer | Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, C, USA |
| L-Glutamin, 200 mM (100x), flüssig | Gibco Cell Culture Systems – Invitrogen, Karlsruhe, D |

| | |
|---|---|
| Malat | Sigma, Taufkirchen, D |
| Mannitol | neoLab, Heidelberg, D |
| Mayers Hämalaun alkoholisch | Merck, Darmstadt, D |
| β -Mercaptoethanol | Merck, Darmstadt, D |
| 2-Methylbutan | Sigma, Taufkirchen, D |
| Methanol | Merck, Darmstadt, D |
| $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ | Merck, Darmstadt, D |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | Merck, Darmstadt, D |
| Magermilchpulver | AppliChem, Darmstadt, D |
| $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ | Merck, Darmstadt, D |
| NaCl | Merck, Darmstadt, D |
| NaCl, 0,9% (isotone Lösung) | B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D |
| $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ | Merck, Darmstadt, D |
| NaOH | Merck, Darmstadt, D |
| Na-Hexanoat | Sigma, Taufkirchen, D |
| Na-Pyruvat, 100 mM Lösung | Sigma, Taufkirchen, D |
| Natriumacetat | Merck, Darmstadt, D |
| Natrium-Deoxycholat $\geq 97\%$ (titration) | Sigma, Taufkirchen, D |
| NH_4 -Acetat | Merck, Darmstadt, D |
| Octanoyl-Carnitin | Tocris Bioscience, Bristol, UK |
| Oligomycin | Sigma, Taufkirchen, D |
| OptiMEM | Gibco Cell Culture Systems – Invitrogen, Karlsruhe, 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 μ g/ml Strep.-Sulfat) | Gibco Cell Culture Systems – Invitrogen, Karlsruhe, D |
| Phosphorwolframsäure | Sigma, Taufkirchen, D |
| PMSF (Stock 100 mM) | AppliChem, Darmstadt, D |
| Protease-Inhibitor Cocktail (100x Stock) | Calbiochem, San Diego, CA, USA |
| Proteasom-Inhibitor MG-132 | MedChem Express, Monmouth Junction, NJ, USA |
| Ponceau | Serva, Heidelberg, D |
| Purified BSA 100x (10 mg/ml) | New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA |
| Restore™ Western Blot Stripping Buffer | ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, Ma, USA |
| RNase Inhibitor | Promega Corporation, Madison, WI, USA |
| Rotenon | Sigma, Taufkirchen, D |
| RPMI 1640 Medium, mit/ohne Glucose | Gibco Cell Culture Systems – Invitrogen, Karlsruhe, D |
| Saccharose | Merck, Darmstadt, D |
| Säurefuchsin | Merck, Darmstadt, D |
| SDS (Dodecylsulfat Natriumsalz) | Merck, Darmstadt, D |
| Succinat | Sigma, Taufkirchen, D |

| | |
|---|---|
| TAE (Tris – Acetat – EDTA) – Puffer (50x) | AppliChem, Darmstadt, D |
| Taurin | Sigma, Taufkirchen, D |
| TEMED | Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, D |
| Tetrazyklinstock (12,5 mg/ml) in EtOH | Bioline, Luckenwalde, D |
| TMPD | Sigma, Taufkirchen, D |
| Trinatriumcitrat-Dihydrat | Merck, Darmstadt, D |
| TRIS HCl (Trizma® hydrochloride) | Sigma, Taufkirchen, D |
| Triton X-100 | AppliChem, Darmstadt, D |
| Tween | Sigma, Taufkirchen, D |
| Trypsin-EDTA-Lösung (10x), flüssig | Gibco Cell Culture Systems – Invitrogen, Karlsruhe, D |
| Xylol | Sigma, Taufkirchen, D |

3.1.4 Substanzen, Enzyme, Kits

| Produkt | Hersteller |
|---|--|
| anti-pig-IL-18 ELISA | PromoCell GmbH, Heidelberg, D |
| Collagenase Typ IV (aus Clostridium histolyticum) | Sigma, Taufkirchen, D |
| CyQUANT® Cell Proliferation Assay Kit | ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, Ma, USA |
| dNTPs 10 mM | QIAGEN GmbH, Hilden, D |
| HiYield® Plasmid Mini Kit | Süd-Laborbedarf Gauting, München, D |
| Immunoreagenz Part I Immunoreagenz Part II | Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, T, USA |
| Lipofectamine® 3000 Transfection Reagent | ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, Ma, USA |
| 6x Loading Dye | ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, Ma, USA |
| Marker (50 bp, 1 kb) | ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, Ma, USA |
| M-MLV Reverse Transkriptase | Promega Corporation, Madison, WI, USA |
| M-MLV RT RNase Inhibitor | Promega Corporation, Madison, WI, USA |
| M-MLV RT 5x Buffer | Promega Corporation, Madison, WI, USA |
| Nucleo Spin RNA | Macherey-Nagel GmbH, Düren, D |
| Precision Plus Protein Dual Color Standard | Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA |
| Proteinase K | Sigma-AldrichCo. LLC., St. Louis, MO, USA |
| QIAquick®Gelextraction Kit | Quiagen GmbH, Hilden, D |
| QIAquick® PCR-Purification Kit | Quiagen GmbH, 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 |
| Random Hexamer Primer (100 µM) | Promega Corporation, Madison, WI, USA |
| REDTaq Ready Mix | Sigma-AldrichCo. LLC., St. Louis, MO, USA |

| | |
|-------------------------------------|--|
| Restriktionsenzym HpaI (2000 U/ml) | New England Biolabs Inc., Ipswich, Ma, USA |
| Restriktionsenzym NotI (2000 U/ml) | New England Biolabs Inc., Ipswich, Ma, USA |
| Restriktionsenzym EcoRI (2000 U/ml) | New England Biolabs Inc., Ipswich, Ma, USA |
| SYBR® Green PCR Kit | Quiagen GmbH, Hilden, D |
| Ultra-Pfu-Polymerase | Stratagene, California, US |
| XFp cell mito stress kit | Agilent Technologies, Santa Clara, USA |

3.1.5 Software

| Produkt | Hersteller |
|---------------|---|
| ImageJ V1.37c | Wayne Rasband, NIH, USA |
| Origin 2016G | OriginLab Corporation, Northampton, USA |

3.1.6 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von Invitrogen, Karlsruhe, D hergestellt.

Genotypisierung

| Zielgen | Primer | Sequenz | Annealing Temp. |
|------------------------------|--------|--------------------------|-----------------|
| murines FAP2 | se | AGCCCCTCTATTTCCCTTTTCATT | 60 °C |
| | as | TTCCACTGCGTCATTCTCCTGTAA | |
| murines FAP2 _{MUT2} | se | CGATACAGGCATCCACAGCT | 57 °C |
| | as | CGAGGGGAAATGCTGACTCTA | |

Mutagenese

| Zielgen | Primer | Sequenz | Annealing Temp. |
|--------------|----------|----------------------------------|-----------------|
| humanes FAP2 | se_EcoRI | GACGAATTCATGCTGCGGGTGCGGTGT | 62 °C |
| | as_BamHI | GACGGATCCTGTTCAAGTCCAAGTAGGACT | 69 °C |
| | | GTAAG | |
| murines FAP2 | se_NotI | GAAGCGGCCGCGATGCTACGGGTGCGGTGTCT | 68 °C |
| | as_EcoRI | GACGAATTCACGCCTGCTCAGTCAAAG | 65 °C |
| | se_SacI | GAAGAGCTCGATGCTACGGGTGCGGTGTC | 67 °C |

| | | | |
|---------------------------------|----------------------------|--|-------|
| murines FAP2 | se_A1006G as_A1006G | TCAAGAAAGCAGGATGGGCCATAG CTATGGCCCATCCTGCTTTCTTGA | 59 °C |
| murines FAP2 _{MUT2} | se_G1012A_2 as_G1012A_2 | GCAGGATGGACCATAATTACTC GAGTAATTATGGTCCATCCTGC | 52 °C |
| murines FAP2 _{MUT2} | se_G1030A_2 as_G1030A_2 | ACTCCGTTAACACCAATCATCC GGATGATTGGTGTTAACGGAGT | 54 °C |

Quantitative Real-time PCR

| Gen | Primer | Sequence (5'>3') | Annealing temp. |
|------------------------------|--------------------|--|------------------------|
| porcines FAP2 | sense antisense | CGACCCTGTCACCAGATTGA ATGGAAAGCCACTTGGACGA | 60°C |
| humanes FAP2 | sense antisense | AGGCCAGGAACATTCCGC GTTCGTCCAAGCCGAGATCC | 60°C |
| murines FAP2 | sense antisense | TTTTCAAGAAAGCAGGATGGA TGACATCCAGAGGGGATGAT | 57°C |
| porcines FN1 | sense antisense | GAGGCACAAGATTCGGGAGG CATAATGGGAAACCGTGTAGGG | 61°C |
| murines FN1 | sense antisense | GAAGACAGATGAGCTTCCCCA GGTTGGTGATGAAGGGGGTC | 59°C |
| porcines Glattmuskelaktin | sense antisense | AGAACACGGCATCATCACCA CAGGGTCCGATGCTCTTCTG | 61°C |
| murines Glattmuskelaktin | sense antisense | GCTACGAACTGCCTGACGG GCTGTTATAGGTGGTTTCGTGGA | 57°C |
| porcines IL-18 | sense antisense | AGCTGAAAACGATGAAGACCTG AAACACGGCTTGATGTCCCT | 61°C |
| murines IL-18 | sense antisense | TCTTGGCCCAGGAACAATGG CGGCCAAAGTTGTCTGATTCC | 60°C |
| porcines NLRP3 | sense antisense | CCTGCAAAAACCTGGGGTTGG CTCCAAGAGCATTTCCTCCGT | 60°C |
| murines NLRP3 | sense antisense | TGGCTGTGTGGATCTTTGCT ACGTGTCATTCCACTCTGGC | 59°C |
| porcines β -actin | sense antisense | CCCATCTACGAGGGGTACG CGCTCCGTCAGGATCTTC | 60°C |
| murines β -actin | sense antisense | GACAGGATGCAGAAGGAGATTACTG CCACCGATCCACACAGAGTACTT | 57°C |

3.1.7 PCR-Programme

Genotypisierungs-PCR

FAP2 Knockout Mäuse

| Schritt | Temperatur | Zeit |
|---------|------------|--------|
| 1 | 95°C | 5 min |
| 2 | 94°C | 20 sec |
| 3 | 60°C | 45 sec |
| 4 | 72°C | 60 sec |
| 5 | 72°C | 5 min |
| 6 | 4°C | hold |

40x Schritt 2 - 4

FAP2_{MUT2} Knockin Mäuse

| Schritt | Temperatur | Zeit |
|---------|------------|--------|
| 1 | 94°C | 5 min |
| 2 | 94°C | 60 sec |
| 3 | 57°C | 60 sec |
| 4 | 72°C | 30 sec |
| 5 | 72°C | 5 min |
| 6 | 4°C | hold |

32x Schritt 2 - 4

Site-directed mutagenesis

PCR-Programm 1

| Schritt | Temperatur | Zeit |
|---------|------------|---------|
| 1 | 95°C | 5 min |
| 2 | 94°C | 30 sec |
| 3 | 49°C | 30 sec |
| 4 | 72°C | 150 sec |
| 5 | 72°C | 5 min |
| 6 | 4°C | hold |

35x Schritt 2 - 4

PCR-Programm 2

| Schritt | Temperatur | Zeit |
|---------|------------|--------|
| 1 | 95°C | 5 min |
| 2 | 94°C | 30 sec |
| 3 | 49°C | 30 sec |
| 4 | 72°C | 60 sec |
| 5 | 72°C | 5 min |
| 6 | 4°C | hold |

35x Schritt 2 - 4

PCR-Programm 3

| Schritt | Temperatur | Zeit |
|---------|------------|---------|
| 1 | 95°C | 5 min |
| 2 | 94°C | 30 sec |
| 3 | 61°C | 30 sec |
| 4 | 72°C | 180 sec |
| 5 | 72°C | 5 min |
| 6 | 4°C | hold |

35x Schritt 2 - 4

Quantitative Realtime-PCR

Anpassung der Temperatur von Schritt 3 und 6 nach optimaler Annealing-Temperatur der Primer (siehe Primer-Übersicht „Quantitative Real-time PCR“)

| Schritt | Temperatur | Zeit |
|---------|------------|--------|
| 1 | 95°C | 10 min |
| 2 | 95°C | 15 sec |
| 3 | 57°C | 20 sec |
| 4 | 72°C | 20 sec |
| 5 | 95°C | 5 sec |
| 6 | 57 °C | 60 sec |
| 7 | 97°C | 5 min |
| 8 | 4°C | hold |

40x Schritt 2 - 4

3.1.8 Antikörper

| Antikörper | Art | Hersteller |
|--|----------|--|
| anti-FAP2, rabbit polyclonal IgG | Prim.-AK | Sigma-Aldrich Co. LLC., Taufkirchen, D Proteintech Group Inc., Manchester, UK |
| anti-Fibronectin, rabbit polyclonal IgG | Prim.-AK | Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, D |
| anti-Aquaporin2, goat polyclonal IgG | Prim.-AK | Alomone labs, Jerusalem, IL |
| anti-Smooth Muscle α -Actin, mouse polyclonal IgG | Prim.-AK | Abcam, Cambridge, UK |
| anti-IL-18, goat polyclonal IgG | Prim.-AK | R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA |
| anti-beta-Actin, rabbit polyclonal IgG | Prim.-AK | Sigma-Aldrich Co. LLC., Taufkirchen, D |

| | | |
|-------------------------------------|---------|---------------------------|
| Alexa Fluor® 488 donkey anti-rabbit | Sek.-AK | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| Alexa Fluor® 555 donkey anti-rabbit | Sek.-AK | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| Alexa Fluor® 647 donkey anti-rabbit | Sek.-AK | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| Alexa Fluor® 555 donkey anti-goat | Sek.-AK | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| Alexa Fluor® 647 donkey anti-mouse | Sek.-AK | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| IgG-HRP donkey anti-rabbit | Sek.-AK | Santa Cruz, Heidelberg, D |

| | | |
|---|-----------------|--------------------------|
| MitoTracker Orange CMTMRos (Stock 1 mM) | Mitochondrien | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| Phalloidin 647 | f-Actin | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| HOE33342 (Stock 5x10 ⁻⁴ M) | Zellkern-Marker | Invitrogen, Karlsruhe, D |

3.1.9 Puffer und Lösungen

Alle Angaben in % sind in m/m (Masse/Masse, engl. w/w, weight/weight) bzw. v/v (Volumen/Volumen) angegeben.

| Bezeichnung | Inhaltsstoffe | Endkonzentration |
|--|--|--|
| Ammoniumacetat | NH ₄ Ac in Aqua dest. | 7,5 M |
| Antikörper-Verdünnungslösung (für Immunfluoreszenz) | BSA Triton X-100 in Aqua dest. | 0,5% 0,04% |
| Blocklösung (für Immunfluoreszenz) | BSA Triton X-100 in Aqua dest. | 5% 0,04% |
| Blocklösung (für Western Blot) | Milchpulver in PBS-T | 5% |
| Citratpuffer, pH 6,0 (für Immunfluoreszenz) | Citronensäure-Monohydrat Trinatrium-Dihydrat in Aqua dest. | 0,3165 g 2,0587 g |
| Epitopdemaskierung, pH 7,4 (für Immunfluoreszenz) | SDS in PBS-Puffer | 0,1% |
| Fixierlösung, pH 7,4 (für Perfusion) | NaCl KH ₂ PO ₄ MgCl ₂ EGTA Saccharose Paraformaldehyd in Aqua dest. | 90 mM 15 mM 2 mM 1 mM 100 mM 3% |
| Fixierlösung, pH 7,4 (für Immunfluoreszenz) | Paraformaldehyd in PBS-Puffer | 3% |

| | | |
|---|--|--|
| Laufpuffer, 5x | Tris Glycin SDS in Aqua dest. | 15 g 72 g 5 g ad 1 l |
| Lichtgrün | Lichtgrün in Aqua dest. +0,2 ml Eisessig | 2% |
| Nachfixierlösung, pH 7,4 | NaCl KH ₂ PO ₄ MgCl ₂ EGTA Saccharose Paraformaldehyd in Aqua dest. | 90 mM 15 mM 2 mM 1 mM 17 % 1% |
| Orange G-Differenzierungslösung | Phosphorwolframsäure Orange G in Aqua dest. | 4% 2% |
| PBS-Puffer, pH 7,4 | KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ NaCl in Aqua dest. | 1,8 mM 10,3 mM 137 mM |
| PBS-T (PBS mit Tween) | Tween PBS | 500 µl ad 500 ml |
| Permeabilisierungs-Lösung, pH 7,4 (für Immunfluoreszenz) | Triton X-100 in PBS-Puffer | 0,04% |

| | | |
|------------------------------|---------------------------------|--------|
| Ringer-Lösung, pH 7,4 | NaCl | 145 mM |
| | KH ₂ PO ₄ | 0,4 mM |
| | K ₂ HPO ₄ | 1,6 mM |
| | MgCl ₂ | 1 mM |
| | Glucose | 5 mM |
| | CaCl ₂ | 1,3 mM |
| | HEPES | 5 mM |
| | in Aqua dest. | |

| | | |
|----------------------------|-----------------------------|------|
| RIPA-Puffer, pH 7,4 | SDS | 0,1% |
| | IGEPAL | 1% |
| | Natrium-Desoxycholat | 0,5% |
| | Protease-Inhibitor-Cocktail | 1x |
| | (Stock 100x) | 1 mM |
| | PMSF (Stock 100 mM) | |

| | | |
|--------------------------|---------------------|----------|
| Sample Puffer, 2x | DTT | 154 mg |
| | 1% Bromophenol Blue | 0,2 ml |
| | 86% Glycerol | 1,16 ml |
| | 10 % SDS | 3 ml |
| | 0,5 M Tris, pH 6,8 | 1,25 ml |
| | in Aqua dest. | ad 10 ml |

| | | |
|--------------------------|-------------------------|---------|
| Sample Puffer, 1x | Sample Buffer, 2x | 500 µl |
| | 0,5 M MgCl ₂ | 10 µl |
| | Benzonase (25 U/µl) | 4 µl |
| | in Aqua dest. | ad 1 ml |

| | | |
|------------------------------------|----------------------|-------|
| Säurefuchsin-Ponceau-Lösung | Ponceau | 0,2 g |
| | Säurefuchsin | 0,1 g |
| | in 300 ml Aqua dest. | |
| | +0,6 ml Eisessig | |

| | | |
|---------------------|-------------------|-------|
| Store Buffer | BSA | 1,5% |
| | NaAzid (Stock 8%) | 0,02% |
| | in PBS-T | |

| | | |
|---|--|----------------------------|
| Tail-Buffer, pH 8,0 | EDTA SDS Tris-HCl in Aqua dest. | 0,1 M 0,5% 50 mM |
| TE-Buffer, pH 7,4 | EDTA Tris-HCl in Aqua dest. | 1 mM 10 mM |
| Transferpuffer | Laufpuffer, 1x Methanol Aqua dest. | 200 ml 200 ml 600 ml |
| Triethanolamin-HCl-Puffer, pH 8,0 | Triethanolamin EDTA in Aqua dest. | 0,5 mM 5 mM |
| Tris-HCl-Puffer, pH 6,8 | Tris in Aqua dest. | 0,5 M |
| Tris-HCl-Puffer, pH 8,1 | Tris in Aqua dest. | 1 M |
| Tris-HCl-Puffer, pH 8,8 | Tris in Aqua dest. | 1,5 M |
| Triton X-100 | Triton X-100 in Aqua dest. | 10% |
| Verdünnungslösung für sek. AK für Western Blot | Milchpulver in PBS-T | 1% |
| Weigerts Eisenhämatoxylin Lösung A | Hämatoxylin in EtOH 96% | 1% |

| | | |
|---|--|------|
| Weigerts Eisenhämatoxylin Lösung B | Eisen(III)chlorid in Aqua dest. + 1 ml 25% HCl | 1,5% |
|---|--|------|

3.1.10 Zellkultur-Medium

| Basismedium | Hersteller | Artikelnummer |
|------------------------------------|--|---------------|
| DPBS | Gibco Cell Culture Systems – Invitrogen, Karlsruhe, D | 14190-094 |
| RPMI Medium 1640 (mit Glc) | | 21875-034 |
| RPMI Medium 1640 (ohne Glc) | | 11879-020 |
| OptiMEM | | 31985-062 |

| Bezeichnung | Inhaltsstoff | Endkonzentration |
|---|---|-----------------------|
| LB-Medium, pH 7,0 (Luria Broth; für Transfektion) | Bacto peptone Bacto yeast extract NaCl in Aqua dest. | 10 g 5 g 10 g |
| LB-Medium, pH 7,0 mit Ampicillin | LB-Medium Ampicillin | 50 µg/ml |
| LLC-PK1-Medium (mit Glucose 2 g/l) | RPMI Medium 1640 (mit Glc) FCS (hitzeinaktiviert) Penicillin / Streptomycin Na-Hexanoat | 10 % 0,5 % 5 mM |
| LLC-PK1-Medium (ohne Glucose) | RPMI Medium 1640 (ohne Glc) FCS (hitzeinaktiviert) Penicillin / Streptomycin Na-Hexanoat | 10 % 0,5 % 5 mM |

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Kultivierung stabil transfizierter induzierbarer Zelllinien

Als Zellmodell für den proximalen Tubulus wurde eine stabil transfizierte Zell-Linie, welche von proximalen Tubuluszellen des Schweins abstammt, verwendet. Diese LLC-PK1 Zellen haben einige ihrer ursprünglichen Eigenschaften erhalten, wie beispielsweise die Transportfähigkeit und die Expression spezifischer Marker für den proximalen Tubulus²⁻⁴. In London wurden die Zellen von Enriko Klootwijk mit Hilfe des Tet-on-Systems stabil transfiziert und exprimieren das entsprechende Zielgen erst bei Gabe von Tetrazyklin (1 µg/ml Medium). Tetrazyklin bindet einen Repressor und inhibiert so die Blockade des Promotors durch diesen Repressor. Dadurch wird die Expression des nachgeschalteten Gens ermöglicht.

Um Effekte von Tetrazyklin auf die Zellen auszuschließen, wurden LLC-PK1_{VEK} Zellen untersucht, die kein Zielgen in das Tet-on System integriert hatten. Es sind sowohl mitotoxische Effekte von Tetrazyklin bekannt⁸²⁻⁸⁴, als auch inhibitorische Effekte auf zelluläre Prozesse^{85,86}.

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

Es wurden die in Tabelle 2 aufgelisteten Zellen verwendet.

| Name | Exprimiertes Gen |
|-------------------------|---|
| LLC-PK1 _{WT} | hFAP2 Wildtyp |
| LLC-PK1 _{VEK} | leerer Vektor ohne nachgeschaltetes Gen |
| LLC-PK1 _{MUT1} | hFAP2 c1006A→G |
| LLC-PK1 _{MUT2} | hFAP2 c1022C→T |
| LLC-PK1 _{MUT3} | hFAP2 c1007C→T |
| LLC-PK1 _{MUT4} | hFAP2 c958C→T |

Tabelle 2: Verwendete LLC-PK1 FAP2 Zellen

3.2.1.2 Transiente Transfektion mit Lipofectamine 3000

Um unbehandelte LLC-PK1 Zellen mit einem spezifischen Plasmid transient zu transfizieren, wurde das Lipofectamine 3000 System benutzt. In das Ausgangsplasmid pIRES-CD8 wurden zunächst über site-directed mutagenesis erstellte, unterschiedlich mutierte *FAP2* Gene oder aus stabil-transfizierten Zellen ausgeschnittene unterschiedlich

mutierte *FAP2* Gene ligiert und bei -20°C gelagert. LLC-PK1 Zellen wurden auf Glasplättchen ausgesät und am folgenden Tag mit dem Lipofectamine 3000 Reagenz transfiziert. Für die Transfektion wurde OptiMEM einmal mit Lipofectamine 3000 und einmal mit $2\ \mu\text{g}$ des jeweiligen Plasmids und P3000 Reagenz nach Angaben des Herstellers gemischt, nach kurzer Inkubationszeit homogenisiert und anschließend auf die Zellen pipettiert. Das P3000 Reagenz gewährleistet einen effizienten Transport des Plasmids zum Zellkern. Am Folgetag wurde das Medium gewechselt. Die Zellen wurden nach 1 bis maximal 4 Tagen nach der Transfektion gefärbt.

3.2.1.3 Immunfluoreszenz-Färbungen auf Zellen

Um antigene Komponenten in Zellen und Gewebeschnitten anzufärben, wurden Antikörper (AK) benutzt, die mit Fluoreszenzfarbstoffen, Enzymen, Isotopen oder Goldpartikeln gekoppelt sind. Bei einer indirekten Immunfluoreszenz-Färbung bindet zuerst der primäre, unkonjugierte Antikörper (Primär-AK) an sein spezifisches Antigen in den Zellen oder im Gewebe. Die Detektierbarkeit des Antigen-Antikörper-Komplexes wird mittels eines zweiten Antikörpers (Sekundär-AK) erreicht, der gegen den F_c -Teil des Primär-AK gerichtet ist. Wird das Fluorophor, das an den Sekundär-AK gekoppelt ist, mit entsprechender Wellenlänge angeregt, kann der Komplex detektiert werden.

Um die Expression bestimmter Zielgene im Zellmodell zu charakterisieren, wurden die Zellen auf Glasplättchen ausgesät und mit $1\ \mu\text{g/ml}$ Tetrazyklin im Medium induziert. Nach mindestens 24 Stunden wurden die Zellen zunächst mit Mitotracker (1:5000) für 30 Minuten, 37°C bei $5\% \text{CO}_2$ inkubiert. Der Mitotracker ist ein Marker für Mitochondrien, der in lebenden Zellen durch das mitochondriale Potential deren Membran passieren kann und somit Mitochondrien anfärbt. Die Zellen wurden anschließend mit Ringerlösung gewaschen und für 15 Minuten mit 3% Paraformaldehyd in PBS fixiert. Nach jedem der folgenden Schritte wurden die Zellen jeweils mit PBS gewaschen. Zur Demaskierung der Epitope wurde für 5 Minuten in $0,1\%$ SDS in PBS inkubiert. Der primäre und sekundäre Antikörper wurden jeweils in $0,04\%$ Triton X-100 in PBS verdünnt. Die Inkubation des primären Antikörpers erfolgte für 1 Stunde. Zusätzlich zum sekundären Antikörper wurden auch immer der Zellkern-Marker HOE33342 (Endkonzentration $5 \times 10^{-7}\ \text{mol/l}$) für 1 Stunde im Dunklen mitgefärbt. Nach einem letzten Waschschrift mit PBS wurden die Glasplättchen mit fluoreszenzfreiem DAKO-Mounting Medium auf Polysin Objektträger eingedeckelt.

Eine Liste aller benutzten primären und sekundären Antikörper, sowie anderer benutzter Farbstoffe ist unter 3.1.8 aufgeführt.

3.2.1.4 Untersuchungen der Abbaubarkeit des FAP2-Proteins

Um zu untersuchen, ob die LLC-PK1 Zellen in der Lage sind, exprimiertes FAP2 wieder abzubauen, wurden LLC-PK1_{WT} Zellen auf Glasplättchen ausgesät und zwei Wochen lang mit Tetrazyklin (1 µg/ml) im Medium induziert. Nach zwei Wochen wurde das Tetrazyklin abgesetzt und eine Schale auf FAP2 gefärbt. Die Zellen wurden anschließend für weitere 8 Wochen ohne Tetrazyklin kultiviert und jede Woche eine Schale gefärbt um den Abbau des FAP2_{WT} zu verfolgen.

3.2.1.5 Messung der IL-18-Expression bei induzierten LLC-PK1 FAP2 Zellen

Um die Menge an gebildetem IL-18 zu bestimmen, wurden induzierbare LLC-PK1_{WT} Zellen und LLC-PK1_{MUT1} in großen Flaschen kultiviert und mit jeweils 1 µg/ml Tetrazyklin für 3 Wochen induziert. Nach 3 Wochen wurde ein letztes Mal frisches Medium Tetrazyklin auf die Zellen gegeben und für 7 Tage täglich ein Aliquot jeder Flasche entnommen und sofort auf -80°C eingefroren. Alle zwei Tage wurde neues Tetrazyklin zugegeben, da es bei 37°C nur begrenzt stabil ist. Nachdem das letzte Aliquot des Mediums abgenommen wurde, wurden die Zellen in PBS abgeschabt, abzentrifugiert und das Zellpellet bei -80°C eingefroren.

In einem zweiten Versuch wurde dieses Experiment wiederholt. Dieses Mal wurden die Zellen für 2 Wochen mit 1 µg/ml Tetrazyklin im Medium induziert. Danach wurde das Medium zum letzten Mal gewechselt und die Zellen ohne Tetrazyklin weiter kultiviert. Während der folgenden 5 Tage wurde täglich ein Aliquot jeder Flasche entnommen und sofort auf -80°C eingefroren. Nach der letzten Proben-Entnahme wurden die Zellen in PBS abgeschabt, abzentrifugiert und das Zellpellet bei -80°C eingefroren.

Ein IL-18 ELISA-Kit spezifisch für Schwein wurde nach Angaben des Herstellers benutzt um die Menge an IL-18, sowohl in den entnommenen Medium-Proben, als auch in den Zelllysaten zu messen.

3.2.1.6 Seahorse-Messungen

Zur Messung der zellulären Respiration wurde das Gerät „Seahorse XFp“ von Agilent verwendet. LLC-PK1_{WT} und LLC-PK1_{MUT1} Zellen wurden vor der Messung 3 Wochen lang oder 1 Woche lang mit Tetrazyklin induziert. Am Tag vor der Messung wurden die Zellen abgelöst, gezählt und jeweils 30000 Zellen pro Well in die Seahorse-Zellkultur-Platten ausgesät und über Nacht weiter induziert. Pro Platte wurden zusätzlich zwei Kammern ohne Zellen nur mit dem verwendeten Zellkulturmedium inkubiert, um in der Messung Leerwerte zu generieren. Zusätzlich wurde auch die Sensor-Platte nach Angaben des Herstellers mit Kalibriermedium bei 37°C ohne CO₂ über Nacht, mindestens jedoch 12 Stunden, inkubiert. Für die Messungen wurde das „XFp Cell Mito Stress Test Kit“ von

Seahorse nach Herstellerangaben verwendet. Als Zugabe-Substanzen wurden im Kit Oligomycin (Stock 100 μM), zweimal FCCP (Stock 100 μM) und Rotenon und Antimycin A (Stock 50 μM) bereitgestellt und in Assay-Medium (DMEM ohne NaHCO_3 , 10 mM Glukose, 1 mM Na-Pyruvat, 2 mM L-Glutamat, pH 7,4) so verdünnt, dass nach der jeweiligen Zugabe zur Kammer folgende Endkonzentrationen vorlagen: Oligomycin 5,0 μM , FCCP Zugabe 1 2,0 μM , FCCP Zugabe 2 1,0 μM (insgesamt 3,0 μM) und Rotenone mit Antimycin A 2,5 μM .

Oligomycin hemmt Komplex V der Atmungskette und sorgt für eine Abnahme des Sauerstoffverbrauches der Zellen. FCCP bildet Löcher in der inneren Mitochondrienmembran, die ein Zurückströmen der Protonen aus dem Intermembranraum ins Zytosol ohne die Benutzung von Komplex V ermöglichen. So können die Zellen die maximale Kapazität der Atmungskette aktivieren. Mittels Rotenon und Antimycin A werden Komplex I und Komplex III der Atmungskette gehemmt. Ein weiteres Durchlaufen der Atmungskette ist somit nicht mehr möglich. Der noch messbare Sauerstoff-Verbrauch der Zellen nach dieser Zugabe ist auf nicht mitochondriale Respiration zurückzuführen (Abb. 9).

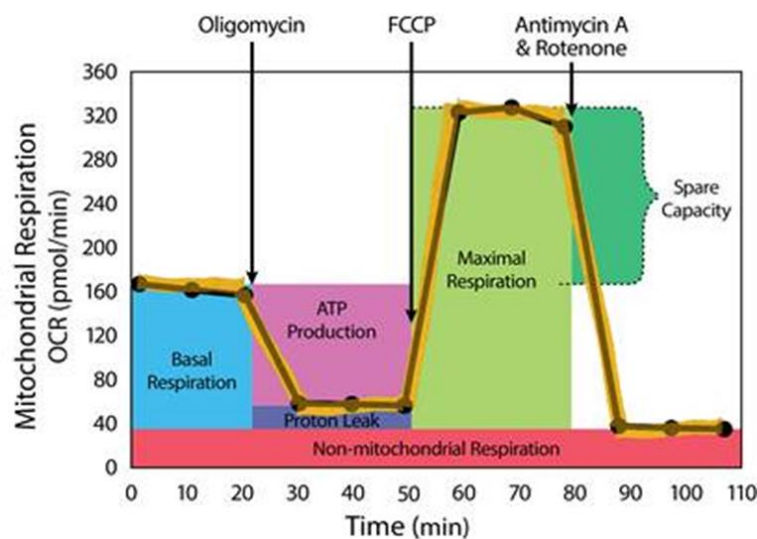


Abbildung 9: Messung des Sauerstoffverbrauches von Zellen mit "Cell mito stress kit"

Die Abbildung zeigt den Sauerstoffverbrauch (Oxygen consumption rate, „OCR“) von Zellen, die mit dem „Cell mito stress kit“ von Seahorse im gleichnamigen Gerät gemessen wurden. Durch Oligomycin wird Komplex V der Atmungskette gehemmt, der einzige mögliche Sauerstoffverbrauch resultiert nun aus Protonen, die über ein „Protonen-Leck“ vom Intermembranraum zurück ins Zytosol gelangen können. FCCP generiert „Löcher“ in die innere Mitochondrienmembran. Diese Löcher ermöglichen es Protonen ohne Komplex V vom Intermembranraum zurück ins Zytosol zu gelangen. Mit der letzten Zugabe eines Rotenon und Antimycin A-Mixes werden Komplex I und Komplex III gehemmt und die mitochondriale Atmung kommt zum Erliegen. Der nun noch messbare Sauerstoffverbrauch ist auf nicht-mitochondriale Respiration zurückzuführen. Abbildung aus Anleitung des „Cell mito stress kit“ von Seahorse.

Die Zellen wurden vor dem Start der Messung zweimal mit Assay-Medium gewaschen und für eine Stunde bei 37°C ohne CO₂ inkubiert. In der Sensor-Platte wurden die Kanäle für die Zugaben nach Herstellerangaben mit Oligomycin, FCCP oder dem Rotenon/Antimycin A-Mix befüllt und die Platte zur Kalibrierung der Sensoren in das Seahorse XFp Gerät gestellt. Es wurde ein vorab eingegebenes Programm gestartet (siehe Tab. 3). Nach der Kalibration wurde die Platte mit den Zellen in das Gerät gestellt und die automatische Messung weitergeführt.

| | | | |
|---------------------------|--|---------------------------------------|----------|
| Basale Respiration | | 3 Minuten mischen 3 Minuten messen | 5 Zyklen |
|---------------------------|--|---------------------------------------|----------|

| Zugabe | Endkonzentration pro Well | Zeit | |
|-------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|----------|
| Oligomycin | 5,0 µM | 3 Minuten mischen 3 Minuten messen | 5 Zyklen |
| FCCP Zugabe 1 | 2,0 µM | 3 Minuten mischen 3 Minuten messen | 5 Zyklen |
| FCCP Zugabe 2 | 1,0 µM | 3 Minuten mischen 3 Minuten messen | 5 Zyklen |
| Rotenone + Antimycin A | 2,5 µM | 3 Minuten mischen 3 Minuten messen | 5 Zyklen |

Tabelle 3: Seahorse-Protokoll

Das automatisch im Seahorse durchlaufene Programm beinhaltet jeweils fünf Messzyklen für die basale Respiration der Zellen ohne Zugaben, die Respiration nach Zugabe von Oligomycin (Hemmung von Komplex V), nach zwei Zugaben von FCCP (Entkopplung) und nach der Zugabe von Rotenone und Antimycin A (Hemmung von Komplex I und Komplex III).

Nach der Messung wurden die Zellen auf -80°C eingefroren. Für die Standardisierung sollte der DNA-Gehalt der Zellen gemessen werden, da die Bestimmung der Zellzahl bei LLC-PK1 Zellen nicht ausreichend genau ist, da die Zellen nach dem Ablösen vom Schalenboden in Clustern vorlagen und nicht als Einzelzellen. Zur Quantifizierung der DNA-Menge wurde das CyQUANT® Cell Proliferation Assay Kit von ThermoFisher nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Messung in diesem Gerät ermöglicht einen ersten Eindruck der zellulären Respiration der Zellen. Für genauere Messungen hat sich das Gerät als nicht optimal erwiesen.

3.2.2 Histologische Methoden

3.2.2.1 Gewebefixierung durch Perfusion mit 3% Paraformaldehyd

Durch die Fixierung von Geweben für histologische Untersuchungen sollen autokatalytische Vorgänge verhindert und die Zellstruktur in einem möglichst natürlichen Zustand erhalten werden. Zusätzlich wird dadurch eine Härtung des Probenmaterials und damit eine bessere Schneidbarkeit bewirkt. Die Stabilisierung der Strukturen wird durch die Fixierung mit Paraformaldehyd erreicht, da es zur Ausbildung von Querverbindungen zwischen den Eiweißmolekülen führt.

Mit Isofluran anästhesierte Mäuse (2,5% Isofluran in einem Gasgemisch aus 50% Sauerstoff und 50% Stickstoff mit einem Fluss von 60 ml/min) wurden getötet, indem ihr Blut durch eine 0,9%ige NaCl-Lösung mit 10 I.U./ml Heparin durch einen Katheter in der Bauchorta ersetzt wurde. Dazu wurde nach Öffnen des Abdomens die Aorta abdominalis freigelegt und unterhalb der Abgänge der Aa. renales abgeklemmt. Der Perfusionskatheter wurde distal zu dieser Klemme in das Gefäß eingeführt und mit einer weiteren Klemme fixiert. Damit die Perfusionslösungen abfließen können, wurde die Vena cava inferior durch einen Schnitt geöffnet. Für die Perfusion wurden nach der Entfernung der proximalen Klemme zunächst 10 ml Vorfixierlösung (0,9%ige NaCl-Lösung mit 10 I.U./ml Heparin) infundiert, das Blut somit entfernt und die Maus getötet, während das Heparin eine eventuelle Blutgerinnung verhindert. Anschließend wurde die Maus über eine retrograde Perfusion mit frischer Fixierlösung (mit 3% Paraformaldehyd) mit einem konstanten Fluss von 15 ml/min fixiert. Die Nieren wurden entnommen und entsprechend der folgenden Experimente als Kryopräparate oder Paraffinpräparate weiter behandelt.

3.2.2.2 Vorbereitung von Kryopräparaten

Die durch die Perfusion fixierten Nieren wurden über Nacht, mindestens jedoch 3 Stunden, bei 4°C in einer Nachfixierlösung (mit 1% Paraformaldehyd) inkubiert. Danach wurden sie in 2-Methylbutan (-35°C) eingefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Zum Schneiden wurden die Nieren mit OCT-Medium auf dem Objekthalter des Kryostats eingebettet. Kryoschnitte der eingefrorenen Nieren (5 µm Dicke) wurden auf Polysine Objektträger aufgezogen und bei -20°C gelagert.

3.2.2.3 Immunfluoreszenz auf Kryoschnitten

Für Immunfluoreszenz-Färbungen wurden die Schnitte zunächst in PBS gewaschen (5 Minuten), um das Einbettmedium zu entfernen. Anschließend wurden die Schnitte in 0,1% SDS 5 Minuten inkubiert um die Epitope zu demaskieren, zweimal für jeweils 5 Minuten

mit PBS gewaschen und anschließend für 10 Minuten mit 5% bovinem Albumin (BSA) inkubiert um unspezifische Bindestellen mit BSA zu blockieren. Primäre und sekundäre Antikörper wurden in 0,04%igem Triton X-100 in PBS mit 0,5% BSA, pH 7,4, verdünnt. Das Triton X-100 sorgt für eine Permeabilisierung der Zellen. Die Schnitte wurden mit den primären Antikörper jeweils über Nacht bei 4°C inkubiert. Die sekundären Antikörper, sowie auch der Kernmarker HOE33342 wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunklen auf die Schnitte gegeben. Vor dem Eindeckeln mit fluoreszenzfreiem Dako Mounting Medium wurden die Schnitte zweimal für jeweils 5 Minuten mit PBS gewaschen.

3.2.2.4 Einbettung in Paraffin

Entnommene perfundierte Organe in Gewebe-Einbettkassetten wurden bis zur Einbettung in Paraffin in 70% Methanol bei 4°C aufbewahrt. Die Inkubation in 70% Methanol erfolgte mindestens über Nacht, konnte aber auch bis zu mehreren Wochen dauern. Zur Vorbereitung auf die Einbettung in Paraffin wurden die Gewebe dehydriert. Dies geschah durch eine Methanolreihe steigender Konzentration (80%, 90%, 100%; jeweils 30 min) bei 4°C. Zuletzt wurde für 30 min in 99% Isopropanol bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Präparate für 60 min in ein auf 70°C erwärmtes Isopropanol/Paraffin-Gemisch (1:1) überführt und anschließend über Nacht in 70°C warmem Paraffin inkubiert, wobei nach 24 h die Lösung gewechselt wurde, um Isopropanol Reste vollständig zu entfernen. Nachdem das Präparat völlig mit flüssigem Paraffin durchtränkt war, wurde es schließlich in die Einbettkassetten in 60°C warmes, geschmolzenes Paraffin eingebettet. Die Abkühlung und Härtung erfolgte über Nacht bei 4°C.

3.2.2.5 Anfertigung von Paraffinschnitten

Mit einem Rotationsmikrotom von Leica wurden 4 – 5 µm dicke Schnitte angefertigt, die in einem 42°C warmen Wasserbad gestreckt wurden. Nach dem Aufziehen auf Polysin-Objektträger wurden die Schnitte im Wärmeschrank bei 38°C mindestens 12 h getrocknet.

3.2.2.6 Immunfluoreszenz auf Paraffinschnitte

Bereits in Paraffin eingebettete Nieren wurden als Kontrollgewebe zur Verfügung gestellt. Die Proben von zwei FAP2-Patienten wurden, ebenfalls in Paraffin eingebettet, von Prof. Kleta zur Verfügung gestellt. Um das Paraffin von den Gewebeproben zu entfernen, wurden die Schnitte zweimal für jeweils 15 Minuten in Xylol gegeben und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe für jeweils 15 Minuten rehydriert (99% Isopropanol, 95% EtOH, 80% EtOH, 70% EtOH). Nach jedem der nachfolgenden Schritte wurden die Schnitte jeweils für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Zum Demaskieren der Epitope wurden die Proben für 15 Minuten bei 95°C in Citratpuffer, pH 6,0, gekocht. Unspezifische

Bindestellen wurden mit Hilfe einer Inkubation von 10 Minuten in einer Lösung mit 5% BSA besetzt. Die primären und sekundären Antikörper wurden in einer 0,5%igen BSA-Lösung verdünnt. Die Inkubation der primären Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer, die sekundären Antikörper zusammen mit HOE33342 als Kernmarker für 1 Stunde bei Raumtemperatur im Dunklen. Zum Eindeckeln wurde fluoreszenzfreies Dako Mounting Medium verwendet.

3.2.2.7 Hämalaun-Eosin (HE) Färbung auf Paraffinschnitten

Zur histologischen Beurteilung der humanen Proben wurde eine Hämalaun-Eosin Färbung der Paraffin-Schnitte durchgeführt. Die Zellkerne werden hierbei durch das basische Hämalaun in Blau angefärbt und das Zytoplasma durch das saure Eosin in Rot. Zunächst wurden die Schnitte durch zweimaliges Inkubieren in Xylol (jeweils 10 Minuten) entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (99% Isopropanol, 95% EtOH, 80% EtOH, 70% EtOH). Nach einem Waschschrift in PBS für 5 Minuten, wurden die Schnitte 3 Minuten mit Mayer`s Hämalaun inkubiert, kurz in 1% Eisessig in Aqua dest. getaucht und anschließend unter fließendem Leitungswasser für 2 Minuten gebläut. Für die Färbung mit Eosin wurden die Schnitte für 2 Minuten mit Eosin inkubiert, bevor sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70% EtOH, 80% EtOH, 95% EtOH, 99% Isopropanol) und Xylol entwässert und mit Xylol-haltigem DEPEX-Medium eingedeckelt wurden.

3.2.2.8 Masson-Goldner Färbung auf Paraffinschnitten

Zum Anfärben von Bindegewebe wurde eine Trichrom-Färbung, oder auch Masson-Goldner Färbung genannt, benutzt. Dabei erscheint das Bindegewebe am Ende Türkis, die Zellkerne Braun und das Zytoplasma Rot.

Zunächst wurden die Schnitte mit Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe (siehe 3.2.2.7) entparaffiniert und anschließend 2 Minuten in Weigerts Eisenhämalaun-Lösung inkubiert. Danach wurde unter fließendem Leitungswasser für 2 Minuten gebläut und kurz in 0,1% HCl-Alkohol differenziert. Die Schnitte wurden nochmals für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut, für 15 Sekunden in 0,5% Phosphorwolframsäure differenziert und 3 Mal für jeweils 5 Minuten in Aqua dest. gewaschen, bevor sie in Säurefuchsin-Ponceau für 10 Minuten gefärbt wurden. Im Anschluss folgten 3 Mal 1 Minute Inkubation in 1% Essigsäure, 20 Sekunden Differenzierung in Orange G-Lösung, 2 Minuten spülen in 1% Essigsäure, 4 Minuten Färben in Lichtgrün-Lösung und abschließendem Spülen in 2% Essigsäure für 2 Minuten. Zum Entwässern wurden die Schnitte in 96% Isopropanol (20 Sekunden), 99% Isopropanol (zweimal 5 Minuten) und Xylol (zweimal 10 Minuten) inkubiert und in Xylol-haltigem DEPEX-Medium eingedeckelt.

3.2.2.9 Mikroskopie

Zur Untersuchung der Färbungen wurde ein konfokales Mikroskop (LSM 710, Zeiss) benutzt. Als Objektiv wurde ein 63x/Öl Objektiv verwendet. Das Pinhole wurde auf 1 µM optische Schnittdicke eingestellt. Für die Anregung der Sekundär-Antikörper wurde monochromatisches Laserlicht der Wellenlängen 488 nm (AlexaFluor® 488), 543 nm (AlexaFluor® 546) und 633 nm (AlexaFluor® 647) benutzt. Zur Erstellung von Übersichtsaufnahmen wurde ein inverses Mikroskop (Observer Z1, Zeiss) mit einem 20x Objektiv benutzt.

3.2.3 Molekularbiologische Methoden

3.2.3.1 Isolierung von Total-RNA

Für die Isolierung von RNA, sowohl von induzierten LLC-PK1 Zellen, als auch von murinen Organen, wurde das Nucleo Spin RNA Kit (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers benutzt. Dieses Säulen-basierte Kit ermöglicht die Aufreinigung von RNA auch aus geringen Gewebe- und Zell-Mengen. Für die Isolierung von RNA aus Zellen wurden diese in 6-well Platten kultiviert, einmal mit PBS gewaschen und anschließend in Lyse-Puffer aus dem Nucleo Spin RNA Kit abgeschabt. Für die Isolierung von RNA aus Nieren wurden Mäuse in Isoflurananästhesie getötet, die Nieren entnommen, halbiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden die Organe bei -80°C gelagert.

Die Konzentration der aufgereinigten RNA wurde am Nanodrop bestimmt. Die Qualität der Aufreinigung wurde für spätere Realtime RT-PCR noch mittels Agarose-Gelelektrophorese bestimmt. Die weitere Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

3.2.3.2 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Um einzelsträngige komplementäre DNA (cDNA) aus der isolierten RNA zu erhalten, wurde 1 µg der Gesamt-RNA umgeschrieben. Hierbei wurden zunächst 1 µl Random Primer (100 µM), die an verschiedensten Stellen der RNA binden, bei 70 °C für 5 Minuten an 1 µg RNA angelagert (Gesamtvolumen 15 µl). Anschließend wurde ein Mastermix hinzugefügt, der aus 1,25 µl dNTPs (10 mM), 5 µl spezifischem Reaktionspuffer (M-MLV Reaction Buffer 5x), 1 µl RNase Inhibitor und 2,75 µl RNase freies Wasser bestand. Dieser Ansatz wurde aufgeteilt in einen 5 µl Ansatz ohne die Transkriptase zum Ausschließen einer Kontamination mit genomischer DNA (- RT) und einen 20 µl Ansatz, zu dem noch 1 µl des Enzyms M-MLV Reverse Transkriptase (100 U) pipettiert wurde. Die Synthese der cDNA erfolgte nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur bei 50 °C für 50 Minuten. In einem abschließenden Schritt wurde das

Enzym für 5 Minuten bei 70°C inaktiviert. Die Qualität der reversen Transkription wurde mittels einer quantitativen PCR für beta-Aktin überprüft und die cDNA bei 4°C kurzfristig und langfristig bei -20°C gelagert.

3.2.3.3 Quantitative Real-time-PCR

Zur Untersuchung der Expressionsstärke bestimmter Gene wurde mittels einer quantitativen Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) die entstandene DNA-Menge nach jedem PCR-Zyklus photometrisch vermessen. Dadurch wird es ermöglicht, den exponentiellen Verlauf der Reaktion in Echtzeit (real time) zu verfolgen. Die quantitative Bestimmung des amplifizierten DNA-Produkts erfolgt indirekt über die Messung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR[®] Green, da dieser mit hoher Affinität an doppelsträngige DNA bindet, wobei gebundenes SYBR[®] Green 1000-fach stärker fluoresziert als freies und eine Signalintensität aufweist, die proportional zur entstehenden DNA-Menge ist. Je höher die Gen-Expression in der Probe, desto eher erreicht diese in der Real-time-PCR den gesetzten Threshold-Wert.

Für den Ansatz der quantitativen real-time PCR wurden 1 µl cDNA, spezifische und, wenn möglich, Intron-überspannende Primer (1 µM) (1 µl sense und antisense Primer-Mix), 3 µl SYBR Green H₂O und 5 µl des SYBR Green Mastermix 2x von QIAGEN verwendet. Im Light Cycler LC480 wurde der Lauf mit dem Primer-spezifischen Amplifikationsprogramm gestartet. Für die Auswertung der gemessenen DNA-Mengen pro Gen wurde auf die DNA-Menge eines Housekeeping-Gens (beta-Aktin) normalisiert. Weiterhin wurden auch die PCR-Effizienzen berücksichtigt, die aus Standard-Verdünnungskurven berechnet wurden. Der Standard wurde für jeden Lauf neu aus allen verwendeten Proben gemischt und 1:5, 1:25 und 1:125 mit PCR-Wasser verdünnt. Die Spezifität der PCR-Amplikons wurde mittels Schmelzkurven-Analyse und Agarose-Gelelektrophorese geprüft. Die Sequenzen der benutzten Primer (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) sind unter 3.1.6 aufgeführt.

3.2.3.4 Isolation von Protein

Um Protein aus Zellen zu isolieren, wurden die Zellen in IP-Lysis Buffer mit Proteinase-Inhibitor (1:10) abgeschabt und auf Eis jeweils 10x mit einer 27G und einer 22G Kanüle aufgezogen um die Lösung zu homogenisieren. Anschließend wurden die Proben jeweils 4x für 20 Sekunden im Ultraschallbad und 40 Sekunden auf Eis im Wechsel inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt für 10 Minuten auf 4 °C bei 14000 x g wurde der Überstand abgenommen und bei -80°C eingefroren.

Zur Isolation von Protein aus murinen Organen wurden die nach der Entnahme eingefrorenen Organe gewogen und in flüssigem Stickstoff mit einem Mörser pulverisiert.

Die Elution der Proteine erfolgte über eine Inkubation des Gewebe-Pulvers in Lyse-Puffer mit 200mM PMSF (1/200 v/v) und EDTA-freiem Protease Inhibitor Cocktail Set III (1/100 v/v, Calbiochem, San Diego, CA) für 20 Minuten auf Eis. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand bis zur weiteren Analyse auf -80°C eingefroren.

3.2.3.5 Bestimmung der Protein-Konzentration (Bradford Assay)

Zur Bestimmung der Protein-Konzentration in Zellen und Gewebe wurde ein Bradford Assay benutzt. Für die Quantifizierung wurde eine Verdünnungsreihe mit bekannten BSA-Konzentrationen vorbereitet. Die Proben und die Standard-Verdünnungen wurden mit Bradford-Reagenz verdünnt (1:100) und in Triplikaten in eine 96-well-Platte überführt. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten im Dunklen, wurde die Absorption bei 595 nm im Plattenleser 550 Microplate Reader von Bio-Rad nach Angaben des Herstellers gemessen. Anhand der Gerade der BSA Standard-Proben wurden die Protein-Konzentrationen ermittelt.

3.2.3.6 Western Blot

Für die Bestimmung der Protein-Expression von FAP2 mittels Western Blot wurden gleiche Mengen an Protein pro Probe in Laemmli-Puffer mit 2-Mercaptoethanol (1:20) für 5 Minuten auf 95°C gekocht bevor die Proben auf das 10%ige SDS-Gel aufgetragen wurden. Nach der Gelelektrophorese wurden die Proben vom SDS-Gel auf eine PVDF Blotting Membran transferiert. Die PVDF Membran wurde zuvor für 20 Sekunden in 100% Methanol aktiviert, um sie hydrophil zu machen und ihre Protein-Bindekapazität zu erhöhen. Um unspezifische Bindestellen auf der Membran zu blockieren, wurde mit 5% Fett-freier Milch in PBS-Tween für maximal 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubation mit dem primären polyklonalen rabbit anti-FAP2 in 1,5% BSA PBS-Tween mit 0,02% NaAzid erfolgte über Nacht bei 4°C. Der sekundäre donkey anti-rabbit IgG (HRP gekoppelt) wurde in 1% Milch in PBS-Tween verdünnt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Entwickelt wurden die Blots nach einer Inkubation mit Western Blot Luminol Reagenz nach Angaben des Herstellers im Bildanalysesystem „Fusion Fx7“. Um die Expression von Kontroll-Proteinen im gleichen Blot zu analysieren, wurde die Membran mittels Restore Western Blot Stripping Puffer von bereits gebundenen Antikörpern für 15 Minuten bei Raumtemperatur befreit, mit PBS-Tween gewaschen und mit dem primären Antikörper gegen das Kontroll-Protein beta-Aktin (rabbit anti-mouse beta-Aktin) in 1,5% BSA PBS-Tween mit 0,02% NaAzid über Nacht bei 4°C inkubiert. Der sekundäre donkey anti-mouse IgG (HRP gekoppelt) wurde in 1% Milch in PBS-Tween verdünnt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die anschließende Entwicklung

erfolgte wie bereits oben beschrieben. Für die Quantifizierung von FAP2 und beta-Aktin wurde das Programm „ImageJ“ benutzt.

3.2.3.7 Site-directed mutagenesis

Um gezielt einzelne Basen in einem gewünschten Gen auszutauschen, wurde eine „Site-directed“ Mutagenese durchgeführt. Hierfür wurden zunächst spezifische Primer für die gewünschte Stelle entworfen, die in sense und anti-sense Richtung genau auf der zu verändernden Stelle liegen und die gewünschte Base enthalten, die ausgetauscht werden soll. Das Gen lag bereits im Plasmid pIRES-CD8 vor, über NotI und EcoRI Schnittstellen eingefügt. Über das PCR-Programm 1 (siehe 3.1.7) wurde ein Fragment amplifiziert, das den Basenaustausch über den anti-sense Mutationsprimer am 3` - Ende trägt. Über das PCR-Programm 2 wurde ein weiteres Fragment amplifiziert, das den Basenaustausch über den sense Mutationsprimer am 5` - Ende trägt (Abb. 10). Die Länge beider PCR Ergebnisse wurden über ein Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert und die gewünschten Banden aus dem Gel geschnitten und mit dem QIAquick® Gelextraction Kit von Qiagen nach Herstellerangaben aufgereinigt.

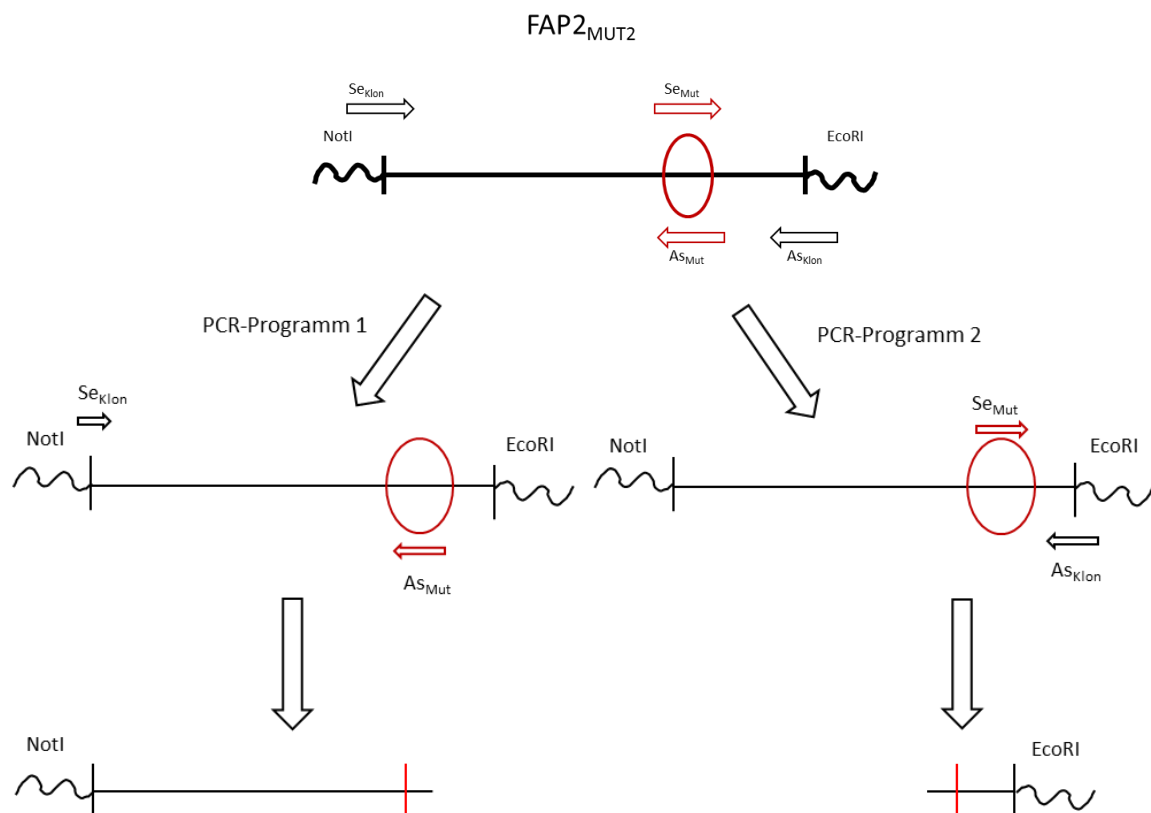


Abbildung 10: Schematische Darstellung der "Site-directed" Mutagenese, PCR 1 und PCR 2
 Als Ausgangsprodukt wurde *FAP2_{MUT2}* in pIRES-CD8 benutzt. Eingefügt wurde das Gen über NotI und EcoRI Schnittstellen. Zur Vereinfachung wird nur das Gen mit den Schnittstellen in obiger Abbildung gezeigt. Über das PCR-Programm 1 wurde ein Fragment amplifiziert, das die NotI Schnittstelle am 5` - Ende und den Basenaustausch am 3` - Ende trägt. Mittels des PCR-Programms 2 wurde ein weiteres Fragment amplifiziert an dessen 5` - Ende der Basenaustausch stattgefunden hat und am 3` - Ende die EcoRI Schnittstelle trägt.

Um das komplette Gen mit dem Basenaustausch zu erhalten, wurde eine dritte PCR durchgeführt. Als Ausgangsmaterial für die Amplifikation wurden dafür die zuvor über PCR-Programm 1 und 2 amplifizierten Fragmente benutzt (Abb. 11). Durch die Benutzung der Klonierungsprimer für diese PCR wurden an den Enden des mutierten Fragments die Schnittstellen für NotI (5'-Ende) und EcoRI (3'-Ende) eingefügt.

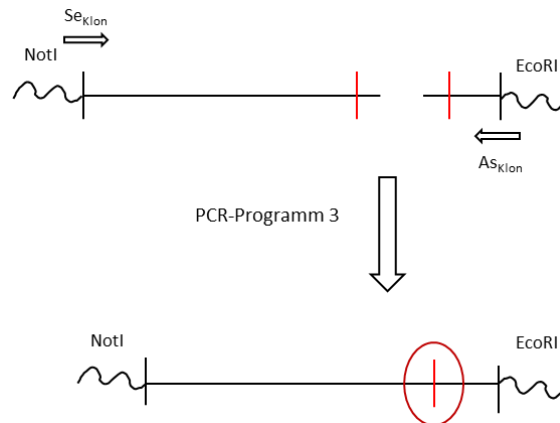


Abbildung 11: Schematische Darstellung der "Site-directed" Mutagenese, PCR 3

Als Ausgangsprodukte für die Amplifikation des gesamten Gens mit der ausgetauschten Base wurden die zuvor amplifizierten Fragmente aus PCR 1 und PCR 2 benutzt. Durch die Benutzung der Klonierungsprimer mit den Schnittstellen für NotI und EcoRI wurden an den Enden des Fragments bereits Schnittstellen für den späteren Verdau und die Ligation in pIRES-CD8 eingefügt.

Vor der Ligation mussten sowohl das mutierte Fragment, als auch der leere pIRES-CD8 mit den Restriktionsenzymen NotI und EcoRI, für 2 Stunden bei 37°C geschnitten werden. Die Länge der verdauten Proben wurden über ein Agarose-Gel kontrolliert, ausgeschnitten und aufgereinigt. Für die Ligation wurde ein Ansatz mit 1 µl Quick Ligase, 1 µl geschnittenem Vektor und 3 µl geschnittenem Fragment und ein Ansatz nur mit geschnittenem Vektor als Kontrolle für den Restriktionsverdau für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das ligierte Plasmid wurde anschließend in kompetente XL1blue *E.coli* Zellen transformiert. Dazu wurden 10 µl des Ligationsproduktes zu 100 µl XL1 blue Zellen pipettiert, für 15 Minuten auf Eis inkubiert, darauf folgte ein Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42°C, bevor die Zellen zu 700 µl LB-Medium gegeben und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert wurden. Anschließend konnten die transformierten Zellen für über-Nacht-Kulturen auf Ampicillin-Platten (50 µg/ml) plattiert und bei 37°C ohne CO₂ inkubiert werden. Am nächsten Tag wurden die Platten auf 4°C gelegt, die Kolonien gezählt und aus dem Verhältnis der Klone zwischen Platten mit Insert und Platte ohne Insert die Anzahl der zu pickenden Kolonien ermittelt. Bis zu 50 Kolonien auf Platten mit Insert lassen auf eine hohe Wahrscheinlichkeit der korrekten Ligation schließen. Die gepickten Klone wurden über Nacht in LB-Medium mit Ampicillin (50 µg/ml) in Flüssigkultur kultiviert. Am nächsten Tag wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe des HiYield®

Plasmid Mini Kits nach Herstellerangaben aufgereinigt und in jeweils 50 µl H₂O eluiert. Ein Kontrollverdau mit NotI und EcoRI wurde durchgeführt um zu testen, ob die Fragmente im Vektor integriert wurden. Für eine genaue Kontrolle wurden die Plasmide zusätzlich zur Sequenzierung eingeschickt.

3.2.4 Mäuse

3.2.4.1 Isolation genomischer DNA

Zur Isolation von genomischer DNA (gDNA) aus Schwanzbiopsien von Mäusen wurden die Biopsien zunächst über Nacht bei 55°C in 300 µl Tail Puffer mit 1 µl Proteinase K (100 mg/ml) zum Aufschließen der Zellen geschüttelt. Am nächsten Tag wurde die DNA nach Zugabe von 100 µl Ammoniumacetat (7,5 M) und 600 µl 100% Isopropanol für 20 Minuten auf -20°C gefällt und die ausgefällte gDNA durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 Minuten pelletiert. Zum Waschen der DNA und zum Entfernen der Salzreste wurde das Pellet anschließend in 1 ml 70% EtOH erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet an der Luft 20 - 30 Minuten getrocknet. Die gDNA konnte im Anschluss daran in 50 µl TE Puffer gelöst werden. Dieser TE-Puffer enthält 10 mM Tris und 1 mM EDTA und ist somit stabilisierend und PCR-kompatibel. Die gelöste gDNA wurde auf 4°C gelagert und für die weitere Verwendung bei Bedarf noch weiter verdünnt.

3.2.4.2 Genotypisierung der FAP2 Knockout Mäuse

Die gDNA der Mäuse wurde vor der Zugabe in den PCR-Ansatz 1:6 in TE Puffer verdünnt und anschließend 0,5 µl zu 19,5 µl des PCR-Mastermixes pipettiert. Der für den Mastermix verwendete RedTaq Ready Mix von Sigma enthält bereits MgCl₂, dNTPs, den Reaktionspuffer und die *Taq*-Polymerase. Zu 10 µl dieses Mixes wurden noch 1 µl DMSO (5%), jeweils 1 µl des sense und des antisense Primers für FAP2 (je 10 µM) und 6,5 µl PCR-H₂O pipettiert. Das PCR-Programm ist unter 3.1.7 „FAP2 Knockout Mäuse“ beschrieben. Das so amplifizierte Produkt von *FAP2* wurde zur Analyse auf ein 2%iges Agarose-Gel aufgetragen, um die Wildtyp-Bande von *FAP2* mit einer Länge von 522 Basenpaaren und die Knockout-Bande mit einer Länge 277 Basenpaaren zu detektieren.

3.2.4.3 Genotypisierung der FAP2 Knockin Mäuse

Vor der Zugabe in den PCR-Ansatz wurde die gDNA der Mäuse 1:6 in TE Puffer verdünnt und anschließend 1 µl zu 19 µl des PCR-Mastermixes pipettiert. Der Mastermix wurde aus 10 µl des RedTaq Ready Mix von Sigma, 1 µl DMSO (5%), jeweils 1 µl des sense und des antisense Primers für FAP2_{MUT2} (je 10 µM) pipettiert und auf 20 µl mit PCR-H₂O aufgefüllt. Das PCR-Programm ist unter 3.1.7 „FAP2 Knockin Mäuse“ beschrieben. Das so amplifizierte Produkt mit einer Länge von 462 bp wurde zur weiteren Analyse mit dem

Restriktionsenzym HpaI verdaut, da durch die Mutation zusätzlich noch eine Restriktionsschnittstelle für HpaI in die DNA eingefügt wurde. Dazu wurden 0,5 µl des Enzyms zu 15 µl PCR-Ansatz pipettiert und für 120 Minuten bei 37°C inkubiert. Bei heterozygoten FAP2^{+/-} Knockin Mäusen sollte eine WT-Bande bei 462 bp und die geschnittenen Knockin-Banden bei 353 bp + 109 bp vorliegen. Bei homozygoten FAP2^{-/-} Knockin Tieren nur die geschnittenen Banden. Zur Analyse wurden die verdauten PCR-Produkte auf ein 2%iges Agarose-Gel aufgetragen. Da der Verdau nicht regelmäßig vollständig abläuft, wurden Proben, bei denen geschnittene Banden zu erkennen waren, noch sequenziert. Dafür wurden jeweils 50 µl des PCR-Ansatzes mit Hilfe des QIAquick PCR purification Kit von QIAGEN nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und in jeweils 15 µl RNase-freiem H₂O eluiert. Die Ansätze für die Sequenzierung bei SeqLab enthielten jeweils 6 µl des aufgereinigten PCR-Produkts, 7 µl RNase-freies H₂O und 2 µl des antisense oder sense Primers. Über die Analyse der entstehenden Chromatogramme können anschließend die DNA-Sequenzen der Proben an den durch die Primer spezifizierten Stellen ermittelt werden.

3.2.4.5 Kreatin-Supplementation

Für den Fütterungsversuch wurden männliche Wildtyp C57Bl/6 Mäuse (n=8, Alter 10 Wochen, von Jackson Laboratories) zufällig einer Kontrollgruppe oder einer Versuchsgruppe zugeordnet. Beide Gruppen erhielten Brot als Kreatin-arme Diät, als Trinkwasser Leitungswasser und die Versuchsgruppe zusätzlich eine Supplementation mit 1% (w/v) Kreatin im Trinkwasser. Eine Woche lang wurde das Trinkwasser täglich gewogen und gewechselt und das Gewicht der Mäuse notiert. Nach 7 Tagen wurden die Mäuse in Isofluran-Narkose durch zervikale Dislokation getötet, die Nieren zügig entnommen, in Hälften geschnitten, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

Zur Quantifizierung der Expression von FAP2 wurden die Nieren mit quantitativer Real-time-PCR und Western Blot wie unter 3.2.3.6 beschrieben analysiert.

3.2.4.6 Arginin-Supplementation

Für den Fütterungsversuch wurden männliche Wildtyp C57Bl/6 Mäuse (n=8, Alter 10 Wochen, von Jackson Laboratories) zufällig zur Kontrollgruppe oder zur Versuchsgruppe eingeteilt. Beide Gruppen erhielten Standardfutter und Leitungswasser mit 5% Saccharose und die Versuchsgruppe zusätzlich eine Supplementation mit 1% (w/v) Arginin im Trinkwasser. Zwei Wochen lang wurde das Trinkwasser alle 2 Tage gewogen und gewechselt und das Gewicht der Mäuse notiert. Nach 14 Tagen wurden die Mäuse in Isofluran-Narkose durch zervikale Dislokation getötet, die Nieren zügig entnommen, in

Hälften geschnitten und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

Zur Quantifizierung der Expression von FAP2 wurden die Nieren mit quantitativer Real-time-PCR und Western Blot wie unter 3.2.3.6 beschrieben analysiert.

3.2.5 Urin-Analyse

Spontanurin von 9 – 12 Wochen alten FAP2^{+/+} Knockout (n = 6) und FAP2^{-/-} Knockout (n = 6) Mäusen wurde zweimal pro Maus an zwei verschiedenen Tage gesammelt. Nachdem die letzten Proben entnommen wurden, wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und Blut entnommen. Auch von FAP2^{+/+} Knockin (n = 8) und FAP2^{-/-} Knockin Mäusen (n = 8) wurde Spontanurin gesammelt. Gemessen wurden im Urin folgende Aminosäuren: L-Alanin, Glycin, L-Valin, L-Leucin, L-Isoleucin, L-Prolin, L-Asparagin, L-Asparaginsäure, L-Methionin, L-Glutaminsäure, L-Phenylalanin, L-Ornithin, L-Lysin, L-Histidin, L-Tyrosin, L-Threonin, L-Glutamin und L-Tryptophan.

Die Messungen wurden vom Institut für Funktionelle Genomik im Biopark Regensburg nach dem Verfahren der Gaschromatographie mit anschließender Massenspektrometrie (GC-MS) durchgeführt. Hierbei trennt der Gas-Chromatograph das zu untersuchende Stoffgemisch auf und das Massenspektrometer dient zur Identifizierung und gegebenenfalls auch zur Quantifizierung der einzelnen Komponenten. Nach Derivatisierung der Aminosäuren erfolgte die Messung nach einem modifizierten Protokoll des Faast kit von Phenomenex (Phenomenex Inc, Torrance, CA, USA). Die Konzentrationen wurden anhand des internen Standards Norvalin ermittelt. Zur Normalisierung wurde die Osmolalität der Urin-Proben gemessen. Dafür wurde der OSMOMAT 030 benutzt. Hierbei wurde der Urin 1:10 in Wasser verdünnt und nach Herstellerangaben im Gerät vermessen. Kreatinin zur Normalisierung ist bei FAP2 Knockout und FAP2 Knockin Mäusen ungeeignet, da FAP2 in der Kreatin-Synthese involviert ist und die Kreatinin-Werte durch den Knockout bzw. die Mutation von *FAP2* verändert werden.

3.2.5 Primärkultur von Nierenzellen

3 Wochen alte C57/BL6 N Mäuse wurden mit Isofluran anästhesiert und durch cervikale Dislokation getötet. Die Nieren wurden entnommen und mit einem sterilen Skalpell in kleine Stücke geschnitten. Darauf folgte eine Inkubation von 30 - 40 min in 1 ml Verdau-Lösung II (enthält 0,5 mg/ml Collagenase) bei 37°C. Die Lösung wurde regelmäßig auf- und abpipettiert und im Mikroskop auf den Grad des Verdaus kontrolliert. Sobald die Niere optisch weitgehend in kurze, vereinzelte Tubulusfragmente zerfallen war, wurde die Suspension abzentrifugiert (500 rpm, 5 Minuten), der Überstand abgenommen und die

Zellen in LLC-PK1 Medium mit Glucose resuspendiert. Um noch eventuelle Reste der Collagenase zu entfernen, wurde nochmals abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und in LLC-PK1 Medium mit Glucose resuspendiert und auf kleinen Schalen ausgesät. Die angewachsenen Zellen wurden mittels Lipofectamine 3000 transient transfiziert und anschließend gefärbt.

3.2.6 Statistik

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwerte inklusive Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Um die Signifikanz zu bestimmen, wurde der Student's unpaired t-Test verwendet. Die Anzahl der Experimente, die für eine Messserie durchgeführt wurden, wird durch die Zahlen in den Legenden der Abbildungen dargestellt (n). Ausgehend von diesen wurde der Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) errechnet. Als signifikant wurden p -Werte $< 0,05$ gewertet und entsprechende signifikante Ergebnisse mit einem Stern (*) markiert, die entsprechenden Werte bei Signifikanz finden sich ebenfalls in den Legenden der Abbildungen (p). Bei multipler Testung wurde die Korrektur nach Bonferroni angewandt, um eine Alphafehler-Kumulierung zu vermeiden.

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchungen am Zellmodell von FAP2

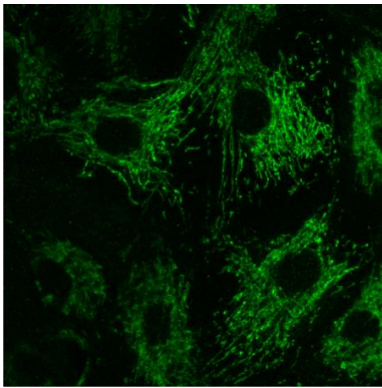
4.1.1 FAP2-Expression in induzierbaren LLC-PK1 Zellen

Für die vorliegende Arbeit wurde neben den bereits beschriebenen LLC-PK1_{WT} und LLC-PK1_{MUT1} Zellen noch drei weitere Mutationen in LLC-PK1 Zellen eingebracht und untersucht: LLC-PK1_{MUT2}, LLC-PK1_{MUT3} und LLC-PK1_{MUT4} (siehe Tab. 2).

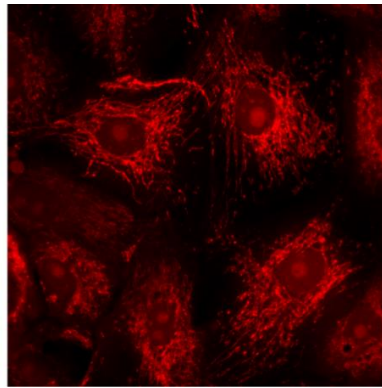
Um die genaue zelluläre Lokalisation zu untersuchen, wurde FAP2 mit dem Mitochondrienmarker Mitotracker ko-gefärbt. Während Zellen mit FAP2_{WT} eine normale Mitochondrienmorphologie und -verteilung aufwiesen (Abb. 12 A), zeigten Zellen mit allen mutierten FAP2-Formen verlängerte, filamentartige Mitochondrien (Abb. 12 B bis E). Die unterschiedlichen Mutationen wiesen dabei leicht unterschiedliche Mitochondrien-Morphologien auf. Bei LLC-PK1_{MUT1} waren die Veränderungen der Morphologie bereits nach zwei Tagen Induktion mit Tetrazyklin sehr gut in praktisch allen Zellen zu erkennen. Die veränderten Mitochondrien wurden mit längerer Induktionsdauer dicker und durchzogen die ganze Zelle (Abb. 12 B). In LLC-PK1_{MUT2} Zellen zeigten sich nach zwei Tagen Induktion bereits in fast allen Zellen erste kurze Mitochondrien, die im Gegensatz zu Mitochondrien in LLC-PK1_{MUT1} keine glatte Oberfläche zu haben schienen (Abb. 12 C). Neben den veränderten Mitochondrien waren noch viele normale Mitochondrien zu erkennen. LLC-PK1_{MUT3} und LLC-PK1_{MUT4} benötigten die längste Induktionsdauer. Nach zwei Tagen Induktion waren bei LLC-PK1_{MUT3} nur in einzelnen Zellen lange und dünne Mitochondrien zu erkennen (Abb. 12 D), bei LLC-PK1_{MUT4} waren erst nach sieben Tagen kurze veränderte Mitochondrien detektierbar (Abb. 12 E).

A: LLC-PK1_{WT} nach 2 Tagen Induktion

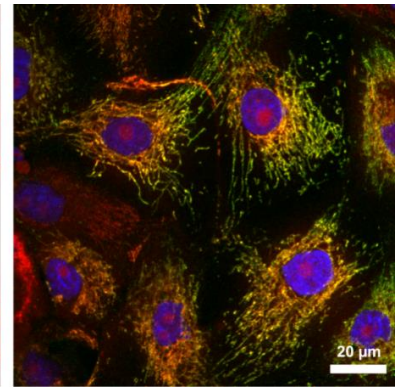
FAP2



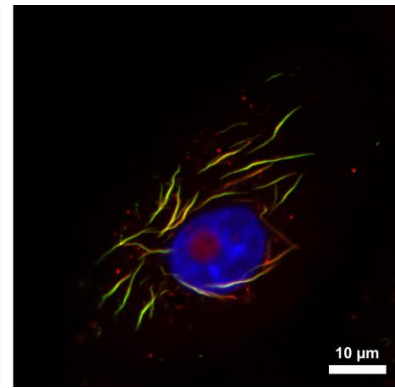
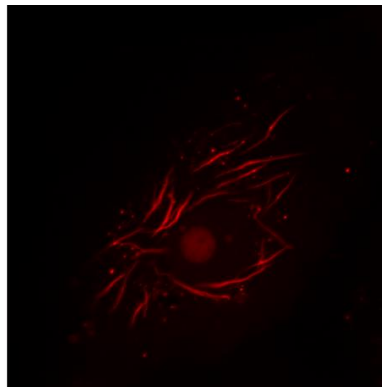
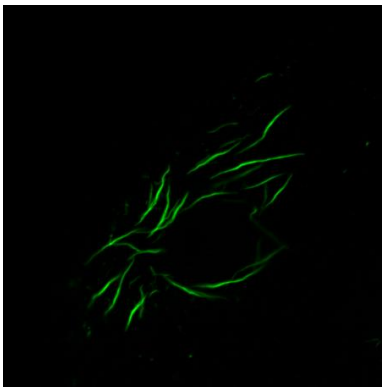
Mitotracker



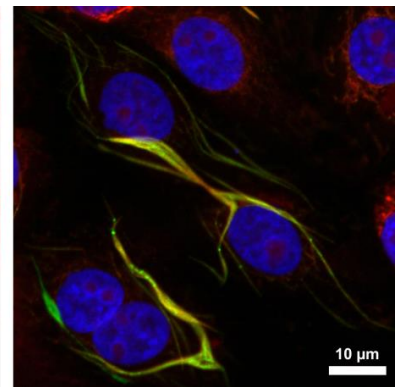
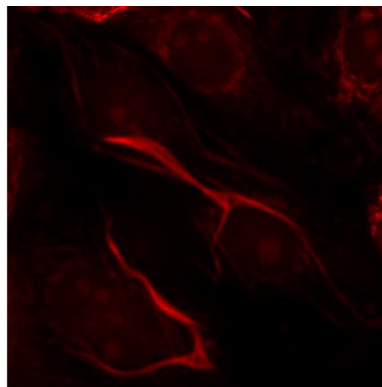
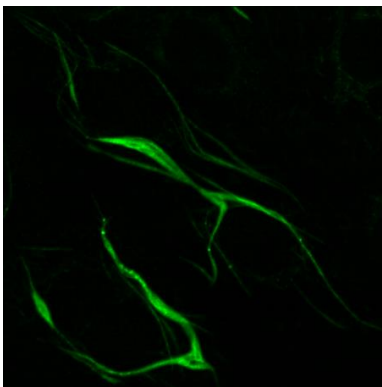
Overlay-Bild



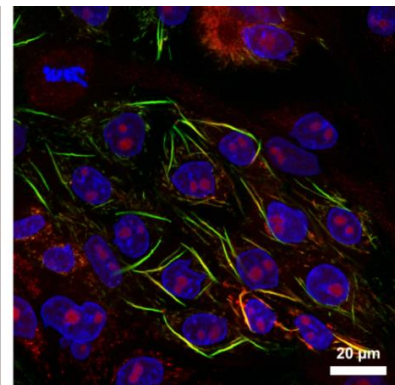
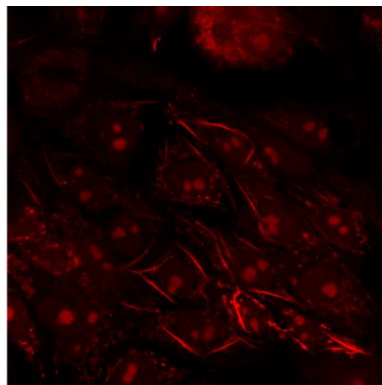
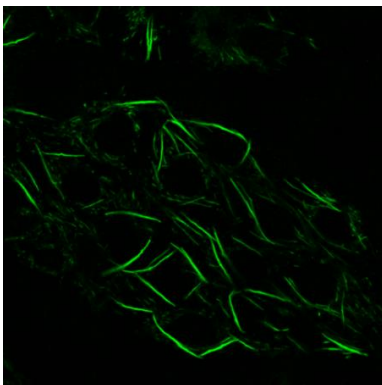
B: LLC-PK1_{MUT1} nach 2 Tagen Induktion



LLC-PK1_{MUT1} nach 7 Tagen Induktion



C: LLC-PK1_{MUT2} nach 2 Tagen Induktion

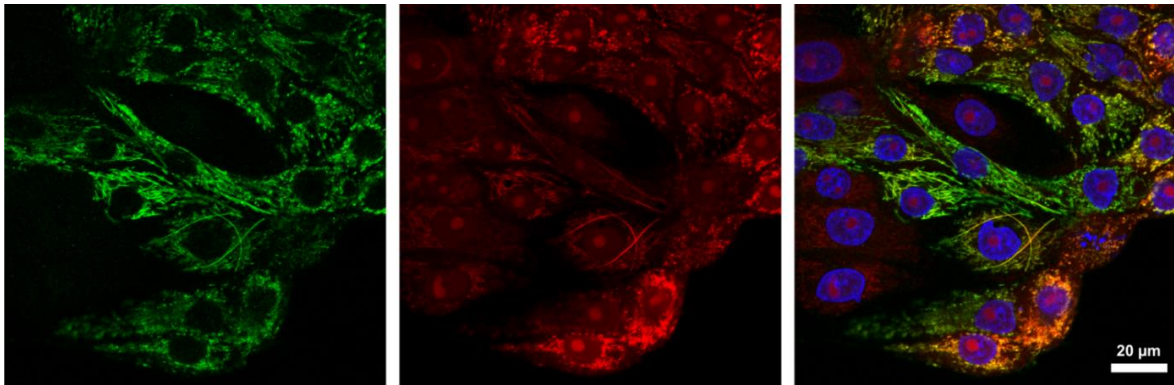
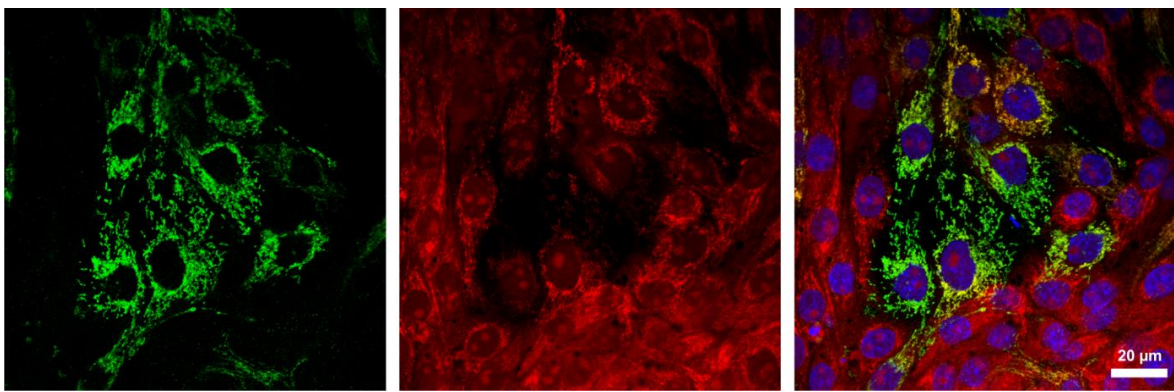
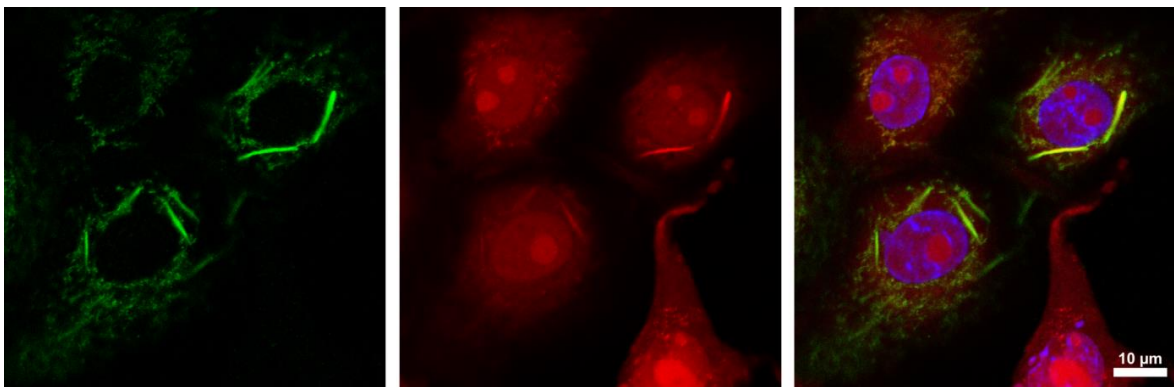


D: LLC-PK1_{MUT3} nach 2 Tagen Induktion

FAP2

Mitotracker

Overlay-Bild

E: LLC-PK1_{MUT4} nach 2 Tagen InduktionLLC-PK1_{MUT4} nach 7 Tagen Induktion**Abbildung 12: Expression von FAP2 in induzierten LLC-PK1 Zellen**

Gefärbt wurden die LLC-PK1 Zellen nach Induktion der FAP2-Expression mit Tetrazyklin auf FAP2 (grün), dem Mitochondrienmarker Mitotracker Orange (rot) und als Zellkernmarker HOE33342 (blau). Im Overlay-Bild jeweils rechts ist die Ko-Lokalisation von FAP2 mit den Mitochondrien zu sehen (gelb). LLC-PK1_{WT} Zellen zeigten nach Induktion eine normale mitochondriale Morphologie, während bei allen FAP2_{MUT} Zellen, nach unterschiedlicher Induktionsdauer, veränderte Mitochondrien-Morphologien auftraten, da die FAP2-Färbung mit dem Mitochondrienmarker Mitotracker ko-lokalisiert.

4.1.2 Untersuchung der Abbaubarkeit von FAP2_{WT}

Die Halbwertszeiten von mitochondrialen Proteinen und Mitochondrien variiert mit dem Organ ⁸⁷, wobei Niere und Leber ähnliche Werte aufweisen. In den 60er Jahren wurden von einigen Gruppen die Halbwertszeiten von mitochondrialen Proteinen oder Bestandteilen und Mitochondrien gemessen. Dabei wurden Zeitangaben von 8,6 Tagen ⁷, 10,3 Tagen ⁹ und 6,7 bis 12,2 Tagen ⁸ für ganze Mitochondrien angegeben. Bei löslichen Proteinen schwankten die Angaben zwischen 5,9 Tagen ⁷ und 11,6 Tagen ⁸. Proteine der äußeren mitochondrialen Membran wiesen eine Halbwertszeit von 4,2 Tagen auf, Proteine der inneren Membran 12,6 Tage ⁸. In LLC-PK1_{WT} Zellen konnte Dr. Carsten Broeker mittels Immunogold-Färbungen zeigen, dass FAP2_{WT} an der inneren Mitochondrienmembran liegt (Abb. 4), was auch der Literatur entspricht ⁵.

Zellen, die das mutierte FAP2_{MUT1} exprimieren, waren auch acht Wochen nach Beenden der Expressions-Induktion mit Tetrazyklin nicht in der Lage, das mutierte FAP2 abzubauen. Die pathologisch veränderten Mitochondrien waren dementsprechend immer noch in den Zellen zu sehen (Abb. 5). Das gleiche Experiment zur Abbaubarkeit sollte auch mit LLC-PK1_{WT} Zellen durchgeführt werden. Eine frühere Durchführung dieses Experiments während der Doktorarbeit von Dr. Carsten Broeker war aus Zeitgründen nicht mehr möglich.

Die LLC-PK1_{WT} Zellen wurden in kleinen Schalen auf Glasplättchen ausgesät und zwei Wochen lang mit Tetrazyklin induziert. Anschließend wurden die Zellen für acht Wochen ohne Tetrazyklin weiter kultiviert und wöchentlich eine Schale gefärbt.

Nach zweiwöchiger Induktion (Woche 0) zeigten die Zellen die erwartete normale FAP2_{WT} Expression, die mit der Färbung des Mitotracker ko-lokalisierte (Abb. 13).

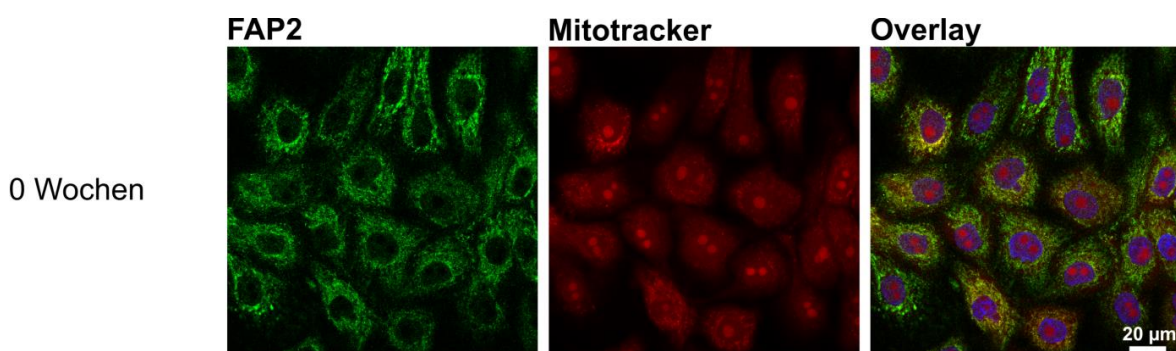


Abbildung 13: Expression von FAP2_{WT} nach zwei Wochen Induktion (Woche 0)

Gefärbt wurden LLC-PK1 FAP2_{WT} Zellen nach einer zweiwöchigen Induktion der FAP2-Expression mit Tetrazyklin (1 µg/ml im Medium) auf FAP2 (grün), einem Mitotracker (rot) als Mitochondrienmarker und HOE33342 (blau) als Zellkernmarker. Im Overlaybild jeweils rechts ist die Ko-Lokalisation von FAP2 mit den Mitochondrien zu sehen (gelb). LLC-PK1_{WT} Zellen zeigen nach Induktion eine normale mitochondriale Morphologie.

Nach Beenden der Expressionsinduktion war nach zwei Wochen immer noch FAP2_{WT} in den Zellen vorhanden, wenngleich die Menge an FAP2_{WT} bereits leicht vermindert erschien (Abb. 14, 2 Wochen). Nach vier Wochen Kultivierung ohne Tetrazyklin war nur noch in wenigen Zellen FAP2_{WT} vorhanden und ab sechs Wochen hatten alle Zellen das überexprimierte FAP2_{WT}-Protein vollständig abgebaut (Abb. 14, 6 Wochen).

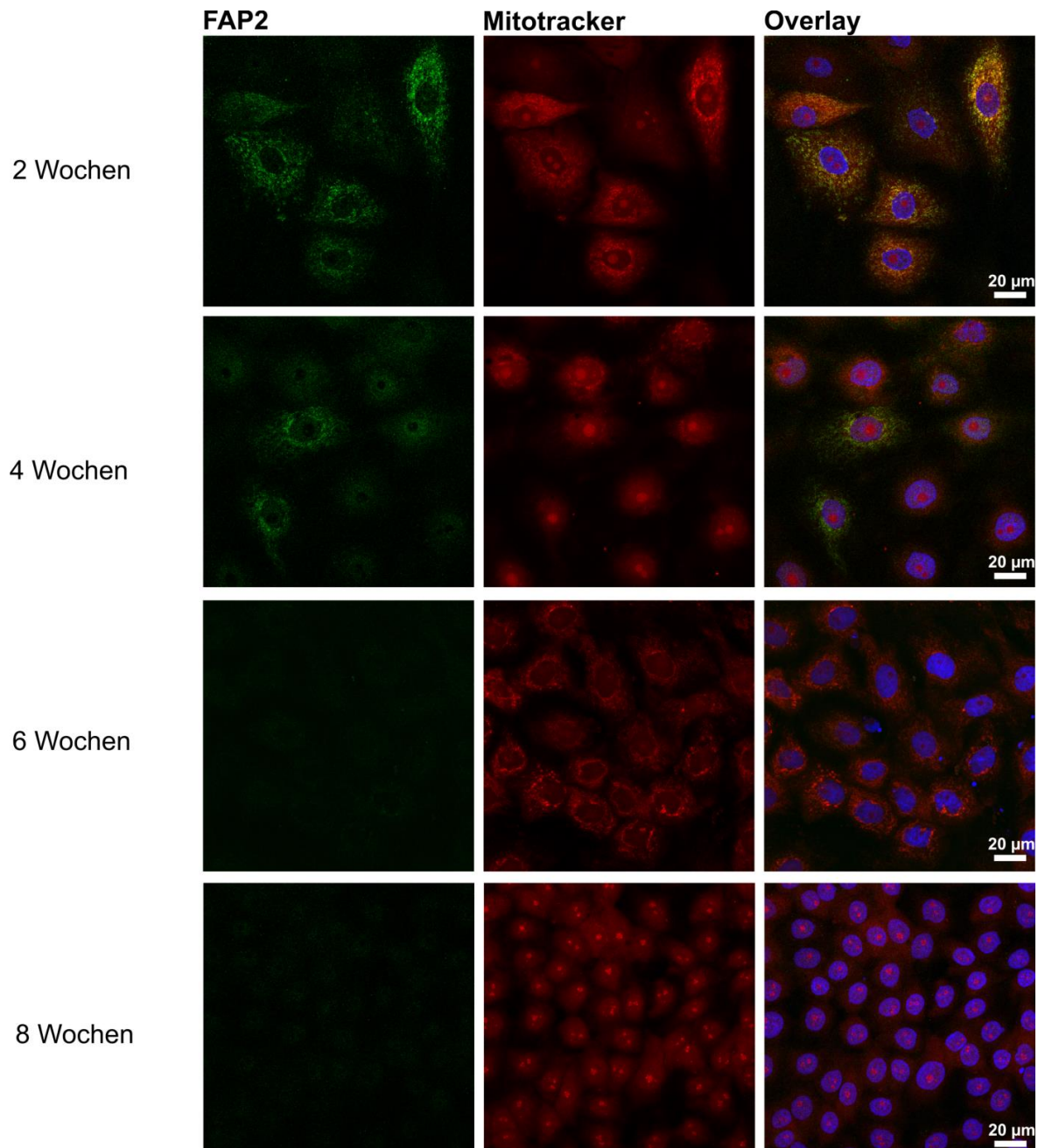


Abbildung 14: Expression von FAP2_{WT} nach Absetzen der Induktion (Woche 2 bis 8)

Gefärbt wurden LLC-PK1_{WT} Zellen nach einer zweiwöchigen Induktion der FAP2-Expression mit Tetrazyklin auf FAP2 (grün), einem Mitotracker (rot) als Mitochondrienmarker und HOE33342 (blau) als Zellkernmarker. Im Overlay-Bild jeweils rechts ist die Ko-Lokalisation von FAP2 mit den Mitochondrien zu sehen (gelb). LLC-PK1_{WT} Zellen waren in der Lage, das überexprimierte FAP2_{WT}-Protein nach sechs Wochen ohne Induktion vollständig abzubauen.

4.2 Histologische Untersuchungen von Patientennieren

4.2.1 Histologie einer Patientenbiopsie

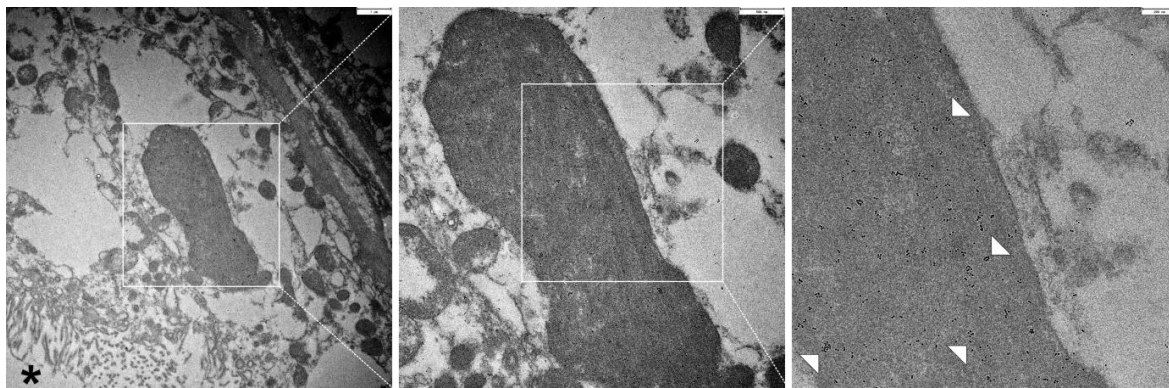
Zusätzlich zum Zell- und Mausmodell wurde eine Patientenbiopsie untersucht, die von Prof. Kleta zur Verfügung gestellt wurde. Der Patient, von dem diese Biopsie in den 60er Jahren entnommen und in Paraffin eingebettet wurde, trug die FAP2 Mutation 1. Als Kontrolle dienten humane Nierenproben, die bei Tumorentfernungen als peritumorales Gewebe mit entnommen wurden. Die ersten Untersuchungen wurden von Dr. Carsten Broeker im Rahmen seiner Dissertation durchgeführt (siehe 1.2 und Abb. 6).

4.2.1.2 Immunogold-Färbung auf die Patientenbiopsie

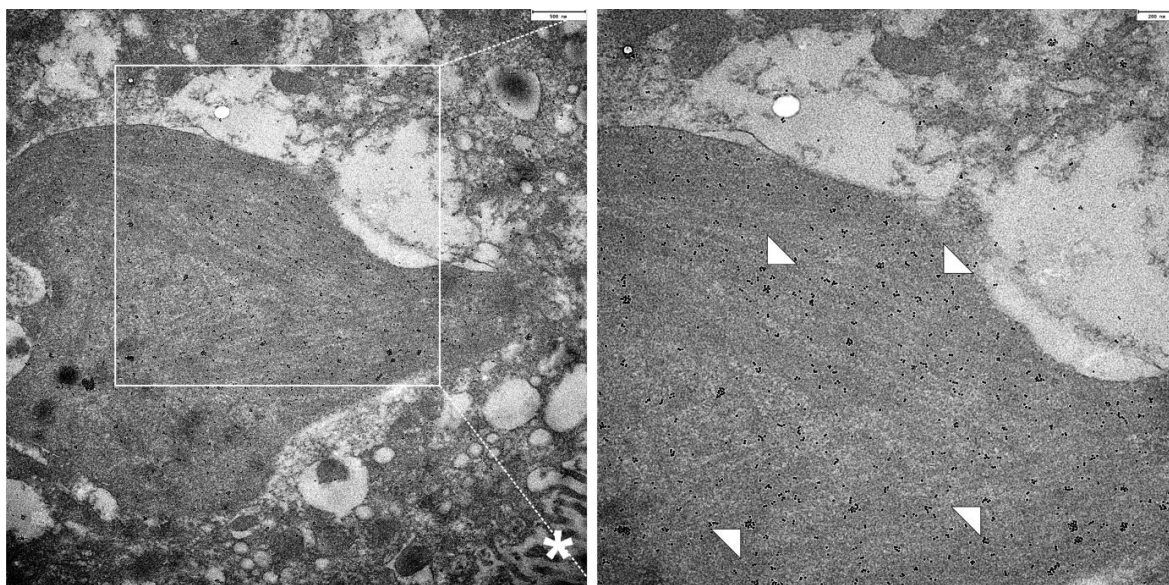
Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Patientenbiopsie wurden bereits von Dr. Carsten Broeker im Rahmen seiner Dissertation angefertigt. Hierbei zeigten sich Glomeruli und nicht-proximale Tubuli normal. In proximalen Tubuli, die durch den Bürstensaum gut zu erkennen waren, waren vergrößerte Mitochondrien zu sehen, in denen, wie im auch im Zellmodell, filamentartige Strukturen zu erkennen waren.

Um diese Filamente genauer zu untersuchen, wurde eine Immunogold-Färbung gegen FAP2 auf der Patientenbiopsie durchgeführt. Hierbei wurde der FAP2-spezifische primäre AK aus den Immunfluoreszenz-Experimenten verwendet, der sekundäre AK war allerdings nicht mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, sondern an Goldpartikel assoziiert (Durchmesser 1 nm), die elektronendicht sind und daher bei elektronenmikroskopischen Aufnahmen als schwarze Punkte erscheinen. In den proximalen Tubuluszellen, die durch den Bürstensaum identifiziert werden konnten (Abb. 15, B, Sternchen), waren analog zum Zellmodell die filamentartigen Strukturen zu sehen. Diese lagen teilweise, im Vergleich zu induzierten LLC-PK1 Zellen, in ungeordneter und nicht paralleler Anordnung in den Mitochondrien vor. Die Filamente, die in den Mitochondrien der proximalen Tubuluszellen zu erkennen waren, zeigten hierbei eine eindeutige Markierung durch die Goldpartikel (Abb. 15, A und B, Pfeile), was bedeutet, dass diese Ablagerungen zumindest zum Teil aus mutiertem FAP2 aufgebaut sind.

A



B

**Abbildung 15: Immunogold-Färbung auf die FAP2-Patientenbiopsie**

Über die Immunogold-Färbung wurde FAP2 mit Goldpartikeln (Pfeile) markiert. Die proximalen Tubuli waren am Bürstensaum (B, Sternchen) erkennbar. In Zellen der proximalen Tubuli waren pathologisch vergrößerte Mitochondrien zu sehen, die voll von filamentartigen Strukturen waren. Da die Goldpartikel überwiegend an diesen Filamenten haften, schienen diese aus mutiertem FAP2 zu bestehen.

4.2.2 Pathophysiologie einer *post mortem* entnommenen Patientennieren

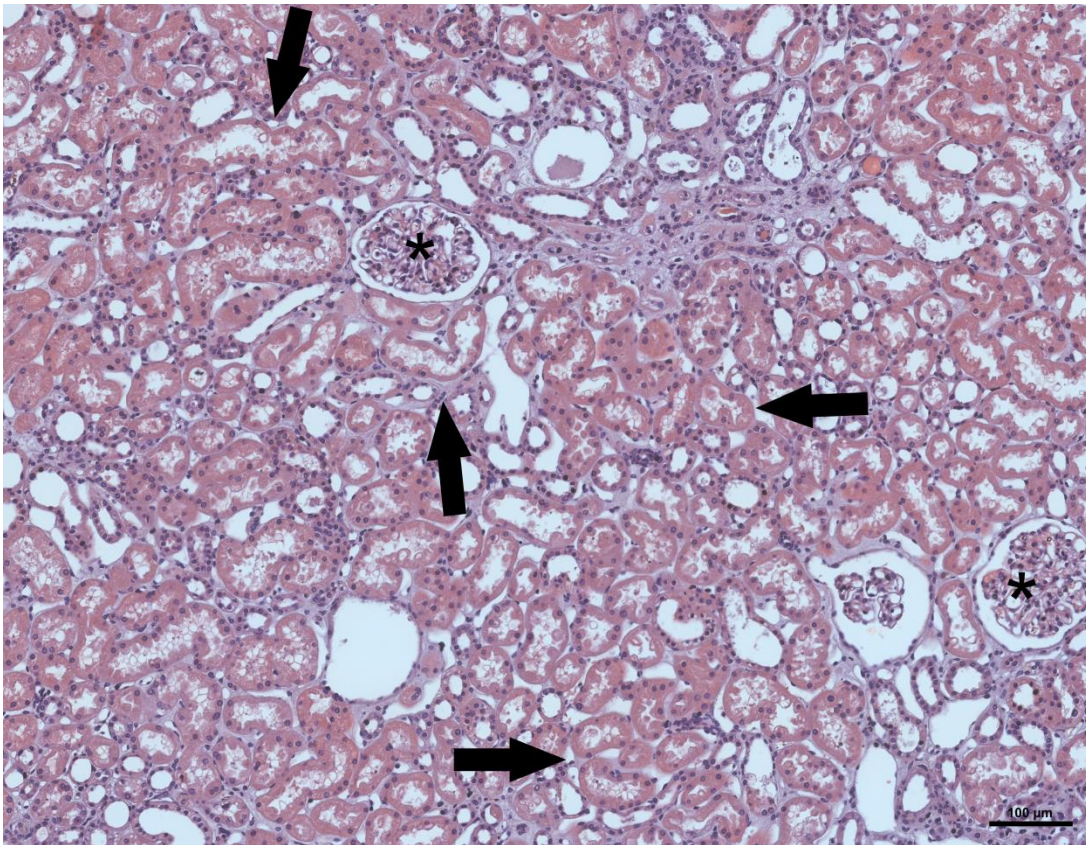
4.2.2.1 Untersuchung der Histologie mittels Hämalaun/Eosin-Färbung

Außer der Biopsie wurde von Prof. Kleta auch noch eine weitere Nieren-Gewebeprobe eines Patienten zur Verfügung gestellt. Diese Probe wurde erst nach dem Tod des Patienten entnommen und wurde ebenfalls in Paraffin eingebettet. Dieser Patient starb im Alter von 65 Jahren aufgrund eines terminalen Nierenversagens.

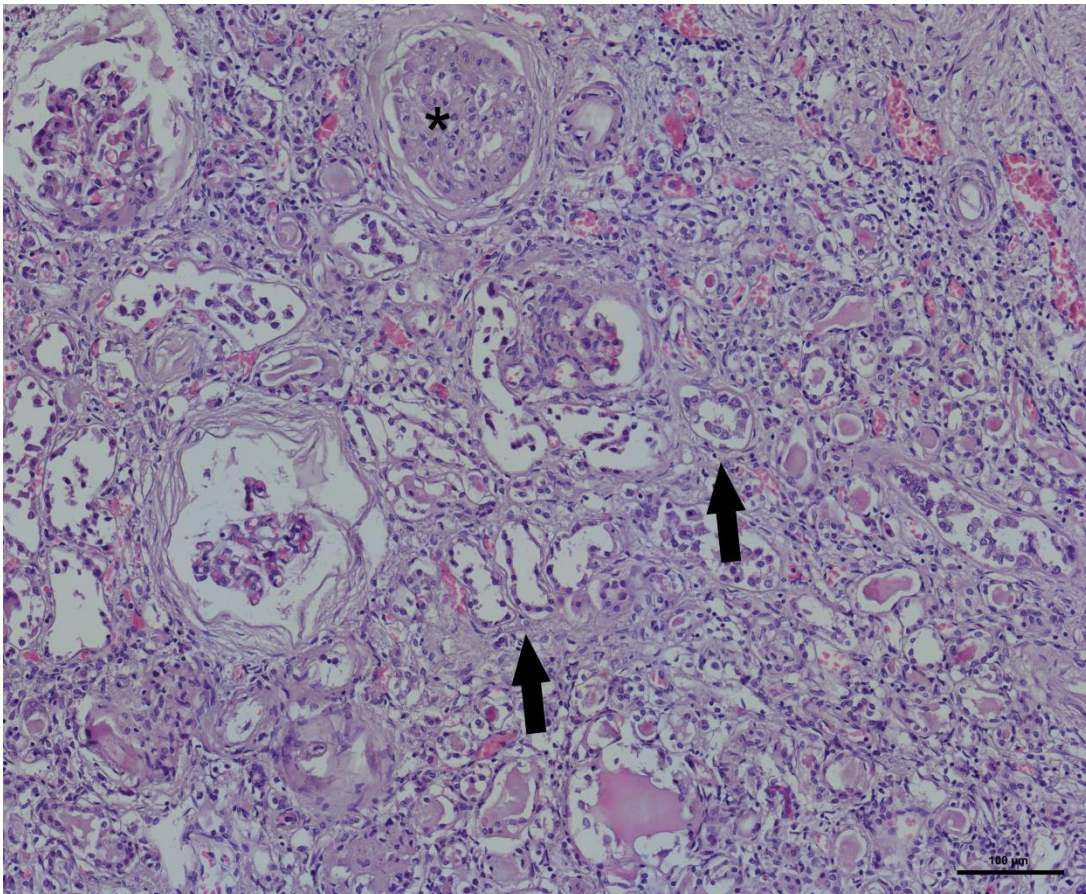
Um die Histologie des Nierengewebes zu beurteilen, wurde zunächst eine Hämalaun/Eosin-Färbung der *post mortem* Niere gemacht. In der Übersichtsaufnahme (Abb. 16 C) war bereits zu erkennen, dass das Nierengewebe stark verändert war. Der Cortex erschien geschrumpft, weshalb die Blutgefäße übermäßig groß wirkten. Ansammlungen von dicht gepackten Zellen mit wenig Zytoplasma ließen auf eine Einwanderung von T-Lymphozyten schließen und damit auf eine entzündliche Veränderung der Niere. Die Medulla enthielt kaum noch Tubuli und erschien in der HE-Färbung als dicht gepacktes Bindegewebe.

Im Vergleich zu einer gesunden Niere (Abb. 16 B) war die Anzahl der Tubuli stark reduziert (Abb. 16 A, Pfeile). In vielen Fällen hatten sich die Epithelzellen von der Basalmembran abgelöst und waren im Lumen zu erkennen.

A: H/E Färbung auf einer Kontrollniere



B: H/E Färbung auf der *post mortem* Patientenniere



C: Übersichtsaufnahme der H/E Färbung auf die *post mortem* Patientenniere**Abbildung 16: Hämalaun/Eosin-Färbung auf eine *post mortem* FAP2-Patientenniere**

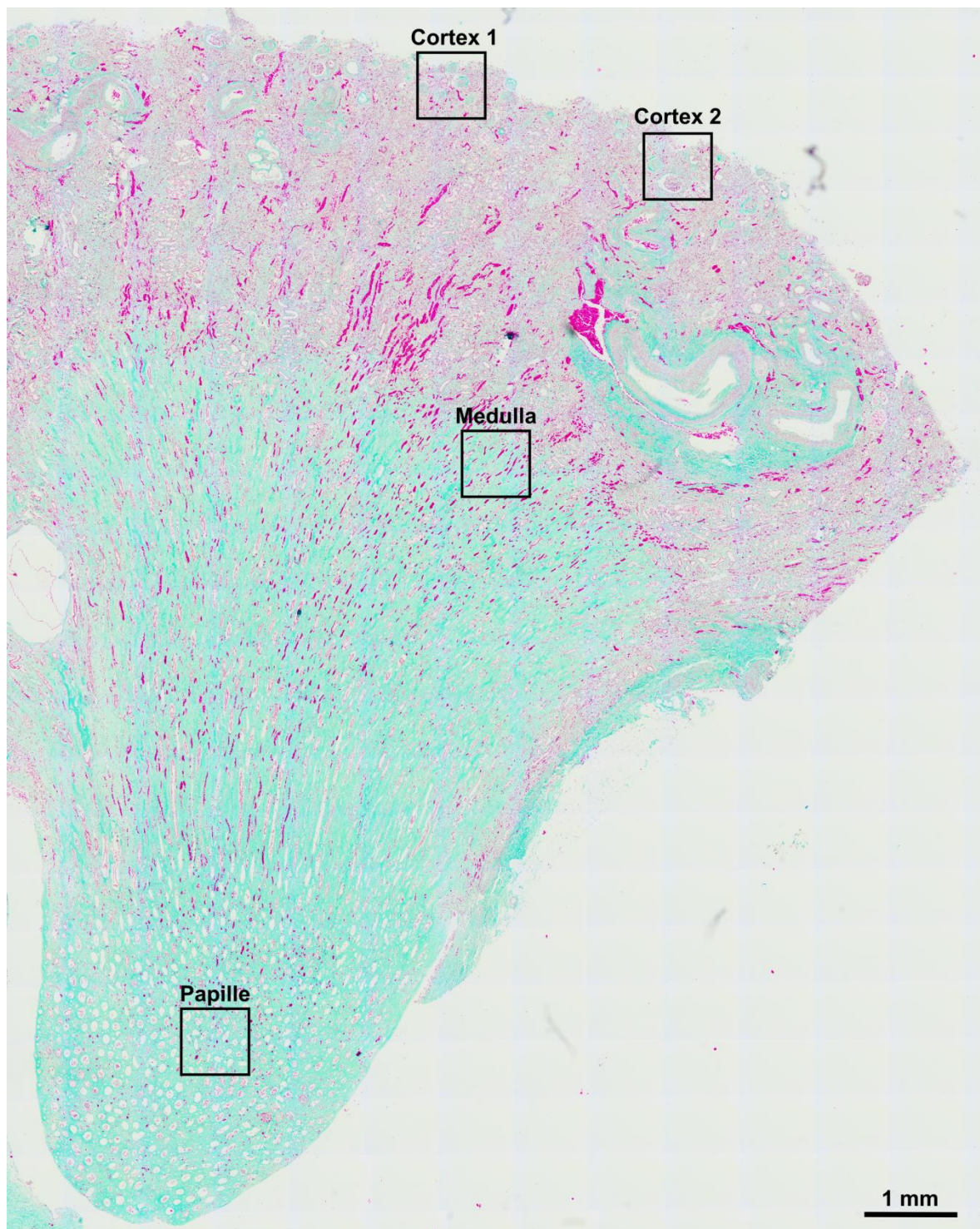
Bei der Hämalaun/Eosin-Färbung werden Zellkerne blau angefärbt und das Zytoplasma rot. Die Anzahl an proximalen Tubuli war der Patientenniere (B, Pfeile) im Vergleich zu einer gesunden Niere (A) stark reduziert. Die Glomeruli waren teilweise verschlossen (B, Sterne). In der Übersicht erschien der Cortex stark geschrumpft, während in Medulla und Papille bereits in dieser Färbung deutliche Veränderungen zu erkennen waren, die auf eine Fibrose hinweisen könnten (C).

4.2.2.2 Markierung von Bindegewebe mittels Masson-Goldner-Färbung

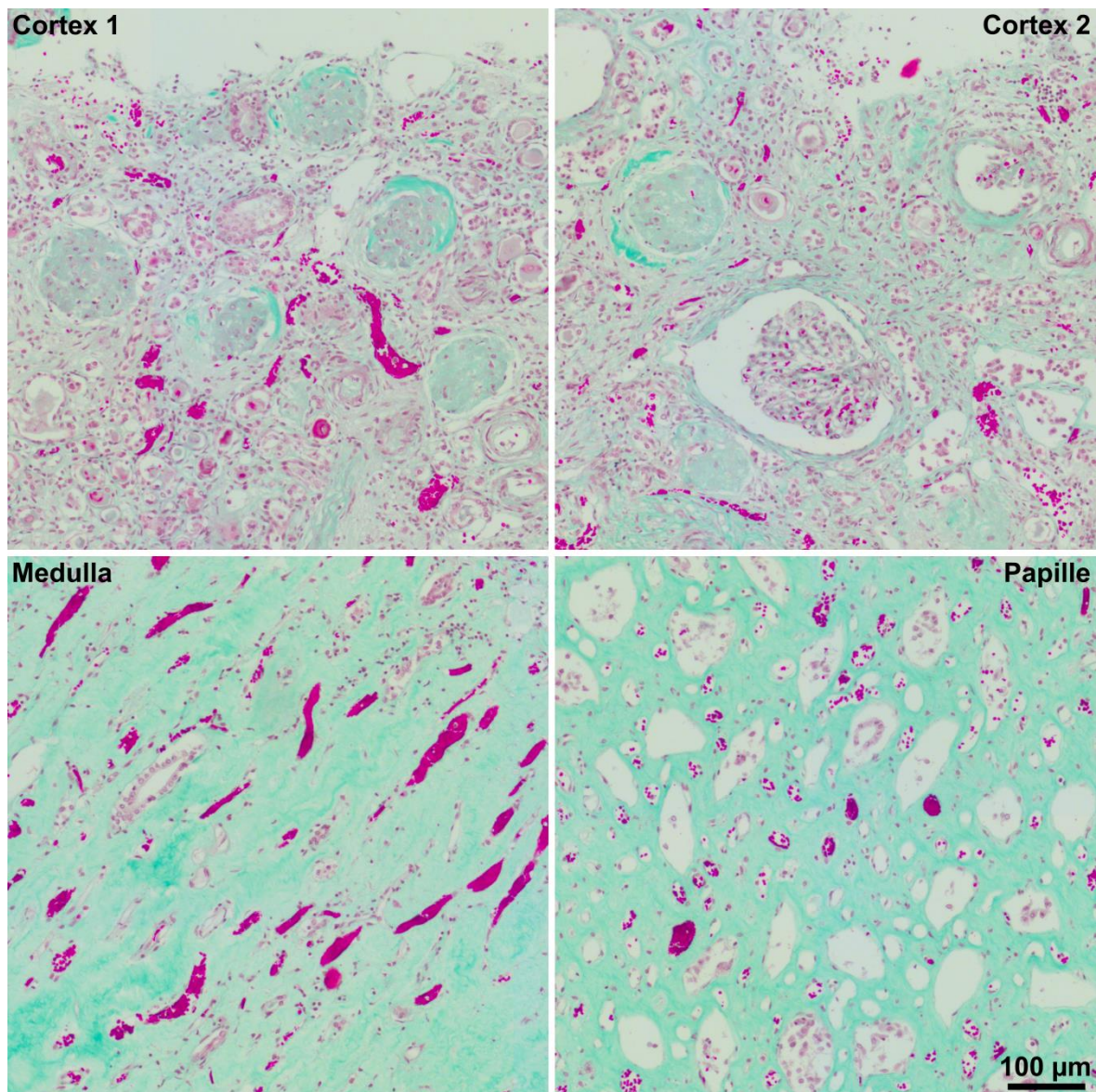
Da in der *post mortem* Probe bereits in der Hämalaun/Eosin-Färbung deutliche Hinweise auf eine Fibrose beobachtet wurden, wurde sie zudem mittels einer Masson-Goldner-Färbung untersucht, da hierbei Bindegewebe in Türkis angefärbt werden kann. Collagen, als Hauptbestandteil von Bindegewebe, macht auch einen Großteil des fibrotischen Gewebes aus.

Im Cortex war eine deutliche Zunahme an Bindegewebe zu erkennen (Abb. 17 A). In einer höheren Vergrößerung waren verödete Glomeruli und defekte Tubuli, bei denen sich die Epithelzellen abgelöst hatten, sichtbar (Abb. 17 B). In Medulla und Papille war eine deutliche Fibrose, gekennzeichnet durch die enorme Zunahme von Bindegewebe (türkis), zu sehen. Es war kaum noch normales Nierengewebe mit gesunden Tubuli zu erkennen (Abb. 17).

A: Übersichtsaufnahme der Masson-Goldner-Färbung auf die Patientenniere



B: Detailbilder der Masson-Goldner-Färbung der Patientenniere

**Abbildung 17: Masson-Goldner-Färbung auf FAP2-Patientenniere**

Zum Nachweis von Bindegewebe bzw. zur Untersuchung von fibrotisch verändertem Gewebe wurde eine Masson-Goldner-Färbung auf die FAP2-Patientenniere durchgeführt. Bindegewebe wird hierbei in Türkis dargestellt. In der Übersichtsaufnahme war eine deutliche Zunahme an Bindegewebe sichtbar (A). B zeigt Detailausschnitte aus der Übersichtsaufnahme von A. Im Cortex waren verschlossene Glomeruli und nur noch wenige Tubuli erkennbar (B, Detailaufnahmen „Cortex“). Im Interstitium waren Ansammlungen von vermutlich eingewanderten T-Lymphozyten zu erkennen (Zellkerne erscheinen braun und Zytoplasma rot). Medulla und Papille schienen hauptsächlich aus Bindegewebe zu bestehen. Hier waren kaum noch intakte Tubuli zu erkennen, während der Zwischenraum komplett mit Bindegewebe gefüllt war (B, Detailaufnahmen „Papille“ und „Medulla“).

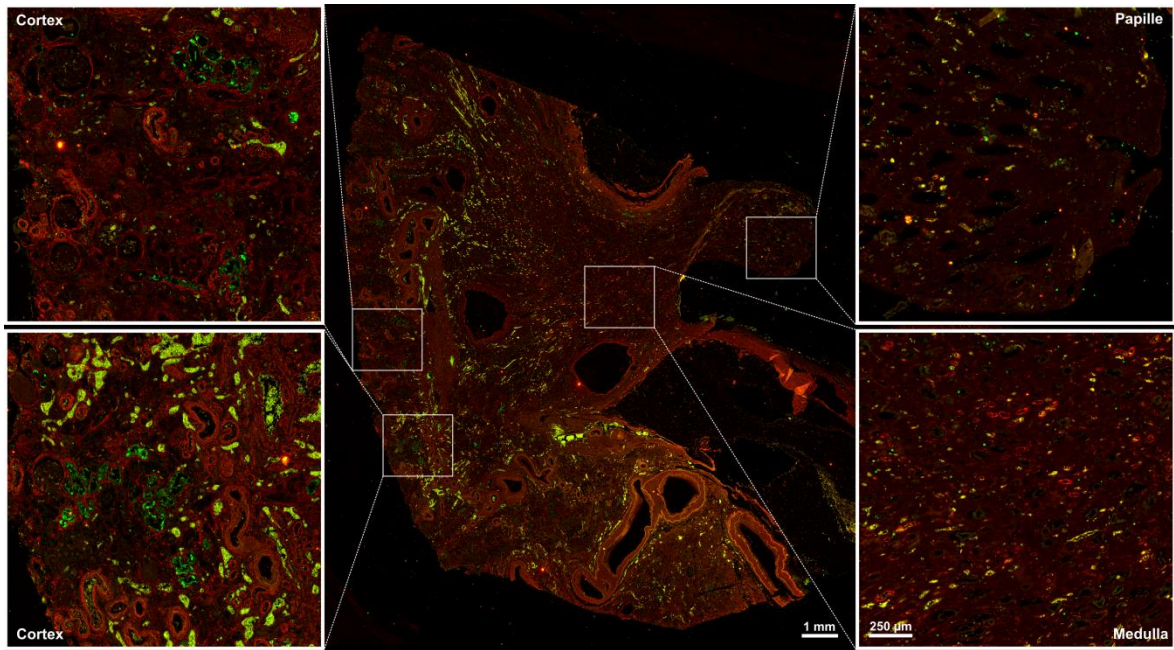
4.2.2.3 Untersuchung der subzellulären FAP2-Lokalisation mittels Immunfluoreszenz

In einem nächsten Schritt wurde die Patientenniere mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Färbung auf die FAP2 Expression hin untersucht. Im Gegensatz zu einer gesunden Niere, bei der ca. 70% der kortikalen Tubuli proximale Tubuli sind, waren in dieser Probe nur noch sehr wenige FAP2-positive Tubuli im Cortex zu finden (Abb. 18 C, FAP2 in grün gefärbt). Wie erwartet, waren distale Tubulussegmente, Glomeruli und Sammelrohre, soweit im Gewebe noch vorhanden, FAP2-negativ (Abb. 18 A). In der Vergrößerung erschien in den proximalen Tubuli ein ähnliches FAP2-Färbemuster wie in der zuvor untersuchten Patientenbiopsie (Abb. 18 A). Auch hier erschienen die Mitochondrien nicht in normaler Dynamik, sondern eher fragmentiert. Außerdem waren in den Tubuli noch FAP2-positive Zelltrümmer zu erkennen, die auch in der Patientenbiopsie zu sehen waren (Abb. 18 C und D). Zusätzlich zu FAP2 wurde die Probe noch auf Glattmuskel-Aktin gefärbt. Glattmuskel-Aktin ist ein Protein, das von Myofibroblasten gebildet wird. Myofibroblasten sind aktivierte Fibroblasten, die bei Gewebeverletzungen zur Produktion von Bindegewebe aktiviert werden^{72,88,89}. Es stellte sich heraus, dass alle Tubuli und alle Glomeruli von mehreren Schichten dieser Zellen umgeben waren, eingebettet in einen dicken Ring aus Bindegewebe, welcher eine extrem verdickte Basalmembran war (Abb. 18 B: Glomeruli, C und D: Tubuli, Glattmuskel-Aktin in rot gefärbt). In höherer Vergrößerung waren bei den FAP2-positiven Tubuli (Abb. 18 D, FAP2 in grün, Glattmuskel-Aktin in rot) die verschiedenen Schichten an Myofibroblasten um die Tubuli besser zu erkennen.

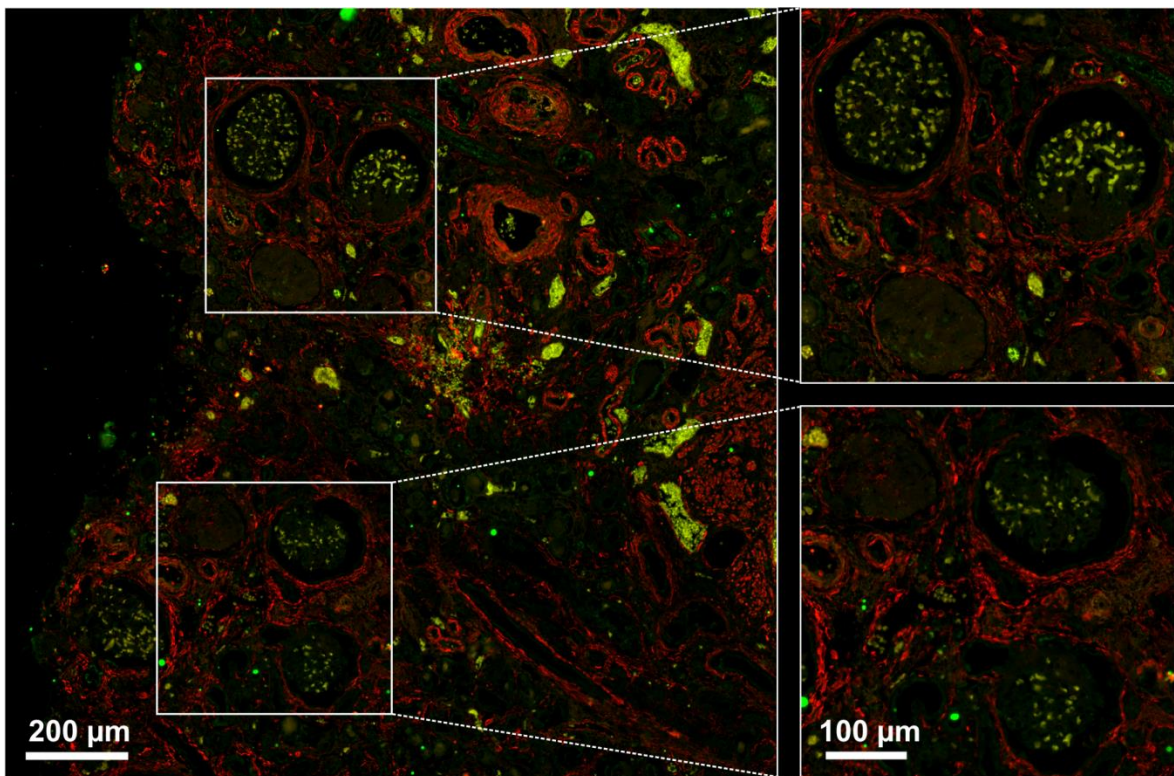
Dass auch Glomeruli und nicht-proximale Tubuli von Glattmuskel-Aktin positiven Myofibroblasten umgeben waren (Abb. 18 B und D), lässt vermuten, dass das Endstadium dieses Fanconi-Syndroms nicht nur auf den Ort der FAP2-Expression, nämlich die proximalen Tubuli, beschränkt scheint.

Detailaufnahmen der Immunfluoreszenz-Färbung der *post mortem* Patientenniere zeigten die FAP2-Expression der proximalen Tubuluszellen (Abb. 19 A). Das Zytosol einiger Tubuluszellen schien komplett voll mit mutiertem FAP2 zu sein (Abb. 19 B, Stern). Im Lumen einiger Tubuli waren FAP2-positive Zellablagerungen zu sehen, die abgestorbene proximale Tubuluszellen sein könnten (Abb. 19 B).

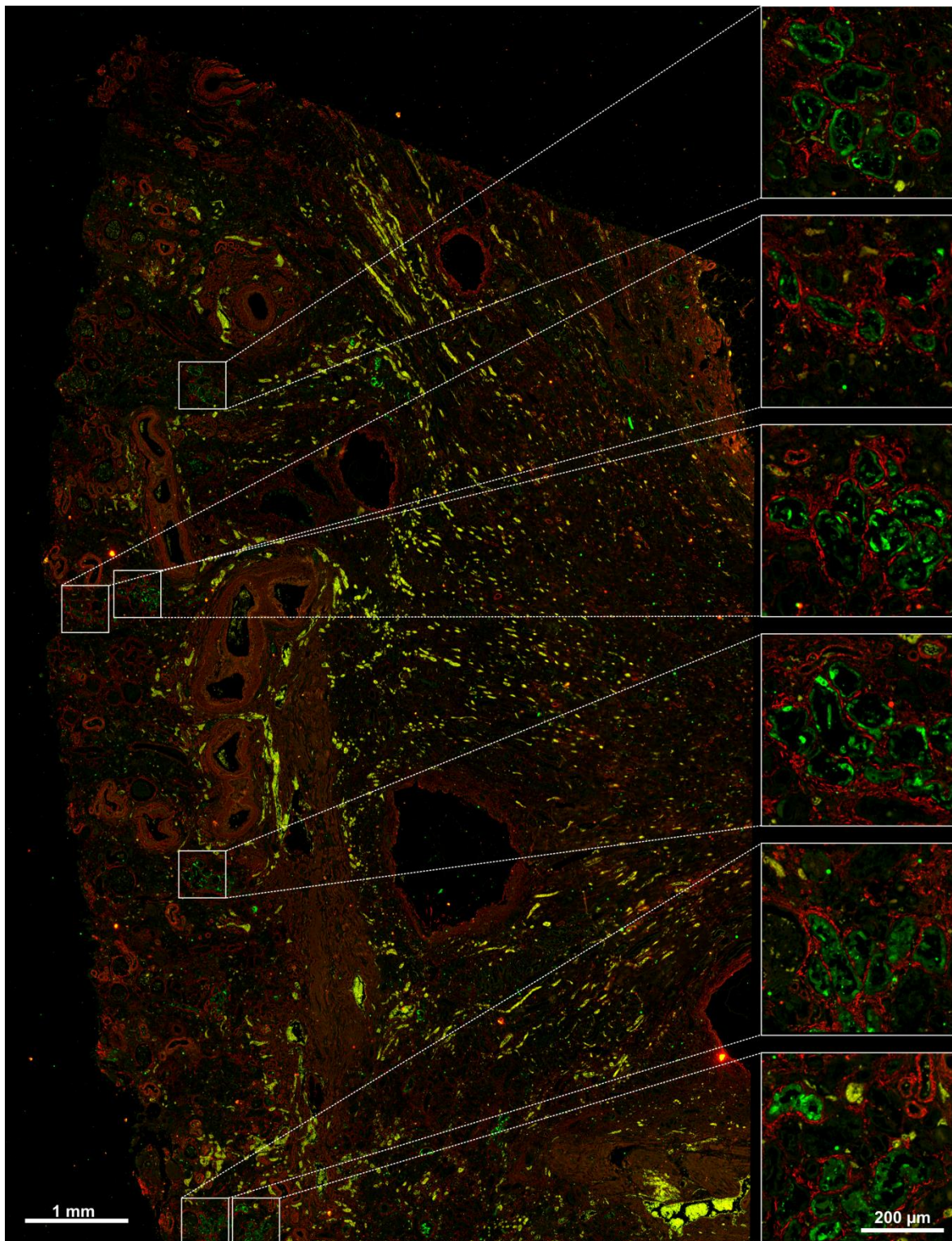
A: FAP2- (grün) und Glattmuskel Aktin-Färbung (rot) auf Patientenniere



B: Kortikale Glomeruli in der Patientenniere



C: Proximale Tubuli in der Patientenniere (FAP2 (grün), Glattmuskel Aktin (rot))



D: Detailaufnahme von proximalen Tubuli in Patientenniere
(FAP2 (grün), Glattmuskel Aktin (rot))

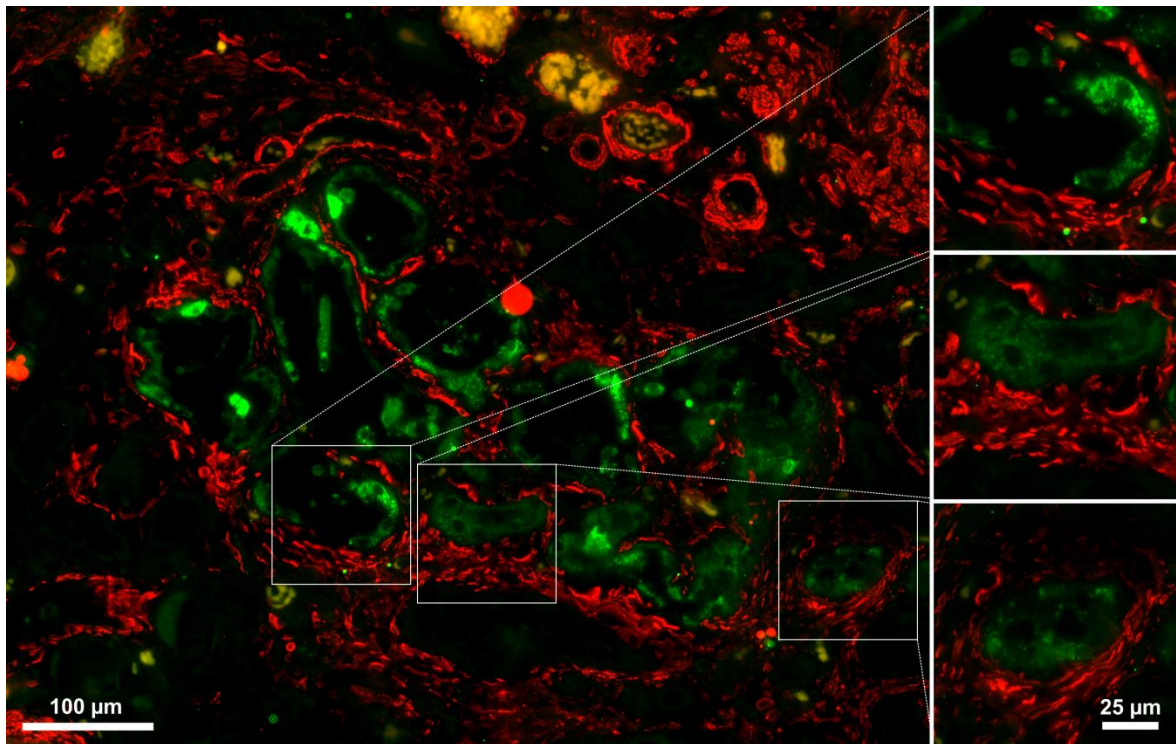
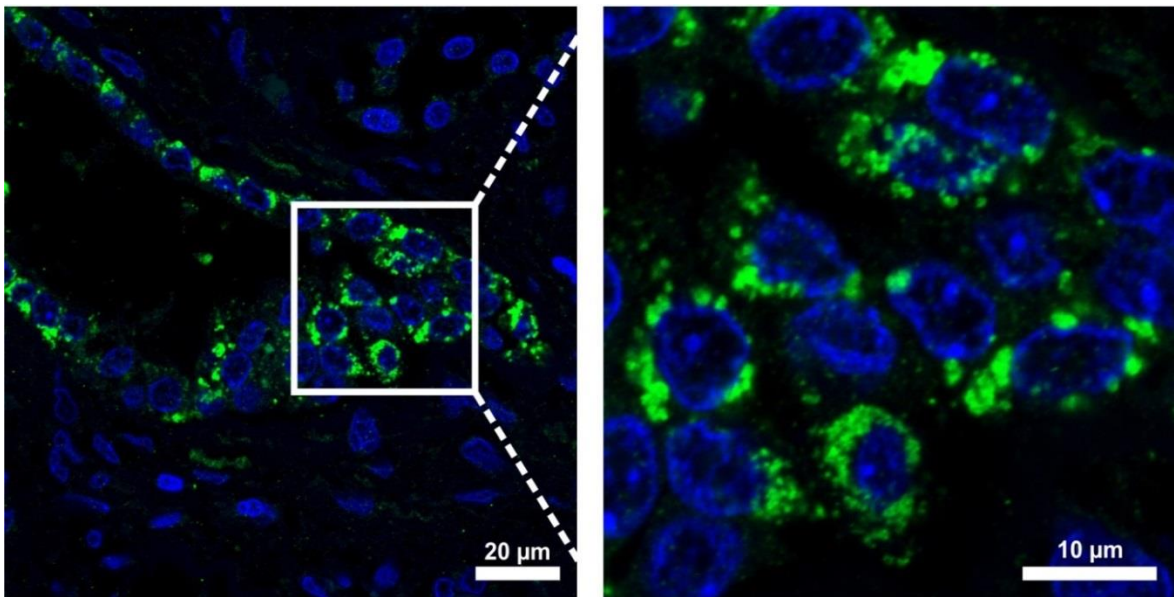


Abbildung 18: Immunfluoreszenz-Färbung auf die *post mortem* FAP2-Patientenniere

FAP2 ist in grün, Glattmuskelaktin in rot dargestellt. Die gelb/orangenen Bereiche waren Erythrozyten, die auf jeder Wellenlänge autofluoreszierten. In der Übersicht (A) war bereits zu erkennen, dass im Cortex nur noch wenige FAP2-positive Tubuli waren, alle anderen Bereiche der Niere, wie distale Tubuli, Sammelrohre und Glomeruli (B) waren FAP2-negativ. In der Färbung konnte beobachtet werden, dass die verbliebenen proximalen Tubuli (C) und die Glomeruli (B) von mehreren Schichten Myofibroblasten umgeben waren.

Detailaufnahmen von proximalen Tubuluszellen in der *post mortem* Patientenniere

A



B

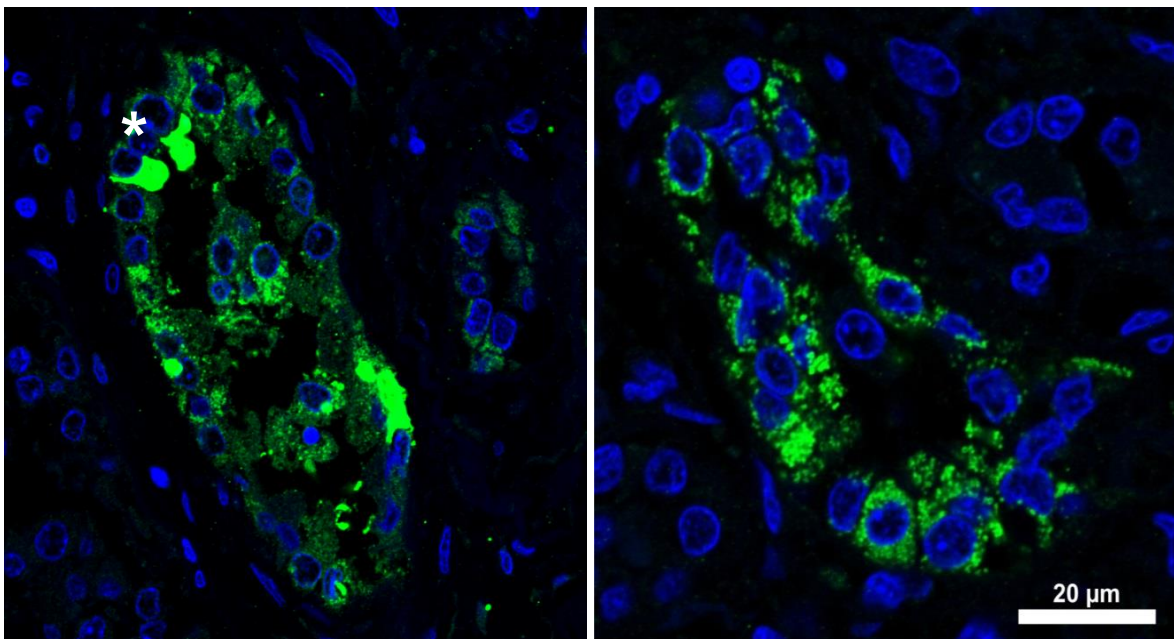


Abbildung 19: Detailaufnahmen der Immunfluoreszenz-Färbung auf die *post mortem* FAP2-Patientenniere

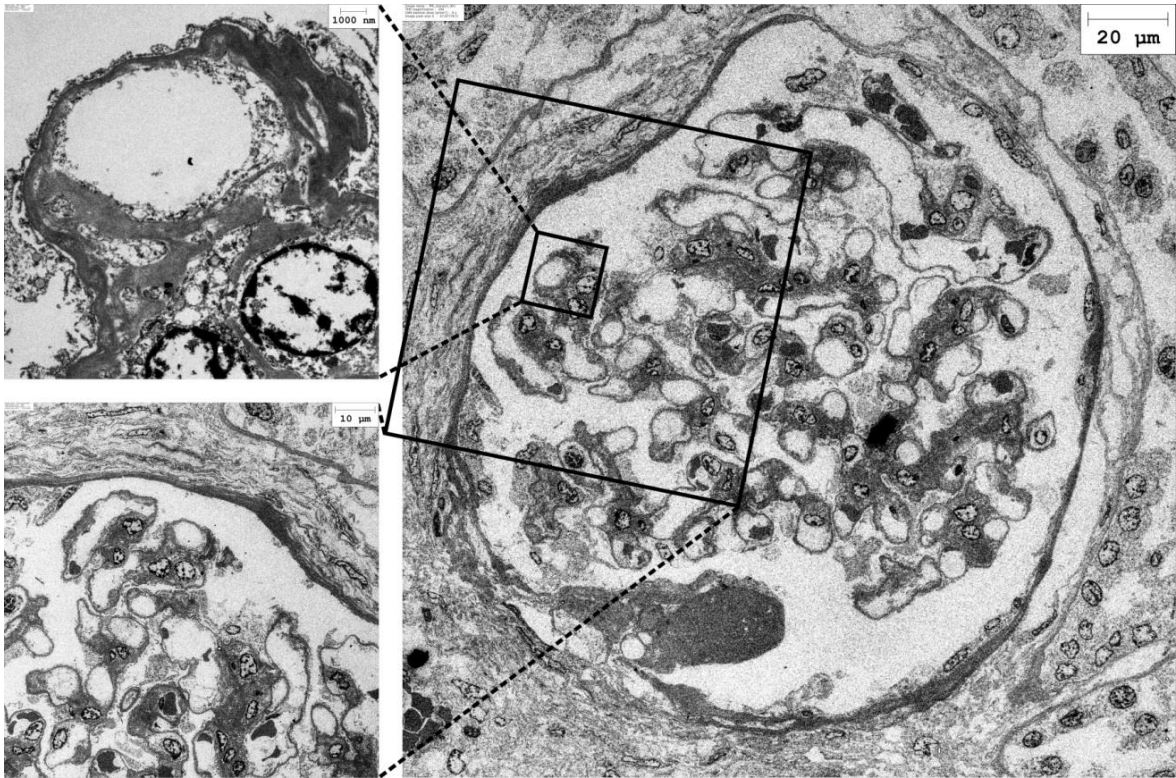
FAP2 ist in grün, die Zellkerne sind in blau dargestellt. Die FAP2 positiven proximalen Tubuli der *post mortem* Patientenniere wiesen ein ähnliches FAP2-Färbemuster auf, wie die zuvor untersuchte Patientenbiopsie (A). Außerdem waren in einigen Tubuli im Lumen FAP2-positive Zellablagerungen zu sehen (B), welche abgestorbene proximale Tubuluszellen sein könnten. Das Zytosol einiger Tubuluszellen (Stern) schien komplett voll mit mutiertem FAP zu sein.

4.2.2.4 Elektronenmikroskopische Untersuchung der *post mortem* Patientenniere

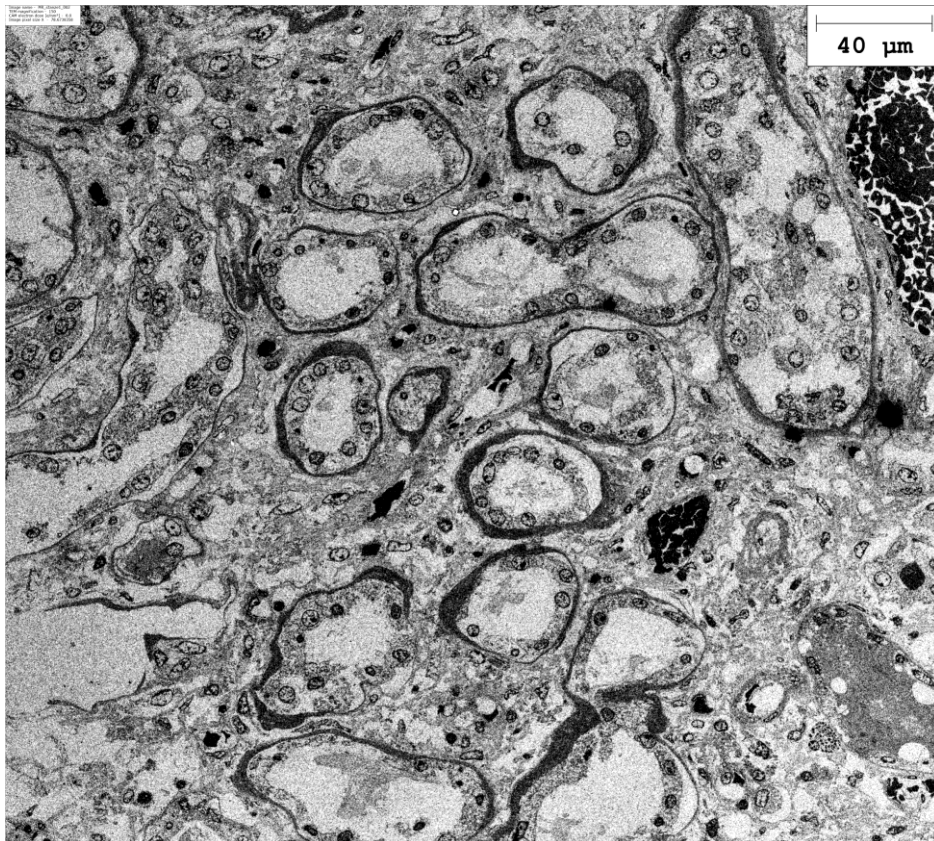
Abschließend wurde auch noch eine elektronenmikroskopische Untersuchung der Nieren-Autopsie durchgeführt. Um in dem stark pathologisch veränderten Gewebe proximale Tubuli für die Elektronenmikroskopie zu bekommen, wurden durch die Immunfluoreszenz-Färbung von Konsekutivschnitten FAP2-positive proximale Tubuli lokalisiert und die Proben für die Elektronenmikroskopie genau an dieser Stelle ausgestanzt. Dadurch konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei den gezeigten Tubuli um proximale Tubuli handelte. Aufgrund der schlechten Histologie war es nicht mehr möglich, die Tubuli eindeutig zu bestimmen. In den vorangegangenen histologischen Untersuchungen wurde bereits beobachtet, dass diese Patienten-Probe eine hoch-fibrotische Morphologie der Niere zeigt, die typisch für das Endstadium dieser Form des Fanconi-Syndroms ist. Auch in der Elektronenmikroskopie war deutlich zu sehen, dass die Glomeruli stark fibrotisch verändert waren (Abb. 20 A). Um die meisten der verbliebenen Tubuli war eine extrem verdickte Basalmembran (Abb. 20 B) zu erkennen, in der Myofibroblasten lagen (Abb. 20 C). Im Lumen dieser Tubuli und in Epithelzellen waren weiterhin längliche Strukturen, die den pathologischen FAP2-Filamenten ähnlich sahen, zu sehen (Abb. 20 D). Für die genauere Untersuchung dieser Strukturen wurde eine Immunogold-Färbung durchgeführt (siehe 4.2.2.5).

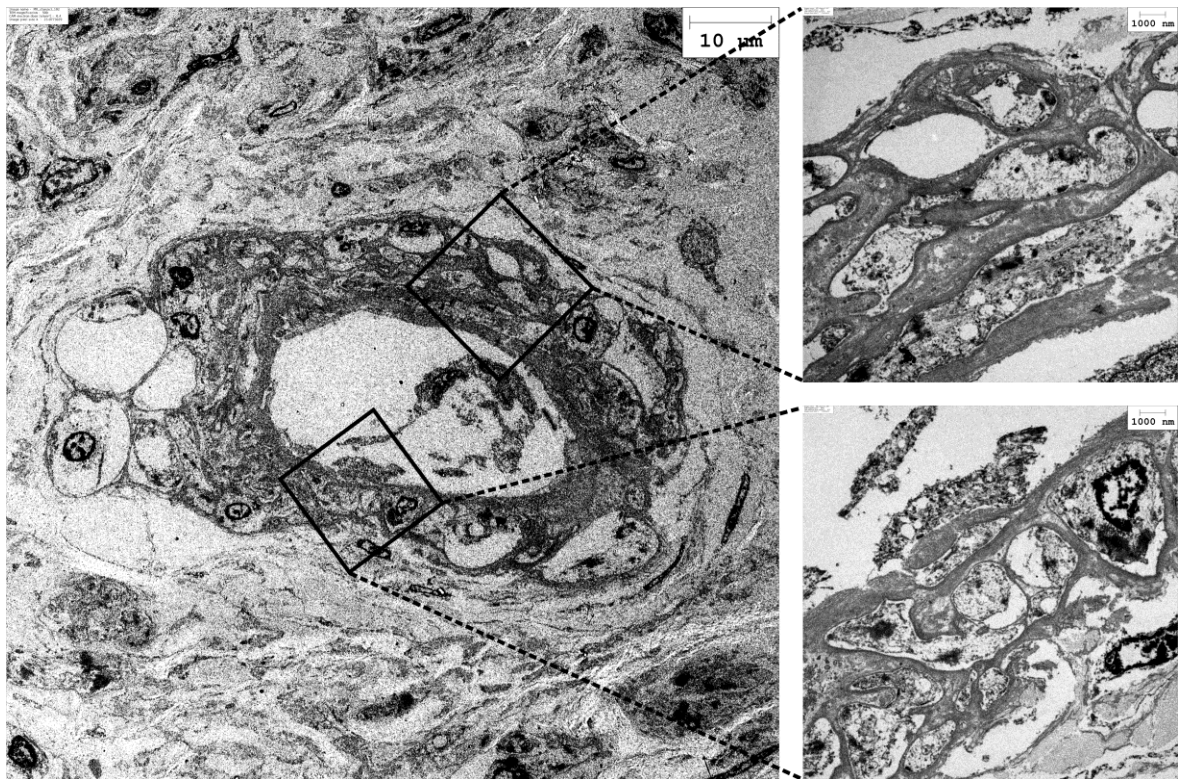
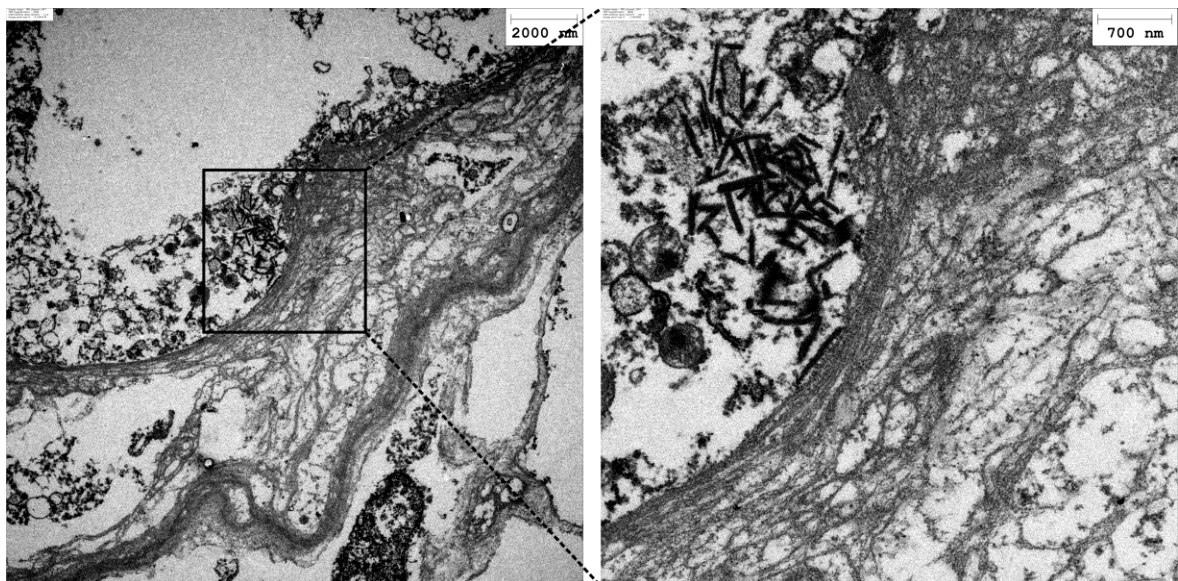
Elektronenmikroskopische Aufnahmen der *post mortem* Patientenniere

A: Glomerulus in der *post mortem* Patientenniere



B: Tubuli in der *post mortem* Patientenniere



C: Detail-Aufnahmen eines Tubulus in der *post mortem* PatientenniereD: Detail-Aufnahmen eines Tubulus in der *post mortem* Patientenniere**Abbildung 20: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der *post mortem* Patientenniere**

Die veränderte Morphologie der *post mortem* Patientenniere war auch in der Elektronenmikroskopie erkennbar. Die Glomeruli zeigten eine veränderte Morphologie mit Myofibroblasten um die Bowman-Kapsel (A). Die verbliebenen Tubuli waren von einer extrem dicken Basalmembran umgeben (B), in denen Myofibroblasten zu erkennen waren (C). Im Lumen der Tubuli, sowie teilweise auch in den Epithelzellen, waren längliche kristallähnliche Strukturen zu sehen (D).

4.2.2.5 Immunogold-Färbung der *post mortem* Patientenniere

Zur weiteren Untersuchung der unbekanntenen Strukturen, die sich im Lumen der verbliebenen Tubuli der Patienten-Autopsie befanden, wurde eine Immunogold-Färbung durchgeführt. Als Primärantikörper wurde der FAP2-spezifische Antikörper der Immunfluoreszenz-Färbungen benutzt. Der Sekundärantikörper war an Goldpartikel gekoppelt, die durch ihre Elektronendichte als schwarze Punkte in der Elektronenmikroskopie erscheinen. Diese Goldpartikel lagen teilweise auf den länglichen Strukturen (Abb. 21, schwarze Pfeile), teilweise verteilt im Zytoplasma vor (Abb. 21, weiße Pfeile). Eine eindeutige Markierung der kristallähnlichen Strukturen durch die Goldpartikel war somit nicht geben.

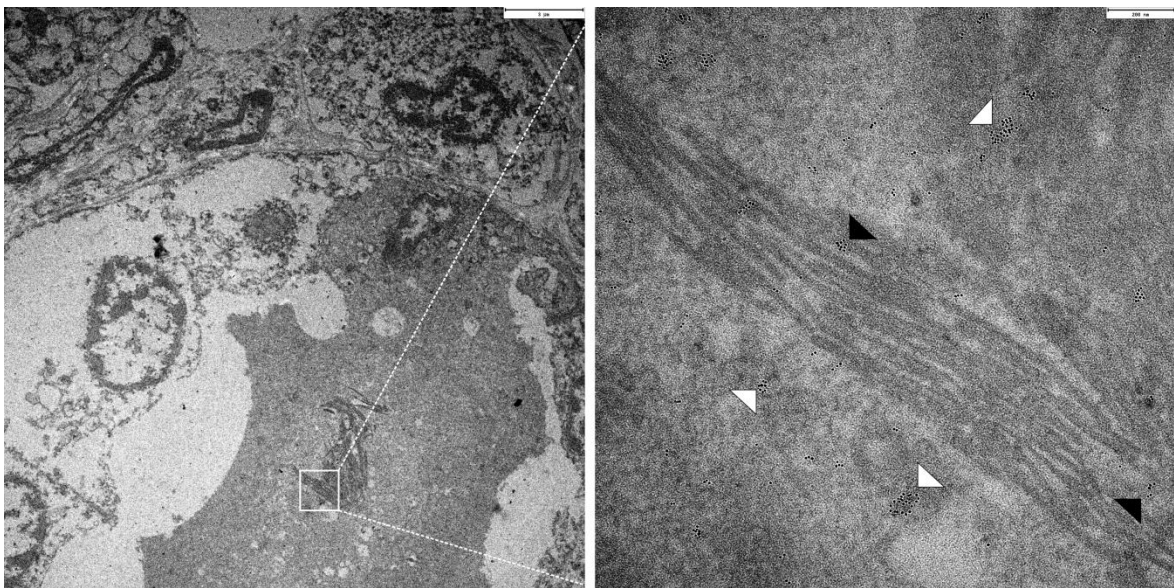


Abbildung 21: Immunogold-Färbung der *post mortem* Patientenniere

Zur Untersuchung, ob FAP2 Bestandteil der filamentartigen Strukturen im Lumen der verbliebenen proximalen Tubuli der *post mortem* Patientenniere ist, wurde eine Immunogold-Färbung durchgeführt. Die Goldpartikel waren zwar teilweise an die assoziiert (schwarze Pfeile), allerdings zeigten sie im Rest des Gewebes eine ähnliche Verteilung (weiße Pfeile), was auf eine unspezifische Markierung schließen lässt.

4.3 Untersuchungen auf Fibrose im FAP2-Zellmodell

4.3.1 Gen-Expressionsanalyse am FAP2-Zellmodell

Da beide Patienten-Gewebeproben Hinweise auf eine renale Fibrose lieferten, sollte im Zellmodell die Expression von Genen untersucht werden, die in einem Zusammenhang mit renaler Fibrose stehen. Dafür wurden stabil transfizierte FAP2_{WT} und FAP2_{MUT1} Zellen für drei Wochen mit Tetrazyklin induziert und anschließend die Expressionsstärke über quantitative Real-time PCR bestimmt. Untersucht wurden dazu NLRP3 als Bestandteil

des Inflammasoms, Interleukin-18 (IL-18) und Fibronectin (FN1). NLRP3 war in Zellen, die das mutierte FAP2 exprimierten, signifikant stärker exprimiert als in Zellen, die FAP2_{WT} exprimierten (Abb. 22 A). Inaktives pro-IL-18 wird von der durch das Inflammasom aktivierten Caspase-1 in aktives IL-18 gespalten. Zellen mit FAP2_{MUT1} zeigten eine signifikant höhere Expression an IL-18 als die Kontrollzellen mit FAP2_{WT} (Abb. 22 B). Auch Fibronectin als wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix bzw. des Bindegewebes war in diesen Zellen signifikant höher exprimiert (Abb. 22 C). Über Immunfluoreszenz-Färbungen der *post mortem* Patientenniere konnten Glattmuskel-Aktin-positive Myofibroblasten um Glomeruli und proximale Tubuli detektiert werden. Auch bei induzierten LLC-PK1_{MUT1} Zellen war Glattmuskel-Aktin signifikant höher exprimiert (Abb. 22 D).

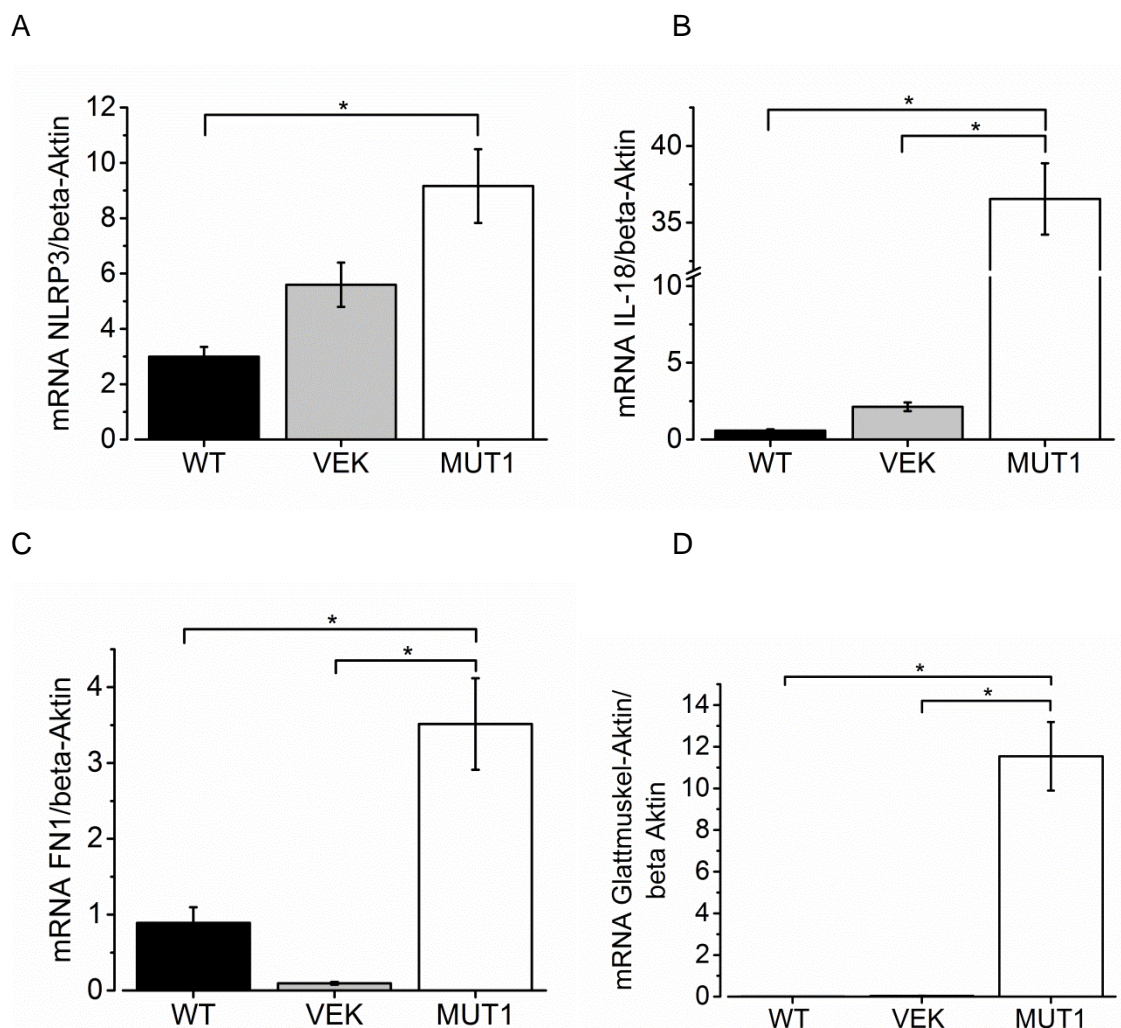


Abbildung 22: mRNA-Expression Fibrose-beteiligter Gene in LLC-PK1 Zellen

Aus LLC-PK1 Zellen wurde nach drei Wochen Induktion mit Tetrazyklin mRNA isoliert und diese über quantitative PCR auf Gene, die mit renaler Fibrose in Verbindung stehen, untersucht (n = 3 pro Gruppe). NLRP3 als Teil des NLRP3-Inflammasoms zeigte bei LLC-PK1MUT1 eine signifikant höhere Expression als bei LLC-PK1WT und LLC-PK1VEK (A, p-Values WT-MUT1 0,036 und VEK-MUT1 0,098). Ebenfalls signifikant erhöht war die Expression der Gene IL-18 (B, p-Values WT-MUT1 0,0041 und VEK-MUT1 0,00409), Fibronectin 1 (C, p-Values WT-MUT1 0,0375 und

VEK-MUT1 0,0295) und Glattmuskel-Aktin (D, p-Values WT-MUT1 0,0198 und VEK-MUT1 0,0199). Alle Werte wurden jeweils auf die Expression von beta-Aktin als Referenz-Gen normalisiert.

4.3.2 Untersuchungen zur Protein-Expression von Interleukin-18 (IL-18)

Da IL-18 auf RNA-Ebene eine signifikant erhöhte Expression in LLC-PK1_{MUT1} Zellen aufwies, wurde darüber hinaus noch die Protein-Expression quantifiziert. Drei Wochen induzierte LLC-PK1_{WT} und LLC-PK1_{MUT1} Zellen und zwei Wochen induzierte und eine Woche ohne Induktion kultivierte LLC-PK1_{WT} und LLC-PK1_{MUT1} Zellen wurden geerntet und das Zell-Lysat mit einem porcinen IL-18 ELISA Kit (siehe 3.2.1.5) untersucht. Es wurden zwei verschiedene Versuchsbedingungen gewählt, weil in vorherigen Studien beobachtet werden konnte, dass Tetrazyklin bzw. das halb-synthetische Minocyclin (Tetrazyklin der zweiten Generation) ein potenter Inhibitor der Expression von Caspase-1 und Matrix-Metalloproteasen (MMP) ist^{86,90,91}. Da die Aktivierung von pro-IL-18 abhängig von Caspase-1 ist, sollte eine mögliche Inhibition der Caspase durch Tetrazyklin im zweiten Versuchsansatz ausgewaschen werden.

Die Zellen, die das mutierte FAP2 überexprimierten, wiesen hierbei in beiden Versionen des Experiments (Abb. 23 A: drei Wochen Induktion, B: zwei Wochen Induktion plus eine Woche auswaschen) einen signifikant höheren Wert an intrazellulär gemessenen IL-18 auf.

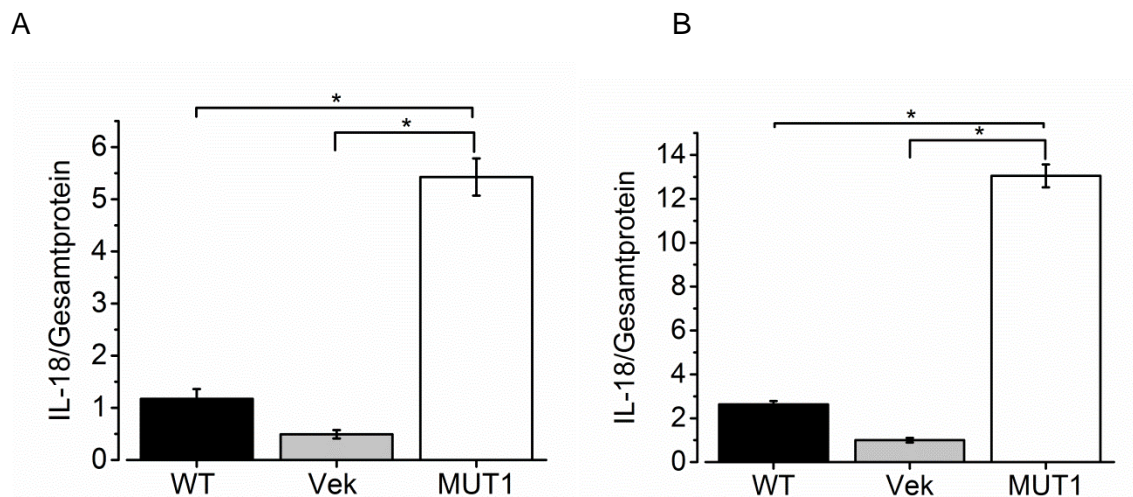


Abbildung 23: Intrazelluläre IL-18 Messung am FAP2-Zellmodell mittels ELISA

Bei diesem Experiment wurden FAP2-Zellen einmal für drei Wochen (A) mit Tetrazyklin induziert und einmal für zwei Wochen induziert und eine weitere Woche ohne Tetrazyklin kultiviert (B). Die Lysate der geernteten Zellen wurden mit Hilfe eines IL-18 ELISA nach Herstellerangaben vermessen. Bei beiden Experimenten zeigten die Zellen mit FAP2_{MUT1} eine signifikant höhere IL-18 Protein-Expression als die Zellen mit FAP2_{WT} oder Vektor-Zellen (n = 3 in allen Gruppen, A p-Values WT-MUT1 0,002 und VEK-MUT1 0,004, B p-Values WT-MUT1 0,001 und VEK-MUT1 0,001).

Auf den identischen Proben der Zell-Lysate von Versuchsaufbau 1 wurden zusätzlich noch Western Blots zur Quantifizierung der IL-18 Protein-Expression durchgeführt. Auch im Western Blot zeigte sich das gleiche Bild wie bereits im ELISA: Zell-Lysate mit FAP2_{MUT1} enthielten signifikant mehr IL-18 als die Kontrollzellen mit FAP2_{WT} oder Vektor-Zellen (Abb. 24).

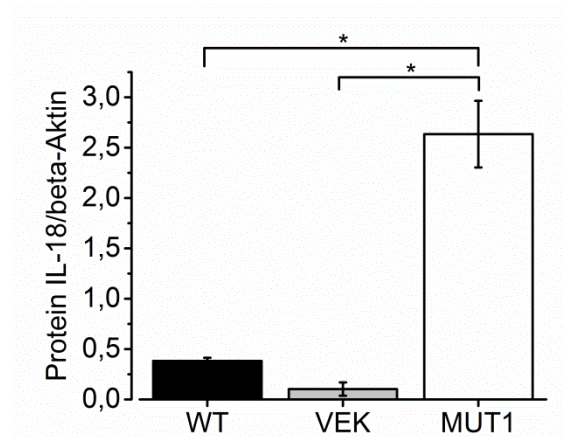


Abbildung 24: Intrazelluläre IL-18 Messung am FAP2-Zellmodell mittels Western Blot

Drei Wochen induzierte FAP2-Zellen zeigten das gleiche Expressionsmuster von IL-18 wie zuvor mittels IL-18 ELISA bestimmt. Die Zellen mit FAP2_{MUT1} zeigten einen signifikant höheren Wert an IL-18 als die Zellen mit FAP2_{WT} oder Vektor-Zellen (n = 3 in allen Gruppen, p-Values WT-MUT1 0,0067 und VEK-MUT1 0,0038).

Auch über Immunfluoreszenz konnte eine erhöhte Menge an intrazellulärem IL-18 in LLC-PK1_{MUT1} Zellen nachgewiesen werden. Die Zellen wurden zunächst zwei Wochen mit Tetrazyklin induziert und anschließend noch eine weitere Woche ohne Induktion weiter kultiviert. In LLC-PK1_{WT} und LLC-PK1_{VEK}-Zellen war fast keine IL-18 Färbung sichtbar, die Überexpression von FAP2_{MUT1} hingegen schien zu einer intrazellulären Akkumulation von IL-18 zu führen (Abb. 25).

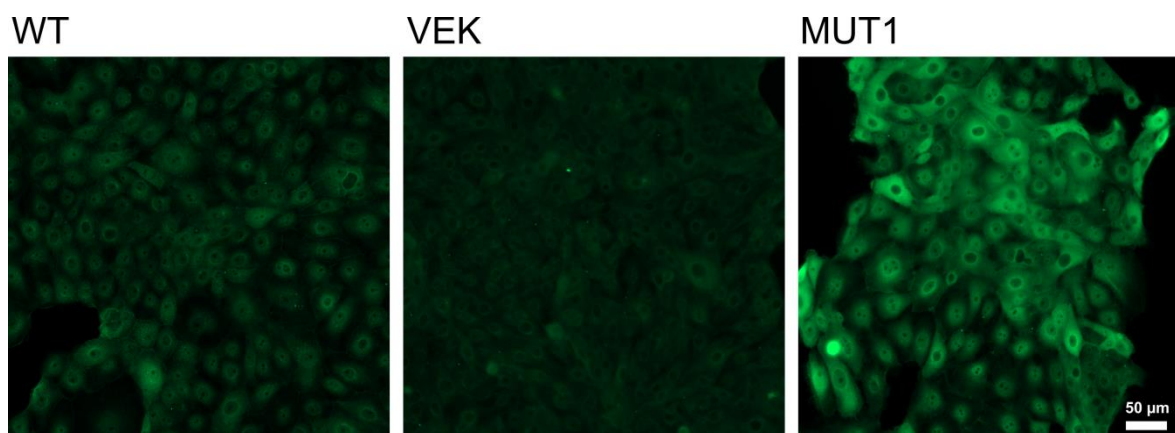


Abbildung 25: Intrazelluläre IL-18 Färbung am FAP2-Zellmodell mittels Immunfluoreszenz

Zwei Wochen induzierte FAP2-Zellen zeigten auch in Immunfluoreszenz-Experimenten die gleiche Expression von IL-18 wie bereits im IL-18 ELISA und im IL-18 Western Blot. Die Zellen mit

FAP2_{MUT1} zeigten eine höhere intrazelluläre Expression von IL-18 als die Zellen mit FAP2_{WT} oder mit FAP2_{VEK}.

4.3.3 Untersuchung auf Protein-Expression von Fibronektin (FN1)

Um die erhöhte Expression von Fibronektin mRNA bei LLC-PK1_{MUT1} Zellen auf Protein-Ebene zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenz-Färbungen mit einem gegen Fibronektin gerichteten Antikörper durchgeführt. LLC-PK1_{WT}, LLC-PK1_{VEK} und LLC-PK1_{MUT1} Zellen wurden für die Färbungen für zwei Tage mit Tetrazyklin induziert und anschließend, wie unter 3.2.1.3 beschrieben, gefärbt. Fibronektin zeigte sich dabei als extrazelluläre, netzartige Ablagerung am Schalenboden. Bei LLC-PK1_{WT} und LLC-PK1_{VEK} Zellen waren nur kleine Fibronektinablagerungen zu erkennen, bei FAP2_{MUT1}-Expression hingegen war FN1 großflächig verteilt (Abb. 26).

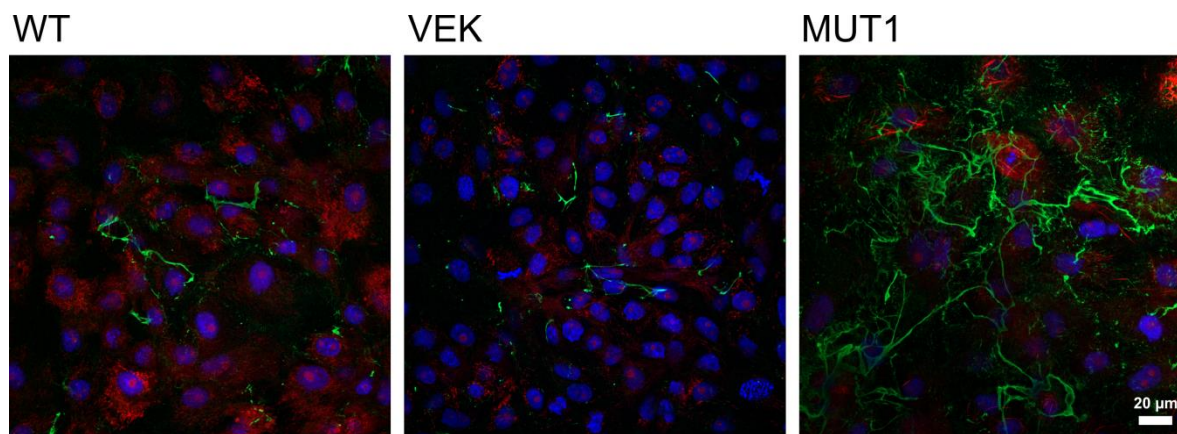


Abbildung 26: Immunfluoreszenz auf Fibronektin im FAP2-Zellmodell

Zwei Tage induzierte FAP2 Zellen zeigten LLC-PK1_{WT} und LLC-PK1_{VEK} Zellen nur sehr geringe extrazelluläre Ablagerungen an Fibronektin (grün). Zellen mit mutiertem FAP2_{MUT1} hingegen sonderten große Mengen an Fibronektin extrazellulär ab. Weiterhin wurde auch noch ein Mitochondrienmarker gefärbt (rot), um den Erfolg der Induktion zu überprüfen. LLC-PK1_{WT} Zellen zeigten dabei ein normales mitochondriales Netzwerk, in LLC-PK1_{MUT1} Zellen zeigten sich die verlängerten Mitochondrien.

4.4 Funktionelle Untersuchung an FAP2-Zellen

Durch die histologischen Untersuchungen von Zellen und Patienten-Proben konnte beobachtet werden, dass die Morphologie von Mitochondrien durch die Mutation in FAP2 stark verändert war. Aus diesem Grund sollte weitergehend untersucht werden, ob auch eine Veränderung der respiratorischen Funktion der Mitochondrien vorlag. Dazu wurde der Sauerstoffverbrauch als indirektes Maß für die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) der induzierten FAP2-Zellen am Respirometer „Seahorse“ der Firma Agilent gemessen. Die Messwerte aus dem Gerät wurden auf den DNA-Gehalt als indirektes Maß für die Zellzahl normalisiert. Für die Messungen wurden Zellen einmal eine Woche lang mit Tetrazyklin und einmal drei Wochen mit Tetrazyklin induziert. Es wurde vermutet, dass

der respiratorische Phänotyp mit der Dauer der Induktion zunimmt, da die FAP2-Filamente nicht mehr gänzlich abgebaut werden können. Zellen, die eine Woche mit Tetrazyklin induziert waren, zeigten keinen Unterschied in ihrer Grundatmung oder dem Protonenleck, egal ob sie FAP2_{WT} oder FAP2_{MUT1} überexprimierten. Allerdings zeigten FAP2_{MUT1} Zellen eine signifikante Verringerung der maximalen Respiration, der ATP-Produktion und der Reservekapazität im Vergleich zu FAP2_{WT} (Abb. 27 A). Wurden allerdings Zellen gemessen, die zuvor drei Wochen lang mit Tetrazyklin induziert waren, waren die Werte zwischen FAP2_{WT} und FAP2_{MUT1} nicht mehr signifikant unterschiedlich (Abb. 27 B). Die Expression von FAP2_{MUT1} schien demnach einen Einfluss auf die oxidative Phosphorylierung der Zellen zu haben, vermutlich aber starben Zellen, die viele pathologisch veränderte Mitochondrien hatten, nach einiger Zeit ab. Hauptsächlich Zellen, die das transfizierte Produkt verloren hatten, überlebten und der Effekt der FAP2_{MUT1} Expression ging verloren.

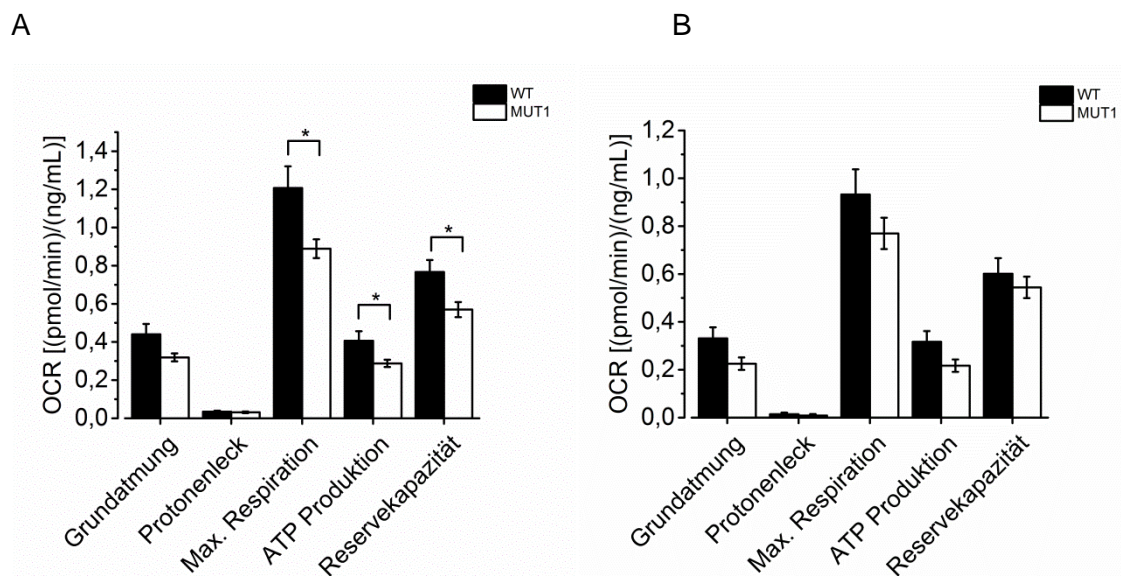


Abbildung 27: Respirometrische Untersuchung nach 1 Woche und 3 Wochen Induktion

LLC-PK1_{WT} und LLC-PK1_{MUT1} Zellen wurden nach einer Woche Induktion mit Tetrazyklin im Respirometer „Seahorse“ vermessen. Die Grundatmung und das Protonenleck waren in beiden Zell-Typen gleich. Allerdings zeigten LLC-PK1_{MUT1} Zellen eine signifikant verringerte maximale Respiration, ATP-Produktion und Rest-Kapazität (A, n = 12 in allen Gruppen, p-Values maximale Respiration 0,021, ATP-Produktion 0,045 und Restkapazität 0,015). Nach drei Wochen Induktion wurden ebenfalls Zellen im „Seahorse“ vermessen. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen LLC-PK1_{WT} und LLC-PK1_{MUT1} Zellen mehr zu erkennen (B) (n = 12 in allen Gruppen).

4.5 Untersuchung des Nieren-Phänotyps von FAP2 Knockout Mäusen

Um zu untersuchen, ob die verminderte Expressionsstärke von FAP2 bei heterozygoten Patienten zu dem Krankheitsbild führt, also ob die Erkrankung durch eine Haploinsuffizienz verursacht wird, wurde die FAP2 Knockout Maus untersucht. Über histologische Untersuchungen und Urin-Messungen sollte untersucht werden, ob FAP2^{-/-} Knockout Mäuse durch das Fehlen von FAP2 ein renales Fanconi-Syndrom entwickeln. In vorausgegangenen Studien konnte bei FAP2^{-/-} Knockout Mäusen starke muskuläre Atrophie durch das Fehlen von Kreatin nachgewiesen werden^{31,92}. Der renale Phänotyp dieser Tiere wurde allerdings bisher noch nicht untersucht.

4.5.1 Expression von FAP2 mRNA im FAP2 Knockout Maus-Modell

Zur Kontrolle der FAP2-Expression in den Nieren der Tiere wurde eine quantitative Real-time PCR auf Nierengewebe von FAP2^{+/+} Knockout (homozygote Wildtyp Mäuse, WT) und FAP2^{-/-} Knockout Mäusen (homozygote Knockout Mäuse, KO) durchgeführt. Hierbei zeigten die FAP2^{-/-} Knockout Mäuse kaum FAP2 Expression auf RNA-Level (Abb. 28). Da der Knockout von FAP2 über eine Deletion von Exon 3 erreicht wurde, kann noch eine Restexpression von FAP2 nachgewiesen werden, allerdings eines kürzeren Fragmentes⁹². Möglicherweise banden die benutzten Primer in geringer Affinität an das verkürzte Knockout Produkt der mRNA.

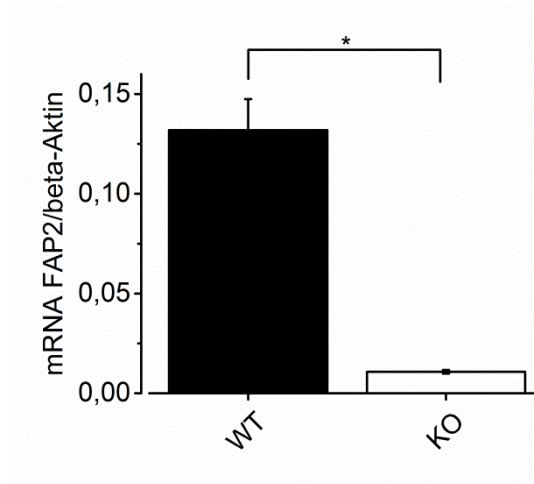


Abbildung 28: mRNA-Expression von FAP2 in Nieren von FAP2^{+/+} und FAP2^{-/-} Knockout Mäusen

Die mRNA-Expression von FAP2 in Nieren der Knockout Mäuse war kaum nachweisbar verglichen mit der Expression in Wildtyp-Kontrollen (WT: n = 6, KO: n = 5, p = 0,0006).

4.5.1.2 Körpergröße

Im Vergleich zu gleichaltrigen homozygoten FAP2^{+/+} Knockout und heterozygoten FAP2^{+/-} Knockout Geschwistertieren waren die homozygoten FAP2^{-/-} Knockout-Tiere deutlich kleiner, was auf eine Gedeihstörung der Tiere durch komplettes Fehlen von FAP2 schließen ließ⁹². Da FAP2^{+/-} Knockout Mäuse von FAP2^{+/+} Knockout Mäusen äußerlich nicht zu unterscheiden waren, ist in Abb. 29 kein heterozygoten Tier gezeigt. Die Phänotypisierung durch Choe *et al.* 2012 zeigte bei den FAP2^{-/-} Knockout Mäusen signifikant verringertes Gewicht und Körperfett verglichen mit FAP2^{+/+} Knockout Mäusen⁹².

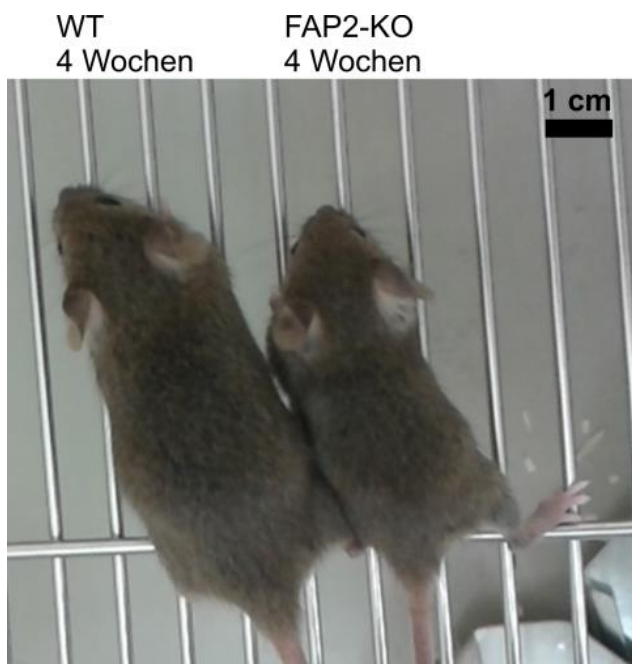


Abbildung 29: Größenvergleich von FAP2^{+/+} und FAP2^{-/-} Knockout Mäusen
Mäuse, die einen FAP2 Knockout haben, sind deutlich kleiner als gleichaltrige Wildtyp-Geschwister.

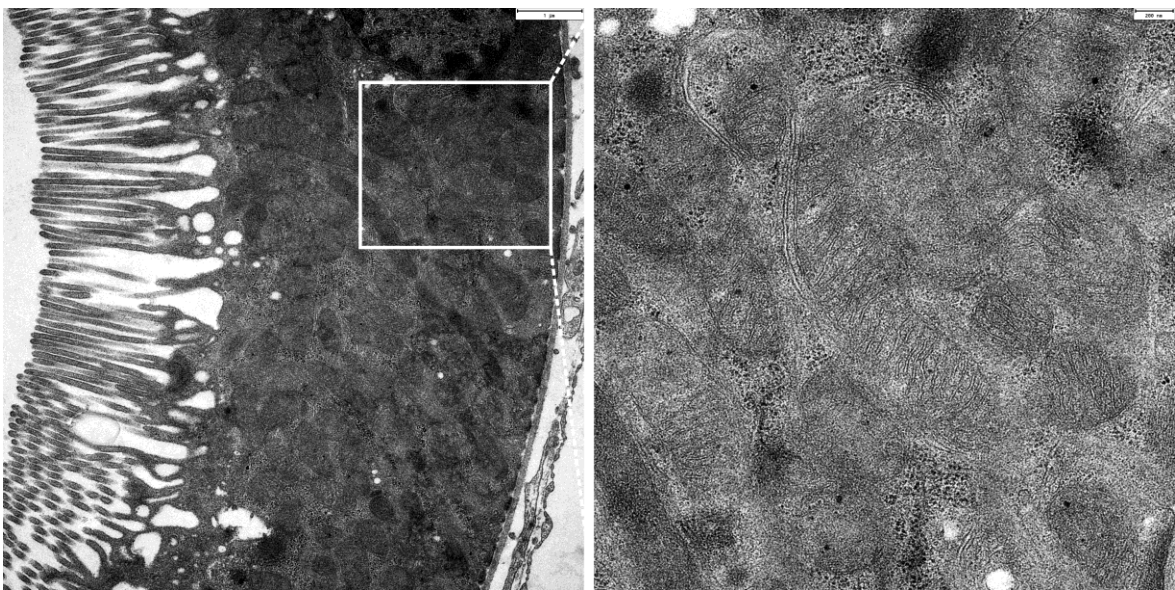
4.5.2 Histologische-Untersuchungen der FAP2 Knockout Maus

4.5.2.1 Elektronenmikroskopie

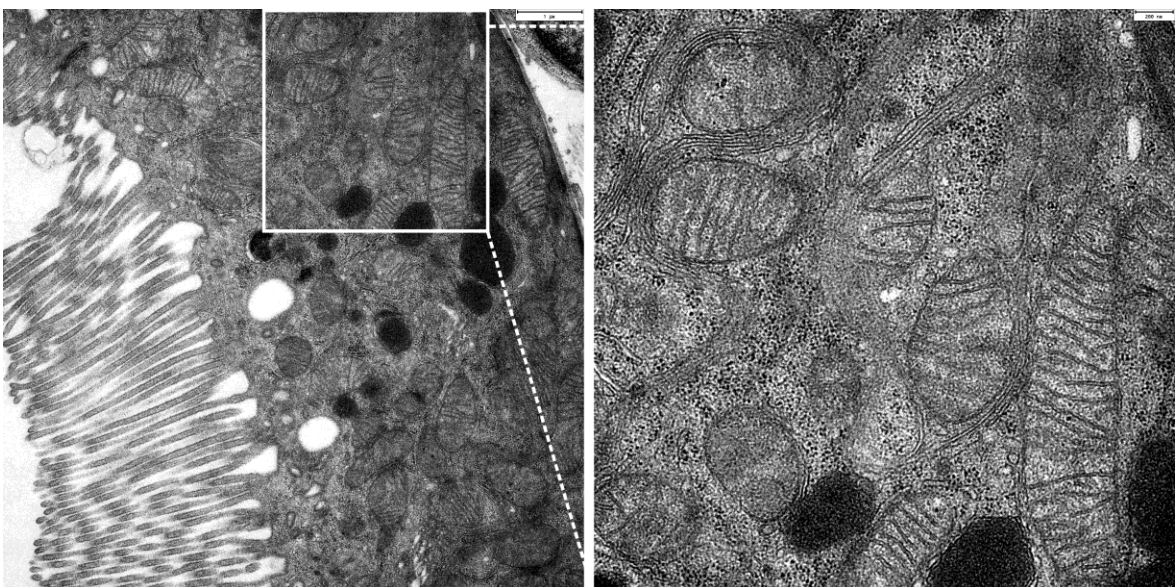
Da in den vorausgegangenen Untersuchungen am LLC-PK1 Zellmodell und an der Patientenbiopsie eine stark veränderte Mitochondrien-Morphologie bzw. auch eine pathologische Veränderung des renalen Gewebes beobachtet werden konnte, sollten auch die FAP2 Knockout Mäuse diesbezüglich untersucht werden. Um die Histologie der Mitochondrien bei einem FAP2-Knockout genauer zu untersuchen, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen von Nieren aus jeweils 15 Wochen alten FAP2^{+/+} und FAP2^{-/-} Knockout Mäusen angefertigt. In den Proben beider Mäuse konnten die

Mitochondrien hauptsächlich basolateral gelegen in den proximalen Tubuluszellen, erkennbar durch den Bürstensaum an der luminalen Seite, beobachtet werden (Abb. 30 A und B, linke Bilder). Sowohl bei FAP2^{+/+} Knockout, als auch bei FAP2^{-/-} Knockout Mäusen zeigten die Mitochondrien eine normale Morphologie mit Doppelmembran und Cristae (Abb. 30 A und B, rechte Bilder). Filamente in den Mitochondrien, wie sie bei der Patientenbiopsie zu erkennen waren, waren bei den Mäusen nicht zu sehen. Auch bei der Anzahl der Mitochondrien war zwischen den beiden Gruppen kein Unterschied zu erkennen. Die Glomeruli der FAP2^{-/-} Knockout Mäuse zeigten ebenfalls keine abweichende Morphologie (Abb. 30 C und D).

A: Proximaler Tubulus einer FAP2^{+/+} Knockout Maus



B: Proximaler Tubulus einer FAP2^{-/-} Knockout Maus



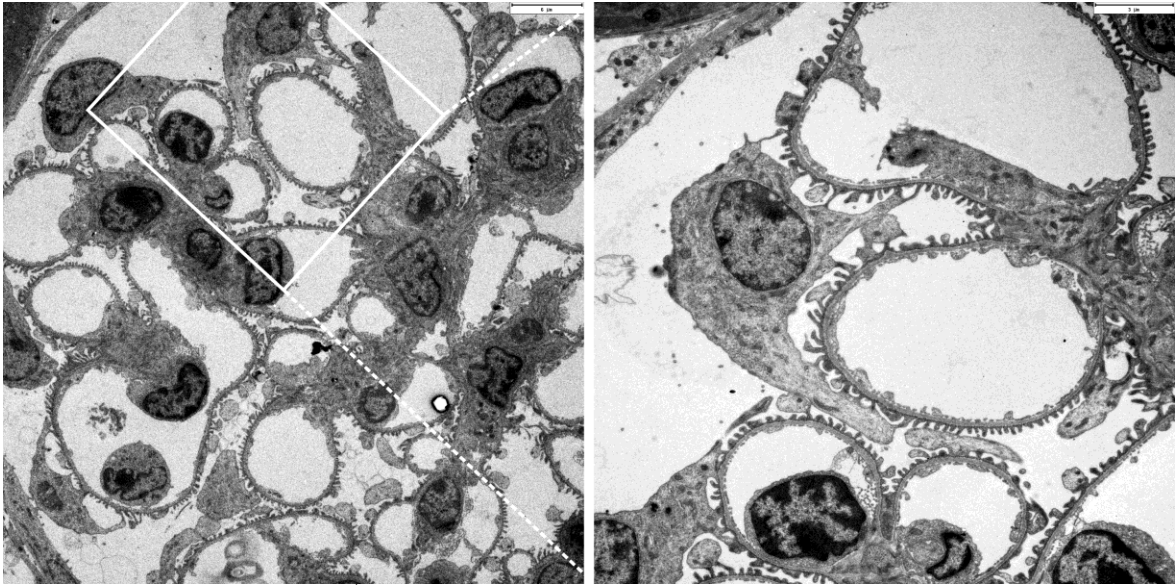
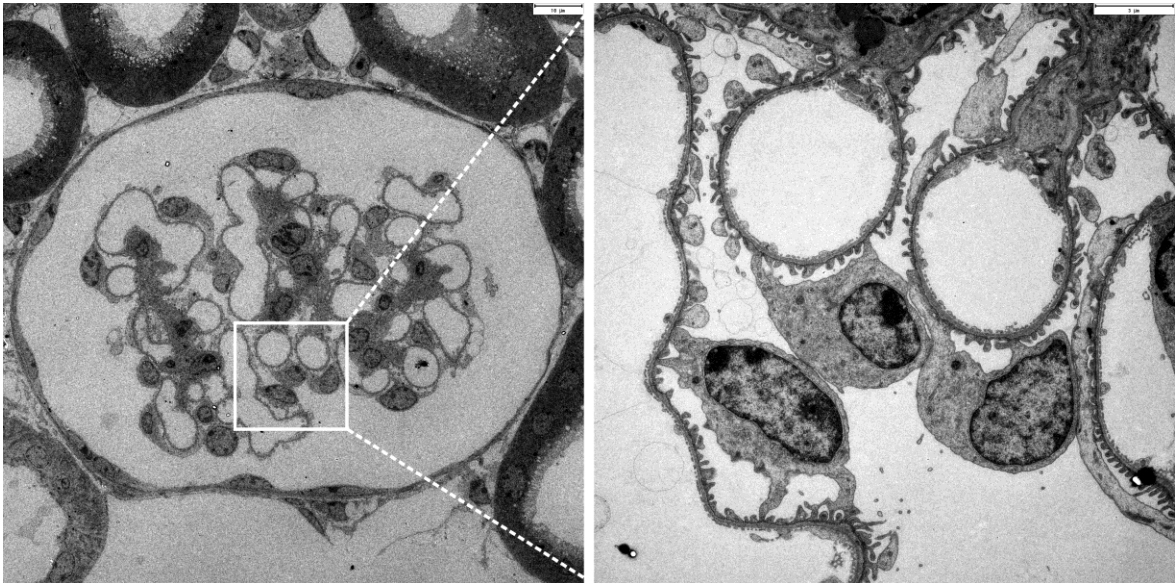
C: Glomerulus einer FAP2^{+/+} Knockout MausD: Glomerulus einer FAP2^{-/-} Knockout Maus

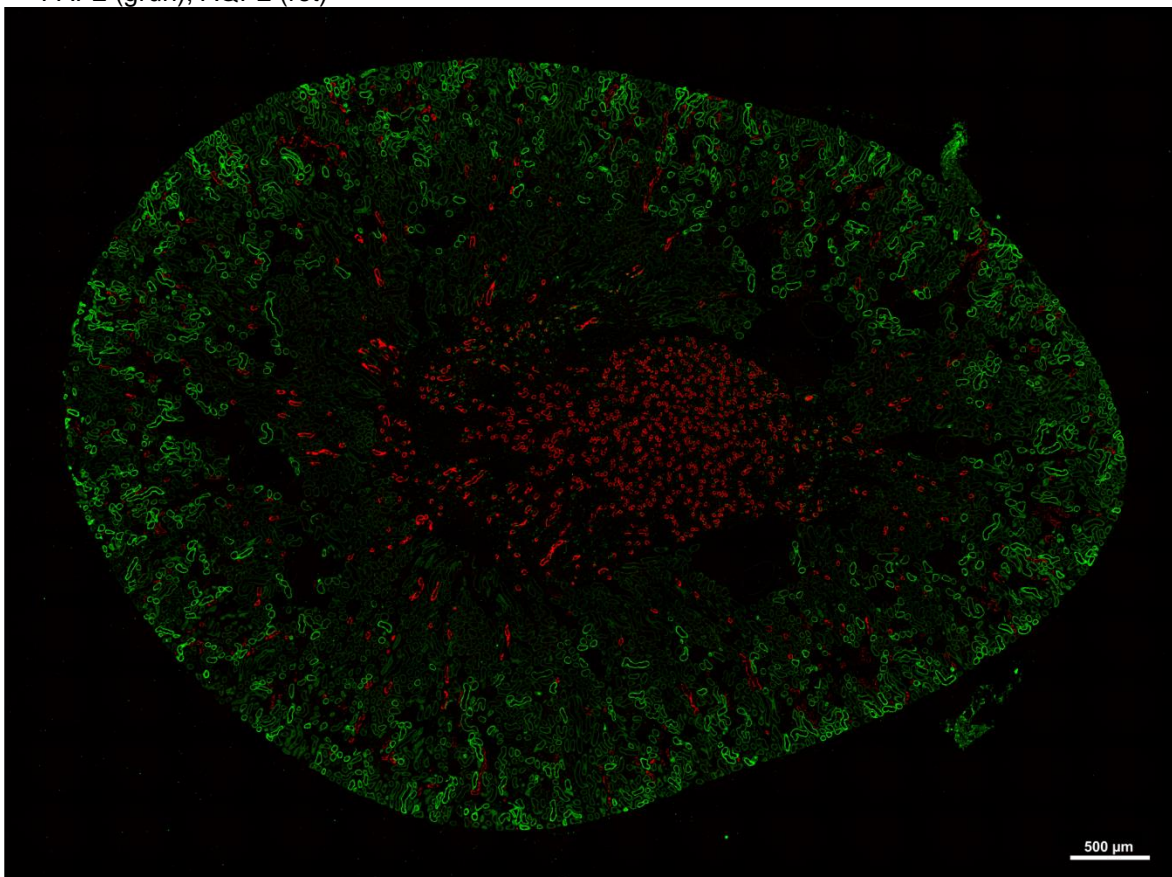
Abbildung 30: Elektronenmikroskopie der Niere einer FAP2^{+/+} Knockout Maus und einer FAP2^{-/-} Knockout Maus

Mitochondrien sind vor allem auf der basolateralen Seite der proximalen Tubuluszellen angeordnet (linkes Bild A und B) und zeigen sowohl in FAP2^{+/+} Knockout, als auch in FAP2^{-/-} Knockout Mäusen eine normale Morphologie mit der Doppelmembran und den Cristae (rechtes Bild A und B). Auch in den Glomeruli waren keine morphologischen Unterschiede zwischen den Mäusen zu erkennen (C und D). Alter der Mäuse jeweils 15 Wochen.

4.5.2.2 Immunfluoreszenz-Färbungen

Um den Knockout von FAP2 auch auf Protein-Ebene zu zeigen, wurden Immunfluoreszenz-Färbungen auf Nieren von Mäusen durchgeführt (Abb. 31). Dazu wurden Kryoschnitte einer FAP2^{+/+} Knockout Maus (13 Wochen alt) und einer FAP2^{-/-} Knockout Maus (10 Wochen alt) untersucht. Gefärbt wurden die Schnitte jeweils auf FAP2 (grün) und Aquaporin2 (AQP2, rot). In der FAP2^{+/+} Knockout Maus zeigte sich die erwartete FAP2-Färbung in den frühen proximalen Tubuli im Cortex der Niere. Der Antikörper, der auch für die Immunfluoreszenz-Färbungen der Zellkulturexperimente und den Untersuchungen der Patienten-Biopsien verwendet wurde, zeigte sich auf murinem Gewebe ebenfalls spezifisch. AQP2 wurde als Marker für Sammelrohre gefärbt, die sich hauptsächlich in der Medulla, aber auch weniger häufig im Cortex befinden. In der FAP2^{-/-} Knockout Maus (Abb. 31 B) war die charakteristische AQP2-Verteilung wie in der FAP2^{+/+} Knockout Maus zu sehen, allerdings wie erwartet keine FAP2-Färbung.

A: Immunfluoreszenz-Färbung auf die Niere einer FAP2^{+/+} Knockout Maus
FAP2 (grün), AQP2 (rot)



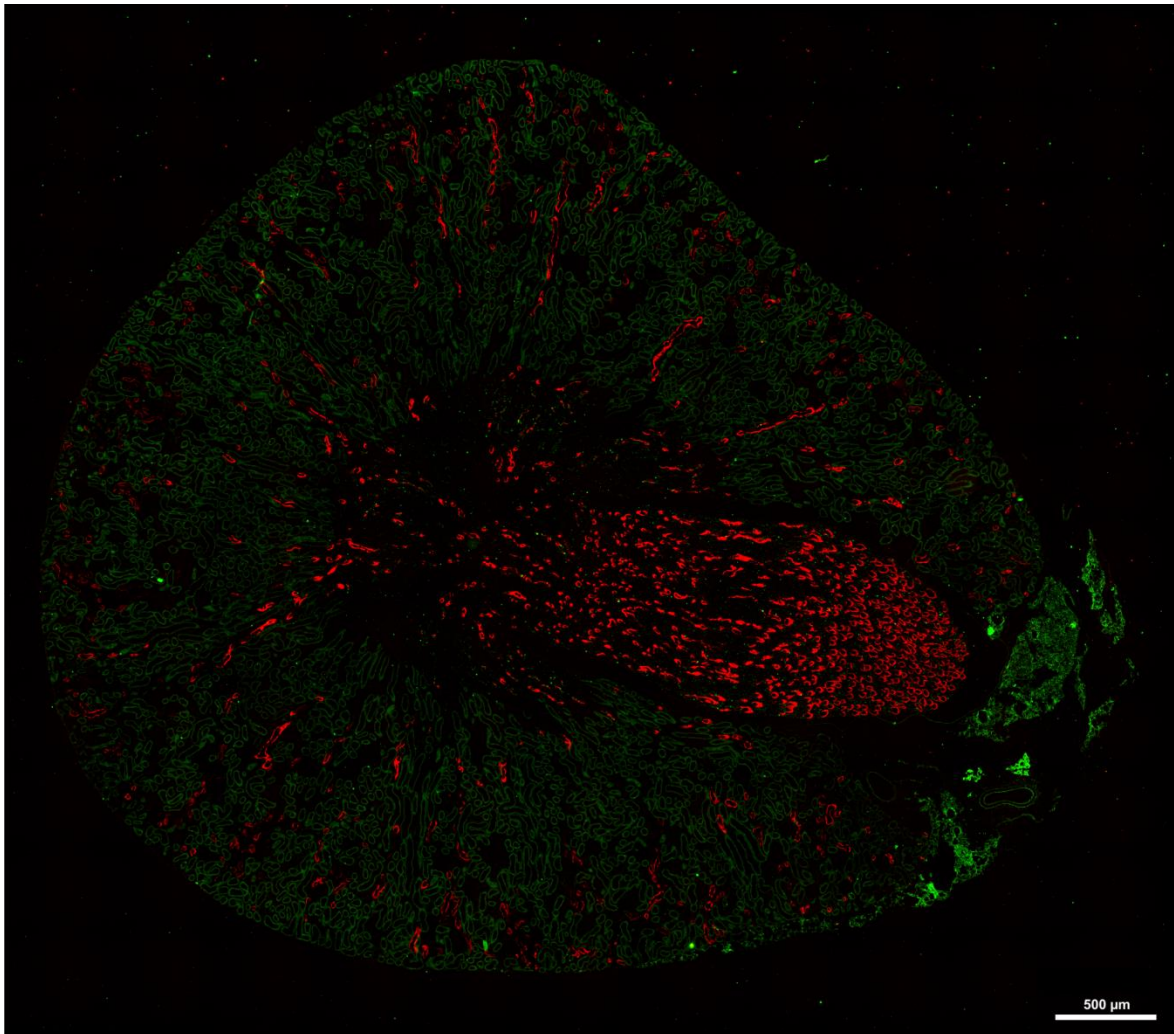
B: Immunfluoreszenz-Färbung auf die Niere einer FAP2^{-/-} Knockout Maus

Abbildung 31: Immunfluoreszenz-Färbungen auf Nieren von FAP2^{+/+} und FAP2^{-/-} Knockout Mäusen

Gefärbt wurden auf den murinen Nieren jeweils FAP2 (grün) und Aquaporin2 (rot). Die charakteristische Aquaporin2-Färbung der Sammelrinne war in beiden Färbungen zu erkennen. In der FAP2^{+/+} Knockout Maus war FAP2 in den frühen proximalen Tubuli im Cortex der Niere detektierbar (A). In der FAP2^{-/-} Knockout Maus war keinerlei FAP2-Färbung erkennbar (B).

4.5.3 Urin-Untersuchungen der FAP2 Knockout Maus

Um zu untersuchen, ob der Knockout von FAP2 zur Entwicklung eines Fanconi-Syndroms wie in den Patienten führt, wurde auch der Urin der FAP2 Knockout Mäuse untersucht. Für dieses Experiment wurde von jeweils 6 FAP2^{+/+} und FAP2^{-/-} Knockout Mäusen Spontanurin gesammelt. In den Urinen wurde die Osmolalität mit Hilfe eines Osmometers bestimmt, da sich die Kreatinin-Werte im Urin durch den Knockout von FAP2 nicht zur Standardisierung eignen. Die FAP2^{-/-} Knockout Mäuse zeigten dabei eine signifikant erhöhte Osmolalität (Abb. 32). Die FAP2^{-/-} Knockout-Tiere zeigten in der phänotypischen Untersuchung von Choe *et al.* einen erhöhten prozentualen Wasseranteil im Körper ⁹², der

möglicherweise die erhöhte Osmolalität im Urin erklären könnte, wenn das Wasser im Körper zurückgehalten wird.

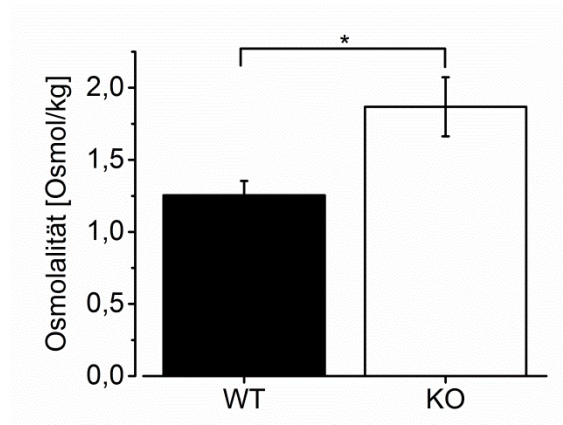


Abbildung 32: Osmolalität im Urin von FAP2^{+/+} und FAP2^{-/-} Knockout Mäusen

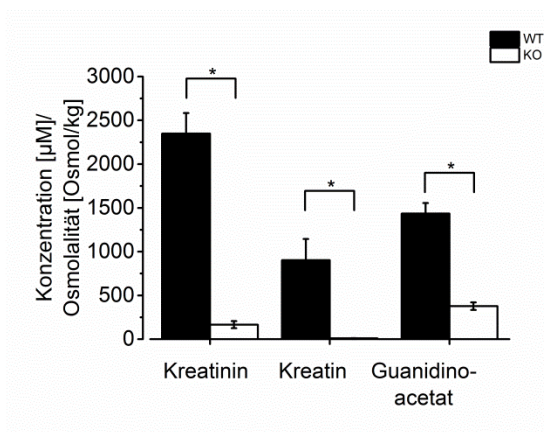
Es wurde Spontanurin von FAP2^{+/+} Knockout und FAP2^{-/-} Knockout Mäusen gesammelt und am Osmometer vermessen. Die KO Mäuse zeigten dabei eine signifikant erhöhte Osmolalität im Urin (n = 6 in beiden Gruppen, p = 0,03).

Weiterhin wurden die Urin-Proben auch im Ionenchromatographen auf Elektrolyte, sowie die Urin- und Plasma-Proben am Institut für funktionelle Genomik im Biopark Regensburg auf organische Substanzen vermessen. Die FAP2^{-/-} Knockout Mäuse zeigten im Vergleich zu den FAP2^{+/+} Knockout Mäusen den erwarteten signifikanten Kreatin- und Kreatinin-Mangel, sowohl in Urin (Abb. 33 A), als auch im Plasma (Abb. 33 B), da FAP2 an der Kreatin-Biosynthese beteiligt ist ⁹². Die Konzentration an Guanidinoacetat im Plasma war erstaunlicherweise nicht verändert (Abb. 33 B), im Urin hingegen, wie erwartet ⁹² signifikant verringert (Abb. 33 A). Guanidinoacetat entsteht aus der Übertragung einer Guanidinogruppe von L-Arginin auf Glycin ⁸⁰ und wird von FAP2 katalysiert. Durch den Knockout von FAP2 in den Mäusen wäre eine verringerte Konzentration von Guanidinoacetat zu erwarten gewesen.

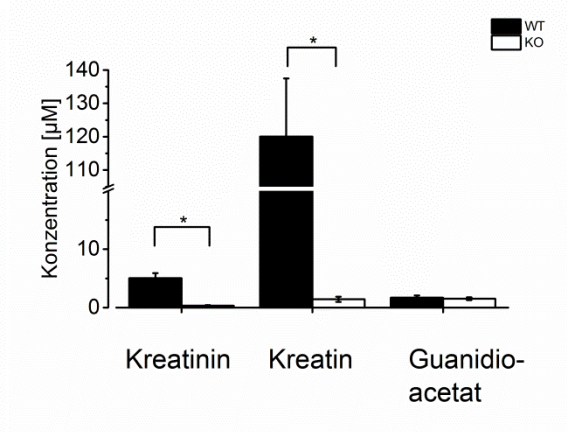
Im Plasma war zudem die Lactat-Konzentration bei den FAP2^{-/-} Knockout Tieren signifikant erniedrigt (Abb. 33 D). Lactat lag bei beiden Gruppen im Urin unterhalb der Detektionsgrenze (Abb. 33 C). Im Urin war weiterhin die Konzentration an Guanidinoacetat bei den FAP2^{-/-} Knockout Tieren signifikant verringert (Abb. 33 A), alle vermessenen Aminosäuren waren unauffällig, bis auf Serin, Threonin, Tryptophan und Phenylalanin. Bei diesen zeigten die FAP2^{-/-} Knockout Tiere einen signifikant erhöhten Wert im Urin (Abb. 33 E). Im Plasma war kein Unterschied bei allen vermessenen Aminosäuren zwischen FAP2^{+/+} Knockout und FAP2^{-/-} Knockout Mäusen (Abb. 33 F). Pyruvat war signifikant erhöht im Urin der FAP2^{-/-} Knockout Mäuse (Abb. 33 C), welches zusammen mit Lactat als Marker für eine Mitochondriopathie vermessen wurde. Die vermessenen Elektrolyte im Urin waren allesamt nicht signifikant verändert zwischen

FAP2^{+/+} Knockout und FAP2^{-/-} Knockout Mäusen (Abb. 33 G). Die FAP2^{-/-} Knockout Mäuse zeigten keine nachweislichen Symptome eines renalen Fanconi-Syndroms. Bei den Patienten waren Glucosurie, eine generalisierte Hyperaminoacidurie, eine „low-molecular-weight“ Proteinurie und eine metabolische Azidose messbar.

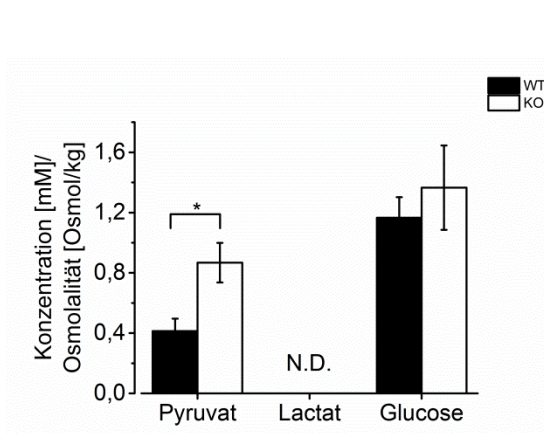
A: Urin



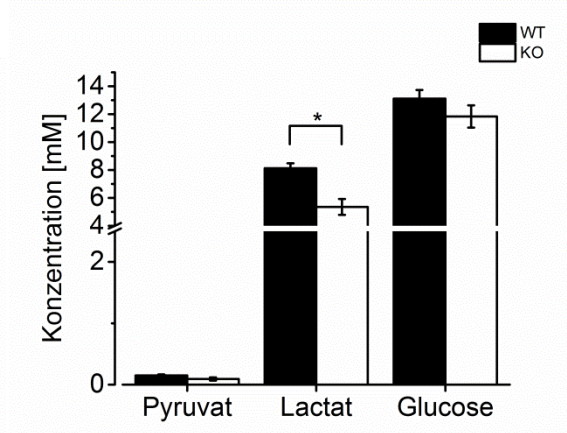
B: Plasma



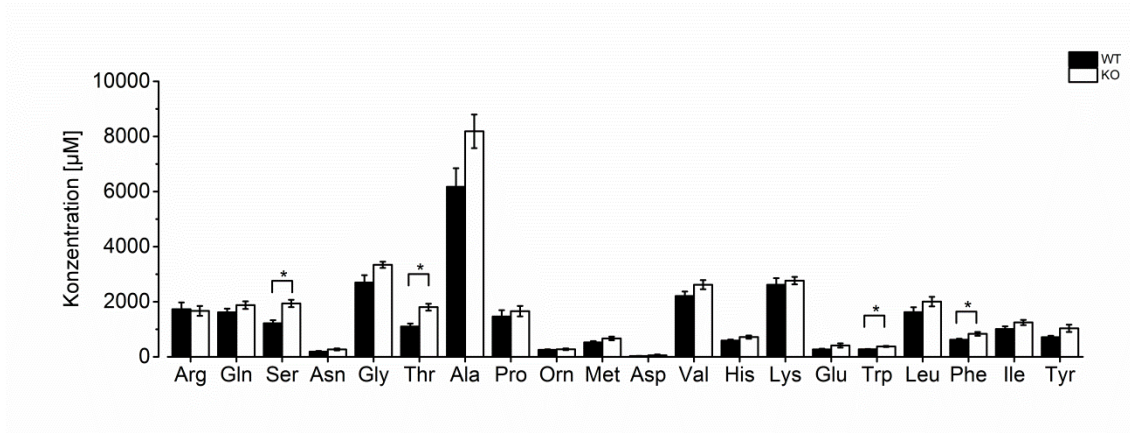
C: Urin



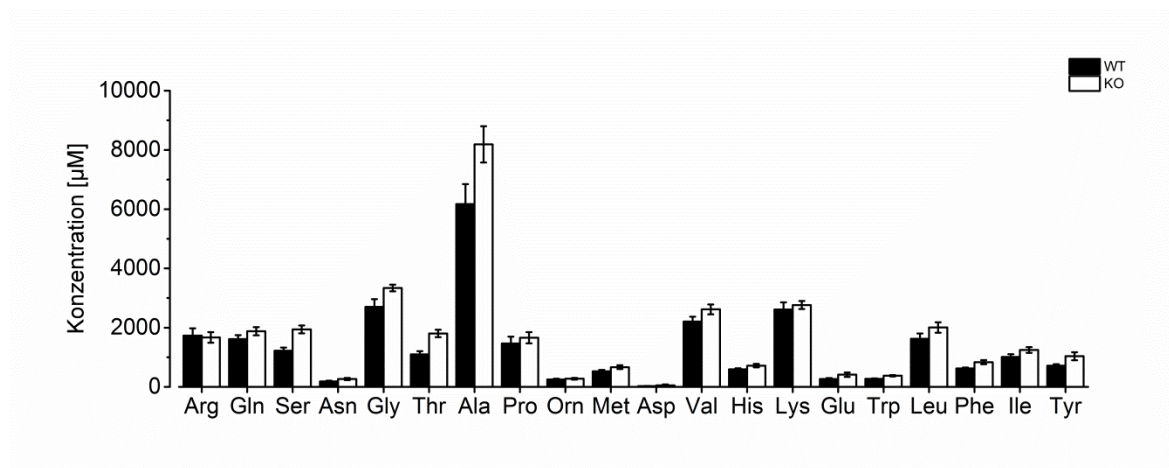
D: Plasma



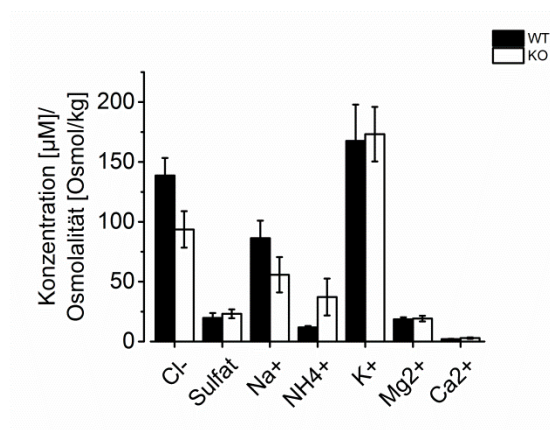
E: Aminosäuren im Urin



F: Aminosäuren im Plasma



G: Elektrolyte im Urin

**Abbildung 33: Urin- und Plasma Messungen von FAP2^{+/+} und FAP2^{-/-} Knockout Mäusen**

Um zu testen, ob FAP2^{-/-} Knockout Mäuse an einem Fanconi-Syndrom leiden, wurde Spontanurin der Tiere auf das typische Ausscheidungsmuster von Patienten hin untersucht. Ferner wurde die FAP2 Enzymaktivität durch Messung von Substraten des Kreatin-Synthesewegs analysiert (n = 6 in beiden Gruppen). Die FAP2^{-/-} Knockout Mäuse zeigten einen signifikant geringeren Wert an Kreatinin (Urin: p = 0,0002, Plasma: p = 0,00258) und Kreatin (Urin: p = 0,014, Plasma: p = 0,00104) in Urin (A) und Plasma (B). Im Urin wiesen die FAP2^{-/-} Knockout Mäuse auch einen verringerten Wert an Guanidinoacetat auf (A, p = 0,0001). Die Aminosäuren im Plasma zeigten keinerlei Unterschiede (F). Im Urin wiesen Serin, Threonin Tryptophan und Phenylalanin bei den FAP2^{-/-} Knockout Mäusen eine höhere Konzentration auf (E, p-Values Ser 0,00208, Thr 0,00172, Trp 0,0039, Phe 0,02534). Im Urin war zusätzlich noch Pyruvat höher bei den FAP2^{-/-} Knockout Mäusen (C, p = 0,02307). Lactat war in den Urinproben beider Gruppen nicht messbar (C, nicht detektierbar, N.D.), während im Plasma Lactat in den FAP2^{-/-} Knockout Mäusen signifikant verringert war (D, p = 0,0031). Bei den Elektrolyten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen FAP2^{+/+} und FAP2^{-/-} Knockout Mäusen (G).

4.6 Fütterungsexperimente

Um zu testen, ob durch unterschiedliche Zusätze im Trinkwasser die Expression von FAP2 in Mäusen beeinflusst werden kann, wurden zwei unterschiedliche Experimente durchgeführt. Für eine mögliche Behandlung der Patienten sollte in einem Experiment untersucht werden, ob die Expression von FAP2 durch eine Supplementation mit Kreatin als negative Rückkopplung reduziert werden kann. Die Patienten zeigen das renale Fanconi-Syndrom bereits im Kindesalter, das akute Nierenversagen tritt allerdings erst zwischen 30 – 60 Jahren auf. Um den Phänotyp von FAP2 Knockin Mäusen, die die Mutation eines Patienten tragen, zu stimulieren, wurde getestet, ob die FAP2 Expression durch eine Supplementation mit L-Arginin als Substrat für FAP2 erhöht werden kann.

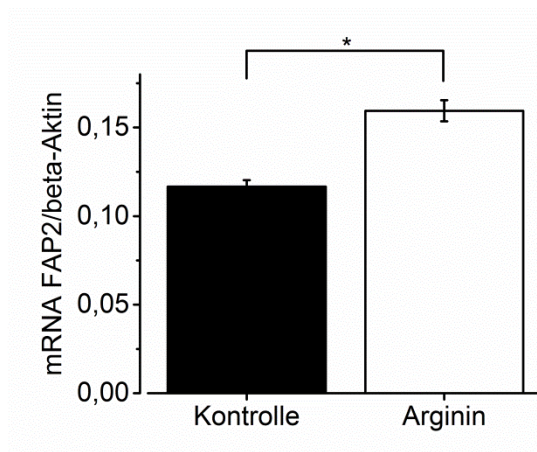
4.6.1 Arginin-Versuch

L-Arginin ist eines der beiden Substrate für den ersten Reaktionsschritt der Kreatin-Biosynthese. Aus der Übertragung einer Guanidinogruppe von L-Arginin auf Glycin entsteht Guanidinoacetat, welches im zweiten Reaktionsschritt methyliert wird⁸⁰. Da der erste Reaktionsschritt von FAP2 katalysiert wird, lag die Überlegung nahe, dass eine Supplementation mit einem Substrat die Expression erhöhen kann.

4 männliche Kontrollmäuse erhielten Leitungswasser mit 5% Saccharose und 4 männlichen Versuchstiere Leitungswasser mit 5% Saccharose (w/v) und zusätzlich 1% L-Arginin (w/v) im Trinkwasser. Die Zugabe von Saccharose war notwendig, da L-Arginin einen bitteren Geschmack hat und die Mäuse Trinkwasser mit ausschließlich L-Arginin nicht trinken. Nach zwei Wochen wurden die Tiere durch cervikale Dislokation getötet und die Nieren für die Analyse des Experiments entnommen. Die Tiere der Versuchsgruppe, die 1% L-Arginin (w/v) erhalten hatten, zeigten sowohl auf RNA-Ebene, als auch auf Protein-Ebene eine signifikante Erhöhung der FAP2-Expression, normalisiert durch die Expression von beta-Aktin (Abb. 34).

Durch die Supplementation mit Arginin konnte die mRNA-Expression von FAP2 um 26,86% gesteigert werden, die Protein-Expression um 52,18%.

A: mRNA-Expression von FAP2



B: Protein-Expression von FAP2

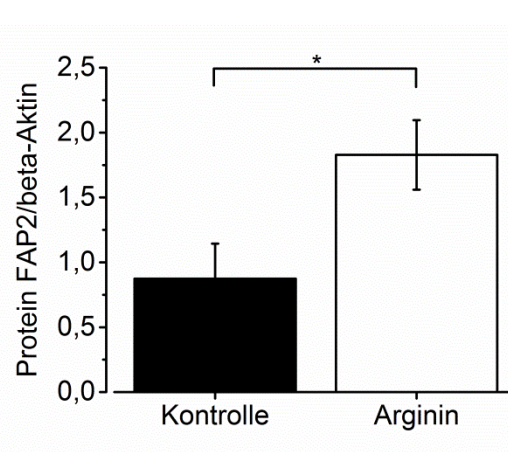


Abbildung 34: FAP2-Expression in Niere nach Supplementation mit 1% Arginin (w/v) für 2 Wochen

Die Kontroll-Gruppe (n = 4, C57/Bl6, männlich) erhielt über 2 Wochen Leitungswasser mit 5% Saccharose (w/v) im Trinkwasser. Die Versuchsgruppe (n = 4, C57/Bl6, männlich) erhielt zur gleichen Zeit Leitungswasser mit 5% Saccharose (w/v) und zusätzlich 1% (w/v) Arginin als Trinkwasser. Die FAP2-Expression auf mRNA-Ebene (A, Anstieg um 26,86%, $p = 0,0017$), als auch auf Protein-Ebene (B, Anstieg um 52,18%, $p = 0,045$) war in den Nieren der Versuchstiere signifikant daraufhin erhöht.

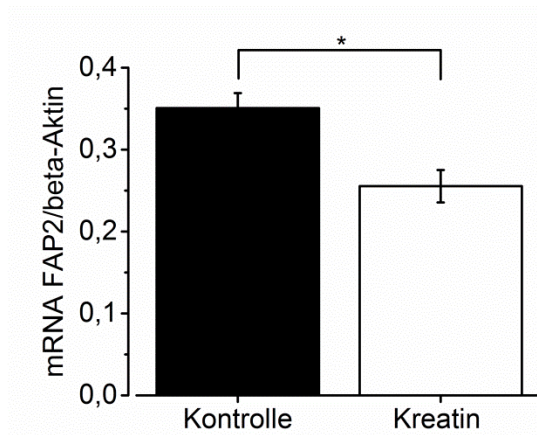
4.6.2 Kreatin-Versuch

In früheren Versuchen konnte bereits beobachtet werden, dass eine Supplementation mit Kreatin zu einer Hemmung der renalen FAP2 Expression führt⁹³. Zu einer genaueren Untersuchung dieser Hemmung sollte ein neuer Versuch durchgeführt werden, um zu untersuchen, ob Kreatin als Produkt der Reaktion bereits den ersten Schritt der Kreatin-Biosynthese in Form einer negativen Rückkopplung hemmt.

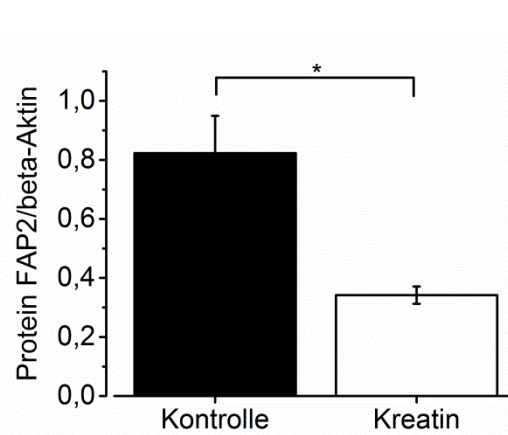
In einem zweiten Fütterungsversuch wurden 8 C57Bl/6 Mäuse (Alter 10 Wochen) zufällig zur Kontrollgruppe (n = 4) oder zur Versuchsgruppe (n = 4) zugeteilt. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten normales Leitungswasser als Trinkwasser, die Tiere der Versuchsgruppe 1% (w/v) Kreatin im Leitungswasser als Trinkwasser für 7 Tage. Alle Mäuse wurden anschließend getötet und die Nieren für weitere Analysen entnommen. Durch die Supplementation mit Kreatin (w/v) konnte die mRNA-Expression und die Protein-Expression von FAP2 in der Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verringert werden (Abb. 35).

Die mRNA-Expression wurde um 27,35% geringer, die Protein-Expression wurde sogar um 52,72% reduziert.

A: mRNA-Expression von FAP2



B: Protein-Expression von FAP2

**Abbildung 35: FAP2-Expression nach Supplementation mit 1% Kreatin (w/v) für 1 Woche**

Die Kontroll-Gruppe (n = 4, C57/Bl6, männlich) erhielt über 1 Woche normales Leitungswasser als Trinkwasser. Die Versuchsgruppe (n = 4, C57/Bl6, männlich) erhielt über den gleichen Zeitraum Leitungswasser mit 1% (w/v) Kreatin im Trinkwasser. Die FAP2-Expression sowohl auf mRNA-Ebene (A, Reduktion um 27,35%, p = 0,013), als auch auf Protein-Ebene (B, Reduktion um 52,72%, p = 0,023) war daraufhin in den Nieren der Versuchstiere signifikant verringert im Vergleich zu der der Kontrollgruppe.

4.7 Untersuchung des Nieren-Phänotyps von FAP2 Knockin**Mäusen**

Um die Krankheit und deren Verlauf *in vivo* studieren zu können, wurden in London Knockin Mäuse generiert. Über eine sequenzspezifische CRISPR/Cas9 Nuklease und ein einzelsträngiges Oligonukleotid, welches die gewünschte Mutation trägt, wurde die Gensequenz von FAP2 der Maus dahingehend verändert, dass der identische Aminosäure-Austausch wie im Protein der Patienten mit FAP2_{MUT2} stattfindet. Ein identisches murines Gen-Konstrukt wurde in mehrere murine Blastozysten injiziert und so Gründermäuse generiert, die die Mutation FAP2_{MUT2} trugen. Die Nachkommen der unterschiedlichen Gründermäuse wurden nicht miteinander verpaart, sodass die Knockin Mäuse auf jeweils eine injizierte Blastozyste zurückzufolgen sind.

In Regensburg wurden, ausgehend von heterozygoten Tieren, homozygote FAP2^{-/-} Knockin Mäuse gezüchtet und phänotypisch untersucht. Da sich die Nachkommen der unterschiedlichen Gründermäuse phänotypisch nicht unterscheiden, werden nachfolgend die Ergebnisse der Nachkommen von nur einer Gründermaus dargestellt.

4.7.1 Expression von FAP2

Für die folgenden Untersuchungen wurden FAP2^{+/+} Knockin Mäuse (WT), heterozygote FAP2^{+/-} Knockin (HZ) und FAP2^{-/-} Knockin Mäuse (KI) verwendet. Von diesen Tieren wurde Spontanurin gesammelt, anschließend wurden die Tiere getötet und die Nieren für Immunfluoreszenz, Elektronenmikroskopie, quantitative Real-Time PCR und Western Blot entnommen.

4.7.1.1 mRNA-Expression von FAP2 bei FAP2 Knockin Mäusen

Die mRNA Expression von FAP2 in den Nieren von FAP2^{+/+}, FAP2^{+/-} und FAP2^{-/-} Knockin Mäusen wurde über Real-Time PCR bestimmt und auf die mRNA-Expression von beta-Aktin normalisiert. Hierbei zeigte sich in FAP2^{-/-} Knockin Mäusen eine höhere Expression der FAP2 mRNA als in FAP2^{+/+} und FAP2^{+/-} Knockin Mäusen (Abb. 36). Die Nachkommen der anderen Gründermäuse zeigten eine ähnlich verteilte mRNA-Expression (Daten nicht gezeigt). Offensichtlich wurde versucht, dadurch eine veränderte Protein-Expression zu regulieren (Abb. 37).

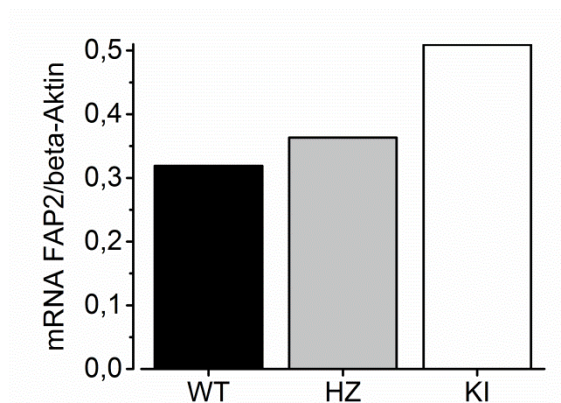


Abbildung 36: mRNA-Expression von FAP2 bei FAP2 Knockin Mäusen

In Nieren von FAP2^{+/+}, FAP2^{+/-} und FAP2^{-/-} Knockin Mäusen wurde die mRNA-Expression von FAP2 untersucht. FAP2^{-/-} Knockin Mäuse zeigten hierbei eine erhöhte FAP2 mRNA-Expression verglichen mit FAP2^{+/+} und FAP2^{+/-} Knockin Mäusen (n = 1). Die mRNA-Expression von FAP2 gab bei Nachkommen anderer Gründermäuse ein identisches Muster. Alter der Mäuse jeweils 8 Wochen.

4.7.1.2 Protein-Expression von FAP2 bei FAP2 Knockin Mäusen

Weiterhin wurde die Protein-Expression von FAP2 in den Nieren von FAP2^{+/+}, FAP2^{+/-} und FAP2^{-/-} Knockin Mäusen über Western Blot untersucht. Die gemessene Protein-Expression von FAP2 wurde auf die Protein-Expression von beta-Aktin normalisiert. Hier zeigte sich ein anderes Expressionsmuster als auf mRNA Ebene beobachtet wurde. FAP2^{+/+} und FAP2^{+/-} Knockin Mäuse zeigten eine gleich starke Protein-Expression von FAP2, während in FAP2^{-/-} Knockin Mäuse die FAP2 Protein-Expression nur etwa 10% der Expression von FAP2^{+/+} und FAP2^{+/-} Knockin betrug (Abb. 37). Diese verminderte Protein-

Expression in den FAP2^{-/-} Knockin Mäusen könnte die Hochregulation der FAP2 mRNA erklären (Abb. 36).

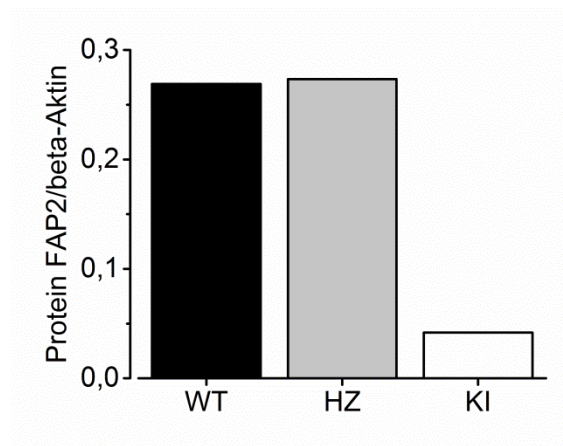
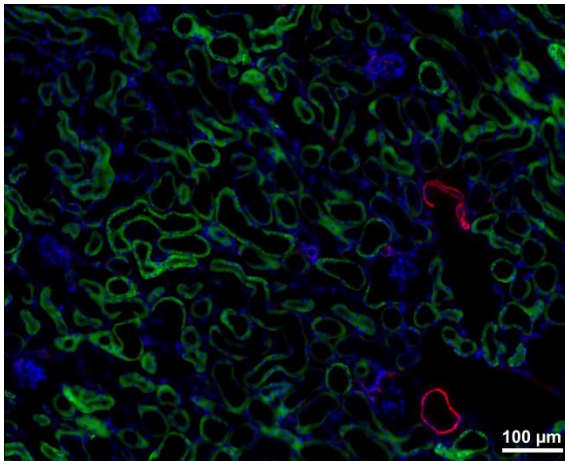
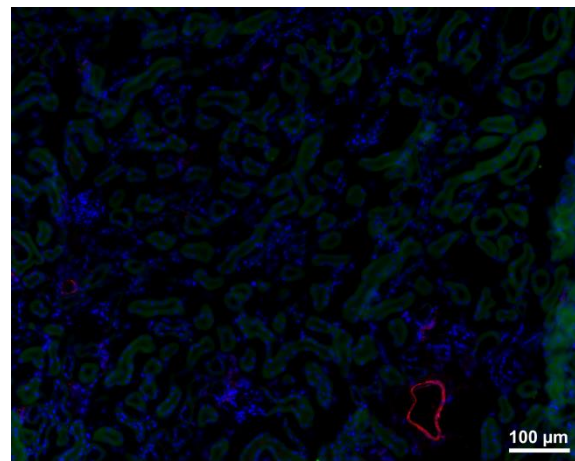


Abbildung 37: Protein-Expression von FAP2 bei Knockin Mäusen

In Nieren von FAP2^{+/+}, FAP2^{+/-} und FAP2^{-/-} Knockin Mäusen wurde die Protein-Expression von FAP2 untersucht. FAP2^{-/-} Knockin Mäuse zeigten hierbei eine um ca. 90% verminderte FAP2 Protein Menge verglichen mit FAP2^{+/+} und FAP2^{+/-} Knockin Mäusen (n = 1). Die Protein-Expression von FAP2 gab bei Nachkommen anderer Gründermäuse ein identisches Muster. Alter der Mäuse jeweils 8 Wochen.

4.7.1.3 Immunfluoreszenz-Färbung auf FAP2 bei FAP2 Knockin Mäusen

Auch in Immunfluoreszenz-Färbungen wurden die Mäuse auf ihre FAP2 Expression hin untersucht. Bei den FAP2^{+/+} Knockin Mäusen zeigte sich die charakteristische FAP2 Färbung in frühproximalen Tubuli (Abb. 38 A). FAP2^{+/-} Knockin Mäusen zeigten eine identische FAP2 Immunfluoreszenz-Färbung wie FAP^{+/+} Knockin Mäuse (Daten nicht gezeigt). Da sich FAP2^{+/-} Knockin Mäuse in allen Untersuchungen wie FAP2^{+/+} Knockin Mäuse verhalten haben, wurden sie in den folgenden Abbildungen nicht mehr dargestellt. Glomeruli, distale Tubuli und Sammelrohre waren FAP2 negativ. In den Nieren von FAP2^{-/-} Knockin Mäusen hingegen war kaum FAP2 Färbung zu erkennen (Abb. 38 B). Diese Färbungen spiegelten auch die Ergebnisse der Western Blots (siehe 4.7.1.2 und Abb. 37) wieder.

A: Niere einer FAP2^{+/+} Knockin MausB: Niere einer FAP2^{-/-} Knockin Maus**Abbildung 38: Immunfluoreszenz-Färbung auf FAP2 bei Knockin Mäusen**

Die Nieren von FAP2^{+/+} und FAP2^{-/-} Knockin Mäusen wurden in Immunfluoreszenz-Experimenten auf FAP2 gefärbt. In FAP2^{+/+} Knockin Nieren war die charakteristische FAP2-Färbung in frühproximalen Tubuli zu erkennen (A, grün), Glomeruli, distale Tubuli und Sammelrohre waren FAP2-negativ. Bei Nieren von FAP2^{-/-} Knockin Mäusen war kaum FAP2-Färbung zu erkennen. In rot wurde Glattmuskel-Aktin gefärbt, welches die Blutgefäße anzeigt.

4.7.2 Elektronenmikroskopie von FAP2 Knockin Mäusen

Zur Untersuchung der Mitochondrienmorphologie bei den FAP2 Knockin Mäusen wurden die Nieren mittels Elektronenmikroskopie untersucht. In allen Nieren war die Histologie gut erhalten und proximale Tubuli eindeutig am Bürstensaum erkennbar. Die proximalen Tubuli erschienen sowohl bei FAP2^{+/+} Knockin (Abb. 39 A), als auch bei FAP2^{-/-} Knockin Mäusen morphologisch unauffällig (Abb. 39 B). Mitochondrien aus proximalen Tubuli wurden zudem in höherer Vergrößerung untersucht. Die Doppelmembran sowie die Cristae waren bei beiden Versuchsgruppen gut erkennbar (Abb. 39 C und D). Allerdings waren in den Mitochondrien der bei FAP2^{-/-} Knockin Mäuse keine filamentartigen oder kristallinen Strukturen zu erkennen (Abb. 39 D), wie sie im induzierbaren LLC-PK1 Zellmodell oder den Patienten-Proben entdeckt wurden.

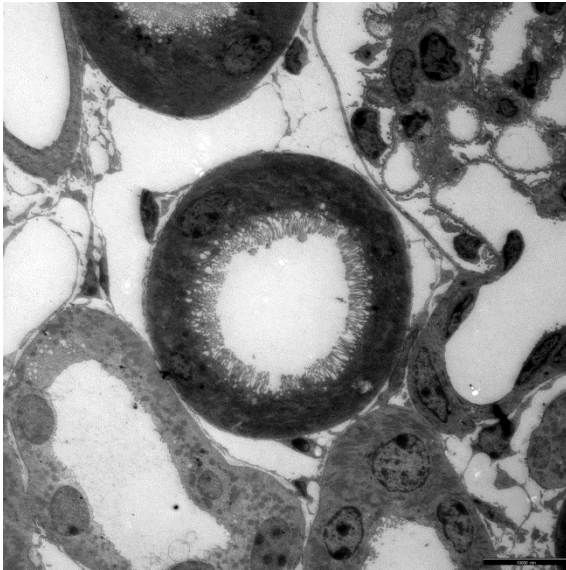
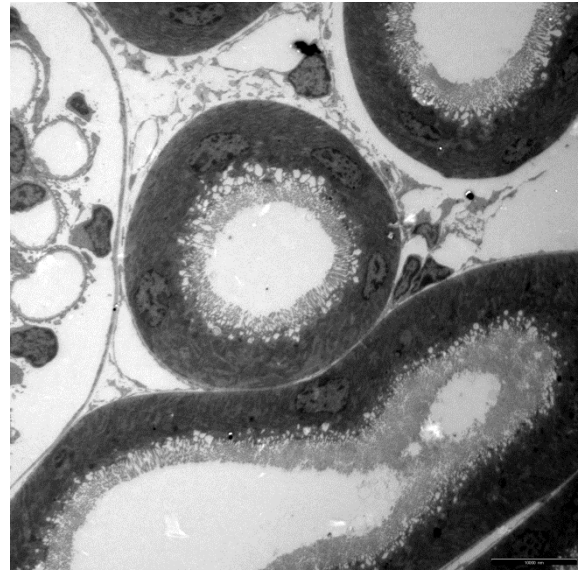
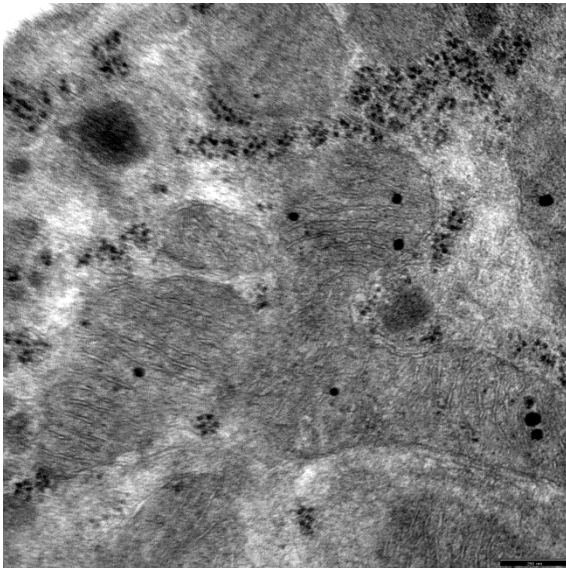
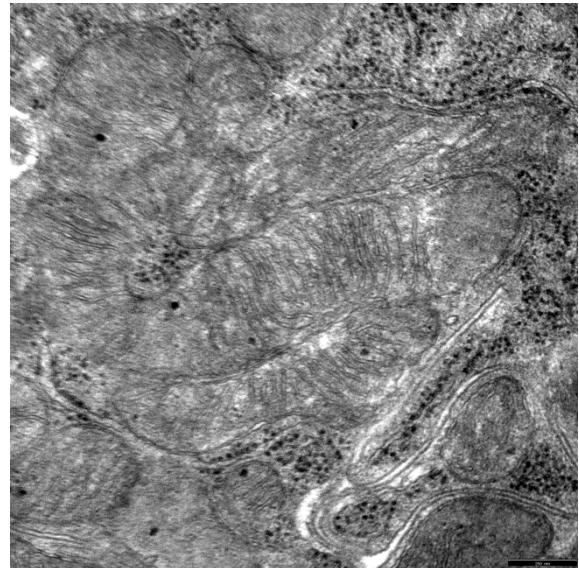
A: FAP2^{+/+} Knockin MausB: FAP2^{-/-} Knockin MausC: FAP2^{+/+} Knockin MausD: FAP2^{-/-} Knockin Maus

Abbildung 39: Elektronenmikroskopische Untersuchungen bei FAP2 Knockin Mäusen

Die Nieren von FAP2^{+/+} und FAP2^{-/-} Knockin Mäusen wurden elektronenmikroskopisch untersucht. In beiden Fällen zeigten sich die proximalen Tubuli morphologisch unauffällig (A und B). Die Mitochondrien in proximalen Tubuluszellen beider Versuchsgruppen zeigten keine morphologischen Auffälligkeiten (C und D). In den Mitochondrien der FAP2^{-/-} Knockin Mäuse waren keine filamentartigen oder kristallinen Strukturen zu erkennen, wie sie bei Patienten oder im induzierbaren LLC-PK1 Zellmodell auftreten (D). Alter der Mäuse jeweils 10 Wochen.

4.7.3 Urin-Analyse von FAP2 Knockin Mäusen

Um zu untersuchen, ob die eingefügte Mutation in FAP2 bei den FAP2^{-/-} Knockin Mäusen zur Entwicklung eines Fanconi-Syndroms wie in den Patienten führt, wurde auch der Urin der FAP2 Knockin Mäuse untersucht. Für dieses Experiment wurde von jeweils 8 FAP2^{+/+} und FAP2^{-/-} Knockin Mäusen Spontanurin gesammelt. In den Urinen wurde die Osmolalität mit Hilfe eines Osmometers bestimmt, da sich die Kreatinin-Werte im Urin

durch den Knockin von FAP2 möglicherweise beeinflusst werden und deshalb nicht zur Standardisierung eignen. Außerdem wurden noch im Urin enthaltene Aminosäuren, Zucker und Elektrolyte vermessen, die bei dieser Form des Fanconi-Syndroms erhöht sind.

Bei der Messung Osmolalität zeigten die FAP2^{-/-} Knockin Mäuse eine signifikant niedrigere Osmolalität im Urin als FAP2^{+/+} Knockin Mäuse (Abb. 40). Im Gegensatz zu FAP2^{-/-} Knockout Mäusen, die eine signifikant erhöhte Osmolalität im Urin im Vergleich zu FAP2^{+/+} Knockout Mäusen zeigten (Abb. 32).

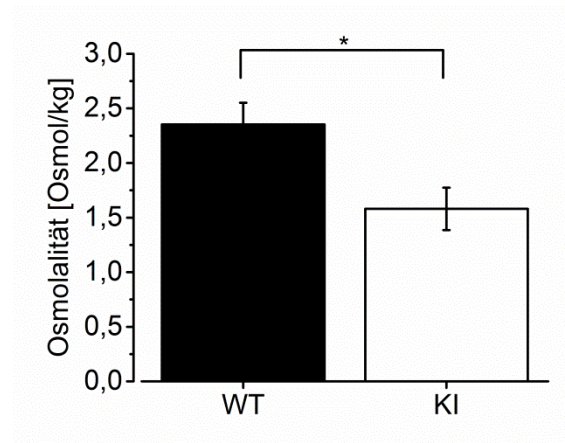


Abbildung 40: Osmolalität im Urin von FAP2 Knockin Mäusen

Die Messung der Osmolalität im Spontanurin von FAP2^{-/-} Knockin Mäusen zeigte einen signifikant niedrigeren Wert verglichen mit der Osmolalität im Spontanurin von FAP2^{+/+} Knockin Mäusen (n = 8 pro Gruppe, p-value = 0,015).

Weiterhin wurden noch die im Urin enthaltenen Aminosäuren am Institut für Funktionelle Genomik im Biopark Regensburg gemessen. Patienten, die diese Mutation in FAP2 haben, zeigen eine generelle Hyperaminoacidurie als ein Symptom für das Fanconi-Syndrom. Abgesehen von Glycin und Ornithin zeigten alle vermessenen Aminosäuren keine signifikanten Unterschiede zwischen FAP2^{+/+} und FAP2^{-/-} Knockin Mäusen. Glycin (Abb. 41 A) und Ornithin (Abb. 41 B) waren jeweils signifikant erhöht in den Proben der FAP2^{-/-} Knockin Mäuse verglichen mit den Proben der FAP2^{+/+} Knockin Mäuse.

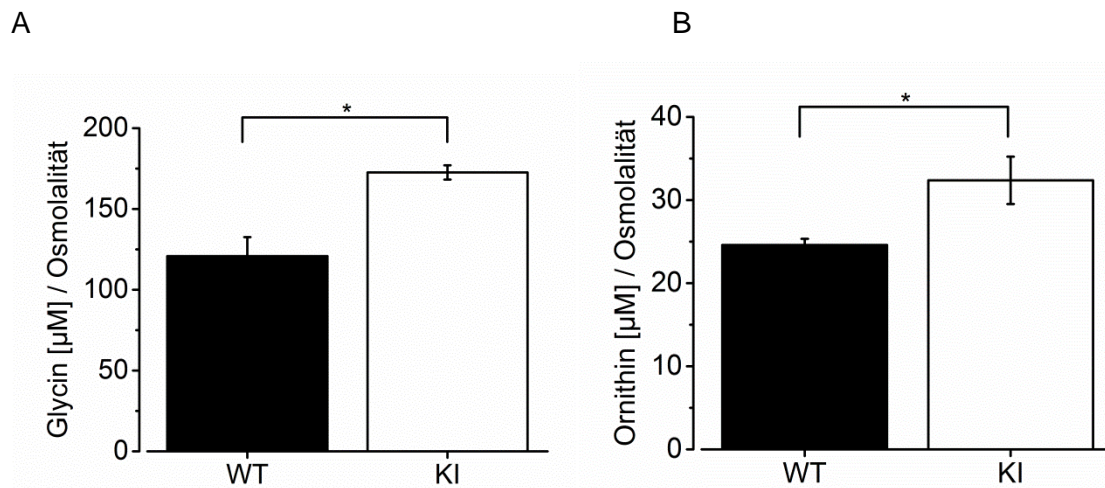


Abbildung 41: Renale Aminosäureausscheidung bei FAP2 Knockin Mäusen

Zusätzlich zur Messung der Osmolalität wurde die renale Aminosäureausscheidung im Spontanurin von FAP2 Knockin Mäusen vermessen. Hierbei zeigte sich nur bei Glycin (A, p-value = 0,018) und Ornithin (B, p-value = 0,035) eine signifikant höhere Ausscheidung bei den FAP2^{-/-} Knockin Mäusen verglichen mit den FAP2^{+/+} Knockin Mäusen (n = 8 pro Gruppe). Zur Normalisierung wurde die Osmolalität der Urin-Proben verwendet, da FAP2 in der Biosynthese von Kreatinin involviert ist und sich Kreatinin somit nicht zur Normalisierung eignet.

4.7.4 Untersuchung auf Fibrose-Marker in FAP2 Knockin Mäusen

Da alle unsere Fanconi-Patienten ein terminales Nierenversagen mit Nierenfibrose bekommen, wurden die Nieren von FAP2^{+/+} und FAP2^{-/-} Knockin Mäusen auf Fibrose-Marker hin untersucht. Benutzt wurde hierfür die Gene, die für murines NLRP3, murines IL-18, murines Fibronectin 1 (FN1) und murines Glattmuskel-Aktin codieren. Die mRNA-Expression dieser Gene wurde bereits im Zellkultur-Modell untersucht (siehe 4.5.1, Abb. 22). In den Nieren von FAP2^{-/-} Knockin Mäusen zeigte sich allerdings keinerlei veränderte mRNA-Expression der untersuchten Fibrose-Marker im Vergleich zur mRNA-Expression dieser Gene in FAP2^{+/+} Knockin Mäusen (Abb. 42). Die FAP2^{-/-} Knockin Mäuse zeigten demnach weder histologisch noch auf mRNA Ebene Hinweise auf eine Fibrose.

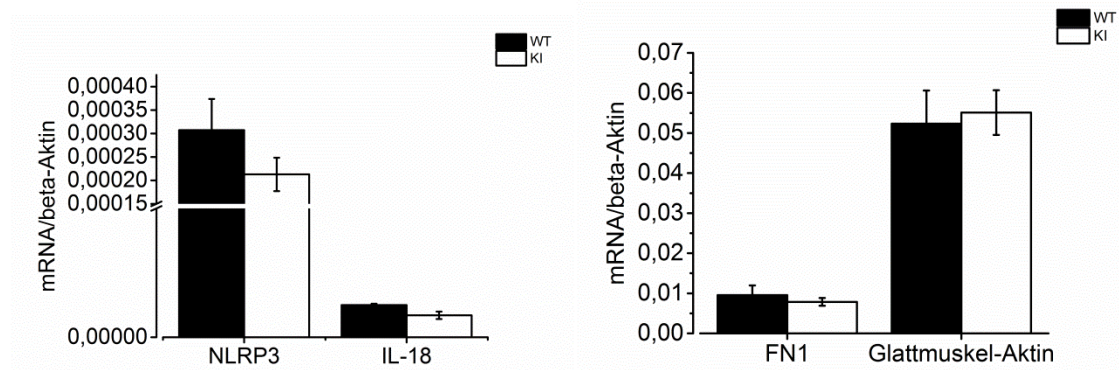


Abbildung 42: mRNA-Expression von Fibrose-Markern in FAP2 Knockin Mäusen

Aus Nieren von FAP2^{+/+} und FAP2^{-/-} Knockin Mäusen wurde mRNA isoliert und über quantitative Real-Time PCR die Expression von ausgewählten Genen untersucht, die als Marker für Fibrose

dienen. Im Gegensatz zum Zellkultur-Modell zeigte sich bei den FAP2^{-/-} Knockin Mäusen keinerlei erhöhte Expression für NLRP3, IL-18, Fibronectin 1 und Glattmuskel-Aktin (n = 3 pro Gruppe).

4.8 Untersuchungen zur Agglomerat-Bildung von murinem FAP2

Die Versuche an FAP2 Knockin Mäusen deuten darauf hin, dass das murine FAP2 mit der humanen Mutation nicht in der Lage ist, mit sich selbst lineare Agglomerate auszubilden. Um diese These im Detail zu untersuchen, wurden verschiedene unten beschriebene Varianten des humanen und murinen FAP2 Gens hergestellt (Tab. 4) und im Zellmodell auf die Ausbildung von mitochondrialen Filamenten hin untersucht.

| Vektor | Wirt | Gen | Mutation | Mutierte Basen | Aminosäure-Austausch |
|-----------|--------|------|----------|----------------------------------|-------------------------------|
| pIRES-CD8 | Maus | FAP2 | MUT2 | c1022C→T | p341P→L |
| pIRES-CD8 | Mensch | FAP2 | MUT2 | c1022C→T | p341P→L |
| pIRES-CD8 | Maus | FAP2 | MUT1 | c1006A→G | p336T→A |
| pIRES-CD8 | Maus | FAP2 | MUT2 | c1022C→T c1012G→A | p341P→L p338V→I |
| pIRES-CD8 | Maus | FAP2 | MUT2 | c1022C→T c1030G→A | p341P→L p344V→I |
| pIRES-CD8 | Maus | FAP2 | MUT2 | c1022C→T c1012G→A c1030G→A | p341P→L p338V→I p344V→I |

Tabelle 4: Plasmide für Transfektionsexperimente

Die humanen Varianten wurden von Christina Sterner aus den stabil transfizierten Zell-Linien LLC-PK1 FAP2_{WT} und LLC-PK1 FAP2_{MUT1} isoliert und in den Vektor pIRES-CD8 kloniert. Die murinen Varianten mFAP_{WT} und mFAP2_{MUT2} wurden ebenfalls von Christina Sterner aus den Nieren der entsprechenden FAP2 Knockin Mäuse isoliert und in den Vektor pIRES-CD8 eingefügt. Das Plasmid mit der Variante mFAP2_{MUT1} wurde mittels „site-directed“ Mutagenese aus dem murinen FAP2_{WT} hergestellt (siehe 3.2.3.7).

Das murine *FAP2* Gen enthält jeweils an Stelle c1012 und c1030 ein Guanin, während das humane *FAP2* Gen an diesen Stellen ein Adenosin enthält. Diese beiden Stellen befinden sich nur 10 bzw. 8 Basen von der mutierten Stelle in FAP2_{MUT2} (c1022C→T) entfernt (Abb. 43).

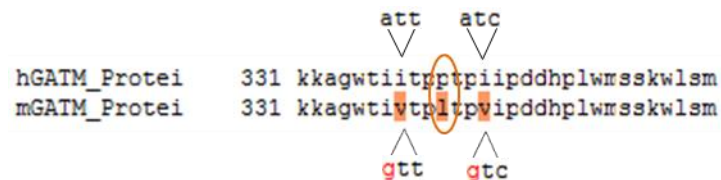


Abbildung 43: Vergleich der mRNA von FAP2 von Mensch und Maus

Durch einen orangenen Kreis ist die Stelle der Mutation der FAP2 Knockin Maus markiert. Bei der FAP2 Knockin Maus befindet sich statt „ccg“ ein „tta“, welches zum Austausch von Prolin („p“) gegen Leucin („l“) führt. Dieser Aminosäure-Austausch liegt auch in Patienten mit der Mutation FAP2_{MUT2} vor. Der Vergleich der Sequenzen der FAP2 mRNA von Mensch und Maus zeigt, dass jeweils zwei Aminosäuren von der veränderten Aminosäure nicht übereinstimmende Aminosäuren vorliegen. Im humanen Protein ist an diesen Stellen Isoleucin („i“), im murinen Protein Valin („v“). Um die murine Aminosäuresequenz in die humane Sequenz zu verändern, wurde in jedem Triplet eine Base verändert: g → a.

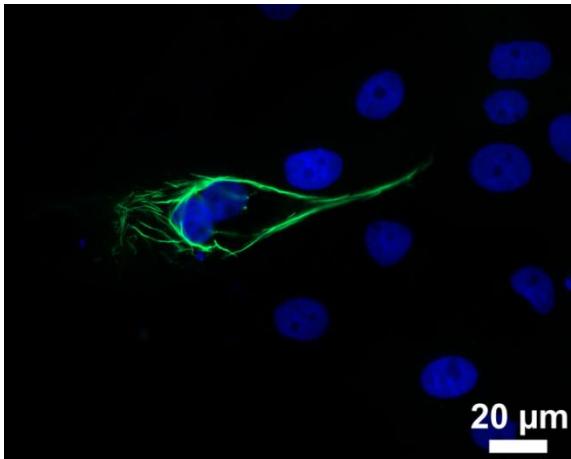
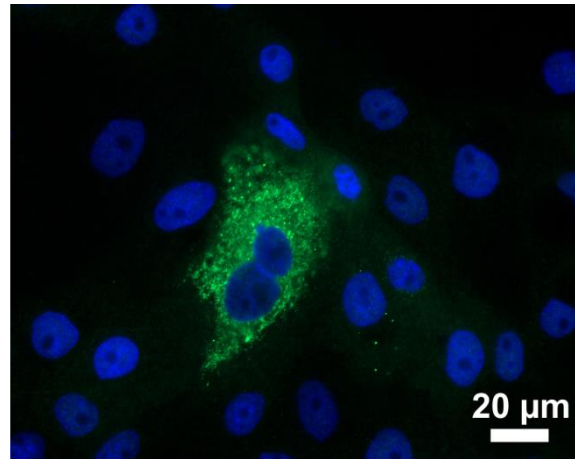
Um zu testen, ob diese Varianten eine Auswirkung auf die Bildung von Filamenten haben, wurden diese beiden Basen im murinen Gen gegen die entsprechenden Basen im humanen Gen ausgetauscht. Es wurden drei unterschiedliche Varianten hergestellt:

1. nur der Austausch bei c1012
2. nur der Austausch bei c1030
3. beide Basen des Mausgens wurden gegen die humanen Varianten getauscht.

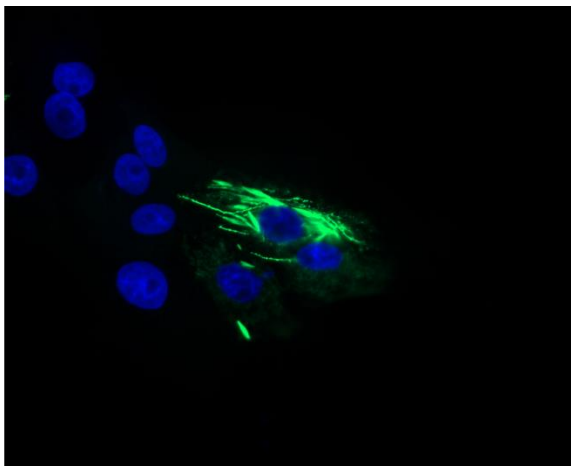
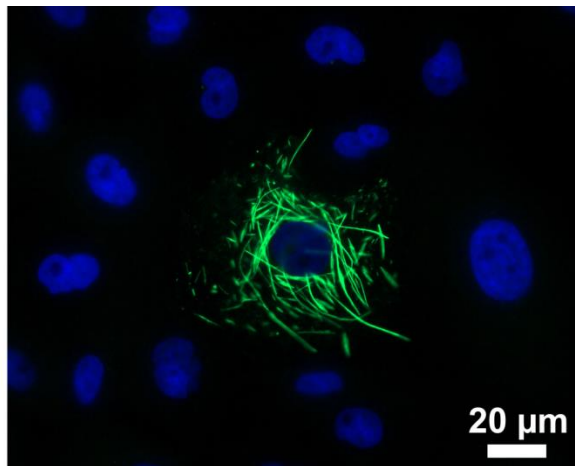
4.8.1 Transfektion in porcine LLC-PK1 Zellen

Diese Plasmide wurden in LLC-PK1 Zellen mit Lipofectamine 3000 transient transfiziert und auf FAP2 gefärbt. LLC-PK1 Zellen, die mit humanem FAP2_{MUT2} transfiziert wurden, zeigten drei Tage nach der Transfektion morphologisch veränderte Mitochondrien (Abb. 44 A), während in Zellen mit murinem FAP2_{MUT2} weiterhin normale Mitochondrien beobachtet wurden (Abb. 44 B). Dieses Experiment zeigt also, dass das FAP2-Mausgen mit der humanen Mutation nicht in der Lage ist, mit sich selbst zu interagieren und Agglomerate zu bilden. Zumindest war dies in porcinen LLC-PK1 Zellen der Fall und auch in Zellen der FAP2 Knockin Maus. Dies könnte zum Beispiel auf eine unterschiedliche Faltung der humanen und murinen Genvariante zurück zu führen sein.

Die Transfektion von porcinen LLC-PK1 Zellen mit murinem FAP2_{MUT1} führte hingegen zur Ausbildung von Filamenten, weswegen es unwahrscheinlich ist, dass die Zell-Art (porcin, human, murin) einen Einfluss auf die Agglomeration von FAP2 zu Filamenten hat (Abb. 45 A). Sieben Tage nach der Transfektion waren die transfizierten Zellen voll mit riesigen Mitochondrien (Abb. 45 B).

A: humanes FAP2_{MUT2}B: murines FAP2_{MUT2}**Abbildung 44: Transiente Transfektion von FAP2_{MUT2} in LLC-PK1 Zellen**

Porcine LLC-PK1 Zellen wurden mit Plasmiden transfiziert, die entweder die humane Variante von FAP2_{MUT2} tragen, oder die murine Variante. Drei Tage nach der Transfektion zeigten sich bei humanem FAP2_{MUT2} die charakteristischen Filamente (A), während bei murinem FAP2_{MUT2} ein normales mitochondriales Netzwerk zu erkennen war (B).

A: murines FAP2_{MUT1}B: murines FAP2_{MUT1} nach 7 Tagen**Abbildung 45: Transiente Transfektion von FAP2_{MUT1} in LLC-PK1 Zellen**

Porcine LLC-PK1 Zellen wurden mit einem Plasmid transfiziert, das die murine Variante von FAP2_{MUT1} enthielt. Drei Tage nach der Transfektion zeigten sich in den Zellen die charakteristischen morphologisch veränderten Mitochondrien (A), nach sieben Tagen waren die Zellen voll damit (B).

4.8.2 Transfektion in murine Primärkulturzellen

Um zu untersuchen, ob die nicht stattfindende Agglomeration des mutierten FAP2 in den FAP2 Knockin Mäusen am murinen Wirtssystem liegt, wurde von murinen Nieren eine Primärkultur kultiviert und die auswachsenden Zellen mit den entsprechenden Plasmiden (Tab. 4) transient transfiziert.

Nieren von jungen Mäusen (C57Bl6/N, Alter 21 Tage) wurden entnommen und der Cortex mit einem Skalpell abgetrennt um möglichst viele proximale Tubuli in Kultur zu nehmen. Die abgetrennten Gewebestücke wurden mit 0,5 mg/ml Collagenase IV verdaut, bis nur

mehr kurze Tubulusbruchstücke vorhanden waren. Diese wurden anschließend in Kultur genommen. Nach fünf Tagen wurden die angewachsenen Zellen mit Lipofectamine 3000 transient transfiziert. In diesen Primärkulturzellen aus Nieren von jungen WT Mäusen war das gleiche Muster wie im vorher beschriebenen Experiment zu beobachten: die Expression von humanem FAP2_{MUT2} (Abb. 46 A) und murinem FAP2_{MUT1} (Abb. 46 C) führte zur Bildung von Filamenten in den Mitochondrien, während bei der Expression von murinem FAP2_{MUT2} keinerlei Filamente zu erkennen waren (Abb. 46 B). Daraus kann gefolgert werden, dass eine Knockin Maus mit der Mutante 1 vermutlich die bessere Wahl gewesen wäre als die verwendete Mutante 2, unter der Voraussetzung, dass nicht das gesamte FAP2 Mausgen gegen die mutierte humane Variante über homologe Rekombination ausgetauscht worden wäre.

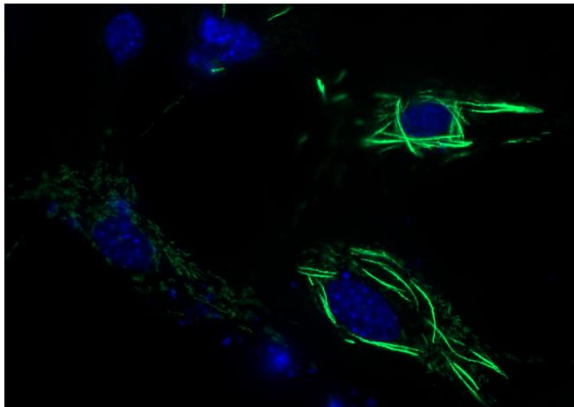
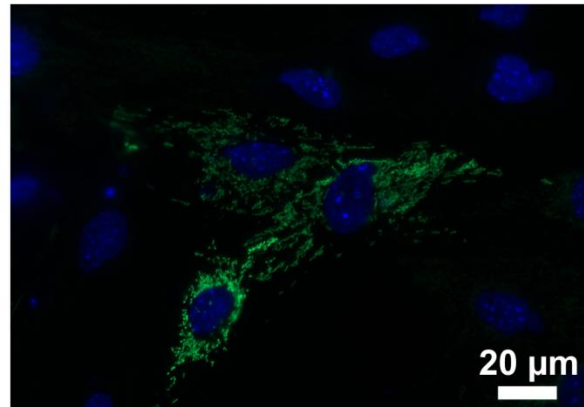
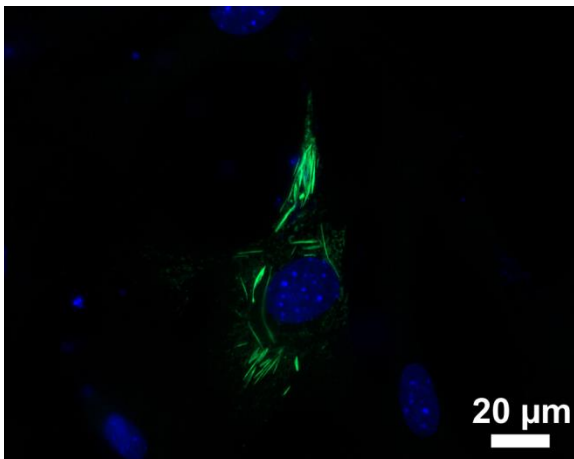
A: humanes FAP2_{MUT2}B: murines FAP2_{MUT2}C: murines FAP2_{MUT1}

Abbildung 46: Transiente Transfektion mit FAP2_{MUT} in murine Primärkulturzellen der Niere
Primärkulturzellen aus murinen Nieren wurden mit Plasmiden transfiziert, die entweder humanes FAP2_{MUT2}, murines FAP2_{MUT2} oder murines FAP2_{MUT1} enthielten. Drei Tage nach der transienten Transfektion mit Lipofectamine3000 waren bei humanem FAP2_{MUT2} (A) und murinem FAP2_{MUT1} (C) pathologisch veränderte Mitochondrien zu erkennen, bei murinem FAP2_{MUT2} hingegen nicht (B).

4.8.3 Transfektionsexpmerimente mit humanisiertem $mFAP2_{MUT2}$

Im Vergleich von humaner und murinen Aminosäuresequenz von FAP2 konnten jeweils 3 Stellen vor und nach der mutierten Aminosäure von $FAP2_{MUT2}$ Unterschiede entdeckt werden (Abb. 43). Zur Untersuchung, ob diese Aminosäuren eine Agglomeration von $FAP2_{MUT2}$ in den Knockin Mäusen verhinderte, wurde die murine Basensequenz dahingehend mutiert, dass ein Aminosäureaustausch zur humanen Sequenz erfolgte. Sollten diese Aminosäuren die Ursache für die verhinderte Agglomeration sein, wäre es eine Option, die Knockin Mäuse weiterhin zu verändern, um diese Aminosäuren ebenfalls auszutauschen.

Die humanisierten Varianten des murinen $FAP2_{MUT2}$ wurden ebenfalls in LLC-PK1 Zellen über das Lipofectamine 3000 System transient transfiziert. Die durch den Eingriff ausgetauschten Aminosäuren an den beiden gewählten Stellen führten nicht zu Ausbildung von pathologisch veränderten Mitochondrien (Abb. 47, A: Basenaustausch bei c1012, B: Basenaustausch bei c1030). Auch ein Plasmid, bei dem beide murine Aminosäuren gegen die humanen Varianten ausgetauscht wurden, zeigte nach transients Transfektion keine veränderten Mitochondrien (Abb. 48). Weitere Mutationen von murinem $FAP2_{MUT2}$ für die Knockin Maus würden vermutlich zu keiner Ausbildung des erhofften Phänotyps führen. $FAP2_{MUT1}$ wäre möglicherweise eine bessere Alternative für eine Knockin Maus, um die Entstehung des Phänotyps des vorliegenden Fanconi-Syndroms zu studieren.

A: Basenaustausch bei c1012 g → a

B: Basenaustausch bei c1030 g → a

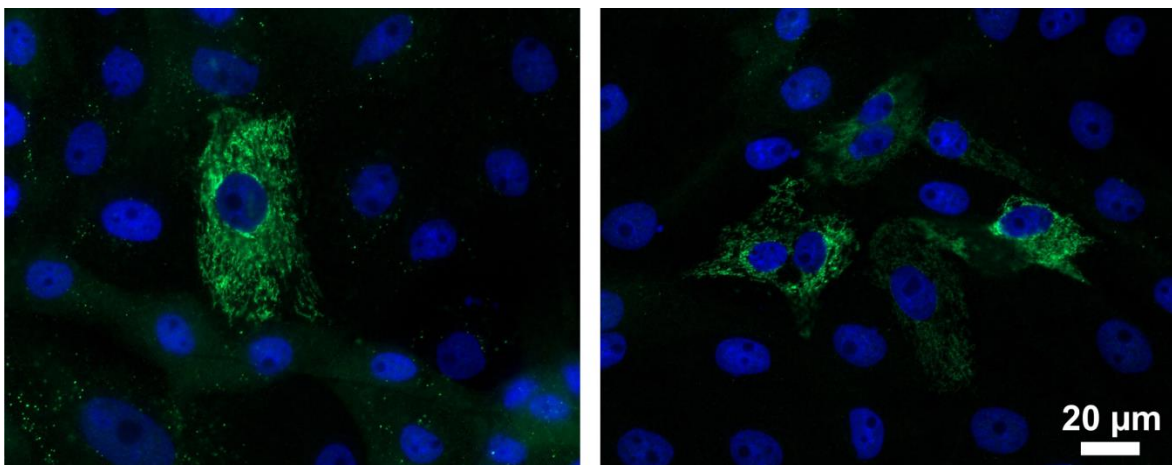


Abbildung 47: Transiente Transfektion von LLC-PK1 Zellen mit humanisiertem $mFAP2_{MUT2}$

Murines $FAP2_{MUT2}$ trägt bei c1012 und bei c1030 ein Guanin statt einem Alanin wie bei humanem $FAP2_{MUT2}$. Über Mutagenese wurde jeweils eine dieser Stellen des murinen $FAP2$ gegen die humane Variante ersetzt (A: Basenaustausch bei c1012, B: Basenaustausch bei c1030) und das entsprechende Plasmid in LLC-PK1 Zellen transfiziert. Drei Tage nach der Transfektion zeigten sich bei keiner der beiden humanisierten Varianten morphologisch veränderte Mitochondrien.

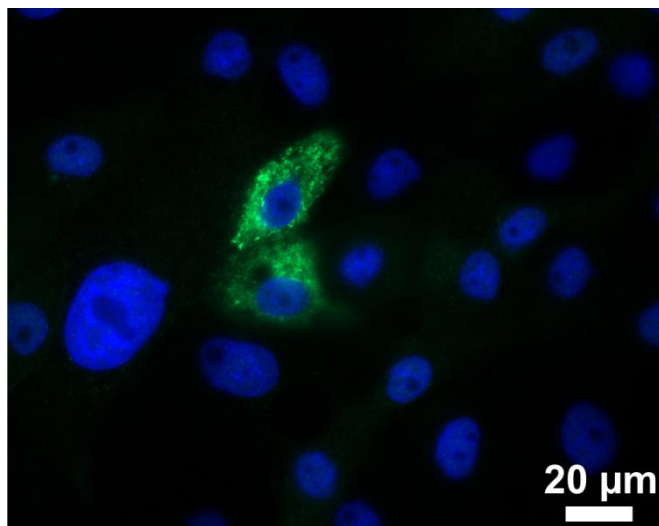


Abbildung 48: Transiente Transfektion von LLC-PK1 Zellen mit doppelt humanisiertem mFAP2_{MUT2}

Auch bei transienter Transfektion mit doppelt humanisiertem murinem FAP2_{MUT2} zeigten sich drei Tage nach der Transfektion keine morphologisch veränderten Mitochondrien in den transfizierten Zellen.

5. Diskussion

5.1 FAP2-Expression in induzierbaren LLC-PK1 Zellen

Vorausgehend zu dieser Doktorarbeit wurden erste Experimente und deren Analyse von Dr. Carsten Broeker im Rahmen seiner Dissertation durchgeführt (2014). Zusätzlich zu der dort beschriebenen Mutation in FAP2 wurden in dieser Arbeit noch drei weitere Patienten-Mutationen von FAP2 histologisch am induzierbaren LLC-PK1 Zellmodell untersucht. In allen FAP2-Mutanten war eine mitochondriale Lokalisation von FAP2 zu sehen, die gut durch eine Ko-Lokalisation mit dem Mitochondrienmarker Mitotracker zu erkennen war (Abb. 12). Im Gegensatz zu Zellen, die FAP2_{WT} exprimierten und eine normale mitochondriale Morphologie aufwiesen (Abb. 12 A), zeigten sich die Mitochondrien in LLC-PK1_{MUT} Zellen stark verlängert (Abb. 12 B - E).

Allerdings war zu sehen, dass die Ausbildung der pathologisch vergrößerten Mitochondrien bei der Überexpression mancher Mutationen eine längere Induktionsdauer benötigte. Bei FAP2_{MUT1} waren bereits nach zwei Tagen Induktion in allen Zellen verlängerte Mitochondrien zu erkennen, die bei längerer Induktionsdauer immer dicker wurden (Abb. 12 B). Veränderte Mitochondrien bei einer Überexpression von FAP2_{MUT2} waren auch nach schon zwei Tagen Induktion zu erkennen (Abb. 12 C). Bei Zellen, die FAP2_{MUT3} überexprimierten, waren nach zwei Tagen Induktion nur in wenigen Zellen sehr dünne verlängerte Mitochondrien zu sehen. Neben den veränderten Mitochondrien zeigten LLC-PK1_{MUT3} Zellen noch ein normales mitochondriales Netzwerk (Abb. 12 D). Am längsten benötigten LLC-PK1_{MUT4} Zellen: nach zwei Tagen Induktion waren hier noch keinerlei Veränderung in der Mitochondrienmorphologie zu erkennen, erst nach sieben Tagen zeigten sich kurze verlängerte Mitochondrien in den Zellen (Abb. 12 E).

Im Rahmen der Dissertation von Dr. Carsten Broeker wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen von induzierten LLC-PK1_{WT} und LLC-PK1_{MUT1} Zellen durchgeführt, die innerhalb der verlängerten Mitochondrien von LLC-PK1_{MUT1} Zellen filamentartige Strukturen offenbarten (Abb. 3). Durch Immunogold-Färbungen konnte eine Beteiligung von FAP2_{MUT1} am Aufbau dieser Strukturen in LLC-PK1_{MUT1} Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4 B), während FAP2_{WT} eher an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert war (Abb. 4 A).

In Kristallographie-Studien konnte die komplette Struktur von FAP2 1997 analysiert werden⁷⁹. Außerdem zeigten Gross *et al.*, dass FAP2 auch als Dimer vorliegen kann⁹⁴, wobei die Häufigkeit von Monomeren die Häufigkeit von Dimeren überwiegt⁷⁹.

Anhand der kristallographisch ermittelten Struktur des Enzyms konnte die Lokalisation der Mutationen der Patienten des vorliegenden Fanconi-Syndroms festgestellt werden. Alle vier entdeckten Mutationen der Patienten liegen an der Oberfläche der dreidimensionalen Struktur von FAP2. Durch den Aminosäureaustausch an der Oberfläche von FAP2 durch die Patienten-Mutation entstehen neue Interaktionsflächen, die eine intramitochondriale multimere Aggregation erlauben (Daten nicht gezeigt).

Es kann vermutet werden, dass für die Bildung der filamentartigen Strukturen, die in den Mitochondrien von LLC-PK1_{MUT} Zellen gebildet werden, zunächst eine spontane Aggregation der FAP2 Monomere oder Dimere geschieht, zugleich befindet sich aber noch viel nicht zusammengelagertes mutiertes FAP2 in den Mitochondrien. Vermutet wird, dass eine bestimmte Menge an aggregiertem FAP2_{MUT} benötigt wird, um die Anlagerung zu beschleunigen. Bei FAP2_{MUT1} wurde diese Schwelle bereits nach weniger als zwei Tagen erreicht, bei FAP2_{MUT2} nach zwei bis drei Tagen, bei FAP2_{MUT3} und FAP2_{MUT4} dauerte es deutlich länger (Abb. 12).

5.2 Nierenphänotyp einer FAP2 Knockout Maus

Es gibt zwei Möglichkeiten, wie mutiertes FAP2 ein Fanconi-Syndrom auslösen kann. Zum einen könnte es durch die Mutation zu einer Haploinsuffizienz kommen. Bei heterozygoten Trägern der Mutation verliert das mutierte Protein seine Funktion und das noch vorhandene funktionstüchtige Protein reicht nicht aus, um die Aktivität zu erhalten. Zum anderen könnte sich durch die Mutation eine neue Funktion des Proteins ausbilden, die zur Entstehung der Erkrankung führen.

Für die Untersuchung des vollständigen Funktionsverlustes von FAP2 wurde eine FAP2 Knockout Maus als Modell benutzt.

Diese Knockout Mäuse wurden bereits von Choe *et al.* 2013 und Nabuurs *et al.* 2013 untersucht, allerdings wurde der Nierenphänotyp dieser Tiere bisher noch nicht untersucht.

Wir konnten einen Knockout von FAP2 auf mRNA-Ebene über PCR beobachten und auch auf Protein-Ebene mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Aufnahmen der Nieren (Abb. 28 und 31).

Auf mRNA-Ebene zeigte sich bei den FAP2^{-/-} Knockout Tieren noch eine Restexpression von FAP2. Der Knockout von FAP2 wurde über eine Deletion von Exon 3 erreicht. Möglicherweise konnten die benutzten Primer in geringer Affinität an das verkürzte FAP2 Knockout Produkt der mRNA binden. Auch bei Choe *et al.* zeigte sich bei FAP2^{-/-} Knockout Mäusen noch ein verkürztes Fragment von FAP2 im Southern Blot⁹².

Auf Protein-Ebene konnte der FAP2 Knockout über Immunfluoreszenz-Aufnahmen von Nierenübersichten nachgewiesen werden (Abb. 31).

Die homozygoten FAP2^{-/-} Knockout Tiere zeigten von Geburt an eine verringerte Körpergröße im Vergleich zu gleichaltrigen FAP2^{+/+} Knockout Geschwistertieren (Abb. 29) und wirkten insgesamt während der beobachteten Zeit kleiner.

Genauere Untersuchungen diesbezüglich wurden bereits von anderen Gruppen durchgeführt. Hierbei wiesen die FAP2^{-/-} Knockout Mäuse weniger Fetteinlagerungen, eine geringere Muskelmasse und einen geringeren Muskeltonus auf verglichen mit gleichalten FAP2^{+/+} Knockout Mäusen^{31,92}. In den Skelettmuskelzellen dieser FAP2^{-/-} Knockout Tiere wurde eine veränderte Mitochondrien-Morphologie und Dysfunktion der Enzyme der mitochondrialen Atmungskette beschrieben³¹.

Auch bei Patienten, die eine FAP2-Defizienz aufweisen, wurden diese Symptome beschrieben⁹⁵.

Unsere elektronenmikroskopische Untersuchungen der Nieren von 15 Wochen alten FAP2^{+/+} und FAP2^{-/-} Knockout Tiere wiesen keinerlei Unterschiede in der mitochondrialen Morphologie im proximalen Tubulus auf und auch andere Bereiche des Nephrons, wie der Glomerulus, zeigten sich unauffällig (Abb. 30).

Auch beim Knockout in einem anderen, an der Kreatin-Synthese beteiligten Enzym belegten frühere Studien eine unveränderte mitochondriale Organisation in Herzmuskelzellen von Mäusen⁹⁶. Ein Kreatin-Mangel schien also keinen Einfluss auf die mitochondriale Morphologie zu haben.

Weitere Untersuchungen an unseren FAP2^{-/-} Knockout Tieren wiesen in den Urin- und Plasma-Proben den erwarteten Kreatin- und Kreatinin-Mangel bei FAP2^{-/-} Knockout Tieren auf, sowie eine signifikant verringerte Menge an Guanidinoacetat (Abb. 33), welches durch den von FAP2 katalysierten ersten Schritt der Kreatin-Synthese aus L-Arginin und Glycin entsteht⁹².

Zur Normalisierung wurde die Urin-Osmolalität benutzt, da die FAP2^{-/-} Knockout Mäuse durch den Knockout einen Kreatinin-Mangel zeigten⁹².

Die FAP2^{-/-} Knockout Mäuse zeigten dabei eine signifikant erhöhte Osmolalität (Abb. 32). Eine mögliche Erklärung dafür wäre der erhöhte prozentuale Wasseranteil im Körper der FAP2^{-/-} Knockout Tiere, der von Choe *et al.* berichtet wird⁹². Wasser wird im Körper zurückgehalten und der Urin wird aufkonzentriert.

Allerdings war bei unseren FAP2^{-/-} Knockout Mäusen keine Glucosurie oder Aminoazidurie, welche typisch für ein Fanconi-Syndrom sind, messbar (Abb. 33).

Untersuchungen unserer Patienten in London zeigten bei einer Hirn-Kreatin Spektroskopie ein normales Körper-Kreatin und normale Kreatin-Spiegel in Urin und Plasma. Ferner gab es keine Anzeichen für neurologische Symptome, wie sie bei Patienten mit FAP2-Defizienz und daraus folgendem Kreatin-Mangel in H¹-MRT Untersuchungen bereits berichtet wurden^{95,97,98}.

Diese Ergebnisse sprechen also zusammen mit den Ergebnissen der FAP2^{-/-} Knockout Tiere gegen eine Haploinsuffizienz als Ursache des hier untersuchten Fanconi-Syndroms.

Auch wenn wir keine generelle Aminoazidurie in den FAP2^{-/-} Knockout Mäusen feststellen konnten, waren doch ein paar vermessene Substanzen signifikant verändert in Urin und Plasma der FAP2^{-/-} Knockout Mäuse verglichen mit FAP2^{+/+} Knockout Mäusen.

Die Aminosäuren Serin, Threonin, Tryptophan und Phenylalanin zeigten jeweils eine höhere renale Ausscheidung bei FAP2^{-/-} Knockout Mäusen (Abb. 33 E).

Serin und Threonin werden im Körper zu Glycin abgebaut, welches als Grundstein für die Bildung von Kreatin, die Porphyrinsynthese und Glutathion dient.

Da bei den FAP2^{-/-} Knockout Tiere die Kreatin-Synthese durch Fehlen des Enzyms nicht ablaufen kann, benötigt der Körper weniger Glycin. Serin und Threonin werden deshalb vermutlich nicht in normalem Maße zu Glycin abgebaut, sondern bei diesen Tieren über den Urin ausgeschieden.

Serin dient zusätzlich zusammen mit Indol als Baustein für Tryptophan, welches über die Niere ausgeschieden wird. Das wäre ein weiterer Abbauweg für ungenutztes Serin im Körper und eine Erklärung für die erhöhte Ausscheidung von Tryptophan über den Urin bei FAP2^{-/-} Knockout Mäusen.

Phenylalanin kann in der Leber in Tyrosin umgebaut oder auch zu Oxalacetat und Acetyl-CoA abgebaut werden und so in den Zitronensäurezyklus eingeschleust werden. Werden höhere Mengen an Phenylalanin über die Nahrung aufgenommen als benötigt, kann es renal ausgeschieden werden.

Ebenfalls erhöht war die gemessene Menge an Pyruvat im Urin der FAP2^{-/-} Knockout Mäuse (Abb. 33 C). Pyruvat entsteht als Endprodukt der Glykolyse und kann durch oxidative Decarboxylierung zu Acetyl-CoA und CO₂ abgebaut werden. Acetyl-CoA kann wiederum in den Zitronensäurezyklus eingeschleust werden. Eine verringerte Pyruvat-Konzentration wäre ein Marker für eine Mitochondriopathie, da durch weniger Pyruvat auch weniger ATP in den Mitochondrien gebildet werden kann. Allerdings zeigten unsere FAP2^{-/-} Knockout Mäuse im Urin eine erhöhte Pyruvat-Konzentration und im Plasma keinen Unterschied zu FAP2^{+/+} Knockout Mäusen.

Der geringere Lactat-Spiegel, der im Plasma der FAP2^{-/-} Knockout Tiere gemessen wurde (Abb. 33 C), könnte aus der verringerten Muskelmasse resultieren, die zuvor bereits berichtet wurde³¹.

5.3 Stabilität von FAP2_{WT}

In der vorausgegangenen Dissertation von Dr. Carsten Broeker wurde ein Stabilitätsversuch mit induzierten LLC-PK1_{MUT1} Zellen durchgeführt (Abb. 5). Hierbei sollte untersucht werden, ob die Zellen in der Lage sind, das überexprimierte FAP2 abzubauen. Aus zeitlichen Gründen war es Dr. Carsten Broeker nur möglich, das Experiment mit induzierten LLC-PK1_{MUT1} Zellen durchzuführen.

Die Halbwertszeiten von mitochondrialen Proteinen und Mitochondrien wurde bereits in verschiedenen Experimenten untersucht und variiert je nach Organ⁸⁷. In den 60er Jahren wurden die Halbwertszeiten von mitochondrialen Proteinen oder Bestandteilen und Mitochondrien gemessen. Dabei wurden Zeitangaben von 8,6 Tagen⁷, 10,3 Tagen⁹ oder 6,7 bis 12,2 Tagen⁸ für ganze Mitochondrien angegeben. Bei löslichen Proteinen schwankten die Angaben zwischen 5,9 Tagen⁷ bis 11,6 Tagen⁸. Proteine der äußeren mitochondrialen Membran wiesen eine Halbwertszeit von 4,2 Tagen auf, Proteine der inneren Membran 12,6 Tage⁸.

Für den Stabilitätsversuch wurden LLC-PK1_{MUT1} Zellen von Dr. Carsten Broeker nach zwei Wochen Induktion für weitere acht Woche ohne Induktion kultiviert. Auch nach dieser Zeit waren noch in jeder Zelle die vergrößerten Mitochondrien zu erkennen (Abb. 5). Es war den LLC-PK1 Zellen also nicht möglich, die langen FAP2_{MUT1} Aggregate wieder abzubauen und ein normales mitochondriales Netzwerk auszubilden.

In den Immunogold-Färbungen von Dr. Carsten Broeker (Abb. 4) konnte beobachtet werden, dass FAP2_{WT} eher an der inneren Mitochondrienmembran liegt, wie es auch zuvor schon beschrieben wurde⁵. Nach ca. 26 Tagen sollte demnach FAP2_{WT} wieder abgebaut sein, wenn kein weiteres FAP2_{WT} gebildet wird.

Der identische Versuchsaufbau wurde erneut benutzt, um im Vergleich zu FAP2_{MUT1} Aggregaten die Stabilität von FAP2_{WT} zu untersuchen. Bereits nach vier Wochen ohne Induktion konnte ein deutlicher Abbau des Proteins in der Immunfluoreszenz beobachtet werden, nach sechs Wochen war kein FAP2_{WT} mehr vorhanden (Abb. 14). Es war den Zellen also möglich, das überexprimierte FAP2_{WT} komplett abzubauen. Allerdings dauerte dieser Prozess länger, als nach den Literaturangaben vermutet wurde. Dies könnte möglicherweise an der starken Überexpression durch das Tet-on System liegen. Bei der Expression des mutierten Proteins wird vermutet, dass die Fission der Mitochondrien durch deren enorme Größe nicht mehr ablaufen kann und damit die natürliche Dynamik gestört wird.

Ein Abbau der FAP2_{MUT1}-Aggregate und somit eine Normalisierung der Morphologie der Mitochondrien wäre essentiell für die natürliche Dynamik von Mitochondrien. Über Fission werden beschädigte Mitochondrien abgeschnürt und können anschließend durch

Mitophagie abgebaut werden^{22,32,99,100}. Ein Ungleichgewicht dieser Dynamik wird bereits als Ursache einiger Erkrankungen vermutet¹⁰¹⁻¹⁰³. 2006 berichtete Chan, dass eine unbalancierte Fusion von Mitochondrien zu einer Elongation der Mitochondrien führt¹⁰⁴. Vergrößerte Mitochondrien allerdings können von Zellen nicht mehr durch mitochondriale Autophagie abgebaut werden¹⁰⁰, was die Ergebnisse des Stabilitätsversuches mit LLC-PK1_{MUT1} Zellen erklären könnte.

Durch den verhinderten Abbau der vergrößerten Mitochondrien ist es den Zellen nicht mehr möglich, fehlerhafte Mitochondrien abzubauen und so überaltern die veränderten Mitochondrien. Solche fehlerhaften oder überalterten Mitochondrien können zur erhöhten Produktion und Freisetzung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (reactive oxygen species, ROS) führen¹⁰⁵⁻¹¹⁰. Erhöhte Konzentrationen von ROS können zu einer Permeabilisierung der mitochondrialen Membranen und so zu einer Freisetzung mitochondrialer Proteine ins Zytoplasma führen¹¹¹⁻¹¹⁵. Dass ROS-Produktion und eine Schädigung der Mitochondrien mit anschließender Permeabilisierung der mitochondrialen Membranen zum Zelltod führen kann, wurde bereits untersucht¹¹⁶⁻¹¹⁹.

Bei Apoptose-Messungen an unserem induzierbaren Zellmodell durch Dr. Jörg Reinders am Biopark Regensburg konnte nachgewiesen werden, dass bei Überexpression von FAP2_{MUT1} deutlich mehr Zellen in Apoptose gehen, als bei Überexpression von FAP2_{WT} (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurde noch Lactat-Dehydrogenase (LDH) als Marker für nicht-apoptotischen Zelltod vermessen. Bei erhöhtem nicht-apoptotischem Absterben von Zellen erhöht sich die LDH-Konzentration im Medium. Auch hier zeigten LLC-PK1_{MUT1} Zellen signifikant höhere Werte als LLC-PK1_{WT} Zellen (Daten nicht gezeigt). Diese Messungen unterstützen die Theorie, dass nicht-abbaubare FAP2_{MUT1} Aggregate zu vermehrtem Zelltod führen.

5.4 Gen-Expressionsanalyse am FAP2-Zellmodell

Induzierte LLC-PK1_{MUT1} Zellen wiesen eine stark veränderte Mitochondrienmorphologie auf, die zu einem gestörten Abbau von Mitochondrien führt. In weiteren Experimenten sollte nun die Expression entzündungsfördernder Gene untersucht werden, deren mRNA-Expression durch diese pathologische Veränderung der Mitochondrien möglicherweise beeinflusst werden. Um etwaige Effekte von Tetrazyklin auszuschließen, wurden auch LLC-PK1_{VEK} Zellen untersucht, bei denen kein Zielgen in das Tet-on System integriert war. Es sind sowohl mitotoxische Effekte von Tetrazyklin bekannt^{83,84,120}, als auch inhibitorische Effekte auf zelluläre Prozesse^{85,86}.

Messungen von Kooperationspartnern konnten zeigen, dass durch die Überalterung der nicht abbaubaren Mitochondrien in induzierten LLC-PK1_{MUT1} Zellen eine erhöhte Menge an ROS produziert wird (Daten nicht gezeigt).

ROS ist ein potenter Aktivator des NLRP3-Inflammasoms^{106,110,121}. Auch wenn der Mechanismus des NLRP3-Inflammasoms noch nicht zur Gänze geklärt ist, sind doch einige Liganden, die diesen Komplex aktivieren, bereits bekannt. Neben ROS können das auch kristalline Ablagerungen sein, die bei zellulärem Stress oder absterbenden Zellen produziert werden^{109,122–125}. Das NLRP3-Inflammasom ermöglicht die Aktivierung von Caspase-1 und weiteren Caspasen^{107,126}. Caspase-1, früher auch „IL-1 β converting enzyme“ genannt, spaltet inaktives pro-IL-18 und pro-IL-1 β in die aktiven Formen IL-18 und IL-1 β ^{127–130}.

LLC-PK1_{MUT1} Zellen zeigten eine Aktivierung von inflammatorischen Prozessen, welche über die erhöhte Expression entzündungsfördernder Gene nachgewiesen werden konnte. Ein zentraler Bestandteil des Inflammasoms ist das Protein NLRP3^{109,122,124,131}, das in LLC-PK1_{MUT1} Zellen auf mRNA-Ebene signifikant erhöht war, verglichen mit LLC-PK1_{WT} und LLC-PK1_{VEK} (Abb. 22 A).

In LLC-PK1_{MUT1} Zellen war zudem eine deutlich erhöhte Expression von IL-18 sowohl auf RNA-Ebene (Real-Time PCR, Abb. 22 B), als auch auf Protein-Ebene (ELISA, Abb. 23, Western Blot, Abb. 24) auffällig. Auch über Immunfluoreszenz-Experimente konnte eine höhere intrazelluläre Expression von IL-18 in LLC-PK1_{MUT1} Zellen im Vergleich zu LLC-PK1_{WT} Zellen beobachtet werden (Abb. 25).

Bei Untersuchungen von murinen Nieren nach unilateraler ureteraler Obstruktion (UUO) konnte ein signifikanter Anstieg von IL-18, Collagen und Glattmuskel-Aktin in der Niere, sowie eine renale Fibrose mit epithelialer zu mesenchymaler Umwandlung des Tubulusepithels festgestellt werden¹⁰⁷. Die Behandlung von humanen proximalen Tubuluszellen (HK-2 Zellen) in Zellkulturexperimenten mit IL-18 führte ebenfalls zu einer Expression von Glattmuskel-Aktin, Collagen, Fibronectin und zu einer epithelialer zu mesenchymaler Umwandlung des Tubulusepithels (epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)^{73,132}. In Tieren, die das humane Bindeprotein für IL-18 (IL-18-BP) überexprimierten und somit IL-18 nicht aktiv war, zeigten signifikant verringerte Expressionen der genannten Obstruktion-induzierten Fibrose-Markern⁷³. IL-18 scheint demzufolge ein potenter Stimulus zur Entwicklung einer renalen Fibrose und zu einer EMT zu sein.

Aufgrund der aktivierten inflammatorischen Prozesse durch eine erhöhte Produktion von IL-18 in den induzierten LLC-PK1_{MUT1} Zellen wird deshalb auch die Entstehung einer Fibrose vermutet.

Obwohl in unserem Zellmodell nur porcine proximale Tubuluszellen vorhanden waren, konnte dennoch eine signifikant erhöhte Expression an intrazellulärem Fibronectin auf mRNA-Ebene (Real-Time PCR, Abb. 22 C) und extrazellulärem Fibronectin auf Protein-Ebene (Immunfluoreszenz-Aufnahmen, Abb. 26) nachgewiesen werden.

Zusätzlich zu Fibronectin als extrazelluläres Matrixprotein war auf mRNA-Ebene auch der Myofibroblasten-Marker Glattmuskel-Aktin signifikant erhöht (Abb. 22 D).

In geschädigtem Nierengewebe können durch die Einwanderung inflammatorischer Zellen Fibroblasten aktiviert werden, die extrazelluläre Matrix (extracellular matrix, ECM), wie zum Beispiel Fibronectin, bilden^{65,70,75}. Eine Verknüpfung von Bestandteilen der ECM stabilisiert die Matrix^{65,67,70,75,76}, wobei ein Cross-link von Collagen mit Fibronectin diese Matrix resistent gegen proteolytische Matrix-Metalloproteasen (MMP) macht⁶⁸.

Zusätzlich zur Aktivierung von solchen mesenchymalen Zellen, die Fibronectin produzieren können, kann es zu einer epithelialer zu mesenchymaler Umwandlung des Tubulusepithels (epithelial-to-mesenchymal transition, EMT) kommen^{73,132}, was eine weitere Quelle für Zellen darstellt, die extrazelluläre Matrixproteine bilden können.

Ein Marker für aktivierte Myofibroblasten, die extrazelluläre Matrixproteine produzieren, ist Glattmuskel-Aktin^{63,64,66,67}. Die erhöhte mRNA-Expression von Glattmuskel-Aktin in unseren induzierten LLC-PK1_{MUT1} Zellen könnte ein möglicher Hinweis auf eine partielle Umwandlung von epithelialen Zellen zu Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften sein.

5.5 Respirometrische Untersuchungen der LLC-PK1 Zellen

Da eine zuvor untersuchte Form des Fanconi-Syndroms durch eine Störung der Energiegewinnung in proximalen Tubuluszellen ausgelöst wurde³⁰, sollte auch bei der jetzt vorliegenden Form untersucht werden, ob die Veränderung der Mitochondrien-Morphologie einen Einfluss auf die respiratorische Funktion der Zellen hat.

Die respirometrischen Messungen zeigten nach einer Woche Induktion zwar Unterschiede in der maximalen Respiration, der ATP-Produktion und der Reservekapazität bei LLC-PK1_{MUT1} Zellen im Vergleich zu LLC-PK1_{WT}. Wurden die Zellen allerdings nach dreiwöchiger Induktion untersucht, waren keine signifikanten Unterschiede mehr messbar. Einzig der Umfang der Reservekapazität war in beiden Versuchen bei Zellen mit mutiertem FAP2 geringer, als bei Zellen mit FAP2_{WT} (Abb. 27).

Die Reservekapazität beschreibt den maximalen Verbrauch von O₂ über die Atmungskette, wenn Komplex V durch Oligomycin gehemmt ist und die Protonen über „Löcher“ die innere Mitochondrienmembran zurück in die Matrix passieren können (Abb. 9). Diese „Löcher“ werden über FCCP generiert und ermöglichen einen Abbau des Protonengradienten, der über die Komplexe der Atmungskette über die innere Mitochondrienmembran aufgebaut wird.

Die Bildung der verlängerten Mitochondrien und die daraus resultierenden überalternden Mitochondrien schienen die maximale Leistung der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) zu vermindern, was eine mögliche Erklärung für eine verminderte Transportaktivität der proximalen Tubuluszellen sein könnte, die zur Ausbildung der

typischen Symptome des Fanconi-Syndromes führt. Auch bei Zystinose wird ein Fanconi-Syndrom durch eine verminderte mitochondriale Respiration ausgelöst^{38,39}.

Im vorherigen Abschnitt wurde bereits diskutiert, dass eine Überexpression von FAP2_{MUT1} zu einer Bildung von filamentartigen Aggregaten in den Mitochondrien führt. Dadurch kommt es zu einer pathologischen Veränderung der Mitochondrienmorphologie, da diese nicht mehr durch Mitophagie abgebaut werden können. Die daraus resultierende Produktion von ROS setzt vermutlich entzündungsstimulierende Prozesse in Gang, die zu einem vermehrten Absterben von Tubuluszellen führt.

Es konnte in der Literatur bereits beobachtet werden, dass die Inhibition von Mitophagie zu einer erhöhten Produktion von mitochondrialem ROS führt. Außerdem wurde in den Experimenten dieser Gruppe eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms durch ROS vermutet¹¹⁰.

Die so ausgelösten Entzündungsprozesse könnten das zu Beginn der vorliegenden Erkrankung diagnostizierte Fanconi-Syndrom erklären. Es entsteht vermutlich eher nicht durch eine gestörte Energiebereitstellung im proximalen Tubulus, wie bei der Form des Fanconi-Syndroms, die bei der Mutation des *EHHADH*-Gens vorliegt³⁰, sondern durch das langsam fortschreitende Absterben der Zellen im proximalen Tubulus. Auch dadurch kann ein Fanconi-Syndrom ausgelöst werden^{133,134}.

5.6 Untersuchung von humanem Patientengewebe

5.6.1 FAP2-Patient 1 (Nierenbiopsie)

Aus Zellkultur-Experimenten und den bisherigen Untersuchungen an murinen und humanen Proben und der bereitgestellten Nierenbiopsie des ersten Patienten mit der vorliegenden Form des Fanconi-Syndroms (21-jähriger Patient) in der Doktorarbeit von Dr. Carsten Broeker war die Lokalisation von FAP2 in der Niere bereits bekannt. FAP2 zeigte eine mitochondriale Lokalisation an der basolateralen Seite von frühproximalen Tubuli (S1/2-Segment), andere Segmente des Tubulussystems und auch Glomeruli waren FAP2-negativ. Die in den 60er Jahren entnommene Nierenbiopsie zeigte bereits erste Schäden an proximalen Tubuli mit abgelösten FAP2-positiven Zelltrümmern im Lumen der Tubuli.

In elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnten filamentartige Strukturen in den Mitochondrien von proximalen Tubuluszellen nachgewiesen werden, nicht-proximale Tubuli und deren Mitochondrien zeigten hingegen keinerlei morphologische Veränderungen (Abb. 3). Um den Aufbau dieser filamentartigen Strukturen zu untersuchen, wurde die Probe mittels Immunogold-Färbung auf FAP2 gefärbt. Dabei ist der sekundäre Antikörper mit Goldpartikeln markiert, die in elektronenmikroskopischen

Aufnahmen durch ihre Elektronendichte als schwarze Punkte erscheinen. Hierbei konnte beobachtet werden, dass die Filamente in den vergrößerten Mitochondrien FAP2 enthielten, da sich die Goldpartikel genau auf diesen Strukturen lagen (Abb. 15). Die Filamente, die in der Zellkultur entdeckt wurden, waren also keine Artefakte, welche durch die Überexpression des mutierten Proteins verursacht wurden.

Es wäre denkbar gewesen, dass nicht nur FAP2_{MUT} alleine zum Aufbau der filamentartigen Strukturen beiträgt, sondern noch weitere Proteine beteiligt sind. *In silico* Strukturanalysen unserer Kooperationspartner bezüglich der Aggregation von FAP2_{MUT} widerlegten diese Vermutung allerdings (Daten nicht gezeigt). Mutiertes FAP2 allein ist ausreichend, um lineare Aggregate zu bilden.

5.6.2 FAP2-Patient 2 (post mortem entnommene Niere)

Weiterhin wurde durch Prof. Kleta noch eine weitere, in Paraffin eingebettete Gewebeprobe eines FAP2-Patienten zur Verfügung gestellt. Diese Probe wurde von einem 65-jährigen Patienten nach dessen Tod, verursacht durch terminales Nierenversagen, entnommen.

Bereits in der Hämalaun/Eosin-Färbung konnte beobachtet werden, dass das Nierengewebe pathologisch stark verändert war. Im Cortex waren kaum intakte Tubuli oder Glomeruli zu sehen, die Blutgefäße hingegen erschienen durch die fibroseinduzierte Schrumpfung des Cortex überdimensional groß. Stellenweise war auch eine Infiltration von Immunzellen zu erkennen, was auf eine Entzündungsreaktion hinweist.

Auch Medulla und Papille waren strukturell verändert mit ungewöhnlich wenig Tubuli, die in sehr viel extrazellulärer Matrix eingebettet waren (Abb. 16).

Zum Anfärben des Bindegewebes wurde eine Masson-Goldner Färbung durchgeführt. Bei diesen Aufnahmen wurde deutlich, dass Medulla und Papille hauptsächlich aus Bindegewebe aufgebaut waren. Bei den vereinzelt übrigen Tubuli hatten sich die Zellen bereits von der Basalmembran abgelöst und waren nur noch im Tubuluslumen zu sehen. Viele Glomeruli waren fibrotisch verändert und nicht mehr funktionell (Abb. 17).

Zur Detektion von FAP2 wurden zudem Immunfluoreszenz-Färbungen an dieser Patientenprobe durchgeführt. Hierbei konnte beobachtet werden, dass der Cortex, der bei gesundem Gewebe zu ca. 75% aus proximalen Tubuli besteht, nur noch wenige halbwegs intakte, FAP2-positive proximale Tubuli enthielt.

Die fragmentiert wirkende Morphologie der Mitochondrien könnte auf eine zelluläre Schädigung der Epithelzellen des proximalen Tubulus hinweisen³² oder eventuell aus einem schlechten Erhalt der Probe resultieren.

Darüber hinaus wurde noch Glattmuskel-Aktin gefärbt. Glattmuskel-Aktin gilt als Marker für aktivierte Fibroblasten, Mesangialzellen und Epithelzellen, die eine Umwandlung zu

mesenchymalen Zellen durchlaufen haben ^{63,64,66,72}. Da das Nierengewebe fibrotisch verändert war, sollte das Vorhandensein solcher Zellen untersucht werden.

In die verdickten Basalmembranen um Tubuli und Glomeruli waren Glattmuskel-Aktin produzierenden Myofibroblasten, teilweise in mehreren Schichten, eingelagert (Abb. 18).

Die Präsenz solcher Zellen wäre eine Erklärung für die massive fibrotische Veränderung, die in diesem Nierengewebe zu erkennen war. Die Herkunft der Zellen ist nicht gänzlich geklärt. Es könnten Immunzellen sein, die durch die Aktivierung der Entzündungsvorgänge chemotaktisch eingewandert sind. Es könnte sich aber auch um umgewandelte interstitielle Zellen handeln oder sogar um partiell umgewandelte Epithelzellen. Eine Umwandlung von epithelialen Zellen in mesenchymale Zellen wird in der Literatur als epitheliale zu mesenchymaler Umwandlung (epithelial-to-mesenchymal transition, EMT) beschrieben. Dabei verlieren die epithelialen Zellen durch Stimuli wie IL-18 ihren epithelialen Phänotyp und zeigen Merkmale eines mesenchymalen Phänotypes, wie beispielsweise die Expression des extrazellulären Matrixproteins Fibronectin oder Glattmuskel-Aktin ^{63,64,66,67,72,88}.

Dass es sich im vorliegenden Fall um EMT handelt ist allerdings eher unwahrscheinlich, da es in der Nierenprobe keine Zellen gab, die sowohl FAP2 als Marker für Epithelzellen des proximalen Tubulus, als auch Glattmuskel-Aktin als Marker für aktivierte Myofibroblasten exprimierten (Abb. 18).

Weiterhin wurden auch im Lumen der verbliebenen proximalen Tubuli FAP2-positive Zelltrümmer entdeckt, wie sie bereits in der zuvor untersuchten Patientenbiopsie beobachtet wurden (Abb. 18 und 19).

Diese Zelltrümmer würden die Vermutung unterstützen, dass in FAP2-positiven Zellen Mitochondrien altern und die mitochondrialen Membranen permeabilisieren. Dadurch können die Filamente ins Zytoplasma gelangen und können dort als sogenannte „damage-associated molecular pattern“ (DAMPs) erkannt werden.

Aktuell gelangen DAMPs, die mitochondrialen Ursprungs sind, immer mehr in das Interesse der Forschung ^{135–138}. Als DAMPs werden molekulare Strukturen bezeichnet, die endogen nicht freigelegt sind, sondern durch die Schädigung von Zellorganellen oder der Zelle freigesetzt werden ¹³⁹. Diese Strukturen werden von sogenannten „pattern recognition receptors“ (PRRs) erkannt, die bestimmte Muster erkennen, die nur bei zellulärer Schädigung oder auch Infektionen auftreten ^{140,141}. Es gibt bereits auch Studien, die Kristalle intrazellulär als Stimuli für Entzündungsreaktionen beschreiben ^{124,125}.

Abgestorbene und abgelöste Zellen des proximalen Tubulus werden anschließend im Lumen des Tubulus weiter in Flussrichtung bewegt. Frische Urinproben von FAP2-Patienten könnten hierfür genauere Ergebnisse liefern, wenn sie auf Zellen im Urin untersucht werden würden.

Zuletzt wurde auch diese Gewebeprobe elektronenmikroskopisch untersucht. Hier waren die verdickten Basalmembranen mit eingelagerten Myofibroblasten besonders deutlich zu erkennen (Abb. 20). Im Lumen der Tubuli waren neben den abgestorbenen und abgeschwemmten Zellen auch kristallartige Strukturen erkennbar, welche sehr ähnlich zu den filamentartigen Ablagerungen der Patientenbiopsie waren. Diese hier waren allerdings nicht in den Mitochondrien, sondern überwiegend im Tubuluslumen oder in geringerer Anzahl innerhalb des Tubulusepithels lokalisiert. In Immunogold-Färbungen waren diese Strukturen allerdings FAP2 negativ (Abb. 21). Aufgrund des Alters der Probe und der Tatsache, dass das Gewebe *post mortem* entnommen und fixiert wurde, wäre nicht auszuschließen, dass es sich bei diesen kristallartigen Strukturen um Artefakte handelt und mögliche einst vorhandene FAP2-Filamente gar nicht mehr nachweisbar sind. Ferner wäre es denkbar, dass es sich zwar um FAP2-Ablagerungen handelt, diese aber aufgrund des Alters und der Behandlung der Probe ihre Antigenität verloren haben. Während die erste untersuchte Patientenbiopsie den Beginn der Erkrankung darstellte, zeigte diese Probe den pathologischen Endzustand der Erkrankung durch die FAP2-Mutation.

5.7 Phänotypische Untersuchung einer FAP2 Knockin Maus

Da die FAP2 Knockout Maus kein renales Fanconi-Syndrom zeigte, wurde in einem nächsten Schritt eine FAP2 Knockin Maus mit einer der vier humanen Mutationen generiert und auf ihren renalen Phänotyp hin untersucht. Dafür ausgewählt wurde die Mutation FAP2_{MUT2} von Prof. Kleta.

Über eine sequenzspezifische CRISPR/Cas9 Nuklease und ein einzelsträngiges Oligonukleotid, welches die gewünschte Mutation trägt, wurde die Gensequenz von FAP2 der Maus dahingehend verändert, dass der identische Aminosäure-Austausch wie im Protein der Patienten mit FAP2_{MUT2} stattfindet.

Ein so generiertes murines Gen-Konstrukt wurde in mehrere murine Blastozysten injiziert, um Gründermäuse zu generieren, die die Mutation FAP2_{MUT2} trugen. Die Nachkommen der unterschiedlichen Gründermäuse wurden nicht miteinander verpaart, sodass die Knockin Mäuse auf jeweils eine injizierte Blastozyste zurückzufolgen sind.

In Regensburg wurden ausgehend von heterozygoten Tieren homozygote FAP2^{-/-} Knockin Mäuse gezüchtet und phänotypisch untersucht. Da sich die Nachkommen der unterschiedlichen Gründermäuse phänotypisch nicht unterscheiden, werden nachfolgend die Ergebnisse der Nachkommen von nur einer Gründermaus dargestellt.

Bei der Untersuchung des Phänotyps der FAP2 Knockin Mäuse wurde zunächst festgestellt, dass alle homozygoten FAP2^{-/-} Knockin Tiere kaum Protein-Expression von

FAP2 zeigten, obwohl die mRNA-Expression bei FAP2^{-/-} Knockin Tieren höher war als bei FAP2^{+/+} Knockin oder heterozygoten FAP2^{+/-} Knockin Tieren (Abb. 36 und 37).

Auch bei Immunfluoreszenz-Färbungen auf FAP2 war nur sehr wenig mutiertes Protein in den proximalen Tubuli der FAP2^{-/-} Knockin Tiere zu erkennen, während bei FAP2^{+/+} Knockin Tieren die übliche FAP2-Färbung zu sehen war (Abb. 38).

Diese Resultate deuten darauf hin, dass das mutierte murine *Fap2* Gen deutlich weniger stark exprimiert wird als das FAP2_{WT}-Protein. Da die mRNA Expression erhöht ist, scheint es eher unwahrscheinlich, dass die Translation des Proteins gestört ist und ursprünglich weniger gebildet wird. Vermutlich wird das mutierte Protein von den Zellen als fehlerhaft erkannt und weitgehend abgebaut, bevor es in die Mitochondrien importiert wird.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung von proximalen Tubuli der Mäuse ergab eine normale Morphologie der Mitochondrien. Es waren keine kristallinen oder filamentartigen Strukturen in der Matrix der Mitochondrien zu erkennen (Abb. 39).

Zusätzlich zu den Expressionsuntersuchungen wurden auch Spontanurin-Proben analysiert. Obwohl die Tiere keine Anzeichen eines renalen Fanconi-Syndroms aufwiesen, fiel jedoch auf, dass die FAP2^{-/-} Knockin Mäuse eine signifikant höhere Menge an Glycin und Ornithin ausschieden (Abb. 41).

Durch die geringere Protein-Expression von FAP2 werden die Substrate Glycin und L-Arginin vermutlich nicht normal weiter zu Guanidinoacetat verstoffwechselt, sondern, im Fall von Glycin, sofort über die Niere ausgeschieden oder, im Fall von L-Arginin, unter Addition von Wasser zu Ornithin und Harnstoff abgebaut und ausgeschieden.

Im Gegensatz zu den zuvor untersuchten FAP2^{-/-} Knockout Mäusen zeigten die FAP2^{-/-} Knockin Mäuse eine signifikant höhere Urin-Osmolalität (Abb. 40), was bedeutet, dass diese Tiere den Urin stärker aufkonzentrieren als die entsprechenden Wildtyp-Kontrollen. Der Grund hierfür ist aber nicht bekannt.

Um bei den FAP2^{-/-} Knockin Mäusen eine mögliche Nierenfibrose nachzuweisen, wurde auch in den Nieren von FAP2^{+/+} Knockin und FAP2^{-/-} Knockin Mäusen die Expression von Entzündungsmarkern auf mRNA-Ebene untersucht. Keines der vier untersuchten Gene (*mNlrp3*, *mIl-18*, *mFn1* und *mGlattmuskel-Aktin*) zeigte dabei eine veränderte Expression in FAP2^{-/-} Knockin Mäusen (Abb. 42).

Diese Ergebnisse unterstützen die zuvor beobachteten Ergebnisse der Phänotypisierung, dass FAP2^{-/-} Knockin Mäuse die zu untersuchende Erkrankung nicht ausbilden und lassen darauf schließen, dass diese Maus-Linie kein geeignetes Modell für die Untersuchung des vorliegenden Fanconi Syndroms ist.

Aus den Untersuchungen der FAP2 mRNA- und Protein-Expression in den FAP2^{-/-} Knockin Mäusen lässt sich zeigen, dass die FAP2^{-/-} Knockin Mäuse durchaus

FAP2_{MUT2} mRNA exprimieren, das mutierte Protein allerdings zu schnell wieder abgebaut wird und somit keine Filamente gebildet werden können.

Da die FAP2^{-/-} Knockin Mäuse im Gegensatz zu den FAP2^{-/-} Knockout Mäusen keine Gedeihstörung zeigten, ist davon auszugehen, dass die FAP2^{-/-} Knockin Mäuse keinen Kreatin-Mangel haben, das verbliebene FAP2_{MUT2} funktionstüchtig ist und dessen verbliebene Restexpression ausreichend ist, um genügend Kreatin zu synthetisieren.

Kreatinin-, Kreatin- und Guanidinoacetat-Messungen im Urin von Knockin Mäusen sind in Auftrag gegeben, die Ergebnisse lagen aber zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht vor.

Die Mäuse waren bei den Untersuchungen noch recht jung (zwischen 8 – 10 Wochen). Möglicherweise benötigt die Ausbildung eines Phänotyps längere Zeit, da die jüngste FAP2-Patientin bei der Diagnose des renalen Fanconi-Syndroms 18 Monate alt war. Das terminale Nierenversagen tritt erst im Alter zwischen 30 – 70 Jahren auf. Aus diesem Grund sollen einige FAP2^{-/-} Knockin Mäuse älter werden, um später zu untersuchen, ob sich der Phänotyp eines renalen Fanconi-Syndroms entwickelt.

Zusätzlich könnte die Expression von FAP2 über Supplementation von L-Arginin stimuliert werden, da wir zeigen konnten, dass die orale Aufnahme von L-Arginin im Trinkwasser bei Mäusen über zwei Wochen zu einer Steigerung der FAP2 Expression, sowohl auf mRNA-Level, als auch auf Protein-Level führt (Abb. 34). In früheren Untersuchungen wurde ein längerer Zeitraum der Supplementation untersucht, der ebenfalls zu einer Steigerung der FAP2 Expression führte¹⁴².

Aufgrund der Ergebnisse, dass FAP2_{MUT2} in den FAP2^{-/-} Knockin Mäusen keine Filamente in den Mitochondrien der proximalen Tubuluszellen ausbildet, wurden Zellkultur-Experimente mit transienter Transfektion durchgeführt. Dabei sollte untersucht werden, ob mutiertes murinem FAP2_{MUT2} überhaupt in der Lage ist, Filamente auszubilden. Dies war nämlich in der Vergangenheit nur an der humanen Variante des mutierten Proteins untersucht worden.

LLC-PK1 Zellen und auch murine Primärkulturen von proximalen Tubuluszellen zeigten bei transienter Transfektion mit humanem FAP2_{MUT2} die erwartete Expression mit den vergrößerten Mitochondrien. Murines FAP2 zeigte ebenfalls eine normale mitochondriale Lokalisation (Abb. 44 A).

Wurden die Zellen jedoch mit murinem FAP2_{MUT2} transfiziert, konnte keine Bildung von Filamenten beobachtet werden. Viele der transfizierten Zellen zeigten ein normales mitochondriales Netzwerk wie bei Überexpression von FAP2_{WT} (Abb. 44 B).

In einem weiteren Experiment wurde ein Plasmid mit murinem FAP2_{MUT1} hergestellt und transient transfiziert. Diese Mutation im murinen Gen führte überraschenderweise zu einer Filament-Bildung in den Mitochondrien, sowohl in LLC-PK1 Zellen (Abb. 45), als auch in der murinen Nieren-Primärkulturen (Abb. 46).

Das Problem der fehlenden Aggregat-Bildung in den FAP2^{-/-} Knockin Mäusen schien demnach nicht an der Verwendung des murinen FAP2 zu liegen, da eine andere Mutation in murinem FAP2 zu einer Bildung von FAP2_{MUT}-Filamenten führt.

Im Vergleich zur humanen Variante befinden sich in der murinen Genvariante von FAP2_{MUT2} in unmittelbarer Nachbarschaft zur eigentlichen Mutation zwei abweichende Basen (bei c1012 und bei c1030), die zu abweichenden Basen in dem entsprechenden Triplet führen und zu einer anderen Aminosäure (Abb. 43). Im humanen Gen befinden sich an diesen Stellen jeweils ein Adenin (A), im murinen Gen jedoch ein Guanin (G).

Um zu testen, ob diese Basen bzw. die geänderten Aminosäuren die Filament-Bildung verhinderten, wurde das murine *Fap2*_{MUT2} Gen an diesen zwei Stellen durch Site-directed mutagenesis humanisiert und anschließend transient in LLC-PK1 Zellen transfiziert.

Bei allen getesteten humanisierten Variationen (jeweils nur eine Stelle humanisiert und beide Stellen humanisiert) konnte keine Bildung von FAP2_{MUT2} Aggregaten beobachtet werden (Abb. 47 und 48).

Es waren eher fragmentierte Mitochondrien in den transfizierten Zellen zu erkennen, was die Theorie unterstützen würde, dass die Mutation 2 von FAP2 im murinen Gen zu einem beschleunigten Abbau des mutierten Proteins beziehungsweise der Mitochondrien mit diesem Protein führt. Damit Mitochondrien durch Mitophagie abgebaut werden können, müssen sie zunächst fissionieren oder fragmentieren, um in autophagolytische Vesikel eingeschlossen werden zu können¹⁰⁰. Ein weiterer Marker für defekte Mitochondrien wäre ein verringertes Membranpotential^{100,143}, welches in weiteren Experimenten für die FAP2 Mutationen untersucht werden soll.

5.8 Vermuteter Pathomechanismus des vorliegenden Fanconi-Syndroms

Obwohl FAP2 nur in Mitochondrien der früh-proximalen Tubuluszellen exprimiert wird und auch nur dort bei Vorliegen der Mutationen Filamente bildet, werden interessanterweise auch pathologische Ereignisse außerhalb des proximalen Tubulus ausgelöst.

Bei mutiertem FAP2 entstehen an der Oberfläche des Proteins neue mögliche Interaktionsstellen. Dadurch kommt es zu einer Aggregation von FAP2_{MUT} und es entstehen lange Filamente in den Mitochondrien.

Mitochondrien, die FAP2_{MUT}-Filamente enthalten, sind in unseren Zellkultur-Experimenten nicht mehr in der Lage, über Mitophagie kontrolliert und abgebaut zu werden. Es kommt zu einer Elongation der Mitochondrien, die FAP2_{MUT} Filamente enthalten (Abb. 49).

Vermutlich liegt dies daran, dass die Fission, welche normalerweise der Mitophagie vorangeht^{22,32,99,100}, durch die mechanisch stabilen Filamente in der Matrix verhindert

wird.

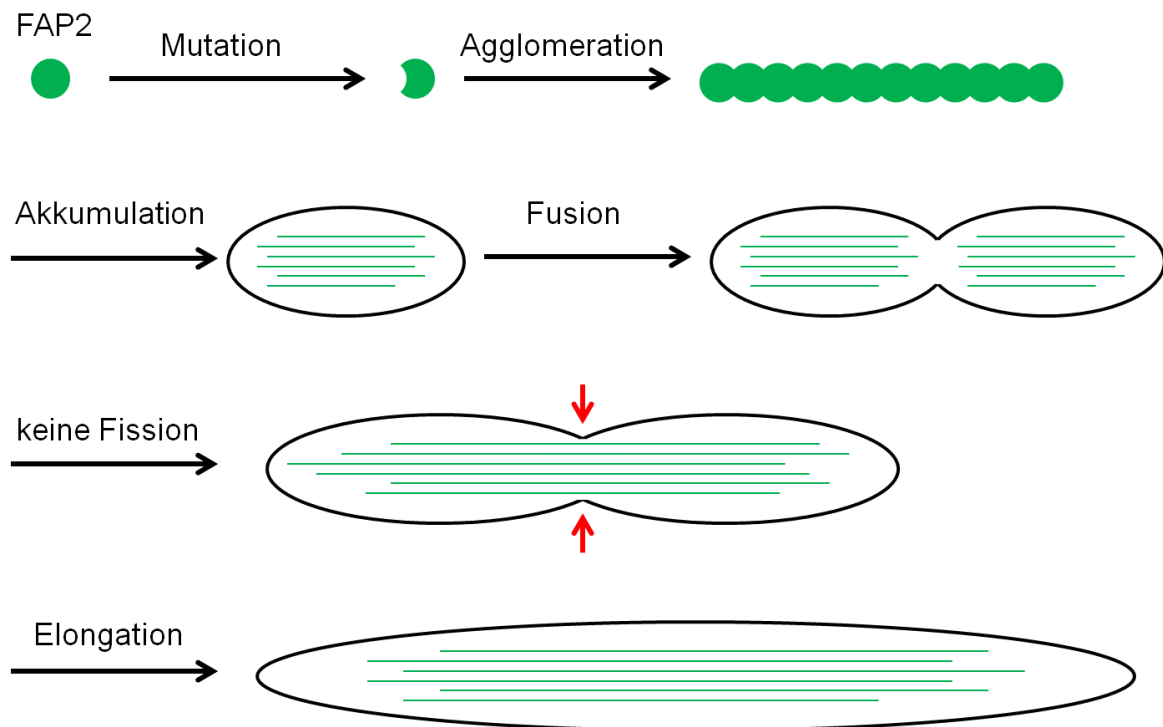


Abbildung 49: Pathomechanismus zur Entstehung der vergrößerten Mitochondrien mit FAP2-Agglomeraten

Durch die Mutation in FAP2 entstehen neue Interaktionsstellen an der Oberfläche des Proteins. Dadurch wird eine Agglomeration von FAP2 ermöglicht. FAP2-Agglomerate akkumulieren in den Mitochondrien. Eine weitere Fusion der Mitochondrien erscheint noch möglich, eine Fission ist allerdings nicht mehr möglich. Die Mitochondrien mit den FAP2-Filamenten können nicht mehr durch Mitophagie abgebaut werden und elongieren.

Ohne den Abbau von defekten Mitochondrien über normale Fission und Mitophagie überaltern diese. Laut Literatur führt dies zu einer erhöhten Bildung von ROS¹⁰⁵⁻¹¹⁰ und vermutlich zu einer Permeabilität der mitochondrialen Membranen^{111,115,144,145} (Abb. 50).

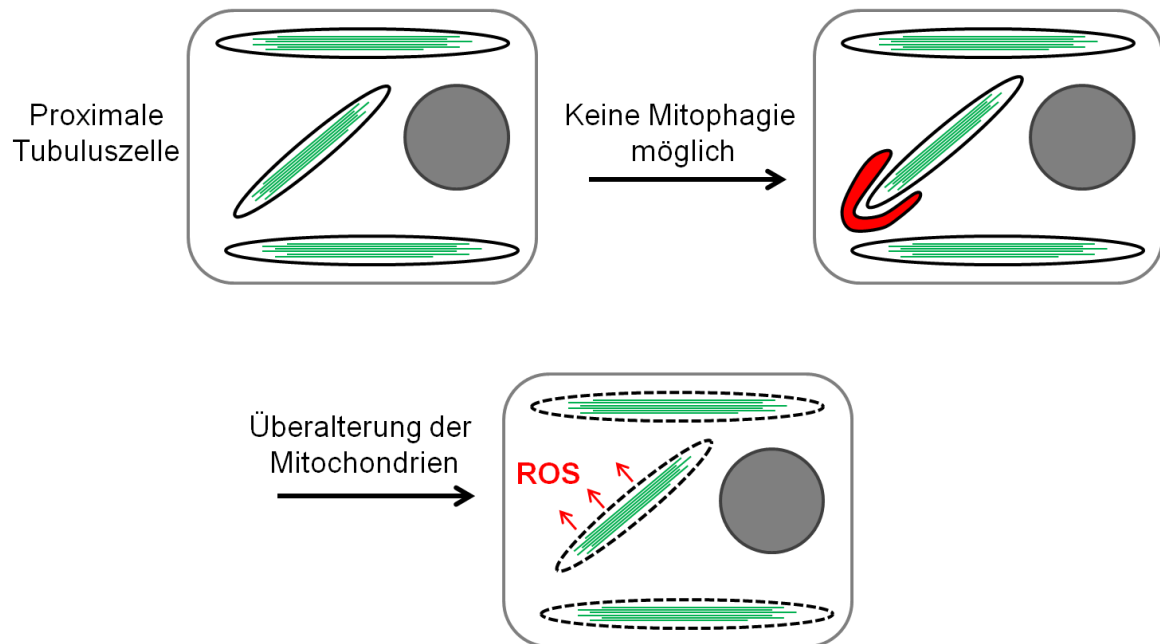


Abbildung 50: Überalterung der Mitochondrien mit FAP2-Filamenten

In proximalen Tubuluszellen akkumulieren verlängerte Mitochondrien mit FAP2-Filamenten. Durch die Größe der Mitochondrien ist eine Mitophagie nicht mehr möglich und die Mitochondrien überaltern. Dies führt zu einer erhöhten Produktion von reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS) und zu einer beginnenden Permeabilisierung der mitochondrialen Membranen.

Bereits die erhöhte Produktion von ROS durch überalterte oder fehlerhafte Mitochondrien^{105–110} ist ein potenter Stimulus. Zum einen kann ROS das NLRP3-Inflammasom aktivieren^{106,110,121}, zum anderen führt es zu einer Permeabilisierung der mitochondrialen Membranen^{111–115} und fördert so eine Freisetzung der mitochondrialen FAP2-Aggregate. Dass ROS-Produktion und eine Schädigung der Mitochondrien mit anschließender Permeabilisierung der mitochondrialen Membranen zum Zelltod durch Apoptose führen kann, wurde bereits untersucht^{116–119}.

Durch die ROS-Produktion der überalternden Mitochondrien und die Permeabilisierung der mitochondrialen Membranen kommt es zum fortschreitenden Absterben der Zellen des proximalen Tubulus (Abb. 51).

Außerdem gibt es Studien, die beschreiben, dass auch IL-18, das in den Zellkultur-Experimenten bei FAP2_{MUT1} signifikant erhöht war, ebenfalls Apoptose von tubulären Epithelzellen unterstützt¹³².

Überalterte Mitochondrien:
Produktion von ROS

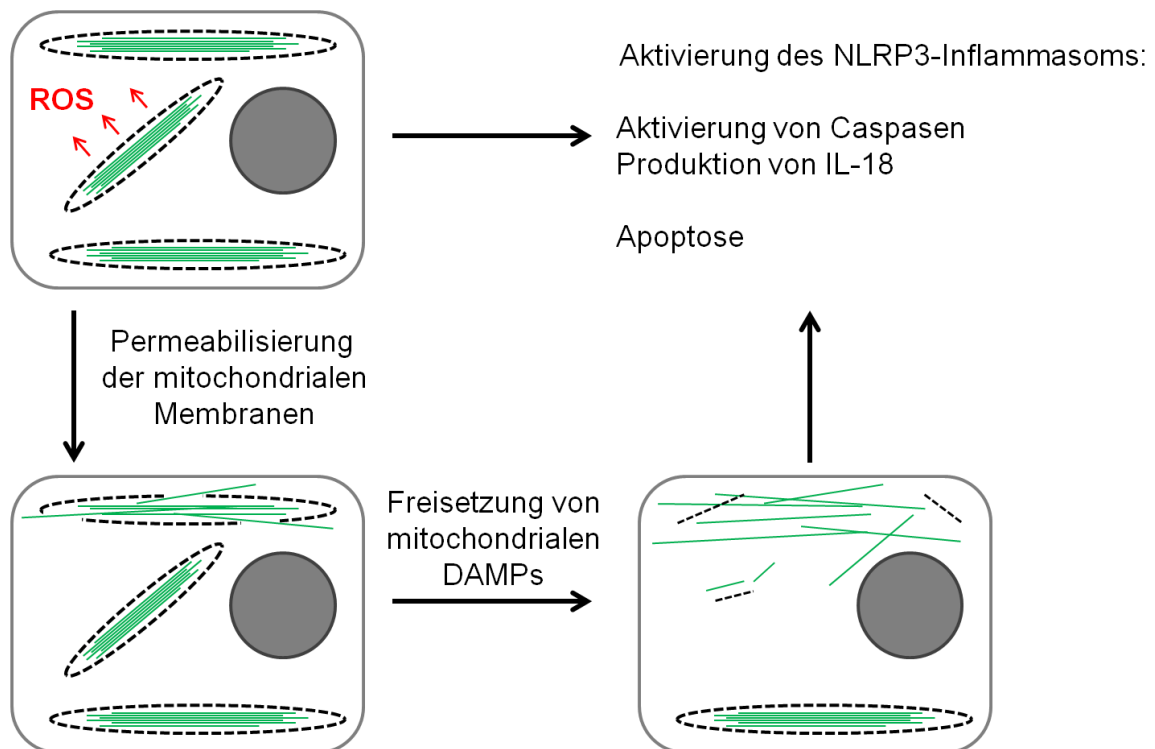


Abbildung 51: Zelluläre Mechanismen durch erhöhte Produktion von reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS)

Die überalternden nicht abbaubaren Mitochondrien bilden eine erhöhte Menge an reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS). ROS ist zum einen selbst ein potenter Stimulus für die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms. Zum anderen induziert es auch eine weitere Permeabilisierung der mitochondrialen Membranen. Dies führt zu einer Freisetzung der FAP2-Filamente und weiterer mitochondrialer „damage-associated molecular pattern“ (DAMPs). Diese endogenen DAMPs können von der Zelle erkannt werden und führen zu einer Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms. Außerdem führt eine erhöhte ROS-Produktion und eine Permeabilisierung mitochondrialer Membranen zum Zelltod durch Apoptose.

Dadurch nimmt die Anzahl der gesunden Epithelzellen des proximalen Tubulus ab und würde das Fanconi-Syndrom erklären, das in frühen Lebensjahren bei unseren Patienten diagnostiziert wird. Es gibt weitere Fälle, bei denen ein Fanconi-Syndrom durch zelluläres Absterben der proximalen Tubuluszellen ausgelöst wird ^{133,134}.

In fortschreitendem Alter kommt es bei unseren Patienten dann zu einem terminalen Nierenversagen. Ausgelöst wird es vermutlich durch weitere zelluläre Reaktionen auf die Bildung der FAP2-Aggregate.

Durch die Permeabilisierung der mitochondrialen Membranen durch Überalterung und ROS Produktion ^{111–115} gelangen Filamente und weitere mitochondriale Bestandteile wie Cytochrom C in das Zytosol der Zelle. Dort gibt es Rezeptoren, die diese endogene Strukturen erkennen können und eine innate Immunantwort induzieren ^{138,141,144,146}.

Dies wäre ein weiterer Stimulus zur Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms, einer Aktivierung von Caspasen und einer Produktion von IL-18.

In Zellkultur-Experimenten konnten wir eine Hochregulierung sowohl von NLRP3 mRNA als auch von IL-18 mRNA beobachten.

Es ist bekannt, dass NLRP3 neben ROS auch durch die Erkennung von DAMPs aktiviert wird, darunter fallen mitochondriale DNA oder kristalline Strukturen ^{107,109,124,131,147}.

In den meisten Fällen wird Caspase-1 durch das NLRP3-Inflammasom aktiviert und spaltet dann pro-IL-18 und pro-IL-1 β in die aktiven Formen IL-18 und IL-1 β ^{109,122,131}. In unseren Zellkultur-Experimenten war interessanterweise nur IL-18 und kein IL-1 β messbar, sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene.

Aktuell wird vermutet, dass das NLRP3-Inflammasom weitere, bisher nicht untersuchte, Caspasen aktiviert, die nur IL-18, nicht aber IL-1 β spalten ¹³¹. Andersrum gibt es bereits Untersuchungen zu Caspase-1 unabhängigen Aktivierungswegen von pro-IL-1 β . So konnten Schönbeck *et al.* bereits 1998 zeigen, dass pro-IL-1 β auch von Matrix-Metalloprotease (MMP) -2, MMP-3 und MMP-9 maturiert werden kann ¹⁴⁸. Dies legt die Überlegung nahe, dass es noch weitere Caspase-1 unabhängige Wege gibt, Vorläufermoleküle der IL-1 Familie in die aktiven Moleküle zu spalten, möglicherweise auch Wege, die nur pro-IL-18 spalten und nicht IL-1 β , wie es im vorliegenden Versuchsaufbau gemessen wurde.

Außerdem gibt es Untersuchungen die herausgefunden haben, dass epitheliale Zellen nur IL-18 bilden und kein IL-1 β ¹⁴⁹.

Es ist bekannt, dass NLRP3^{-/-} Mäuse während unilateraler ureteraler Obstruktion (UUO) als Stress-Stimulus für die Niere weniger Infiltration von inflammatorischen Zellen und weniger Fibrose zeigen als Mäuse, die NLRP3 exprimierten ¹⁰⁷. Ebenso konnte eine Erhöhung der NLRP3-Expression in mehreren humanen Biopsien von nicht-diabetischen Nieren mit chronischen Nieren-Erkrankungen gemessen werden ¹⁰⁷.

NLRP3 scheint demzufolge eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer Fibrose zu spielen.

Weiterhin ist bekannt, dass bei einer Fibrose eine epitheliale zu mesenchymale Umwandlung (EMT) Typ2 auftreten kann ^{72,73}. Dabei verlieren epitheliale Zellen ihre Differenzierung und zeigen dann einen Myofibroblasten-artigen mesenchymalen Phänotyp mit Produktion von extrazellulären Matrixproteinen ^{71,72,88}.

Eine solche Umwandlung konnte allerdings in der vorliegenden post mortem Patientenniere nicht nachgewiesen werden. Es waren keine Zellen zu sehen, die sowohl FAP2 als Epithelzell-Marker, als auch Glattmuskel-Aktin als Marker für aktivierte Myofibroblasten zeigten. Wahrscheinlicher ist es, dass eingewanderte Immunzellen oder umgewandelte interstitielle Zellen zur Produktion der extrazellulären Matrixproteine beitragen. Bei Fibrose in Nieren von Mäusen konnte in der Literatur beobachtet werden,

dass ungefähr 12% der Fibroblasten aus dem Knochenmark stammen und 30% durch EMT entstehen⁸⁸.

Dennoch scheinen die Epithelzellen in einer noch nicht geklärten Weise zur Produktion der ECM beizutragen, da in unseren Zellkultur-Experimenten eine erhöhte Expression von Fibronektin auf mRNA-Ebene und auch auf Protein-Ebene nachgewiesen werden konnte.

Die durch die Zellschädigung ausgelösten Entzündungsreaktionen führen in der Niere durch den oben diskutierten Mechanismus zu erhöhter Bildung von extrazellulärer Matrix, um das geschädigte Gewebe zu ersetzen. Bei chronischer Schädigung der Zellen bzw. des Gewebes kann eine Verknüpfung von Bestandteilen der ECM-Proteine untereinander die Stabilität der Matrix gegen proteolytische Matrix-Metalloproteasen (MMP) erhöhen^{65,68,70,74-76}. Eine Verknüpfung von Collagen mit Fibronektin macht die ECM sogar resistent gegen MMPs⁶⁸.

Eine solche Verknüpfung wäre auch bei dem Patient dieses Fanconi-Syndroms denkbar, da die *post mortem* entnommene Nierenprobe eine starke Fibrose zeigt.

Dafür sprechen würden auch die Ergebnisse unserer Zellkultur-Experimente mit LLC-PK1_{MUT1} Zellen, die eine stark erhöhte Expression von extrazellulärem Fibronektin aufwiesen (Abb. 27).

Möglicherweise könnten Medikamente, deren anti-fibrotischer Effekt bereits untersucht wurde⁶⁹, auch bei diesen Patienten eingesetzt werden, um die Entstehung der Fibrose und das darauf folgende Nierenversagen zu verlangsamen.

5.9 Therapieoptionen

Weiterhin wurden zwei unterschiedliche Fütterungsversuche mit Wildtyp Mäusen durchgeführt, um die Expression von FAP2 zu beeinflussen. Zum einen sollte in einem Experiment durch eine Supplementation mit L-Arginin untersucht werden, ob die Expression von FAP2 dadurch stimuliert werden kann. In einem zweiten Versuch sollte durch eine Supplementation mit Kreatin die Expression von FAP2 verringert werden.

Beide Stoffe wären eine Möglichkeit für eine Behandlung unserer Patienten um die Expression des mutierten FAP2 zu verringern.

Eine Supplementation mit L-Arginin wäre zudem noch eine Option, um den Phänotyp von neuen FAP2 Knockin Mäusen zu stimulieren.

L-Arginin ist zusammen mit Glycin das Ausgangsprodukt für Guanidinoacetat, welches weiter zu Kreatin verstoffwechselt wird. Dieser erste Schritt wird von FAP2 enzymatisch umgesetzt^{79,80}. 2015 wurde die exogene Gabe von L-Arginin bei Ratten untersucht¹⁴². Nach 13 wöchiger Supplementation zeigten die behandelten Ratten eine erhöhte

Plasmakonzentration an L-Arginin und eine erhöhte Aktivität von FAP2 in Niere und Leber¹⁴².

In unserem Versuch wurden WT-Mäuse benutzt, die für zwei Wochen 1% (w/v) L-Arginin über das Trinkwasser erhielten, um dem Enzym mehr Ausgangsprodukt bereitzustellen, da es zu den semi-essentiellen Aminosäuren gehört. Da die Expression von FAP2 so auf mRNA- und Protein-Ebene in der Niere signifikant erhöht werden konnte (Abb. 35), wäre diese Behandlung eine Möglichkeit, den Phänotyp bei den geplanten neuen FAP2 Knockin-Mäusen zu stimulieren, da die ersten Symptome der Patienten im frühen Kindesalter auftreten, Mäuse aber eher nicht länger als ein bis zwei Jahre leben.

Zusätzlich könnte eine L-Arginin-arme Diät bei unseren Patienten die Expression von mutiertem FAP2 verringern und so die Entstehung der intramitochondrialen FAP2-Agglomerate in proximalen Tubuluszellen der Patienten möglicherweise verzögern. L-Arginin ist vor allem in Nüssen und Samen, sowie in Fisch, Rind-, Schweine- und Hühnerfleisch enthalten.

Im zweiten Versuch erhielten WT Mäuse 1% Kreatin (w/v) für eine Woche über das Trinkwasser. Bei der Auswertung der FAP2-Expression in den Nieren der Versuchstiere konnte bestätigt werden, dass Kreatin als Endprodukt eine negative Rückkopplung auf die Expression von FAP2 hat (Abb. 36), wie es auch von McGuire *et al.* 1984 beschrieben wurde⁹³.

Die exogene Gabe von Kreatin könnte also eine weitere mögliche Therapieoption für FAP2-Patienten darstellen, da dies vermutlich die Bildung der intramitochondrialen Filamente in proximalen Tubuluszellen der Patienten verlangsamen würde, da die Expression von mutiertem FAP2 verringert wird.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine neuartige, autosomal-dominant vererbte Form des renalen Fanconi-Syndroms untersucht. Neben der klassischen proximalen Tubulopathie, die bereits in der Kindheit einsetzt und eher mild ausfällt, kommt es bei allen betroffenen Patienten im Erwachsenenalter zu einem terminalen Nierenversagen und zur Ausbildung fibrotischer Schrumpfnieren. Über Kopplungsanalysen konnte das betroffene Gen identifiziert werden, dessen Genprodukt als Stoffwechsellzym normalerweise in den Mitochondrien frühproximaler Tubuluszellen lokalisiert ist und von uns als FAP2 („Fanconi-assoziiertes Protein 2“) bezeichnet wird.

Durch die Untersuchung des renalen Phänotyps einer FAP2 Knockout Maus konnte eine Haploinsuffizienz als Ursache der Krankheitsentstehung ausgeschlossen werden. Diese Mäuse zeigten keine Symptome eines Fanconi-Syndroms.

Es hat sich herausgestellt, dass mutiertes FAP2 in der mitochondrialen Matrix mit sich selbst aggregiert und sich dort in Form langer Fibrillen ablagert. Dies konnte sowohl im verwendeten Zellmodell (stabil transfizierte, induzierbare LLC-PK1 Zellen), als auch in der untersuchten Patientenbiopsie nachgewiesen werden. Als Folge davon werden über einen bisher noch nicht im Detail bekannten Mechanismus schwere Entzündungsprozesse, das Absterben von proximalen Tubuluszellen und eine Fibrose induziert. Als Mechanismus, der diese Entzündungsprozesse anstößt, wurde eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasomenkomplexes nachgewiesen. In unserem Zellmodell konnte eine Erhöhung von NLRP3 auf mRNA-Ebene beobachtet werden, sowie auch eine Erhöhung von IL-18 auf mRNA- und auf Protein-Ebene. IL-18 ist ein bekannter potenter Entzündungsmediator, der in der Literatur bereits mit der Entstehung der Nierenfibrose in Zusammenhang gebracht wurde. Als Fibrose-Marker waren im Zellmodell die mRNA- und Protein-Expression des extrazellulären Matrixproteins Fibronectin 1 und des mesenchymalen Markers Glattmuskel-Aktin erhöht. Die Untersuchung einer *post mortem* Patientenniere zeigte in Übereinstimmung mit den *in vitro* Daten eine starke Fibrose, die sich über das gesamte Nierengewebe erstreckte.

Zusammenfassend sind sehr wahrscheinlich die Aggregate von mutiertem FAP2 die Ursache für die Entstehung der vorliegenden Erkrankung. Interessanterweise lässt sich durch spezielle Nahrungssupplementationen die Expression von FAP2 als Stoffwechsellzym beeinflussen. So könnte eine Reduktion der Expression von mutiertem FAP2 eine Therapieoption darstellen, da dadurch die die Aggregatbildung reduziert werden kann.

7. Literaturverzeichnis

1. Broeker, C. Mitochondriopathien als Ursache des renalen Fanconi-Syndroms. (2014).
2. Nielsen, R. *et al.* Characterization of a kidney proximal tubule cell line, LLC-PK1, expressing endocytotic active megalin. *J. Am. Soc. Nephrol.* **9**, 1767–1776 (1998).
3. Hull, R. N., Cherry, W. R. & Weaver, G. W. The origin and characteristics of a pig kidney cell strain, LLC-PK. *In Vitro* **12**, 670–7 (1976).
4. Rabito, C. a. Occluding junctions in a renal cell line (LLC-PK1) with characteristics of proximal tubular cells. *Am. J. Physiol.* **250**, F734-43 (1986).
5. McGuire, D. M., Gross, M. D., Elde, R. P. & van Pilsum, J. F. Localization of L-arginine-glycine amidinotransferase protein in rat tissues by immunofluorescence microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* **34**, 429–435 (1986).
6. Terman, A., Kurz, T., Navratil, M., Arriaga, E. A. & Brunk, U. T. Mitochondrial turnover and aging of long-lived postmitotic cells: the mitochondrial-lysosomal axis theory of aging. *Antioxid. Redox Signal.* **12**, 503–535 (2010).
7. Beattie, D. S., Basford, R. E. & Koritz, S. B. The turnover of the protein components of mitochondria from rat liver, kidney, and brain. *J. Biol. Chem.* **242**, 4584–4586 (1967).
8. Brunner, G. & Neupert, W. Turnover of outer and inner membrane proteins of rat liver mitochondria. *FEBS Lett.* **1**, 153–155 (1968).
9. FLETCHER, M. J. & SANADI, D. R. Turnover of rat-liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **51**, 356–60 (1961).
10. Epstein, F. H. Oxygen and renal metabolism. *Kidney Int.* **51**, 381–5 (1997).
11. Balaban, R. S. & Mandel, L. J. Coupling of aerobic metabolism to active ion transport in the kidney. *J. Physiol.* **304**, 331–48 (1980).
12. Biemesderfer, D. *et al.* NHE3: a Na⁺/H⁺ exchanger isoform of renal brush border. *Am. J. Physiol.* **265**, F736–F742 (1993).
13. Kanai, Y., Lee, W., You, G., Brown, D. & Hediger, M. A. The Human Kidney Low Affinity Na⁺/glucose Cotransporter SGL 2. *J. Clin. Invest* **93**, 397–404 (1994).
14. Hirayama, B. a *et al.* Kinetic and specificity differences between rat, human, and rabbit Na⁺-glucose cotransporters (SGLT-1). *Am. J. Physiol.* **270**, G919–G926 (1996).
15. Beck, L. *et al.* Targeted inactivation of Npt2 in mice leads to severe renal phosphate wasting, hypercalciuria, and skeletal abnormalities. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 5372–5377 (1998).
16. Kanai, Y. & Hediger, M. A. Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature* **360**, 467–471 (1992).
17. Anderson, S. *et al.* Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**, 457–465 (1981).
18. Yuan, Z. *et al.* Calcium Uptake via Mitochondrial Uniporter Contributes to Palmitic Acid-induced Apoptosis in Mouse Podocytes. *J. Cell. Biochem.* (2017). doi:10.1002/jcb.25930
19. Schmidt, U. & Guder, W. G. Sites of enzyme activity along the nephron. *Kidney Int.*

- 9**, 233–242 (1976).
20. Wirthensohn, G. & Guder, W. G. Renal Substrate Metabolism. *Physiol. Rev.* **66**, 469–497 (1986).
 21. Guder, W. G. & Ross, B. D. Enzyme distribution along the nephron. *Kidney Int.* **26**, 101–111 (1984).
 22. Ranieri, M. *et al.* Mitochondrial Fusion Proteins and Human Diseases. **2013**, (2013).
 23. Zhang, J., Frerman, F. E. & Kim, J.-J. P. 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 (2006).
 24. Zeviani, M. & Di Donato, S. Mitochondrial disorders. *Brain* **127**, 2153–2172 (2004).
 25. Niaudet, P. Mitochondrial disorders and the kidney. 387–390 (1998).
 26. Munnich, A., Rustin, P., Rotig, A., Chretien, D. & Bonnefont, J. Clinical Aspects of Mitochondrial Disorders. **15**, 448–455 (1992).
 27. Kurogouchi, F. *et al.* 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 (1998).
 28. Emma, F. *et al.* ‘Bartter-like’ phenotype in Kearns-Sayre syndrome. *Pediatr. Nephrol.* **21**, 355–360 (2006).
 29. Mihai, C. M., Catrinou, D., Toringhibel, M., Stoicescu, R. M. & Hancu, A. De Toni-Debré-Fanconi syndrome in a patient with Kearns-Sayre syndrome: a case report. *J. Med. Case Rep.* **3**, 101 (2009).
 30. Klootwijk, E. D. *et al.* Mistargeting of peroxisomal EHHADH and inherited renal Fanconi’s syndrome. *N. Engl. J. Med.* **370**, 129–38 (2014).
 31. Nabuurs, C. I. *et al.* Disturbed energy metabolism and muscular dystrophy caused by pure creatine deficiency are reversible by creatine intake. *J. Physiol.* **591**, 571–92 (2013).
 32. Zhan, M., Brooks, C., Liu, F., Sun, L. & Dong, Z. Mitochondrial dynamics: regulatory mechanisms and emerging role in renal pathophysiology. *Kidney Int.* **83**, 568–81 (2013).
 33. Debre, R., Marie, J., Cleret, F. & Messimy, R. Rachitisme tardif coexistent avec une nephrite chronique et une glycosurie. *Arch Med Enf* **37**, 597–606 (1934).
 34. DeToni, G. Remarks on the relations between renal rickets (renal dwarfism) and renal diabetes. *Acta Paediatr* **16**, 479–484 (1933).
 35. Fanconi, G. Der frühinfantile nephrotisch-glycosurische Zwergwuchs mit hypophosphatämischer Rachitis. *Jahrb. Kinderheilkd.* **147**, 299–305 (1936).
 36. Lignac, G. Über Störung des Cystinstoffwechsels bei Kindern. *Dtsch Arch Klin Med* **145**, 139–150 (1924).
 37. Hall, A. M. & Unwin, R. J. The not so ‘mighty chondrion’: Emergence of renal diseases due to mitochondrial dysfunction. *Nephron - Physiol.* **105**, (2006).
 38. van’t Hoff, W. G., Ledermann, S. E., Waldron, M. & Trompeter, R. S. Early-onset chronic renal failure as a presentation of infantile nephropathic cystinosis. *Pediatr. Nephrol.* **9**, 483–4 (1995).
 39. Nesterova, G. & Gahl, W. Nephropathic cystinosis: late complications of a

- multisystemic disease. *Pediatr. Nephrol.* **23**, 863–78 (2008).
40. Debray, F.-G. *et al.* Acute tubular dysfunction with Fanconi syndrome: a new manifestation of mitochondrial cytopathies. *Am. J. Kidney Dis.* **51**, 691–6 (2008).
 41. Wang, L. C., Lee, W. T., Tsai, W. Y., Tsau, Y. K. & Shen, Y. Z. Mitochondrial cytopathy combined with Fanconi's syndrome. *Pediatr. Neurol.* **22**, 403–406 (2000).
 42. Izzedine, H., Launay-Vacher, V., Isnard-Bagnis, C. & Deray, G. Drug-induced Fanconi's syndrome. *Am. J. Kidney Dis.* **41**, 292–309 (2003).
 43. Hall, A. M., Bass, P. & Unwin, R. J. Drug-induced renal fanconi syndrome. *Qjm* **107**, 261–269 (2014).
 44. Conti, F., Vitale, G., Cursaro, C., Bernardi, M. & Andreone, P. Tenofovir-induced Fanconi syndrome in a patient with chronic hepatitis B mono-infection. *Ann Hepatol* **15**, 273–276 (2016).
 45. Bosch, A. M. Classical galactosaemia revisited. *J. Inherit. Metab. Dis.* **29**, 516–25 (2006).
 46. Morris, R. C. An experimental renal acidification defect in patients with hereditary fructose intolerance. II. Its distinction from classic renal tubular acidosis; its resemblance to the renal acidification defect associated with the Fanconi syndrome of children with c. *J. Clin. Invest.* **47**, 1648–1663 (1968).
 47. MORGAN, H. G., STEWART, W. K., LOWE, K. G., STOWERS, J. M. & JOHNSTONE, J. H. Wilson's disease and the Fanconi syndrome. *Q. J. Med.* **31**, 361–84 (1962).
 48. Halvorsen, S., Pande, H., Loken, a C. & Gjessing, L. R. Tyrosinosis. A study of 6 cases. *Arch. Dis. Child.* **41**, 238–49 (1966).
 49. ZETTERSTROEM, R. TYROSINOSIS. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **111**, 220–6 (1963).
 50. Cherqui, S. & Courtoy, P. J. The renal Fanconi syndrome in cystinosis: pathogenic insights and therapeutic perspectives. *Nat. Rev. Nephrol.* **13**, 11 51nrneph.2016.183-77 89 (2016).
 51. Monnens, L. & Levtchenko, E. Evaluation of the proximal tubular function in hereditary renal Fanconi syndrome. *Nephrol. Dial. Transplant* **23**, 2719–22 (2008).
 52. Szabolcs, M. J. *et al.* Mitochondrial DNA deletion: A cause of chronic tubulointerstitial nephropathy. *Kidney Int.* **45**, 1388–1396 (1994).
 53. de Lonlay, P. *et al.* A mutant mitochondrial respiratory chain assembly protein causes complex III deficiency in patients with tubulopathy, encephalopathy and liver failure. *Nat Genet* **29**, 57–60 (2001).
 54. Ramos-Arroyo, M. A. *et al.* Clinical and biochemical spectrum of mitochondrial complex III deficiency caused by mutations in the BCS1L gene. *Clin. Genet.* **75**, 585–7 (2009).
 55. Van Biervliet, J. P. *et al.* Hereditary mitochondrial myopathy with lactic acidemia, a De Toni-Fanconi-Debré syndrome, and a defective respiratory chain in voluntary striated muscles. *Pediatr. Res.* **11**, 1088–93 (1977).
 56. DiMauro, S. *et al.* Fatal infantile mitochondrial myopathy and renal dysfunction due to cytochrome-c-oxidase deficiency. *Neurology* **30**, 795–804 (1980).
 57. Ogier, H. *et al.* de Toni-Fanconi-Debré syndrome with Leigh syndrome revealing severe muscle cytochrome c oxidase deficiency. *J. Pediatr.* **112**, 734–9 (1988).

-
58. Dent, C. E. & Friedman, M. Hypercalcuric Rickets Associated With Renal Tubular Damage. *Arch. Dis. Child.* **39**, 240–9 (1964).
 59. Wrong, O. M., Norden, A. G. & Feest, T. G. 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**, 473–93 (1994).
 60. Charnas, L. R., Bernardini, I., Rader, D., Hoeg, J. M. & Gahl, W. A. Clinical and laboratory findings in the oculocerebrorenal syndrome of Lowe, with special reference to growth and renal function. *N. Engl. J. Med.* **324**, 1318–25 (1991).
 61. Ansermet, C. *et al.* Renal Fanconi Syndrome and Hypophosphatemic Rickets in the Absence of Xenotropic and Polytopic Retroviral Receptor in the Nephron. *J. Am. Soc. Nephrol.* (2016). doi:10.1681/ASN.2016070726
 62. Magen, D. *et al.* A loss-of-function mutation in NaPi-IIa and renal Fanconi's syndrome. *N. Engl. J. Med.* **362**, 1102–9 (2010).
 63. Schnaper, H. W. Renal fibrosis. *Methods Mol. Med.* **117**, 45–68 (2005).
 64. Liu, Y. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int.* **69**, 213–7 (2006).
 65. Shweke, N. *et al.* Tissue transglutaminase contributes to interstitial renal fibrosis by favoring accumulation of fibrillar collagen through TGF-beta activation and cell infiltration. *Am. J. Pathol.* **173**, 631–42 (2008).
 66. Hewitson, T. D. Fibrosis in the kidney: is a problem shared a problem halved? *Fibrogenesis Tissue Repair* **5**, S14 (2012).
 67. Liu, Y. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nat Rev Nephrol.* **7**, 684–96 (2015).
 68. Johnson, T. S. *et al.* Transglutaminase transcription and antigen translocation in experimental renal scarring. *J. Am. Soc. Nephrol.* **10**, 2146–2157 (1999).
 69. Fukagawa, M., Noda, M., Shimizu, T. & Kurokawa, K. Chronic progressive interstitial fibrosis in renal disease--are there novel pharmacological approaches? *Nephrol. Dial. Transplant* **14**, 2793–5 (1999).
 70. Mosher, D. F. Cross-linking of fibronectin to collagenous proteins. *Mol. Cell. Biochem.* **58**, 63–8 (1984).
 71. Kalluri, R. & Weinberg, R. a. Review series The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* **119**, 1420–1428 (2009).
 72. Kalluri, R. & Neilson, E. G. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J. Clin. Invest.* **112**, 1776–1784 (2003).
 73. Bani-Hani, A. H. *et al.* IL-18 neutralization ameliorates obstruction-induced epithelial-mesenchymal transition and renal fibrosis. *Kidney Int.* **76**, 500–11 (2009).
 74. Huang, L. *et al.* Transglutaminase inhibition ameliorates experimental diabetic nephropathy. *Kidney Int.* **76**, 383–394 (2009).
 75. Kleman, J. P., Aeschlimann, D., Paulsson, M. & van der Rest, M. Transglutaminase-catalyzed cross-linking of fibrils of collagen V/XI in A204 rhabdomyosarcoma cells. *Biochemistry* **34**, 13768–13775 (1995).
 76. Fisher, M. *et al.* Modulation of tissue transglutaminase in tubular epithelial cells alters extracellular matrix levels: A potential mechanism of tissue scarring. *Matrix Biol.* **28**, 20–31 (2009).

-
77. Humm, A., Fritsche, E., Mann, K., Go, M. & Huber, R. amidinotransferase and identification of its active-site cysteine residue. **776**, 771–776 (1997).
 78. Humm, A., Huber, R. & Mann, K. Izzm The amino acid sequences of human and pig. **339**, 101–107 (1994).
 79. Humm, a, Fritsche, E., Steinbacher, S. & Huber, R. Crystal structure and mechanism of human L-arginine:glycine amidinotransferase: a mitochondrial enzyme involved in creatine biosynthesis. *EMBO J.* **16**, 3373–85 (1997).
 80. Borsook, H. & Dubnoff, J. W. THE SYNTHESIS OF GLYCOCYAMINE IN RAT KIDNEY AND A MECHANISM OF CREATINE SYNTHESIS IN VIVO. *Science* **91**, 551–2 (1940).
 81. Bessman, S. P. & Carpenter, C. L. THE CREATINE-CREATINE PHOSPHATE ENERGY SHUTTLE Samuel P. Bessman. (1985).
 82. Moullan, N. *et al.* Tetracyclines Disturb Mitochondrial Function across Eukaryotic Models: A Call for Caution in Biomedical Research. *Cell Rep.* (2015). doi:10.1016/j.celrep.2015.02.034
 83. Chatzisprou, I. A., Held, N. M., Mouchiroud, L., Auwerx, J. & Houtkooper, R. H. Tetracycline antibiotics impair mitochondrial function and its experimental use confounds research. *Cancer Res.* **75**, 4446–9 (2015).
 84. Ahler, E. *et al.* Doxycycline Alters Metabolism and Proliferation of Human Cell Lines. *PLoS One* **8**, 8–14 (2013).
 85. Zhu, S. *et al.* Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature* **417**, 74–78 (2002).
 86. Chen, M. *et al.* Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nat. Med.* **6**, 797–801 (2000).
 87. Chan, X. C. Y., Black, C. M., Lin, A. J., Ping, P. & Lau, E. Mitochondrial protein turnover: methods to measure turnover rates on a large scale. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **78**, 54–61 (2015).
 88. Iwano, M. *et al.* Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J. Clin. Invest.* **110**, 341–350 (2002).
 89. Zhuang, Y. *et al.* NLRP3 inflammasome mediates albumin-induced renal tubular injury through impaired mitochondrial function. *J. Biol. Chem.* **289**, 25101–25111 (2014).
 90. Li, J. *et al.* Minocycline Protects Against NLRP3 Inflammasome-Induced Inflammation and P53-Associated Apoptosis in Early Brain Injury After Subarachnoid Hemorrhage. *Mol. Neurobiol.* **53**, 2668–2678 (2016).
 91. Garrido-Mesa, N., Zarzuelo, A. & Gálvez, J. Minocycline: Far beyond an antibiotic. *Br. J. Pharmacol.* **169**, 337–352 (2013).
 92. Choe, C. *et al.* L-arginine:glycine amidinotransferase deficiency protects from metabolic syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 110–23 (2013).
 93. McGuire, D. M., Gross, M. D., Van Pilsum, J. F. & Towle, H. C. Repression of rat kidney L-arginine:glycine amidinotransferase synthesis by creatine at a pretranslational level. *J. Biol. Chem.* **259**, 12034–12038 (1984).
 94. Gross, M. D., Eggen, M. A., Simon, A. M. & Van Pilsum, J. F. The purification and characterization of human kidney L-arginine:glycine amidinotransferase. *Arch.*
-

- Biochem. Biophys.* **251**, 747–55 (1986).
95. Edvardson, S. *et al.* L-arginine:glycine amidinotransferase (AGAT) deficiency: clinical presentation and response to treatment in two patients with a novel mutation. *Mol. Genet. Metab.* **101**, 228–32 (2010).
 96. Branovets, J. *et al.* Unchanged mitochondrial organization and compartmentation of high-energy phosphates in creatine-deficient GAMT-/- mouse hearts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **305**, H506-20 (2013).
 97. Battini, R. *et al.* Creatine depletion in a new case with AGAT deficiency: clinical and genetic study in a large pedigree. **77**, 326–331 (2002).
 98. Item, C. B. *et al.* Arginine: Glycine Amidinotransferase Deficiency: The Third Inborn Error of Creatine Metabolism in Humans. 1127–1133 (2001).
 99. Archer, S. L. Mitochondrial dynamics--mitochondrial fission and fusion in human diseases. *N. Engl. J. Med.* **369**, 2236–51 (2013).
 100. Twig, G. *et al.* Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J.* **27**, 433–446 (2008).
 101. Amati-Bonneau, P. *et al.* OPA1 mutations induce mitochondrial DNA instability and optic atrophy 'plus' phenotypes. *Brain* **131**, 338–51 (2008).
 102. Hudson, G. *et al.* Mutation of OPA1 causes dominant optic atrophy with external ophthalmoplegia, ataxia, deafness and multiple mitochondrial DNA deletions: a novel disorder of mtDNA maintenance. *Brain* **131**, 329–37 (2008).
 103. Züchner, S. *et al.* Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat. Genet.* **36**, 449–51 (2004).
 104. Chan, D. C. Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 79–99 (2006).
 105. Halle, A. *et al.* The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat. Immunol.* **9**, 857–65 (2008).
 106. Dostert, C. *et al.* Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* **320**, 674–7 (2008).
 107. Vilaysane, A. *et al.* The NLRP3 inflammasome promotes renal inflammation and contributes to CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* **21**, 1732–44 (2010).
 108. Knauf, F. *et al.* NALP3-mediated inflammation is a principal cause of progressive renal failure in oxalate nephropathy. *Kidney Int.* **84**, 895–901 (2013).
 109. Gurung, P., Lukens, J. R. & Kanneganti, T. D. Mitochondria: diversity in the regulation of the NLRP3 inflammasome. *Trends Mol. Med.* **21**, 193–201 (2015).
 110. Zhou, R., Yazdi, A. S., Menu, P. & Tschopp, J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* **469**, 221–5 (2011).
 111. Orrenius, S., Gogvadze, V. & Zhivotovsky, B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **47**, 143–83 (2007).
 112. Frei, B., Winterhalter, K. H. & Richter, C. Mechanism of alloxan-induced calcium release from rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **260**, 7394–7401 (1985).
 113. Kowaltowski, A. J., Castilho, R. F. & Vercesi, A. E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett.* **495**, 12–15 (2001).
 114. Hermes-Lima, M., Valle, V. G., Vercesi, A. E. & Bechara, E. J. Damage to rat liver mitochondria promoted by delta-aminolevulinic acid-generated reactive oxygen

- species: connections with acute intermittent porphyria and lead-poisoning. *Biochim. Biophys. Acta* **1056**, 57–63 (1991).
115. Akopova, O. V *et al.* The effect of permeability transition pore opening on reactive oxygen species production in rat brain mitochondria. *Ukr. biokhimichniy zhurnal (1999)* **83**, 46–55
 116. Kim, J.-S., He, L. & Lemasters, J. J. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304**, 463–70 (2003).
 117. Hockenbery, D. M., Oltvai, Z. N., Yin, X. M., Millman, C. L. & Korsmeyer, S. J. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* **75**, 241–51 (1993).
 118. Kane, D. J. *et al.* Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* **262**, 1274–7 (1993).
 119. Schepers, M. S. J., van Ballegooijen, E. S., Bangma, C. H. & Verkoelen, C. F. Crystals cause acute necrotic cell death in renal proximal tubule cells, but not in collecting tubule cells. *Kidney Int.* **68**, 1543–53 (2005).
 120. Moullan, N. *et al.* Tetracyclines Disturb Mitochondrial Function across Eukaryotic Models: A Call for Caution in Biomedical Research. *Cell Rep.* (2015). doi:10.1016/j.celrep.2015.02.034
 121. Petrilli, V. *et al.* Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ* **14**, 1583–1589 (2007).
 122. van de Veerdonk, F. L., Netea, M. G., Dinarello, C. A. & Joosten, L. A. B. Inflammasome activation and IL-1 β and IL-18 processing during infection. *Trends Immunol.* **32**, 110–6 (2011).
 123. Latz, E., Xiao, T. S. & Stutz, A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 397–411 (2013).
 124. Mulay, S. R. *et al.* Calcium oxalate crystals induce renal inflammation by NLRP3-mediated IL-1 β secretion. *J. Clin. Invest.* **123**, 236–246 (2013).
 125. Anders, H.-J. & Muvuru, D. a. The inflammasomes in kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **22**, 1007–1018 (2011).
 126. Martinon, F., Burns, K. & Tschopp, J. The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . *Mol. Cell* **10**, 417–426 (2002).
 127. Dinarello, C. A. Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **856**, 1–11 (1998).
 128. Thornberry, N. A. *et al.* A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* **356**, 768–74 (1992).
 129. Kronheim, S. R. *et al.* Purification of interleukin-1 beta converting enzyme, the protease that cleaves the interleukin-1 beta precursor. *Arch. Biochem. Biophys.* **296**, 698–703 (1992).
 130. Cerretti, D. P. *et al.* Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* **256**, 97–100 (1992).
 131. Lorenz, G., Darisipudi, M. N. & Anders, H. J. Canonical and non-canonical effects of the NLRP3 inflammasome in kidney inflammation and fibrosis. *Nephrol. Dial. Transplant.* **29**, 41–48 (2014).
 132. Liang, D. *et al.* Effects of interleukin 18 on injury and activation of human proximal

- tubular epithelial cells. *Nephrology (Carlton)*. **12**, 53–61 (2007).
133. Taub, M. & Cutuli, F. Activation of AMP kinase plays a role in the increased apoptosis in the renal proximal tubule in cystinosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **426**, 516–521 (2012).
 134. Chevronnay, H. P. G. *et al.* Time Course of Pathogenic and Adaptation Mechanisms in Cystinotic Mouse Kidneys. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1–14 (2014). doi:10.1681/ASN.2013060598
 135. Hu, Q., Wood, C. R., Cimen, S., Venkatachalam, A. B. & Alwayn, I. P. J. Mitochondrial damage-associated molecular patterns (MTDs) are released during hepatic ischemia reperfusion and induce inflammatory responses. *PLoS One* **10**, 1–17 (2015).
 136. Wenceslau, C. F. *et al.* Mitochondrial damage-associated molecular patterns and vascular function. *Eur. Heart J.* **35**, 1172–1177 (2014).
 137. Krysko, D. V. *et al.* Emerging role of damage-associated molecular patterns derived from mitochondria in inflammation. *Trends Immunol.* **32**, 157–164 (2011).
 138. Zhang, Q. *et al.* Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* **464**, 104–7 (2010).
 139. Seong, S.-Y. & Matzinger, P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 469–478 (2004).
 140. Palm, N. W. & Medzhitov, R. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunol. Rev.* **227**, 221–233 (2009).
 141. Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* **5**, 987–995 (2004).
 142. Yang, Y. *et al.* Safety of long-term dietary supplementation with L-arginine in rats. *Amino Acids* **47**, 1909–20 (2015).
 143. Higgins, G. C. & Coughlan, M. T. Mitochondrial dysfunction and mitophagy: the beginning and end to diabetic nephropathy? *Br. J. Pharmacol.* **171**, 1917–42 (2014).
 144. Yang, J. C. & Cortopassi, G. A. Induction of the mitochondrial permeability transition causes release of the apoptogenic factor cytochrome C. *Free Radic. Biol. Med.* **24**, 624–631 (1998).
 145. Zoratti, M. & Szabb, I. BB The mitochondrial permeability transition. **1241**, 139–176 (1995).
 146. Li, P., Nijhawan, D. & Wang, X. Mitochondrial activation of apoptosis. *Cell* **116**, S57–S61 (2004).
 147. Schepers, M. S. J., van Ballegooijen, E. S., Bangma, C. H. & Verkoelen, C. F. Crystals cause acute necrotic cell death in renal proximal tubule cells, but not in collecting tubule cells. *Kidney Int.* **68**, 1543–53 (2005).
 148. Schonbeck, U., Mach, F. & Libby, P. Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing. *J. Immunol.* **161**, 3340–3346 (1998).
 149. Faust, J. *et al.* Correlation of renal tubular epithelial cell-derived interleukin-18 up-regulation with disease activity in MRL-Fas^{lpr} mice with autoimmune lupus nephritis. *Arthritis Rheum.* **46**, 3083–3095 (2002).

8. Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Lokalisation der FAP2-Expression in der Maus-Niere..... | 5 |
| Abbildung 2: FAP2-Immunfluoreszenz-Färbung in der humanen Niere..... | 6 |
| Abbildung 3: Elektronenmikroskopie von induzierten LLC-PK1 _{MUT1} Zellen | 7 |
| Abbildung 4: Immunogold-Färbung bei induzierte LLC-PK1 Zellen | 8 |
| Abbildung 5: Abbaubarkeit von veränderten Mitochondrien in LLC-PK1 _{MUT1} Zellen..... | 9 |
| Abbildung 6: Histologische Voruntersuchungen der Patientenbiopsie | 10 |
| Abbildung 7: Schematischer Aufbau einer Zelle des proximalen Tubulus | 12 |
| Abbildung 8: Schematische Darstellung der Atmungskette | 14 |
| Abbildung 9: Messung des Sauerstoffverbrauches von Zellen mit "Cell mito stress kit" ... | 38 |
| Abbildung 10: Schematische Darstellung der "Site-directed" Mutagenese, PCR 1 und PCR 2..... | 46 |
| Abbildung 11: Schematische Darstellung der "Site-directed" Mutagenese, PCR 3..... | 47 |
| Abbildung 12: Expression von FAP2 in induzierten LLC-PK1 Zellen | 54 |
| Abbildung 13: Expression von FAP2 _{WT} nach zwei Wochen Induktion (Woche 0) | 55 |
| Abbildung 14: Expression von FAP2 _{WT} nach Absetzen der Induktion (Woche 2 bis 8) | 56 |
| Abbildung 15: Immunogold-Färbung auf die FAP2-Patientenbiopsie | 58 |
| Abbildung 16: Hämalaun/Eosin-Färbung auf eine <i>post mortem</i> FAP2-Patientenniere..... | 61 |
| Abbildung 17: Masson-Goldner-Färbung auf FAP2-Patientenniere..... | 64 |
| Abbildung 18: Immunfluoreszenz-Färbung auf die <i>post mortem</i> FAP2-Patientenniere..... | 68 |
| Abbildung 19: Detailaufnahmen der Immunfluoreszenz-Färbung auf die <i>post mortem</i> FAP2-Patientenniere..... | 69 |
| Abbildung 20: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der <i>post mortem</i> Patientenniere ... | 72 |
| Abbildung 21: Immunogold-Färbung der <i>post mortem</i> Patientenniere..... | 73 |
| Abbildung 22: mRNA-Expression Fibrose-beteiligter Gene in LLC-PK1 Zellen | 74 |
| Abbildung 23: Intrazelluläre IL-18 Messung am FAP2-Zellmodell mittels ELISA | 75 |
| Abbildung 24: Intrazelluläre IL-18 Messung am FAP2-Zellmodell mittels Western Blot.... | 76 |
| Abbildung 25: Intrazelluläre IL-18 Färbung am FAP2-Zellmodell mittels Immunfluoreszenz | 76 |
| Abbildung 26: Immunfluoreszenz auf Fibronectin im FAP2-Zellmodell..... | 77 |
| Abbildung 27: Respirometrische Untersuchung nach 1 Woche und 3 Wochen Induktion. | 78 |
| Abbildung 28: mRNA-Expression von FAP2 in Nieren von FAP2 ^{+/+} und FAP2 ^{-/-} Knockout Mäusen..... | 79 |
| Abbildung 29: Größenvergleich von FAP2 ^{+/+} und FAP2 ^{-/-} Knockout Mäusen..... | 80 |
| Abbildung 30: Elektronenmikroskopie der Niere einer FAP2 ^{+/+} Knockout Maus und einer FAP2 ^{-/-} Knockout Maus | 82 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 31: Immunfluoreszenz-Färbungen auf Nieren von FAP2 ^{+/+} und FAP2 ^{-/-} Knockout Mäusen | 84 |
| Abbildung 32: Osmolalität im Urin von FAP2 ^{+/+} und FAP2 ^{-/-} Knockout Mäusen | 85 |
| Abbildung 33: Urin- und Plasma Messungen von FAP2 ^{+/+} und FAP2 ^{-/-} Knockout Mäusen | 87 |
| Abbildung 34: FAP2-Expression in Niere nach Supplementation mit 1% Arginin (w/v) für 2 Wochen | 89 |
| Abbildung 35: FAP2-Expression nach Supplementation mit 1% Kreatin (w/v) für 1 Woche | 90 |
| Abbildung 36: mRNA-Expression von FAP2 bei FAP2 Knockin Mäusen..... | 91 |
| Abbildung 37: Protein-Expression von FAP2 bei Knockin Mäusen..... | 92 |
| Abbildung 38: Immunfluoreszenz-Färbung auf FAP2 bei Knockin Mäusen | 93 |
| Abbildung 39: Elektronenmikroskopische Untersuchungen bei FAP2 Knockin Mäusen ... | 94 |
| Abbildung 40: Osmolalität im Urin von FAP2 Knockin Mäusen | 95 |
| Abbildung 41: Renale Aminosäureausscheidung bei FAP2 Knockin Mäusen | 96 |
| Abbildung 42: mRNA-Expression von Fibrose-Markern in FAP2 Knockin Mäusen..... | 96 |
| Abbildung 43: Vergleich der mRNA von FAP2 von Mensch und Maus..... | 98 |
| Abbildung 44: Transiente Transfektion von FAP2 _{MUT2} in LLC-PK1 Zellen | 99 |
| Abbildung 45: Transiente Transfektion von FAP2 _{MUT1} in LLC-PK1 Zellen | 99 |
| Abbildung 46: Transiente Transfektion mit FAP2 _{MUT} in murine Primärkulturzellen der Niere | 100 |
| Abbildung 47: Transiente Transfektion von LLC-PK1 Zellen mit humanisiertem mFAP2 _{MUT2} | 101 |
| Abbildung 48: Transiente Transfektion von LLC-PK1 Zellen mit doppelt humanisiertem mFAP2 _{MUT2} | 102 |
| Abbildung 49: Pathomechanismus zur Entstehung der vergrößerten Mitochondrien mit FAP2-Agglomeraten | 118 |
| Abbildung 50: Überalterung der Mitochondrien mit FAP2-Filamenten | 119 |
| Abbildung 51: Zelluläre Mechanismen durch erhöhte Produktion von reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS)..... | 120 |

9. Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Häufigste genetische Erkrankungen mit Fanconi-Syndrom | 16 |
| Tabelle 2: Verwendete LLC-PK1 FAP2 Zellen | 35 |
| Tabelle 3: Seahorse-Protokoll..... | 39 |
| Tabelle 4: Plasmide für Transfektionsexperimente..... | 97 |

10. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| A | Adenosin |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| AK | Antikörper |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| AQP2 | Aquaporin2 |
| Aqua dest. | Aqua destilliert |
| as | antisense |
| AS | Aminosäure |
| α -SMA | smooth muscle alpha actin (Glattmuskel-Aktin) |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| °C | Grad Celsius |
| C | Kohlenstoff |
| C | Cytosin |
| Ca ²⁺ | Calcium |
| cDNA | komplementäre DNA |
| Cl ⁻ | Chlorid |
| cm | Zentimeter |
| DAMP | Damage-associated molecular pattern |
| DMEM | Dulbecco`s modified eagle medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonucleinsäure |
| DTNB | 5,5`-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure |
| DTT | 1,4-Dithiothreitol |
| ECM | Extrazelluläre Matrix |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGTA | Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N`-tetraessigsäure |
| EHHADH | L-3-Enoyl-CoA-Hydratase/L-3-Hydroxy-Acyl-CoA-Dehydrogenase |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay |
| EMT | Epitheliale-mesenchymale Transition |
| EtOH | Ethanol |
| FAP2 | Fanconi-assoziertes Protein 2 |
| FCCP | Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone |
| FCS | fetales Kälberserum |
| FN | Fibronectin |
| g | Gramm |
| G | Guanin |
| gDNA | genomische DNA |
| Glc | Glukose |
| hum | human |
| H ⁺ | Wasserstoff |
| h | Stunde |
| H ₂ O | Wasser |

| | |
|------------------|--|
| HE | Hämatoxylin-Eosin |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| HMGCS2 | HMG-CoA Synthase |
| HRP | Horse raddish peroxidase |
| HZ | heterozygot |
| I.E. | internationale Einheit |
| IF | Immunfluoreszenz |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| K ⁺ | Kalium |
| KI | Knockin |
| KO | Knockout |
| L | Liter |
| M | Molar [mol/l] |
| m | Meter |
| mur | murin |
| 2-ME | 2-Mercapoethanol |
| MeOH | Methanol |
| mg | Milligramm |
| Mg ²⁺ | Magnesium |
| ml | Milliliter |
| mM | Milli-Molar |
| mm | Millimeter |
| MMP | Matrixmetallo-Protease |
| MQ | Milli-Q Wasser |
| mRNA | messenger RNA |
| MT | Mitotracker |
| Na ⁺ | Natrium |
| NLRP | Nucleotide-binding oligomerization domain, leucine-rich repeat and pyrin domain containing |
| NTP | Nucleosidtriphosphat |
| O ₂ | Sauerstoff |
| P | Phosphat |
| p | porcin |
| PAMP | Pathogen-associated molecular pattern |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PFA | Paraformaldehyd |
| RNA | Ribonucleinsäure |
| rpm | rounds per minute |
| TGF | Transforming growth factor |
| SDS | Natrium-Dodecylsulfat |
| se | sense |
| SEM | standard error of the mean |
| T | Thymin |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA-Puffer |
| U | Unit |

| | |
|-----|---|
| U | Uracil |
| µl | Mikroliter |
| µM | Mikromolar |
| v/v | volume per volume (Volumen pro Volumen) |
| Vek | Vektor |
| w/v | weight per volume (Gewicht pro Volumen) |
| WT | Wildtyp |

11. Anhang

11.1 Eigene Veröffentlichungen

11.1.1 Publikationen in Vorbereitung

Reichold M., Klootwijk E.D., Reinders J., Otto E., Milani M., Broeker C., Laing C., **Wiesner J.**, Devi S., Zhou W., Schmitt R., Renner-Sattler K., Oefner P.J., Dettmer K., Simbuerger J.M., Witzgall R., Stanescu H.C., Dumitriu S., Iancu D., Patel V., Mozere M., Tekman M., Jaureguiberry G., Kesselheim A., Walsh S., Gale D., Howie A.J., Gottwald E., Hall A. M., Kasgharian M., O'Brien K., Ferreira C., Atwal, P. S., Jain M., Hammers A., Geoff C-E., Choe C-U., Isbrandt D., Cebrian-Serrano A., Davies B., Sandford R.N., Pugh C., Konecki D., Povey S., Bockenbauer D., Lichter-Konecki U., Gahl W.A., Unwin R.J., Warth R., Kleta R.

GATM, renal Fanconi syndrome and kidney failure

11.1.2 Kongressbeiträge

Schmitt R., **Wiesner J.**, Christ C., Albrecht A., Reichold M.

High-resolution respirometry on proximal tubules from mice

Kongress der Deutschen Physiologischen Gesellschaft 2016 in Lübeck – Poster

Schmitt R., **Wiesner J.**, Christ C., Albrecht A., Reichold M.

High-resolution respirometry on proximal tubules from mice

Kongress der Gesellschaft für Nephrologie 2016 in Berlin – Poster

11.2 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. 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.

.....
Julia Wiesner

12. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle ist hierbei natürlich Herrn Prof. Dr. Warth zu nennen, für die Überlassung des spannenden Themas. Durch sein Interesse an meinen Experimenten und sein stets offenes Ohr hat er mir geholfen auch schwierige Episoden in den Jahren dieser Promotion mit Optimismus zu bewältigen.

Als nächstes möchte ich mich auch sehr herzlich bei PD Dr. Markus Reichold bedanken, der mich die ganze Zeit über betreut und unterstützt hat und mir bei allen Fragen (teilweise auch nicht unbedingt wissenschaftlicher Art) stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Ein besonderer Dank geht natürlich an alle meine Kollegen und Kolleginnen in der Arbeitsgruppe Warth, Sascha, Ines, Christina, Anna-Lena, Roland, Sara und Catarina, die für eine entspannte Atmosphäre in der Arbeit sorgen und für die Hilfsbereitschaft, wann immer ein Problem aufgetaucht ist. Auch bei inzwischen nicht mehr in der AG Warth arbeitenden Kollegen möchte ich mich bedanken, Philipp, die große Julia und ganz besonders bei Carsten Broeker, der mich in das Thema eingearbeitet hat und während seiner Promotion bereits mit ersten Versuchen zum Thema beigetragen hat.

Weiterhin geht noch ein großer Dank an Prof. Robert Kleta (University College London), der die Bearbeitung dieses Themas erst ermöglicht hat, indem er die Patienten untersucht und das Gen identifiziert hat. Zudem hat er uns die Untersuchung von zwei Gewebeproben von betroffenen Patienten ermöglicht. Auch bei Dr. Enriko Klootwijk möchte ich mich bedanken, der die hier verwendeten stabil transfizierten Zell-Linien generiert und nach Regensburg geschickt hat.

Ein weiteres Dankeschön geht auch an Personen, die nicht in der AG Warth arbeiten und dennoch Proben vorbereitet oder vermessen haben: Frau Dr. Dettmer vom Institut für Funktionelle Genomik in Regensburg für die Vermessung von Aminosäuren in Mausurin. Helga Schmidt vom Institut für Anatomie für die Aufbereitung der Proben und der Unterstützung beim Anfertigen der elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Dr. Stefan Reinhold, der uns ebenfalls Nierengewebeproben für Kontrollfärbungen überlassen hat.

Dr. Jörg Reinders und seinem Team vom Institut für funktionelle Genomik, die ebenfalls an diesem Projekt arbeiten.

Zudem möchte ich allen anderen nicht genannten Personen danken, die in der einen oder anderen Form zur Vollendung dieser Arbeit beigetragen haben.

Zuletzt will ich mich noch herzlich bei meiner ganzen Familie und meinen engen Freunden bedanken, die mich immer motiviert haben diese Arbeit zu machen und meine Erzählungen über die Arbeit im Labor geduldig ertragen haben. Vor allem bei meinen Eltern möchte ich mich bedanken, dass sie mich während meines Studiums und meiner Promotion finanziell unterstützt haben, sodass ich mich auf meine Ausbildung konzentrieren konnte.