

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Neonatologie und
Kinderkardiologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Ärztlicher Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. E. Mayatepek

**Der renale Phänotyp beim Very-Long-Chain Acyl-CoA
Dehydrogenase- (VLCAD-) Mangel:
Studien am VLCAD^{-/-}-Mausmodell**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Antonia Charlotte Marita Krogmann

2020

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekanin/Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. Ute Spiekerkötter, Universitätsklinikum Freiburg

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. Keitel-Anselmino, Universitätsklinik Düsseldorf

In Dankbarkeit meinen Eltern

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Tucci S, Krogmann A, Herebian D, Spiekerkoetter U: „**Renal response to short- and long-term exercise in very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase-deficient (VLCAD^{-/-}) mice.**“ Mol Cell Pediatr. 2014 Dec;1(1):5. doi: 10.1186/s40348-014-0005-z. Epub 2014 Oct 2.

Zusammenfassung

Der Very long-chain acyl-CoA Dehydrogenase (VLCAD)-Mangel ist die häufigste angeborene langkettige Fettsäureoxidationsstörung und führt zu klinischen Symptomen in Zuständen mit erhöhtem Energiebedarf. Die Nieren und die Leber, als wichtige Organe für die Glukoneogenese, spielen vor allem unter den Bedingungen der gestörten Fettsäureoxidation eine wichtige Rolle, um die Glukose Homöostase aufrechtzuerhalten. Es ist wenig bekannt, welche Auswirkungen eine gestörte mitochondriale Fettsäureoxidation auf den renalen Stoffwechsel und die renale Funktion haben.

In der vorliegenden Studie untersuchten wir den renalen Metabolismus und den Nierenphänotyp im Modell der VLCAD^{-/-}-Maus. Die Untersuchungen erfolgten in drei Altersstufen der Maus, sowie unter verschiedenen metabolischen Zuständen, wie nach körperlicher Aktivität, nach Fasten und unter einer fettmodifizierten Diät. Zur Charakterisierung des Metabolismus gehörte die Oxidationsrate von Palmitoyl-CoA, um die Funktion des defizienten Enzyms bzw. enzymatische Kompensationsmechanismen zu definieren. Es erfolgte zudem die Bestimmung der Expressionsraten von Genen der β -Oxidation, des Kohlenhydratstoffwechsels, der Lipogenese, sowie die Quantifizierung von Glykogen und der Acylcarnitine im Nierengewebe. Zur Untersuchung der Nierenschädigung und Nierenfunktion wurden Marker des Nierenversagens bestimmt, sowie Funktionsbestimmungen antioxidativer Enzyme durchgeführt, da oxidativer Stress als Pathomechanismus beim VLCAD-Mangel diskutiert wird.

Wichtige Ergebnisse dieser Analysen waren, dass - trotz niedriger Palmitoyl-CoA Oxidationsrate - das Nierengewebe der VLCAD^{-/-}-Mäuse keine Hinweise auf oxidativen Stress oder eine Nierenschädigung zeigte. Parallel zu Untersuchungen anderer Organe konnte in den Nieren jedoch eine verminderte Energieproduktion durch reduzierte Fettsäureoxidation belegt werden. Im Gegensatz zu Herz und Muskel scheint die Niere weniger auf die Energie aus Fettsäuren angewiesen zu sein. Statt dessen entwickelt sie Mechanismen, um die Energieproduktion aus Kohlenhydraten zu sichern, was durch die signifikant erniedrigte Glykogenkonzentration in der Niere vor allem nach körperliche Aktivität belegt wurde. In verschiedenen Stresssituationen vor allem bei körperlicher Aktivität akkumulieren VLCAD^{-/-}-Mäuse keine langkettigen Acylcarnitine in den Nieren, wie dieses z.B. im Muskel oder im Herz nach körperlicher Aktivität der Fall ist.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Niere der VLCAD^{-/-}-Maus die Defizienz eines Enzyms der mitochondrialen Fettsäureoxidation kompensieren kann. Die Nierenzellen können den Energiebedarf durch einen aktivierten Kohlenhydratmetabolismus im Rahmen von Ausdauertraining aufrechterhalten. Gleichzeitig fand sich eine Akkumulation langkettiger Fettsäurenmetabolite, deren langfristige Auswirkungen weiterhin unbekannt bleiben. VLCAD^{-/-}-Mäuse entwickeln keinen nephrologischen Phänotyp.

Abstract

Deficiency of the very long-chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD) is the most common inborn disorder of mitochondrial β -oxidation of long-chain fatty acids. Symptoms usually manifest in situations of increased energy demand. Kidney and liver, the main gluconeogenic organs, play an important role in maintaining glucose homeostasis if β -oxidation is malfunctioning. Little is known about the consequences of a mitochondrial β -oxidation defects on renal metabolism and function.

Therefore, we investigated how VLCAD-deficiency affects kidney function and kidney metabolism. We examined young and older mice, as well as mice in situations of normal and increased energy demand i.e. after exercise, fasting or under a supplemented fatty diet. To characterize the renal metabolism, we assessed the palmitoyl-CoA (C16-CoA) oxidation rate in the kidney of wild-type and VLCAD^{-/-}-mice as well as the expression of other dehydrogenases with overlapping substrate specificity. Renal damage and function were measured by the activity of antioxidant enzymes and by the expression of genes upregulated immediately prior to renal failure. Finally, renal glycogen content and acyl-carnitines were quantified as markers for impaired energy production from fatty acid oxidation.

We were able to show that despite the very low oxidation rate of palmitoyl-CoA in renal mice tissue - the VLCAD^{-/-}-mice did not show any signs of oxidative stress or renal damage. In line with other organs we were able to identify a diminished energy production via fatty acid oxidation. Therefore, other than in heart and muscle tissue, the kidneys are not dependent on fatty acid oxidation. Instead the kidney develops mechanism to meet the energy demand via carbohydrate metabolism. This was shown by a decreased glycogen content in VLCAD^{-/-}-mice after physical exercise. Under situations of higher energy demand such as physical activity long-chain acylcarnitines do not accumulate in the kidneys of VLCAD^{-/-}-mice in contrast to heart and muscle tissue.

In conclusion the kidneys of VLCAD-deficient mice are able to compensate the mitochondrial fatty acid oxidation defect. The activated carbohydrate metabolism meets the energy demand during physical stress. We also demonstrated accumulation of long chain fatty acids with unknown long-term effects. VLCAD^{-/-}-mice do not develop a nephrological phenotype.

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abb. 1: Schematische Darstellung der mitochondrialen β -Oxidation. | 1 |
| Abb. 2: Carnitin Zyklus. | 2 |
| Abb. 3: VLCAD-Mangel. | 3 |
| Abb. 4: Glukosestoffwechsel in der Niere [36]. | 8 |
| Abb. 5: Oxidationsrate von Palmitoyl-CoA bei Wildtyp- und VLCAD ^{-/-} -Mäusen in unterschiedlichem Alter und nach körperlicher Aktivität. | 25 |
| Abb. 6: Effekte von Fasten und fettmodifizierter Diät auf die Oxidationsrate von Palmitoyl-CoA bei Wildtyp- und VLCAD ^{-/-} -Mäusen. | 26 |
| Abb. 7: Spezifische Aktivität der Citrat-Synthase. | 27 |
| Abb. 8: Spezifische Aktivität der Katalase. | 28 |
| Abb. 9: Spezifische Aktivität der NAD(P)H Chinon-Oxidoreduktase. | 29 |
| Abb. 10: Spezifische Aktivität der Glutathionperoxidase. | 30 |
| Abb. 11: Relative Expression von ACADM; dem Gen, welches für MCAD kodiert. ... | 31 |
| Abb. 12: Relative Expressionsrate von ACADL; dem Gen, welches für LCAD kodiert. | 32 |
| Abb. 13: Relative Expressionsrate von AOX. | 33 |
| Abb. 14: Relative Expressionsrate von PPARGC1A. | 34 |
| Abb. 15: Relative Expressionsrate von PDK4. | 35 |
| Abb. 16: Relative Expressionsrate von Pcx. | 36 |
| Abb. 17: Relative Expressionsrate von Pck1. | 37 |
| Abb. 18: Relative Expressionsrate von HMOX; dem Gen, welches für Ho-1 kodiert. ... | 38 |
| Abb. 19: Relative Expressionsrate von LCN2; dem Gen, welches für Ngal kodiert. | 39 |

| | |
|---|----|
| Abb. 20: Relative Expressionsrate von HAVCR1; dem Gen, welches für KIM1 kodiert. | 40 |
| Abb. 21: Relative Expressionsrate von SREBP-1c. | 41 |
| Abb. 22: Relative Expressionsrate von FASN..... | 42 |
| Abb. 23: Relative Expressionsrate von ACACA; dem Gen, welches für ACC1 α kodiert. | 43 |
| Abb. 24: Freies Carnitin (C0). | 44 |
| Abb. 25: Acetylcarnitin (C2). | 45 |
| Abb. 26: Summe langkettiger Acylcarnitine C12-C18OH. | 46 |
| Abb. 27: Glykogengehalt im Nierengewebe..... | 47 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Tabelle 1: Übersicht über die untersuchten Gene sowie deren Symbole und Alias | VII |
| Tabelle 2: Primer und deren Sequenzen | 16 |
| Tabelle 3: Übersicht über die verschiedenen Mausgruppen und ihre Bezeichnungen ... | 18 |

Abkürzungsverzeichnis

- °C. Grad Celsius
- ACACA.** Acetyl-CoA Carboxylase α (Gen)
- ACADL.** Acyl-CoA Dehydrogenase Long Chain (Gen)
- ACADM.** Acyl-CoA Dehydrogenase Medium Chain (Gen)
- ACADVL.** acyl-CoA dehydrogenase very long chain-Gen
- ACC1 α .** Acetyl-CoA Carboxylase 1 α (Enzym)
- ACN.** Acetonitril
- AOX.** Peroxisomale Acyl-CoA Oxidase
- ATP.** Adenosin-Triphosphat
- BSA.** Bovine Serum Albumin
- C16:1-CoA.** Enoyl-Palmitoyl-CoA
- C16-CoA.** Palmitoyl-CoA
- CACT.** Carnitin-Acylcarnitin-Translokase
- CO₂.** Kohlenstoffdioxid
- CoA.** Coenzym A
- CPT I.** Carnitin-Acyltransferase I
- CPT II.** Carnitin-Acyltransferase II
- dH₂O.** Destilliertes Wasser, Aqua
- DMSO.** Dimethylsulphoxide
- DTNB.** 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure
- FAD.** Flavin-Adenin-Dinucleotid
- FADH₂.** reduziertes Flavin-Adenin-Dinucleotid
- FASN.** Fatty Acid Synthase
- g.** Gramm
- GPX.** Glutathionperoxidase
- GR.** Glutathionreduktase
- GSH.** Glutathion
- GTP.** Guanosintriphosphat, Guanosintriphosphat
- h.** Stunde
- H₂O.** Wasser
- H₂O₂.** Wasserstoffperoxid
- HAVCR1.** Hepatitis A Virus Cellular Receptor 1 (Gen)
- HCl.** Salzsäure
- HGMD.** Human Genetic Mutation Database
- HMOX1.** Heme Oxygenase 1 (Gen)
- Ho-1.** Hemoxagenase-1 (Enzym)
- Hz.** Hertz
- kb.** Kilobasen
- KIM1.** Kidney-Injury Molecule 1 (Enzym)
- LCAD.** Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase, langkettigen Acyl-CoA Dehydrogenase
- LCN2.** Lipocalin 2 (Gen)
- LCT.** Long-Chain Tryglyceride, langkettige Triglyceride
- m.** Meter
- mA.** Milliampere
- MCAD.** Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase, mittelkettigen Acyl-CoA Dehydrogenase
- MCT.** Medium-Chain Triglyceride, mittelkettige Triglyzeride
- MeOH.** Methanol
- mg.** Milligramm
- min.** Minute
- ml.** Milliliter
- mM.** Millimolar
- ms.** Millisekunde
- MS/MS.** Tandem Massenspektrometer
- mTFP.** Mitochondrialen Trifunktionellen Proteinkomplex
- NAD(P).** Nicotin-Amid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
- NAD(P)H.** Reduziertes Nicotin-Amid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
- NADH.** Reduziertes Nicotin-Amid-Adenin-Dinucleotid
- ng.** Nanogramm
- Ngal.** Neutrophil gelatinas-associated Lipocalin (Enzym)
- nm.** Nanometer
- nmol.** Nanomol
- NQO1.** NAD(P)H Chinon-Oxidoreduktase
- OH.** Hydroxyl Radikal
- PBS.** Phosphate-buffer saline; Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
- Pck1.** Phosphoenolpyruvat Carboxykinase
- PCR.** Polymerase Ketten Reaktion; Polymerase Chain Reaktion
- Pcx.** Pyruvat-Carboxylase
- PDK4.** Pyruvate Dehydrogenase Kinase Isoenzyme 4
- PEPCK.** Phosphoenolpyruvat Carboxykinase
- PGC1 α .** PPARGC1A, Peroxisome Proliferative Activated Receptor γ Coactivator 1 α
- PPARGC1A.** PGC1 α , Peroxisome Proliferative Activated Receptor γ Coactivator 1 α
- RNA.** Ribonucleic acid, Ribonucleinsäure
- rpm.** Revolutions per Minute; Umdrehungen pro Minute
- RT qPCR.** Quantitative rt-PCR
- rt-PCR.** Real-time PCR; Echtzeit PCR
- SCAD.** Short-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase, kurzkettige Acyl-CoA Dehydrogenase
- SD.** Standardabweichung

SEM. Standard error of the mean,
Standardfehler des Mittelwertes
SREBP-1c. Steroyl Element Binding Protein-
1c
Tris. Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U. Unit; Enzymeinheit
UCP1. Uncoupling Protein 1
V. Volt

VLCAD. Very-Long-Chain Acyl-CoA
Dehydrogenase, sehr langkettigen Acyl-
CoA Dehydrogenase
VLCAD^{-/-}. VLCAD-Knockout
VLCADD. VLCAD-Mangel oder -Defizienz
WT. Wildtyp
µg. Mikrogramm
µl. Mikroliter
µM. Mikromol

Tabelle 1: Übersicht über die untersuchten Gene sowie deren Symbole und Alias

| Gen-Symbol | Gen-Name | Enzym | Alias |
|-------------------|---|----------------|--|
| ACADS | Acyl-CoA Dehydrogenase Short Chain | SCAD | |
| ACADM | Acyl-CoA Dehydrogenase Medium Chain | MCAD | |
| ACADL | Acyl-CoA Dehydrogenase Long Chain | LCAD | |
| ACADVL | Acyl-CoA Dehydrogenase Very Long Chain | VLCAD | |
| AOX | Acyl-CoA Oxidase | AOX | |
| PPARGC1A | PPARG Coactivator 1 α | PGC-1 α | Peroxisome Proliferative Activated Receptor γ Coactivator 1 α |
| PDK4 | Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4 | PDK4 | Pyruvate Dehydrogenase Kinase Isoenzyme 4 |
| PCX | Pyruvat Carboxylase | PC | |
| PCK1 | Phosphoenolpyruvate Carboxykinase 1 | PCK1 | PEPCK-C; Phosphoenolpyruvat Carboxykinase |
| LCN2 | Lipocalin 2 | Ngal | Neutrophil gelatinas-associated Lipocalin |
| HAVCR1 | Hepatitis A Virus Cellular Receptor 1 | KIM1 | Kidney-Injury Molecule 1 |
| HMOX1 | Heme Oxygenase 1 | Ho-1 | Hemoxygenase 1 |
| SREBP-1c | Steroyl Element Binding Protein-1c | SREBP-1 | |
| ACACA | Acetyl-CoA Carboxylase α | ACC1 α | Acetyl-CoA Carboxylase 1 α |
| FASN | Fatty Acid Synthase | FAS | Fatty Acid Synthase |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-------------|
| ZUSAMMENFASSUNG | I |
| ABSTRACT | II |
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS | III |
| TABELLENVERZEICHNIS | V |
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | VI |
| INHALTSVERZEICHNIS | VIII |
| 1 EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 DIE MITOCHONDRIALE B-OXIDATION | 1 |
| 1.2 DAS ENZYM: VERY-LONG-CHAIN ACYL-CoA DEHYDROGENASE | 3 |
| 1.3 DER VLCAD-MANGEL | 3 |
| 1.3.1 MOLEKULARGENETIK | 4 |
| 1.3.2 KLINISCHER VERLAUF | 4 |
| 1.3.3 DIAGNOSTIK | 5 |
| 1.3.4 THERAPIE | 6 |
| 1.4 DAS KNOCKOUT (VLCAD^{-/-})-MAUSMODELL | 7 |
| 1.5 DIE NIEREN | 8 |
| 1.6 FRAGESTELLUNG UND ZIELE DER ARBEIT | 9 |
| 2 MATERIAL UND METHODIK | 10 |
| 2.1 MATERIAL | 10 |
| 2.1.1 GERÄTE | 10 |
| 2.1.2 VERBRAUCHSMATERIAL | 11 |
| 2.1.3 CHEMIKALIEN | 12 |
| 2.1.4 PROGRAMME | 15 |
| 2.1.5 KITS | 16 |
| 2.1.6 PRIMER | 16 |
| 2.2 METHODIK | 18 |
| 2.2.1 MAUSMODELL | 18 |
| 2.2.2 PROTEINEXTRAKTION AUS GEWEBE | 20 |
| 2.2.3 PROTEINBESTIMMUNG NACH BRADFORD | 20 |
| 2.2.4 PALMITOYL-CoA OXIDATION | 21 |
| 2.2.5 CITRAT-SYNTHASE AKTIVITÄT | 21 |
| 2.2.6 OXIDATIVER STRESS | 22 |
| 2.2.7 ARBEITEN MIT NUKLEINSÄUREN | 23 |
| 2.2.8 RIBONUCLEINSÄURE (RNA; RIBONUCLEIC ACID)- EXTRAKTION | 23 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 2.2.9 | BESTIMMUNG DER ACYLCARNITINE | 23 |
| 2.2.10 | GLYKOGENGEHALT | 24 |
| 2.2.11 | STATISTISCHE AUSWERTUNG | 24 |
| 3 | <u>ERGEBNISSE</u> | 25 |
| 3.1 | PALMITOYL-CoA OXIDATIONSRATE | 25 |
| 3.2 | CITRAT-SYNTHESE AKTIVITÄT | 27 |
| 3.3 | OXIDATIVER STRESS | 28 |
| 3.3.1 | KATALASE | 28 |
| 3.3.2 | NAD(P)H CHINON-OXIDOREDUKTASE..... | 29 |
| 3.3.3 | GLUTATHIONPEROXIDASE (GPX)..... | 30 |
| 3.4 | GEN-EXPRESSION..... | 31 |
| 3.4.1 | B-OXIDATION: ACYL-CoA DEHYDROGENASE MEDIUM CHAIN (ACADM), ACYL-CoA DEHYDROGENASE LONG CHAIN (ACADL), ACYL-CoA OXIDASE (AOX)..... | 31 |
| 3.4.2 | TRANSKRIFTIONSFAKTOREN KOHLENHYDRATSTOFFWECHSEL: PEROXISOME PROLIFERATIVE ACTIVATED RECEPTOR γ COACTIVATOR 1A (PPARGC1A; PGC1A), PYRUVATE DEHYDROGENASE KINASE ISOENZYME 4 (PDK4), PYRUVAT CARBOXYLASE UND PHOSPHOENOYL-PYRUVAT CARBOXYKINASE..... | 34 |
| 3.4.3 | NIERENVERSAGEN: HEME OXYGENASE 1 (HMOX1), LIPOCALIN 2 (LCN2) UND HEPATITIS A VIRUS CELLULAR RECEPTOR 1 (HAVCR1) | 38 |
| 3.4.4 | LIPIDAKKUMULATION: STEROYL ELEMENT BINDING PROTEIN-1c (SREBP-1c), FATTY ACID SYNTHASE (FASN) UND ACETYL-CoA CARBOXYLASE A (ACACA) | 41 |
| 3.5 | ACYLCARNITINE..... | 44 |
| 3.5.1 | C0, FREIES CARNITIN:..... | 44 |
| 3.5.2 | C2, ACETYLCARNITIN: | 45 |
| 3.5.3 | LANGKETTIGE ACYLCARNITINE..... | 46 |
| 3.6 | GLYKOGENGEHALT..... | 47 |
| 4 | <u>DISKUSSION</u> | 48 |
| 4.1 | KOMPENSATIONSMECHANIEN IN DER NIERE..... | 48 |
| 4.2 | TOXIZITÄT UND ENERGIEMANGEL | 50 |
| 4.3 | OXIDATIVER STRESS, NIERENVERSAGEN UND LIPIDAKKUMULATION..... | 51 |
| 4.4 | THERAPIEEFFEKTE..... | 53 |
| 5 | <u>SCHLUSSFOLGERUNG</u> | 54 |
| 6 | <u>LITERATURVERZEICHNIS</u> | 55 |
| 7 | <u>ANHANG</u> | 59 |
| 7.1 | ZUSÄTZLICHE GRAFIKEN | 59 |
| 7.2 | DANKSAGUNG | I |

1 Einleitung

1.1 Die mitochondriale β -Oxidation

Die mitochondriale β -Oxidation von Fettsäuren ist ein wichtiger Prozess zur Bereitstellung von zellulärer Energie. Während körperlicher Anstrengung oder während des Fastens deckt der Körper ca. 80% seines Energiebedarfs durch β -Oxidation der Fettsäuren. Mangel einer oder mehrerer Enzyme der β -Oxidation durch angeborene Enzym-Defekte kann zu einem schweren Energiemangel führen.

Ein Zyklus der β -Oxidation beinhaltet vier Teilreaktionen, in denen eine aktivierte Fettsäure, (Acyl-CoA (Coenzym-A)) um zwei Kohlenstoffatome gekürzt und ein Acetyl-CoA abgespalten wird (siehe Abb. 1). Acetyl-CoA ist ein wichtiger Energielieferant für den Citratzyklus und die Biosynthese von Ketonkörpern.

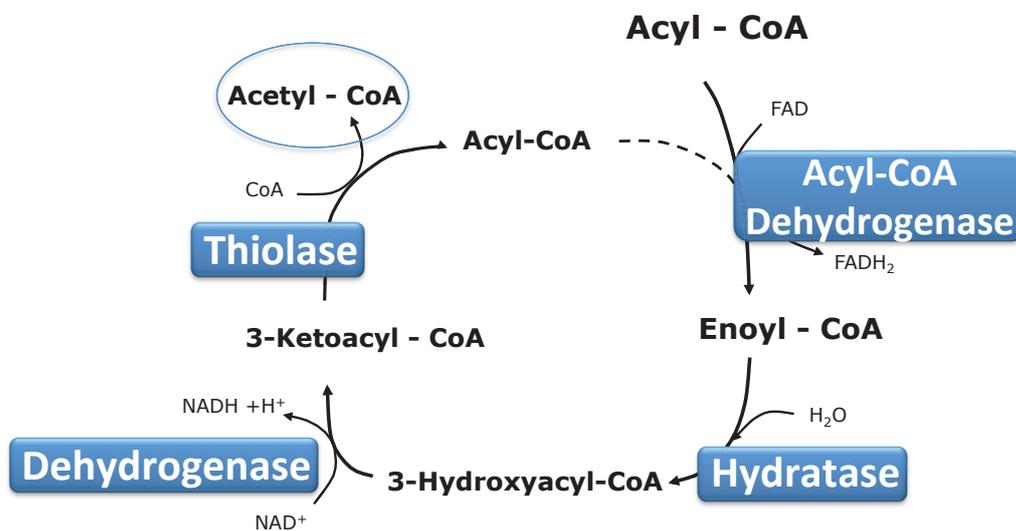


Abb. 1: Schematische Darstellung der mitochondrialen β -Oxidation.

Vereinfachte Darstellung der Oxidation von Fettsäuren. Ein Zyklus beinhaltet 4 Teilschritte, die jeweils durch ein Enzym katalysiert werden. Am Ende wird Acetyl-CoA abgespalten und es entsteht eine um zwei C-Atome gekürzte Fettsäure. Diese geht erneut in den Zyklus ein. Genaue Erklärung siehe unten.

Die erste Teilreaktion der β -Oxidation wird von Acyl-CoA Dehydrogenasen katalysiert. Dies geschieht durch kettenlängen spezifische Enzyme: Der kurzkettigen (SCAD = Short-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase), mittelkettigen (MCAD = Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase), langkettigen (LCAD = Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase) und der sehr langkettigen (VLCAD = Very-Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase) Acyl-CoA Dehydrogenase.

MCAD, LCAD und VLCAD besitzen überlappende Substratspezifitäten [1, 2]. Diesem ersten Oxidationsschritt folgen drei weitere Teilreaktionen. Die Teilreaktionen werden für langkettige Fettsäuren von Enzymen durchgeführt, welche alle im mitochondrialen trifunktionellen Proteinkomplex (mTFP) liegen [2].

Die β -Oxidation von Fettsäuren geschieht in den Mitochondrien. Zunächst werden die Fettsäuren an der äußeren Mitochondrienmembran von der Acyl-CoA-Synthetase (oder auch Fettsäure- Thiokinase) mit Hilfe eines freien Coenzym-A (HS-CoA) unter Adenosin-Triphosphat (ATP)-Verbrauch zu Acyl-CoA aktiviert [3].

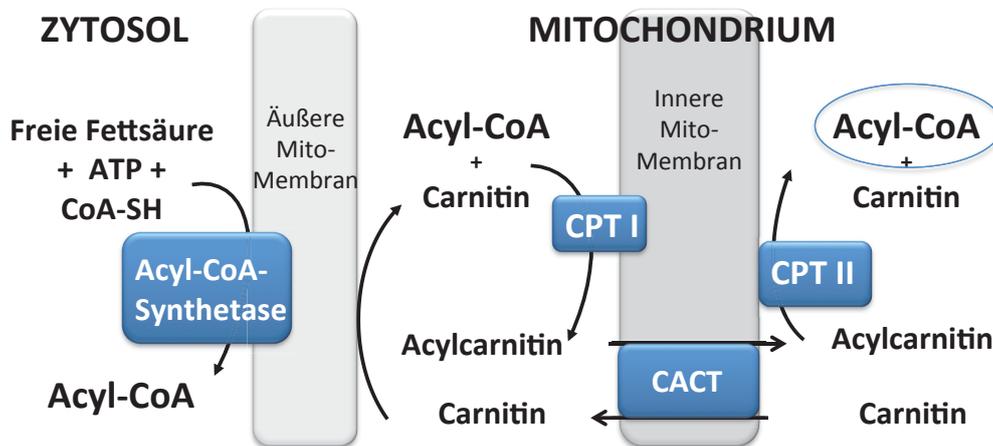


Abb. 2: Carnitin Zyklus.

Aktivierung der Fettsäure im Zytosol. Transport der langkettigen Fettsäuren über die äußere und innere Mitochondrienmembran mit Hilfe von 3 Enzymen: CPT I = Carnitin-Acyltransferase I, CACT = Carnitin-Acylcarnitin-Translokase, CPT II = Carnitin-Acyltransferase II.

Die in der Nahrung enthaltenen Fette haben vorwiegend 16 oder 18 Kohlenstoffatome und sind langkettige Fettsäuren [3]. Damit diese langkettigen Fettsäuren die innere Mitochondrienmembran passieren können, müssen sie zunächst an Carnitin gebunden werden. Carnitin ist eine aus Lysin gebildete zwitterionische Verbindung, die durch die Nahrung aufgenommen oder in der Leber durch endogene Biosynthese synthetisiert wird. Für den carnitingebundenen Transport von langkettigen Fettsäuren in das Mitochondrium sind drei Enzyme verantwortlich (siehe Abb. 2). Die Carnitin-Acyltransferase I sitzt an der zytosolischen Seite der inneren Mitochondrienmembran und katalysiert die Bindung von Carnitin an die aktivierte Fettsäure. Eine Translokase befördert im Austausch zu einem Carnitin-CoA ein Acylcarnitin über die Membran. Die Carnitin-Acyltransferase II befindet sich auf der inneren Seite der inneren Mitochondrienmembran. Sie bindet die HS-CoA-Gruppe wieder an die Fettsäure und befreit diese von Carnitin [3].

1.2 Das Enzym: Very-long-chain Acyl-CoA Dehydrogenase

Die VLCAD katalysiert den ersten Schritt der β -Oxidation von langkettigen Fettsäuren. Langkettige Fettsäuren (C_{16} - C_{18}) sind die häufigsten aller Fettsäuren und werden dabei entweder mit der Nahrung aufgenommen oder stammen aus endogener Lipolyse.

Die VLCAD oxidiert das Kohlenstoffatom an Position C_2 der aktivierten Fettsäure. Aus Palmitoyl-CoA (C_{16} -CoA) entsteht Enoyl-Palmitoyl-CoA ($C_{16}:1$ -CoA). Die dabei freiwerdenden Elektronen überträgt das Enzym auf ein Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD). Hier entstehen eine einfach ungesättigte Fettsäure mit einer Doppelbindung zwischen Position C_2 und C_3 ($C_{16}:1$ -CoA) und ein reduziertes Flavin-Adenin-Dinukleotid ($FADH_2$).

Erblich bedingte Veränderungen in dem Gen für VLCAD, dem Acyl-CoA Dehydrogenase Very-Long-Chain-Gen (ACADVL-Gen), führen zu einem VLCAD-Mangel oder zu einer VLCAD-Defizienz (VLCADD) [2].

1.3 Der VLCAD-Mangel

In den letzten 15 bis 20 Jahren wurden verschiedene Enzymdefekte des Fettsäurenstoffwechsels identifiziert. Mittlerweile sind mehr als 20 Enzym- und Transportdefekte bekannt [4, 5]. Der VLCAD-Mangel ist die häufigste langkettige Fettsäurenoxidationsstörung mit einer regionalen Inzidenz von 1:30.000 bis 1:100.000 [6-9]. Hierbei kommt es durch den Mangel oder das Fehlen des Enzyms zum Abbruch der Reaktionen der β -Oxidation und somit zur Akkumulation von langkettigen Acylcarnitinen und langkettigen Acyl-CoA (siehe Abb. 3).

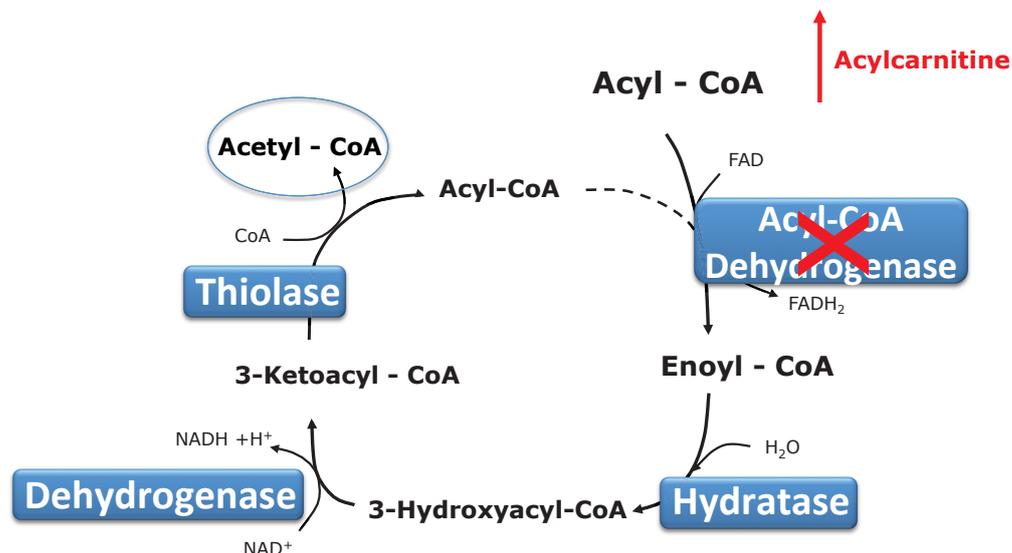


Abb. 3: VLCAD-Mangel.

Bei einem Mangel an langkettigen Acyl-CoA-Dehydrogenasen ist die β -Oxidation blockiert. Es kommt zur Akkumulation von langkettigen Acylcarnitinen und Acyl-CoA.

1.3.1 Molekulargenetik

Mutationen im ACADVL-Gen, welche autosomal rezessiv vererbt werden, resultieren in einer verminderten oder fehlenden Aktivität der VLCAD. Dem VLCAD-Mangel liegt eine hohe molekulare Heterogenität zu Grunde [10]. Bisher sind zirka 283 Sequenzvariationen beschrieben (Human Genetic Mutation Database (HGMD) Februar 2019).

Das ACADVL-Gen ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 17, 17p13.1, lokalisiert und 5,4 Kilobasen (kb) lang. Die kodierende Region besteht aus 20 Exonen. Dabei können Mutationen im Bereich der Exone und Introne liegen.

Andresen et al. (1999) charakterisierten 55 Patienten und fanden 58 verschiedene Mutationen, welche unterschiedliche Auswirkungen auf die Proteinstruktur hatten. Eine Nullmutation führte in der Regel nicht zur Bildung des Proteins. Dagegen resultierte eine Missense-Mutation in der Bildung des Proteins, welches vorzeitig degradiert wurde. Dieses hatte eine reduzierte Aktivität des Enzyms zur Folge. Somit wurde von einer Genotyp-Phänotyp Korrelation ausgegangen. [11]

1.3.2 Klinischer Verlauf

Eine katabole Stoffwechsellaage, ausgelöst durch einen Infekt, körperliche Aktivität oder Fasten, kann bei Fettsäureoxidationsstörungen klinische Symptome hervorrufen. Unter diesen Umständen ist auch eine schwere metabolische Entgleisung möglich. Vor allem sind Organe mit einem sehr hohen Energiebedarf betroffen, wie das Herz, die Skelettmuskulatur oder die Leber [8].

Das klinische Bild eines VLCAD-Mangels ist heterogen mit verschiedenen Schweregraden und gleichzeitig variiert das Alter bei Erstmanifestation [10].

Die Pathomechanismen des VLCAD-Mangels wurden mittlerweile umfangreich untersucht. Aktuell steht bei der Pathogenese-Forschung die Untersuchung der Effekte einer gestörten Fettsäureoxidation auf andere Energiestoffwechselwege im Vordergrund.

Vor Aufnahme der Fettsäureoxidationsstörungen in das erweiterte Neugeborenen-Screening manifestierte sich die schwere Verlaufsform bereits in den ersten Lebenswochen und -monaten mit einer Kardiomyopathie und Hepatopathie. Der infantile hepatische Phänotyp zeigte sich in einer hypoketotischen Hypoglykämie und Lethargie und wurde in der Regel durch eine Infektion mit Fieber und Fasten ausgelöst. Der später manifeste mildere myopathische Phänotyp entwickelte sich erst im Jugend- oder frühen Erwachsenenalter und ging mit Muskelschwäche, Rhabdomyolyse und Myoglobinurie einher.

In kataboler Stoffwechsellaage sind VLCAD-defiziente Patienten nicht ausreichend in der Lage, aus endogener Lipolyse stammende langkettige Fettsäuren zur Energieproduktion zu oxidieren. Diese akkumulieren als Acylcarnitine und sind in

hoher Konzentration in den Geweben und im Blut nachweisbar. Die Kohlenhydrate der Nahrung stehen in kataboler Stoffwechsellage alternativ nicht zur Verfügung.

Durch das Neugeborenencreening ist die Prognose bei Kenntnis der Krankheit und rechtzeitigen prophylaktischen Maßnahmen mittlerweile sehr gut. Es können Dauerschäden vermieden oder gemindert werden [2].

Evens et al. [12] beobachteten 23 Patienten über 14 Monate bis 16 Jahre und 7 Monate. Hier zeigte sich, dass asymptomatische Patienten asymptomatisch blieben und es keinen Biomarker gab, welcher die Notwendigkeit für die Initiierung einer Therapie stellte. Mutationsanalysen hingegen weisen auf eine Phänotyp-Genotyp Korrelation hin. Die Autoren empfehlen weiterhin, die strenge und dauerhaft fettmodifizierte Diät innerhalb der ersten fünf Lebensjahre, inklusive der Gabe von mittelkettigen Triglyzerid (MCT, Medium-Chain Triglyceride)-Boli vor Beginn körperlicher Aktivität einzuhalten [12]. In späteren Jahren kann die Diät gelockert werden, die MCT-Boli vor der körperlichen Aktivität sollten allerdings beibehalten werden.

Spiekerkoetter et al. [13] untersuchten in einer Studie 75 Individuen mit einem VLCAD-Mangel oder Störungen des mitochondrialen trifunktionellen Proteinkomplexes. Auch hier zeigte sich, dass alle asymptomatisch Betroffenen, welche durch das erweiterte Neugeborenencreening detektiert wurden, im Beobachtungszeitraum von 7 Jahren asymptomatisch blieben. Von den symptomatisch Betroffenen litten 38% - trotz adäquater Behandlung - unter intermittierender Muskelschwäche. Dies bestätigte sich in einer Studie von Laforet und Mitarbeitern. In dieser Studie wurde besonders hervorgehoben, dass Symptome vor allem durch Fieber, Fasten und körperlicher Aktivität induziert waren [14].

1.3.3 Diagnostik

Im Neugeborenencreening und bei klinischem Verdacht werden Acylcarnitine mittels Tandem Massenspektrometrie im Trockenblut analysiert. Bei einem VLCAD-Mangel sind folgende langkettige Acylcarnitine erhöht: $C_{14:2}$, $C_{14:1}$ und C_{14} , sowie die entsprechenden Quotienten $C_{14:1}/C_{12:1}$. Das freie Carnitin ist in der Regel vermindert [2, 15]. Im Urin sind die C_6 - bis C_{14} -Dicarbonsäuren erhöht nachweisbar [16]. Allerdings können Acylcarnitine und organische Säuren im Urin bei anaboler Stoffwechsellage auch komplett unauffällig sein. Bei dem Verdacht auf einen VLCAD-Mangel muss die Diagnose durch einen Enzymtest (z.B. die Palmitoyl-CoA Aktivität in Lymphozyten) oder eine molekulargenetische Untersuchung [2] bestätigt werden.

1.3.4 Therapie

Als Therapie wird eine fettreduzierte und fettmodifizierte Diät eingesetzt, wobei die essentiellen Fettsäuren substituiert werden müssen [17]. Vitamine und Mineralien müssen bei einer ausgewogenen Diät nicht zusätzlich supplementiert werden [17]. Insbesondere ist darauf zu achten, dass keine katabolen Stoffwechsellagen eintreten. Hierzu zählt eine regelmäßige Nahrungs- und Kohlenhydratzufuhr vor allem in Situationen mit erhöhtem Energiebedarf, wie z.B. bei Fieber.

Die Therapie Empfehlungen beim VLCAD-Mangel richten sich danach ob Patienten Symptome haben oder nicht. Symptomatischen Patienten empfiehlt man eine Diät, die eine reduzierte und bilanzierte Zufuhr an langkettigen Triglyzeriden (LCT; Long-Chain Triglyceride) enthält (25-30% des Fettanteils), sowie eine Anreicherung der Diät mit synthetischen, mittelkettigen Triglyceriden. Außerdem ist die zusätzliche Gabe von MCT oder Kohlenhydraten vor sportlicher Aktivität empfohlen [18]. Für die asymptomatischen Patienten existieren keine strikten Diätvorgaben, wobei die Zufuhr langkettiger Fettsäuren nicht übermäßig sein sollte [18]. Wenn die Kreatinkinase, die Leberenzyme und Glukose normwertig sind, kann der VLCAD-defiziente, asymptomatische Säugling bedenkenlos gestillt oder mit der Flasche gefüttert werden.

In einer akuten katabolen Phase beim VLCAD-defizienten Patienten ist es wichtig eine anabole Stoffwechsellage wiederherzustellen. Dies geschieht durch Glukosezufuhr, entweder peroral in Form von Maltodextrin oder intravenös als Glukose-Infusion. Zusätzlich werden oral mittelkettige Triglyzeride gegeben.

Mit Hilfe dieser Therapie können Symptome wie die Kardiomyopathie reversibel sein, und es treten keine hypoketotischen Hypoglykämien auf. Jedoch können bei erhöhter körperlicher Aktivität durch die oben genannten Maßnahmen Muskelschwäche und Muskelschmerzen in der Regel nicht komplett eliminiert werden [2].

Die Supplementierung von Carnitin ist beim VLCAD-Mangel umstritten. Studien haben gezeigt, dass eine Supplementierung von Carnitin die Produktion von langkettigen Acylcarnitinen induziert, welche toxische Effekte haben können [19, 20]. Mit steigendem Carnitin Bedarf, kommt es zu einer gesteigerten endogenen L-Carnitin Biosynthese, sowohl bei VLCAD^{-/-}-Mäusen [19] als auch beim Menschen. Eine exogene Zufuhr supprimiert hingegen die endogene L-Carnitin Biosynthese in der Leber. Vorübergehende niedrige Konzentrationen von Carnitin in Blut und Geweben können durch die endogene Biosynthese gut kompensiert werden [19]. Eine intravenöse Gabe von L-Carnitin bei akuter metabolischer Entgleisung sollte vermieden werden. Ein starker Anstieg an potentiell toxischen Acylcarnitinen kann am Herzen zu Überleitungsstörungen führen.

1.4 Das Knockout (VLCAD^{-/-})-Mausmodell

Es wurden zwei unterschiedliche Mausmodelle des VLCAD-Mangels entwickelt [21, 22]. Im Gegensatz zum Menschen haben Mäuse zwei Dehydrogenasen, welche überlappende Substratspezifitäten besitzen: die VLCAD und die Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (LCAD). Die LCAD ist bei Mäusen für einen Großteil der Oxidation von Palmitoyl-CoA verantwortlich. Im Menschen ist die LCAD ebenfalls vorhanden. Ihre pathogenetische Bedeutung ist jedoch noch weitgehend unklar. Erst kürzlich wurde ihre Defizienz mit der Dysfunktion von Surfactant in Lungengewebe in Verbindung gebracht [23-25].

Mäuse mit einem LCAD-Mangel sind charakterisiert durch einen plötzlichen, unklaren Tod, Fastenintoleranz, hypoketotische Hypoglykämien, sowie schwere kardiale und hepatische Fettinfiltrationen [22, 26]. Die Mäuse haben eine hohe Rate an Fehlgeburten, wobei 40% der Feten in Utero versterben [26]. Kurz nach der Geburt zeigt sich bei LCAD-defizienten Mäusen eine deutliche, aber nicht fortschreitende kardiale Hypertrophie ohne wesentliche Dysfunktion [23, 27].

Parallel zu Menschen mit einem VLCAD-Mangel, zeigen LCAD^{-/-}-Mäuse eine Akkumulation von C12- bis C14-Acylcarnitinen in Blut und Gewebe, wobei am meisten C14-Acylcarnitine anfallen [8, 22]. Bei den VLCAD^{-/-}-Mäusen kommt es im Gegensatz dazu zu einer Akkumulation von C16- bis C18-Acylcarnitinen. Chegary and Brinke et al. zeigten, dass die LCAD in Mäusen primär die Verstoffwechslung von ungesättigten statt gesättigten Acyl-CoA übernimmt [28].

VLCAD^{-/-}-Mäuse sind in den ersten Lebenswochen asymptomatisch und entwickeln einen klinischen Phänotyp durch Stress und katabole Situationen [29], wie dies bei der milden Form des VLCAD-Mangels zu beobachten ist. Außerdem zeigt sich in der Langzeitbeobachtung, dass sich am Ende des ersten Lebensjahres eine Kardiomyopathie entwickelt [30], welche durch eine intrazelluläre Lipid Akkumulation und mitochondriale Proliferation gekennzeichnet ist [21].

Da die Expressionsrate des Uncoupling Protein 1 (UCP1) bei Mäusen, welche unter einer Fettsäureoxidationsstörung leiden, sehr niedrig ist, sind diese Mäuse sehr intolerant gegenüber Kälte [22]. Die Mäuse sind nicht in der Lage, bei 4°C ohne Zittern Wärme zu generieren [31].

Bei kardial-spezifischen VLCAD^{-/-}-Mäusen zeigte sich ebenfalls eine dilatative Kardiomyopathie und eine Kälte-Intoleranz [32]. Katabole Situationen wie Fasten und Kälte-Exposition resultieren bei VLCAD^{-/-}-Mäusen in einer Abnahme des Glykogengehaltes in der Leber und in schwerer Hypoglykämie mit beeinträchtigter Gluconeogenese [33]. Ein Drittel der Mäuse haben den Kälte-Stress-Test aufgrund von schwerer Hypothermie und Lethargie nicht überlebt [34, 35]. Körperliche Aktivität führte zu hohen Konzentrationen von langkettigen Acylcarnitinen im Blut und Muskelgewebe in Verbindung mit einer verminderten Laufgeschwindigkeit und Laufstrecke auf dem Laufband [29, 34].

Während biochemisch die LCAD-defiziente Maus dem VLCAD-Mangel beim Menschen ähnlicher ist, entspricht der klinische Phänotyp der VLCAD-defizienten Maus dem klinischen Phänotyp beim Menschen und ist damit ein sehr geeignetes Modell für pathophysiologische Untersuchungen.

1.5 Die Nieren

Die Nieren haben eine Vielzahl an Aufgaben im menschlichen Organismus. Neben der Primärharnbildung und Harnkonzentrierung sind sie auch ein wichtiger Bestandteil der Hormonproduktion und der Regulation des Säure-Base-Haushaltes.

Hierfür benötigen die Nieren eine ständige Energiezufuhr in Form von ATP. Ein Großteil dieser Energie wird für die aktiven Transportmechanismen im Tubulussystem benötigt. Der Energiestoffwechsel ist hauptsächlich sauerstoffabhängig. Wichtige Substrate sind hier vor allem Ketonkörper und freie Fettsäuren.

Die distalen Nephronabschnitte und das Sammelrohr nutzen zur Energiebereitstellung in erster Linie die Glykolyse teilweise auch die anaerobe Glykolyse, da besonders im Papillenbereich der Sauerstoffgehalt sehr gering ist.

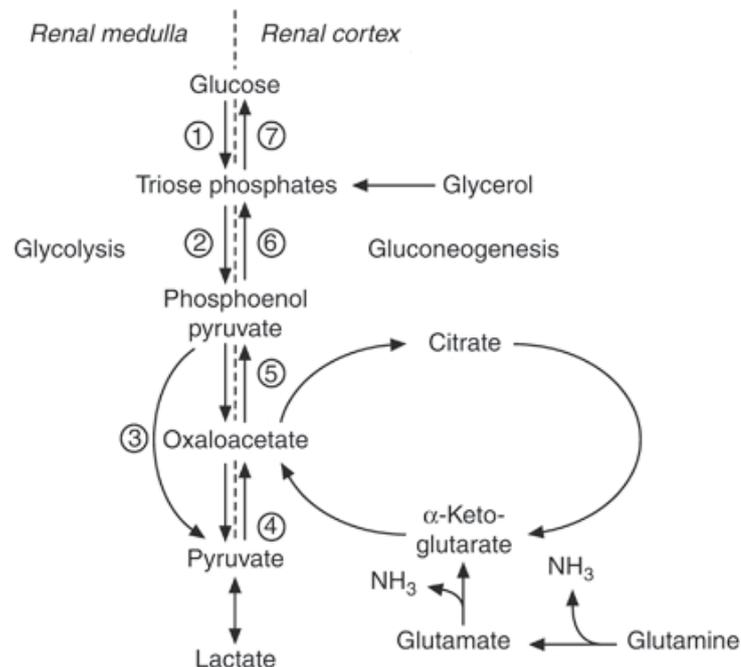


Abb. 4: Glukosestoffwechsel in der Niere [36].

Glykolyse im Nierenmark (1: die ersten drei Schritte der Glykolyse: Hexokinase, Glucose-6-Phosphat-Isomerase, Phospho-Fruktokinase und Aldolase; 2: Glycerophosphat-Dehydrogenase, Phosphoglycerat-Kinase, Phosphoglycerat-Mutase, Enolase; 3: Pyruvat-Kinase) ;

Glukoneogenese in der Nierenrinde (4: Pyruvat-Carboxylase (Pcx); 5: Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (PEPCK = Pck1); 6: Enolase, Phosphoglycerat-Mutase, Phosphoglycerat-Kinase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; 7: Triose-Phosphat-Isomerase, Fructose-1,6-Bisphosphat-Aldolase, Fructose-1,6-Bisphosphatase, Glucose-6-Phosphat-Isomerase, Glucose-6-Phosphatase)

Die Niere ist nicht nur in der Lage zur Glykolyse, sondern ist auch ein wichtiges Organ für die Gluconeogenese, welche hauptsächlich im Rindbereich stattfindet. Kommt es zum Beispiel im Rahmen eines Hungerzustandes zu einer Azidose, führt das zu einer Bildung von Glukose aus Glutamin im Kortex der Niere. Diese Glukose ist nicht nur für die Azidosebekämpfung wichtig, indem sie H^+ -Ionen bereitstellt, sondern dient in dieser katabolen Phase dem menschlichen Körper auch als Energiequelle. Rund 50% des Energiebedarfs stammen im Hungerzustand aus den Nieren. [37Kapitel 10.11] [38Kapitel 29.7]. Es ist zusätzlich beschreiben, dass die Niere sehr empfindlich auf oxidativen Stress reagiert [39] mit der möglichen Folge eines akuten Nierenversagens.

1.6 Fragestellung und Ziele der Arbeit

Der kardiale, hepatische und myopathische Phänotyp des VLCAD-Mangels ist beim Menschen und am Mausmodell gut charakterisiert. Unklar ist, ob auch die Niere bei Vorliegen einer Fettsäureoxidationsstörung mit beeinträchtigt ist. Dieses ist grundsätzlich zu erwarten, da der Enzymdefekt auch in den Nieren vorhanden ist und die Nieren als energieabhängige Organe eine wichtige Rolle in der Energiebereitstellung für den Körper spielen. Auch andere angeborene mitochondriale Erkrankungen sind durch einen Nierenphänotyp gekennzeichnet. Zusätzlich werden die im Körper entstehenden toxischen Acylcarnitine über die Niere ausgeschieden und akkumulieren ggfs. dort. Pathophysiologische Veränderungen in der Niere sind beim VLCAD-Mangel bisher nicht erforscht. Im Rahmen dieser Studie sollen folgende Fragestellungen im Mausmodell des VLCAD-Mangels untersucht werden:

- 1) Ist der renale Energiestoffwechsel durch den VLCAD-Mangel beeinträchtigt?
- 2) Wie beeinflussen Stressfaktoren wie Fasten und körperliche Aktivität, sowie eine fettmodifizierte Diät den renalen Stoffwechsel?

2 Material und Methodik

2.1 Material

2.1.1 Geräte

| Geräte | Typ | Hersteller |
|-------------------------------|--|--|
| Begasungsbrutschrank | BB 6220 | Heraeus, Kendro, Hanau, Deutschland |
| Feinwaage | A200S | Sartorius, Göttingen, Deutschland |
| Laufband | Columbus Instruments Simplex II metabolic rodent treadmill | Columbus Instruments, Columbus, OH, USA |
| Gefriertrockner (Lyophilizer) | Type 2040 VDH | Snijders, Tilburg, Holland |
| Ofen | Functional line Kendro | Heraeus, Kendro, Hanau, Deutschland |
| Photometer | infinite M200 | Tecan, Männedorf, Schweiz |
| Polytron Homogenizer | PT1200 | Kinematica, Schweiz |
| Pulverisierer | | BRAND, Wertheim, Deutschland |
| RT qPCR Thermocycler | 7500 Real-Time PCR System | Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA |
| Spektrophotometer | NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000 | PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland |
| Tandem LC-MS/MS | Quattro Micro | Waters, Milford, Massachusetts, USA |
| Taumelschüttler | Biometra® WT 12 | Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland |
| Thermomixer | Comfort | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |

| | | |
|---|-------------------|--|
| Thermostat | HLC | Ditabis AG, Pforzheim, Deutschland |
| Tischzentrifuge | Biofuge fresco | Heraeus Deutschland GmbH & Co. KG, Hanau, Deutschland |
| Trockner | L30 | H Schrader |
| Schüttel- und Mischgeräte (Vortexer) | MS2 Minishaker | IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland |
| Schüttel- und Mischgeräte (Vortexer) | REAX Top | Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Schwabach, Deutschland |
| Zentrifuge | Multifuge 3S/3s-R | Heraeus Deutschland GmbH & Co. KG, Hanau, Deutschland |

2.1.2 Verbrauchsmaterial

| Produkt | Typ | Hersteller |
|--|--|--|
| 96-Loch Filterplatten | Nunc MicroWell™ Filter Plates | Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| 96-Lochplatten | Nunc MicroWell™ Plates; schwarz und weiß | Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Dispenserpipettenspitzen | Combitips 12,5ml | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Dispenserpipettenspitzen | Combitips 0,5ml | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Filterpapierkarte | | |
| Filterröhrchen | | |
| Kontrolldiät | ssniff® EF R/M Control | SSniFF Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland |
| Kunststoffpipetten (2, 5, 10, 25ml) | costar® Stripette | Corning Incorporated, Corning, New York, USA |
| MCT-modifizierte Diät | Ceres MCT-Öl | Basis GmbH, Oberpfaffenhofen, Deutschland |

| | | |
|--|---|---|
| Membran (RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit) | | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| Pipetman 200µl | | Gilson, Villiers le Bel, Frankreich |
| Pipetten (10 µl, 100 µl, 1000 µl) | | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Reaktionsgefäße (15ml) | Cellstartubes | Greiner Bio-One GmbH; Frickenhausen, Deutschland |
| Reaktionsgefäße (50ml) | BD Falcon | BD, Franklin Lakes, NJ, USA |
| Reaktionsgefäße (1,5ml) | Reagiergefäß 1,5ml | SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland |
| Reaktionsgefäße (2,0ml) | Safe-Lock Tubes 2ml | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Reaktionsgefäße (0,5ml) | Safe-Lock Tubes 0,5ml | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Rollengläser mit Schnappdeckel | Polypropylene conical Tube, 50ml, steril | Astro Medtec Medizintechnik GmbH, Bergheim, Österreich |

2.1.3 Chemikalien

| Substanz | Hersteller |
|---|--|
| 2,6-Dichlorophenolindophenol sodium salt FLUKA Analytical | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Acetonitril (ACN) | LiChrosolv® Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Acetonitril für LS-MS Geräte | Fisher scientific, Schwerte, Deutschland |
| AcetylCoA sodium salt hydrate | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Albumin Solution, 35% in DPBS | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| AmplifluRed | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |

| | |
|--|--|
| Aqua, dH ₂ O | LiChrosolv® Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| BIO-RAD Protein Assay | BIO-RAD Laboratories, München, Deutschland |
| Bovine serum albumin (BSA) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Bradford Reagent: Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Calibrator | Bio Assay System, Hayward, CA, USA |
| Catalase from bovine liver | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| CellLytic™ M Mammalian Tissue Lysis/ Extraction Reagent | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Dicumarol | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| DMSO (dimethylsulphoxide), 5ml, steril | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| DNase I, RNase free, lyophilisiert | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| DTNB (5,5-Dithiobis(2-Nitrobenzoesäure)) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| EnzymChrom™ Glycogen Assay Kit – Reagenz | Bio Assay System, Hayward, CA, USA |
| Ethanol, Emsure® | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Ferrocenium hexa-fluorophosphate | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Glutathion | Bio Assay System, Hayward, CA, USA |
| Glutathion-Peroxidase-Assay Buffer | Bio Assay System, Hayward, CA, USA |

| | |
|---|--|
| Glutathion-Reduktase Enzyme | Bio Assay System, Hayward, CA, USA |
| H ₂ O ₂ (30%) | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Salzsäure (HCl) | |
| Horseradish Peroxidase (HRP) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| L-carnitine-methyl-d ₃ hydrochloride (C0) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Methanol (MeOH)/Wasser (H ₂ O) (1:1) | |
| Methanol | LiChrosolv® Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Methanol für LS-MS Geräte | Fisher chemicals, Chula Vista, California, USA |
| n-Butano-acetylchlorine | |
| Reduziertes Nicotin-Amid-Adenin-Dinucleotid- (NADH) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Reduziertes Nicotin-Amid-Adenin-Dinucleotid- Phosphat (NAD(P)H) | Bio Assay System, Hayward, CA, USA |
| Octanoyl-L-carnitine-(N-methyl-d ₃) hydrochloride (C8) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Oxalacetat SAFC 98% | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Palmitic Acid, minimum 99% | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Palmitoyl- ¹³ C ₁₆ coenzyme A | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Palmitoyl-L-carnitine-(N-methyl-d ₃) hydrochloride (C16) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Phosphate-buffer saline (PBS)-Puffer pH 7,3 (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung) | Serag –Wiessner GmbH&Co.KG, Naila, Deutschland |

| | |
|--|---|
| Proteinase Inhibitor Cocktail for use with Mammalian cell & tissue extracts, DMSO solution | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Proteinkinase K (RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit) | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| Proteinstandard 2mg BSA/ml | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| RDD Puffer (RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit) | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| RNase-freies Wasser (RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit) | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| RPE Puffer (RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit) | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| RT-Mix (Quanti Tect® SYBR® Green RT-PCR Kit) | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| RW1 Puffer (RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit) | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| β-Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| β-Mercaptoethanol-RLT Puffer (RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit) | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| SYBR-Green (Quanti Tect® SYBR® Green RT-PCR Kit) | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| TRIS Pufferan® | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |

2.1.4 Programme

Software

Adobe Acrobat
 GraphPadPrism
 Microsoft Office
 Tecan-Magellan™-Reader

Anwendungsgebiet

EDV
 EDV
 EDV
 ELISA-Reader

2.1.6 Kits

| Name | Hersteller |
|--|---|
| Citrat Synthase Assay Kit | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| EnzymChrom™ Glutathion Peroxidase Assay Kit (EGPX-100) | Bio Assay System, Hayward, CA, USA |
| EnzymChrom™ Glycogen Assay Kit (Cat# E2GN-100) | Bio Assay System, Hayward, CA, USA |
| Quanti Tect® SYBR® Green RT-PCR Kit | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit | Qiagen, Hilden, Deutschland |

2.1.7 Primer

Die verwendeten Primer für die Genexpressionsstudien wurden mit der FastPCR Software vom R. Kalender, Institute of Biotechnology, Helsinki, Finnland entworfen/konstruiert.

Tabelle 2: Primer und deren Sequenzen

| Probe | | Forward 5' → 3' | Hersteller |
|--|-------------|--|----------------------|
| Gen | Enzym | Reverse 3' → 5' | |
| <i>β-Actin</i> | | 5'→3' TAGGCACCAGGGTGTGATGG 3'→5' CTCATGTCGTCGCCAGTTGG | Eurofins, MWG-Operon |
| <i>β-Oxidation</i> | | | |
| <i>ACADM</i> | <i>MCAD</i> | 5'→3' GAAAGTTGCGGTGGCCTTGG 3'→5' AAGCACACATCATTGGCTGC | Eurofins, MWG-Operon |
| <i>ACAL</i> | <i>LCAD</i> | 5'→3' GGAAGAGCAAGCGTACTCC 3'→5' TCTGTCATGGCTATGGCACC | Eurofins, MWG-Operon |
| <i>AOX</i> | | 5'→3' TGCCCAGGTGAGAAGCCTGACG 3'→5' TCAGACTGGCGCCTCACAGC | Eurofins, MWG-Operon |
| <i>Kohlenhydratstoffwechsel</i> | | | |
| <i>PPARGC1A</i> | | 5'→3' CAACATGCTCAAGCCAAAC 3'→5' GGAGTTAGGCCTGCAGTTCC | Eurofins, MWG-Operon |
| <i>PDK4</i> | | 5'→3' CCTGTCAGAGTTTGTAGACAC 3'→5' CAAAGGCATCTTGGACTACTG | Eurofins, MWG-Operon |
| <i>Pcx</i> | | 5'→3' CGCTGCAGGCGTTCCAGTGG 3'→5' ACTCCTCATAGCTATGCACG | Eurofins, MWG-Operon |
| <i>Pck1</i> | | 5'→3' AGACCGCAGGACGCGGAACC 3'→5' CCTTCAGGTCTACGGCCACC | Eurofins, MWG-Operon |

| Probe | | Forward 5' → 3' | Hersteller |
|----------------------------------|--------------------------------|--|----------------------|
| Gen | Enzym | Reverse 3' → 5' | |
| <i>Niereninsuffizienz</i> | | | |
| <i>LCN2</i> | <i>Ngal</i> | 5'→3' GTGGTACGTTGTGGGCCTGG 3'→5' TGGCCAGCCCTGGAGCTTGG | Eurofins, MWG-Operon |
| <i>HAVCRI</i> | <i>KIM-1</i> | 5'→3' GTCAGCATCTCTAAGCGTGG 3'→5' GGCAGAAGGTCCCTCAGAGG | Eurofins, MWG-Operon |
| <i>HMOX1</i> | <i>Ho-1</i> | 5'→3' ATTGAGCTGTTTGAGGAGCTGC 3'→5' CACTGCCACTGTTGCCAACAGG | Eurofins, MWG-Operon |
| <i>Lipogenese</i> | | | |
| <i>SREBP-1c</i> | | 5'→3' CAGCTCAGAGCCGTGGTGA 3'→5' TTGATAGAAGACCGGTAGCGC | Eurofins, MWG-Operon |
| <i>ACACA</i> | <i>ACCIα</i> | 5'→3' TCAACAGGCTGAGCTTCACACG 3'→5' ACTGGTCATGATATCCTGCAGC | Eurofins, MWG-Operon |
| <i>FASN</i> | | 5'→3' TCTGGAATCCGCACCGGCTACC 3'→5' TTCCCGGGTTGCCCTGTCAAGG | Eurofins, MWG-Operon |

2.3 Methodik

2.3.1 Mausmodell

In dieser Arbeit wurde das VLCAD^{-/-}-Mausmodell verwendet. Die VLCAD^{-/-}-Maus wurde generiert wie beschrieben von Exil et al. [21]. Die Genotypisierung erfolgte nach Spiekerkoetter et al. [29] mit Hilfe der Polymerase Ketten Reaktion (PCR; Polymerase Chain Reaktion). Die Experimente wurden an Mäusen mit einem gemischt genetischen Hintergrund (Kreuzung C57BL6+129sv) durchgeführt [40].

Die Mäuse erhielten Futter und Wasser ad libitum. Alle Mäuse wurden nach Beendigung der Versuche gewogen und mittels Kohlenstoffdioxid (CO₂) für post mortem Untersuchungen getötet. Die Nieren wurden unmittelbar extrahiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Blutproben wurden durch Herzpunktion entnommen und auf einer Filterpapierkarte getrocknet.

Alle Studien wurden nach Genehmigung durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (Aktenzeichen 8.87-50.10.34.09.072) und nach den Richtlinien der Tierversuchskommission der Heinrich-Heine-Universität durchgeführt.

Die Mäuse wurden in acht verschiedene Gruppen jeweils VLCAD^{-/-}-Mäuse mit einer korrespondierenden Wildtyp (WT)-Kontrollgruppe eingeteilt. Jede Gruppe besteht aus 4 bis 7 Mäusen (n= 4-7).

Tabelle 3: Übersicht über die verschiedenen Mausgruppen und ihre Bezeichnungen

| | | |
|----------|--------|--|
| Gruppe 1 | KR3M | Kontrolldiät, Ruhebedingungen; 3 Monate |
| Gruppe 2 | KR6M | Kontrolldiät, Ruhebedingungen; 6 Monate |
| Gruppe 3 | KR12M | Kontrolldiät, Ruhebedingungen; 12 Monate |
| Gruppe 4 | KA3M1h | Kontrolldiät, 1. Laufprotokoll: 1 Stunde; 3 Monate |
| Gruppe 5 | KA3M2w | Kontrolldiät, 2. Laufprotokoll: 2 Woche; 3 Monate |
| Gruppe 6 | KF3M | Kontrolldiät, 24h Fasten; 3 Monate |
| Gruppe 7 | MR3M | Fettmodifizierte, MCT- Diät, Ruhebedingungen; 3 Monate |
| Gruppe 8 | MF3M | Fettmodifizierte, MCT- Diät, 24h Fasten; 3 Monate |

2.3.1.1 Alter

Um zu ermitteln wie sich der Phänotyp der Mäuse im zeitlichen Verlauf darstellt, wurden Mäuse im jungen, juvenilen und adulten Alter getestet. Die erste Gruppe (KR3M) wurde nach zehn bis zwölf Wochen, die zweite (KR6M) nach sechs Monaten und die dritte (KR12M) nach zwölf Monaten untersucht. Alle drei Gruppen erhielten eine Kontrolldiät und standen unter Ruhebedingungen.

2.3.1.2 Laufbandversuche

Mit der vierten und fünften Gruppe wurden Laufbandversuche nach zwei verschiedenen Protokollen durchgeführt. Beide Versuche wurden auf einem Columbus Simplex II metabolic Laufband für Nagetiere mit vier individuellen Laufbahnen ohne Neigungswinkel und einem Schock Stimulus (3 Hertz (Hz), 200 Millisekunde (ms), 160 Volt (V), 1,5 Milliampere (mA)) durchgeführt.

Das erste Laufbandprotokoll beinhaltet einen einmaligen Stresstest von 60 Minuten (min) Dauer. Dieses Protokoll wurde von Ter Veld et al. (2009) [41] beschrieben und für unsere Versuche leicht modifiziert: Die Mäuse wurden in eine Laufkammer gesetzt und nach einer Adaptationsphase von 15 min wurde die Anfangsgeschwindigkeit von 4 Meter (m)/min eingestellt und alle 5 min um 2 m/min auf ein Maximum von 16 m/min erhöht. Der Versuch wurde über 60 min durchgeführt oder nach Erschöpfungssignalen abgebrochen. Erschöpft galt eine Maus, wenn sie länger als zwei Sekunden auf dem Schocker blieb, ohne den Versuch zu unternehmen, wieder auf das Laufband zu gelangen. Die Mäuse dieser Gruppen gehörten der Gruppe KA3M1h an.

Das zweite Laufbandprotokoll der Gruppe KA3M2w beinhaltet einen wiederholten Stresstest über einen Zeitraum von zwei Wochen. An fünf Tagen der Woche liefen die Mäuse jeweils 45 min zweimal am Tag mit 0° Steigung. Das Protokoll startete mit einer Geschwindigkeit von 10 m/min. Ab dem fünften Tag wurde die Geschwindigkeit zunächst auf 8 m/min dann, ab dem 10. Tag, auf 6 m/min reduziert. [41].

2.3.1.3 Diätzusammensetzung

Die ersten fünf Gruppen erhielten eine reguläre Mausdiät (ssniff® EF R/M Control, SSniFF Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland). Diese enthält 51% LCT-Fett. Das entspricht 13% der metabolisierbaren Energie aus Fettsäuren (errechnet mit dem Atwater-Faktor). Die LCT-Aufnahme für jede Maus entsprach ungefähr 250 Milligramm (mg) pro Tag, bei einer Aufnahme von ca. 5 Gramm (g) Futter pro Tag und einem durchschnittlichen Körpergewicht von 30 g [42]. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird diese Diät als „Kontrolldiät“ bezeichnet.

Die Fastentiere (KF3M) erhielten zunächst die oben beschriebene Kontrolldiät. Für den Versuch mussten sie 24 Stunden (h) fasten (keine Nahrung, aber Wasser *ad libitum*). Danach erfolgten die skizzierten Analysen.

Die Gruppen sieben (MR3M) und acht (MF3M) erhielten ab dem Alter von fünf bis sieben Wochen über fünf Wochen eine modifizierte Mausdiät (ssniff EF R/M Control, ssniff Spezialdiäten GmbH). Hier wurde der Fettanteil von 5% der normalen Diät auf 4,4% MCT (Ceres MCT-Öl; Basis GmbH, Oberpfaffenhofen, Deutschland) und 0,6% LCT aufgeteilt. Als LCT wurde dabei Sojabohnen Öl verwendet, um die langkettigen, essentiellen ω 3 - ω 6 Fettsäuren bereitzustellen. Dies entsprach ungefähr 13% der metabolisierbaren Energie aus Fett. Bei diesen Mäusen entsprach die LCT-Aufnahme ca. 30 mg pro Tag und die MCT-Aufnahme ca. 220 mg pro Tag. Diese Diätmodifikation mit MCT wurde gewählt, da sie bei Patienten eine Therapieoption

darstellt. Im weiteren Verlauf wird diese Diät als „fettmodifizierte Diät“ bezeichnet. In der achten Mausgruppe (MF3M) wurde nach fünfwöchiger, fettmodifizierter Diät eine Fastenperiode von 24 h angeschlossen.

Die Mäuse unter Laufband- bzw. Hunger- Stressbedingungen wurden mit Mäusen unter Kontrollbedingungen verglichen. Außerdem erfolgte der Vergleich mit korrespondierenden Wildtyp-Mäusen. Die Abkürzungen für die Bezeichnungen der Gruppen aller Mäuse sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Die Auswirkungen des VLCAD-Mangels auf die Niere sollen in der VLCAD^{-/-}-Maus unter typischen Stressoren, die bei Patienten klinische Symptome verursachen, untersucht werden.

2.3.2 Proteinextraktion aus Gewebe

Zur Durchführung verschiedener Funktionsanalysen der Enzyme war die Proteinextraktion aus Gewebe notwendig. Für die Herstellung der Proteinlysate wurde Gewebe entnommen und abgewogen. Zu dem Gewebe wurde das 20-fache Volumen an CellLytic® Puffer hinzugefügt. Außerdem wurde der CellLytic® Puffer mit einer 10%igen Proteinaseinhibitor®-Lösung versetzt. Das Gewebe wurde zerkleinert, homogenisiert und zentrifugiert. Zusätzlich wurde es für fünf Minuten mit 13000 Umdrehungen pro Minute (rpm; revolutions per Minute) bei 4 Grad Celsius (°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C eingefroren.

2.3.3 Proteinbestimmung nach Bradford.

Um die Proteinkonzentration zu bestimmen, wurde eine Methode nach Bradford [43] angewandt.

Als erstes wurde eine Vergleichsreihe mit bekannter Proteinkonzentration angesetzt. Hierzu wurde eine 2 mg/ml Bovine Serum Albumin (BSA-) Stammlösung verwendet. Für die Stammlösung wurden 2 mg BSA in 1 Milliliter (ml) PBS Puffer gelöst und gleichzeitig eine Vergleichsreihe angesetzt mit Konzentrationen von 0 bis 1,2 [mg/ml] in 0,2 mg Schritten.

Für die Konzentrationsbestimmungen wurden 5 Mikroliter (µl) von einem 1:15 verdünnten Proteinlysate bzw. unverdünntem Proteinstandard in definierter Konzentration in die Löcher einer 96er Lochplatte gegeben. Auf die Proteinlösungen wurden 200 µl einer 1:5 verdünnten Bradford-Reagenz (Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brialliant-Blau G-250) gegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurde mit einem Photometer die Fluoreszenz bei einem Absorptionsmaximum von 580 Nanometer (nm) gemessen. Aus den Daten der

Proteinstandards wurde eine Standardkurve erstellt, mit deren Hilfe die Konzentration der einzelnen Proben errechnet werden konnte. Die Konzentrationsbestimmung wurde in Doppelbestimmung durchgeführt, um Fehler der Messung zu verringern.

2.3.4 Palmitoyl-CoA Oxidation

Um die Umsatzrate von C16-CoA zu ermitteln, wurden zunächst wie in 2.3.2 beschrieben, Proteinlysate erstellt und dessen Konzentration wie in 2.3.3 bestimmt.

Eine Proteinmenge von 20 Mikrogramm (μg) wurde in 10 Millimolar (mM) Ferrocenium Hexafluorphosphat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) (1,32 mg Ferrocenium gelöst in 2 ml Salzsäure (HCl)) gelöst, welches als Elektronenakzeptor anstelle von FAD diente. Um ein Gesamtvolumen von 100 μl zu erreichen, wurde mit 100 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)- HCl Puffer (pH 8) aufgefüllt.

Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 Nanomol (nmol) (4 μl 5 mM) des Substrates C16:0-CoA (25 mg gelöst in 4,9704 ml MeOH/H₂O (1:1)). Die Lösung wurde auf einem Heizblock (37°C) für 10 min bei 800 rpm geschüttelt. Gestoppt wurde die Reaktion durch die Zugabe von 100 μl gekühltem Acetonitril (ACN). Danach wurde die Lösung geschüttelt, gemixt und 10 min. auf Eis inkubiert, um die Proteinpräzipitation zu fördern. Anschließend wurde der Reaktionsansatz 5 min. lang mit 13000 rpm und bei 5°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und dieses wurde bei -80°C eingefroren.

Mittels Tandem-Massen-Spektrometer wurden 120 μl jeder Probe analysiert. Die Messung jeder Probe erfolgte in Doppelbestimmung. Die Konzentration des VLCAD Produktes zusammen mit dem Produkt aus der Folge Reaktion (C16:1-CoA und OH-C16-CoA) und des Substrates (C16-CoA) wurden massenspektrometrisch quantifiziert.

2.3.5 Citrat-Synthase Aktivität

Die Citrat-Synthase ist das erste Enzym des Citratzyklus. Ihre Aktivität ist direkt proportional zur Mitochondrien Anzahl. Der Citrat-Synthase Assay wurde durchgeführt, um die Proliferationsrate der Mitochondrien und den Citrat Flux zu ermitteln [23].

Zur Untersuchung der spezifischen Aktivität der Citrat-Synthase wurden je 2 μl 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB) [10 mM], 2 μl Acetyl-CoA [30 mM] und das jeweilige Volumen entsprechend zu 8 μg Protein zusammen in eine 96er Well-Platte pipettiert. Es wurde mit Tris-HCl-Puffer (pH=7,5) auf 200 μl aufgefüllt. Durch Zugabe von 10 μl Oxalacetat [10 mM] wurde die Reaktion gestartet und im Tecan-Magellan-Reader bei Wellenlänge 412 nm alle 10 Sekunden für 2 Minuten gemessen.

2.3.6 Oxidativer Stress

2.3.6.1 Katalase Aktivität

Die spezifische Aktivität der Katalase wurde an Hand einer indirekten photometrischen Methode gemessen [44, 45]. Bei der Verstoffwechslung von langkettigen Triglyzeriden über den peroxisomalen Weg entsteht Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Dies ist ein starkes Oxidationsmittel. Bei phosphorolytischer Spaltung von H_2O_2 entsteht das Hydroxyl (OH)-Radikal. Radikale rufen oxidativen Stress hervor. H_2O_2 wird von der Katalase neutralisiert. Somit ist die Aktivität der Katalase ein indirekter Marker für oxidativen Stress.

Hierfür wurde eine Standardreihe angelegt mit bekannten Katalase-Konzentrationen. Diese dienen der Erstellung einer sigmoidalen Eichkurve. Die Nierenhomogenate wurden im Verhältnis 1:8000 (KR3M, KR6M, KR12M, KA3M1h, KA3M2w, MR3M, MF3M) beziehungsweise 1:10000 (KF3M) verdünnt. Die H_2O_2 -Lösung wurde bis auf 40 Mikromol (μM) verdünnt und Licht geschützt aufbewahrt. Die Bestimmung erfolgte in einer 96er Well-Platte. In dreifacher Bestimmung wurden 25 μl Standard, in zweifacher Bestimmung 25 μl Probe und in einfacher Bestimmung 25 μl PBS-Puffer für die Kontrolle in jeweils vorgeschriebene Löcher pipettiert. Bis auf die Löcher für die Kontrollen, wurden in die Löcher 25 μl H_2O_2 Lösung pipettiert, mit Alufolie bedeckt und 25 min bei Raumtemperatur auf dem Taumelschüttler inkubiert. Unmittelbar vor Gebrauch wurden 4962 μl PBS-Puffer, 25 μl Ampliflu Red (20 mM) und 10,75 μl [200 Units (U)/ml] HRP zur Working-Solution zusammen pipettiert. Danach wurden 50 μl der Working-Solution in jedes Loch pipettiert und 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Anschließend wurde die Fluoreszenz im Tecan-Magellan bei einer Exzitation von 540 Emission von 590 nm gemessen.

2.3.6.2 NAD(P)H Chinon-Oxidoreduktase (NQO1) Aktivität

Um die spezifische Aktivität der NAD(P)H Quinon-Oxidoreduktase zu analysieren, wurde eine Kinetik an Hand eines Protokolls von Milder et. al. (2010) durchgeführt [46]. Die NAD(P)H Chinon-Oxidoreduktase ist ein Flavoprotein, welches die Zelle vor Radiation und oxidativem Stress schützt [46]. Kommt es zu einer Substratverringerng des Enzyms, hat das eine höhere Rate an oxidativem Stress zur Folge. NQO1 bindet verschiedene Tumorsuppressorgene und stabilisiert diese gegen Proteasome. [47]. Sie katalysiert die folgende Reaktion: $NAD(P)H + H + \text{Chinon} \rightarrow \text{Nicotin-Amid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NAD(P))} + \text{Hydrochinon}$.

30 μg Proteinlysate wurden mit je 158 μl einer 25 mM Tris-HCL (pH=7,5), 10 μl NAD(P)H [0,2 mM], 1 μl FAD [1 mM] und 1 μl BSA [0,7 mg/ml] versetzt. Ein Parallelansatz enthielt 1 μl Dicumarol [20 μM], um den Komplex I der Atmungskette zu blockieren. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 20 μl 2,6-Dichlorophenolindophenol [200 μM] gestartet. Anschließend wurde im Tecan-Magellan Reader die Absorption bei 600 nm alle 10 Sekunden für 2 Minuten gemessen.

2.3.6.3 Glutathionperoxidase (GPX) Aktivität

Mit Hilfe des Glutathionperoxidase-Assay-Kit der Firma BioVision wurde die spezifische Aktivität der GPX gemessen [48, 49]. Die Glutathionperoxidase katalysiert zusammen mit der Glutathionreduktase (GR) folgende Reaktion: $2 \text{GSH} + 2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GS-SG}$ und $\text{GS-SG} + \text{NAD(P)H H}^+ \rightarrow 2\text{GSH} + \text{NAD(P)}^+$. Somit trägt die GPX zur Entgiftung von mitochondrialen Hydrogenperoxiden bei [50]. In dem vorliegenden Enzymtest wird der NAD(P)H Verbrauch gemessen. Die Messung erfolgt nach den Angaben durch den Hersteller. Es wurde dafür 50 µg Proteinlysate eingesetzt.

2.3.7 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.3.8 Ribonucleinsäure (RNA; ribonucleic acid)- Extraktion

Mit Hilfe des RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit von Qiagen wurde RNA aus dem Nierengewebe extrahiert. Die Extraktion erfolgte nach Herstellerangaben. Anschließend wurde die Konzentration der extrahierten RNA mittels NanoDrop® bestimmt.

2.3.8.1 Echtzeit PCR (rt-PCR; Real-time PCR)

Die rt-PCR wurde mit Hilfe des QuantiTec SYBR Green RT-PCR Kits (Qiagen) an einem Applied Biosystem 7900HT Sequence Detection System in Micro Amp 96-Well optischen Reaktionsplatten verschlossen mit MircoAmps optical caps (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) durchgeführt.

Zur Vervielfältigung mittels quantitativer rt-PCR (RT qPCR; quantitative real-time Polychain Reaction) wurden Pools aus jeder Gruppe erstellt. Hierzu wurden je 1000 bzw. 1500 Nanogramm (ng) einer Probe einer Gruppe zusammen mit den anderen Proben der Gruppen gemischt. Jeder Pool wurde auf eine Konzentration von 2,5 ng/µl verdünnt. Für jede Messung wurden insgesamt 10 ng RNA eingesetzt.

Vorwärts- und Rückwärtsprimer wurden mit dem FastPCR Programm (R. Kalender, Institute of Biotechnology, Helsinki) hergestellt. Eine Übersicht über die Sequenzen findet sich unter 2.1.7. Zur Messung im RT qPCR wurde ein Mastermix angesetzt. Dieser enthielt pro Well-Platte 4 µl ddH₂O, 2µl Primermix, 10 µl SYBR-Green sowie 0,3 µl RT-Mix. Pro Reaktionsansatz wurden dann 16 µl des Mastermix und jeweils 4 µl der Pool-Lösungen zusammen pipettiert. Alle Lösungen wurden auf Eis gehalten und auf Eis zusammen pipettiert. Die Messung erfolgte über Nacht im RT qPCR.

Alle Reaktionsschritte wurden durchgeführt, wie von Schafer et al. (2007) beschrieben [51].

2.3.9 Bestimmung der Acylcarnitine

Um die Konzentration der akkumulierten Acylcarnitine zu bestimmen, wurde ein

Verfahren nach van Vlies et al. [52] angewandt. Das tiefgefrorene (-80°C) Nierengewebe wurde über Nacht lyophilisiert. Das gefriergetrocknete Gewebe wurde gewogen und anschließend pulverisiert. Zu jeder Probe wurden 1 ml 80%iges ACN mit 50 µl Internem Standard (16.25 nmol [²H₃] carnitine, for carnitine and γ-butyrobetaine concentrations; 0.05 nmol [²H₃]C₁₆-acylcarnitine, for C14–C18-acylcarnitines) [19] dazugegeben und auf dem Vortexmischer geschüttelt. Mit dem Polytronhomogenisierer wurde das Gewebe 30 sek. bis 1 min lang homogenisiert. Danach wurden die Proben 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert. 300 µl des Überstandes wurde für 2 min bei 24000xg zentrifugiert und filtriert. Nach Butylierung durch Zugabe von 100 µl n-Butano-Acetylchlorine wurden die Proben bei 65°C für exakt 15 min im Ofen erwärmt. Anschließend wurden diese bei 40°C an der Luft für 30-60 min getrocknet. Die getrockneten Proben wurden bei -80°C eingefroren. Unmittelbar vor der Messung wurden 100 µl ACN/H₂O (50%) zu jeder Probe dazugegeben und im Tandem Massenspektrometer (MS/MS) gemessen.

2.3.10 Glykogengehalt

Der Glykogengehalt im Nierengewebe wurde mithilfe des EnzymChrom™ Glycogen Assay Kits (Cat# E2GN-100) bestimmt. Glykogen ist ein verzweigtes Polysaccharid aus Glukoseeinheiten. Diese Glukoseeinheiten sind über α1,4- und α1,6-glykosidische Bindungen miteinander verknüpft. Glykogen dient als Energiereserve und ist primär in Leber und Muskel gespeichert. Es ist sehr schnell mobilisierbar [53]. Da bei Störungen der Oxidation langkettiger Fettsäuren wie bei dem VLCAD-Mangel, die Energieproduktion aus Glukose eine wichtige Rolle spielt, erfolgte in dieser Arbeit die Untersuchung des Glykogengehaltes im Nierengewebe.

2.3.11 Statistische Auswertung

Alle Daten sind als Durchschnittswerte ± Standardabweichung (SD) präsentiert, wobei **n** die Anzahl der getesteten Tiere angibt. In den Abbildungen haben wir zur graphischen Vereinfachung den Mittelwert ± Standardfehler (SEM = Standard error of the mean) verwendet. Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mittels ungepaartem t-Test auf ihre Signifikanz getestet. Sie wurden als signifikant angesehen, wenn $p < 0,05$ vorlag. Zur Auswertung der Daten wurde Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA) und zur graphischen Darstellung wurde GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) benutzt.

3 Ergebnisse

3.1 Palmitoyl-CoA Oxidationsrate

Um das Ausmaß der Fettsäureoxidationsstörung im Nierengewebe zu bestimmen, wurde die Aktivität der Palmitoyl-CoA Oxidationsrate bei Wildtyp- und VLCAD^{-/-}-Mäusen unter Ruhebedingungen und verschiedenen Stressoren gemessen.

Die Aktivität des Enzyms war bei den drei Monate alten VLCAD^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtypen signifikant erniedrigt (Abb. 5) ($13,07 \pm 1,71$ vs. $15,96 \pm 2,18$; $p \leq 0,01$). Zusätzlich zeigte sich eine altersabhängige Abnahme der Oxidationsrate. Die Palmitoyl-CoA Oxidation bei den sechs Monate alten Mäusen war sowohl bei den Wildtyp- als auch bei den VLCAD^{-/-}-Mäusen niedriger als bei den drei Monate alten Tieren. Dies scheint durch einen physiologischen Mechanismus bedingt zu sein. Das einstündige Laufprotokoll änderte nicht die Palmitoyl-CoA Oxidationsrate in den Nieren. Das Laufprotokoll über zwei Wochen hingegen führte ebenfalls zu einer Reduktion der Enzymaktivität in beiden Genotypen, wobei die Abnahme nur bei VLCAD^{-/-} Mäusen signifikant war (Abb. 5).

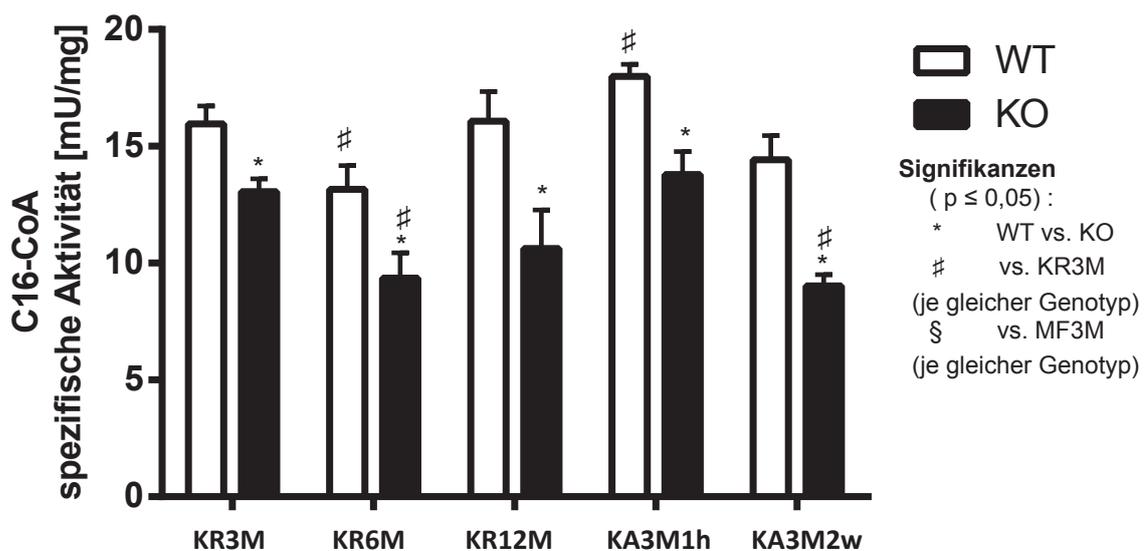


Abb. 5: Oxidationsrate von Palmitoyl-CoA bei Wildtyp- und VLCAD^{-/-}-Mäusen in unterschiedlichem Alter und nach körperlicher Aktivität.

Gruppe 1: KR3M, Gruppe 2: KR6M, Gruppe 3: KR12M, Gruppe 4: KA3M1h, Gruppe 5: KA3M2w; WT = Wildtyp-Mäuse; KO = VLCAD^{-/-}-Mäuse; die Daten sind als Mittelwert \pm Standard error of the mean (SEM) angegeben ($n \geq 5$). Werte gelten als signifikant, wenn gilt: $p \leq 0,05$ (two way ANOVA und T-Test).

Eine Fastenperiode von 24 Stunden hatte eine signifikante Reduktion der Oxidationsrate bei beiden Genotypen zur Folge (Abb. 6). Sehr interessant war die signifikante Abnahme der Enzymaktivität bei den Wildtyp-Mäusen nach einer 5-wöchigen MCT-basierten, fettmodifizierten Diät im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen mit der Kontrolldiät ($10,66 \pm 0,66$ vs. $15,86 \pm 2,18$; $p \leq 0,05$). Unter der fettmodifizierten Diät war die Palmitoyl-CoA Oxidation bei Wildtyp- und VLCAD^{-/-}-Mäusen vergleichbar. Im Gegensatz zu der Kontrolldiät hatte eine Fastenperiode von 24 Stunden in Kombination mit der fünfwöchigen fettmodifizierten Diät keine Auswirkung auf die Oxidationsrate bei Wildtyp- und VLCAD^{-/-}- Mäusen (Abb. 6).

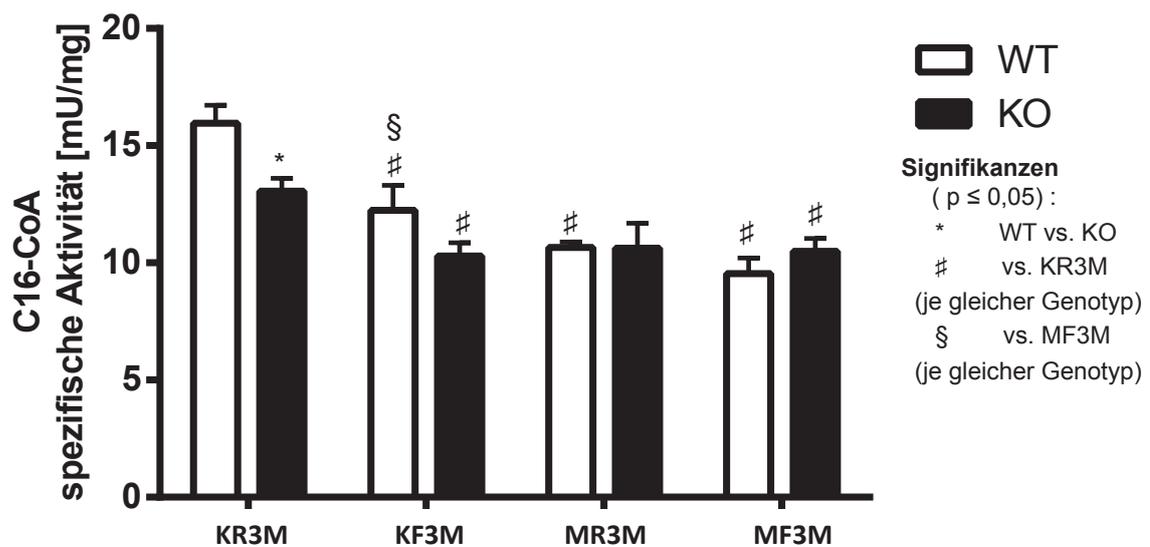


Abb. 6: Effekte von Fasten und fettmodifizierter Diät auf die Oxidationsrate von Palmitoyl-CoA bei Wildtyp- und VLCAD^{-/-}-Mäusen.

Gruppe 1: KR3M, Gruppe 6: KF3M, Gruppe 7: MR3M, Gruppe 8: MF3M; WT = Wildtyp-Mäuse; KO = VLCAD^{-/-}-Mäuse; die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben ($n \geq 5$). Werte gelten als signifikant, wenn gilt: $p \leq 0,05$ (two way ANOVA und T-Test).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Oxidationsrate von Palmitoyl-CoA im Nierengewebe der VLCAD^{-/-}-Mäuse reduziert war, allerdings nicht Null betrug, obwohl es sich um ein VLCAD^{-/-}-Mausmodell handelt. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Palmitoyl-CoA Oxidation zu einem großen Teil durch andere Enzyme katalysiert wird. Eine wichtige Beobachtung war außerdem, dass diätetische Veränderungen mit fast ausschließlich mittelkettigen Fettsäuren (MCT), auch bei der Wildtyp-Maus zu einer Reduktion der Palmitoyl-CoA führten.

3.2 Citrat-Synthase Aktivität

Als Maß für die Proliferationsrate der Mitochondrien wurde die Citrat-Synthase Aktivität und der Citrat Flux ermittelt.

Abb. 7 zeigt die spezifische Aktivität der Citrat-Synthase in den verschiedenen Mausgruppen. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen innerhalb der jeweiligen Mausgruppen. Auffallend war ein signifikanter Anstieg der Citrat-Synthase Aktivität bei Wildtyp-Mäusen nach einem zweiwöchigen Laufband-Training, nach Supplementierung mit der fettmodifizierten Diät, sowie nach 24 Stunden Fasten, wobei der Anstieg nach dem Fasten am deutlichsten war.

Die Ergebnisse zeigen, dass der VLCAD-Mangel im Knockout Mausmodell keinen Einfluss auf die Mitochondrien Anzahl und den Citrat-Flux in den Nieren hat.

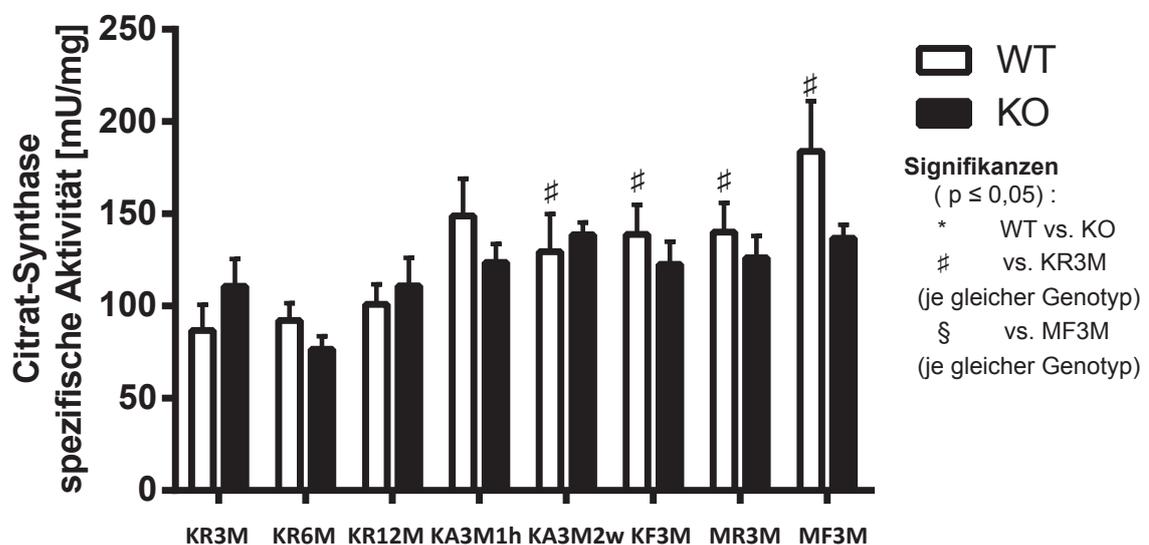


Abb. 7: Spezifische Aktivität der Citrat-Synthase.

Gruppe 1: KR3M, Gruppe 2: KR6M, Gruppe 3: KR12M, Gruppe 4: KA3M1h, Gruppe 5: KA3M2w, Gruppe 6: KF3M, Gruppe 7: MR3M, Gruppe 8: MF3M; WT = Wildtyp-Mäuse; KO = VLCAD^{-/-}-Mäuse; die Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben (n ≥ 5). Werte gelten als signifikant, wenn gilt: p ≤ 0,05 (two way ANOVA und T-Test).

3.3 Oxidativer Stress

Um oxidativen Stress im Nierengewebe zu quantifizieren, wurden unterschiedliche Enzymtests durchgeführt, welche als Marker für peroxisomalen (Katalase), zytosolischen (NAD(P)H Chinon-Oxidoreduktase) und mitochondrialen (Glutathionperoxidase) oxidativen Stress dienen. Die Katalase ist ein peroxisomales Enzym und ist dafür zuständig die Wasserstoffperoxide der AOX zu Wasser und Sauerstoff zu entgiften [42]. Die NAD(P)H Chinon-Oxidoreduktase schützt die Zelle vor Radiation und oxidativem Stress [46]. Kommt es zu einer Substratverringernung des Enzyms, ist oxidativer Stress die Folge. Die Glutathionperoxidase ist für die Entgiftung von mitochondrialen Wasserstoffperoxiden zuständig [50].

3.3.1 Katalase

Die unterschiedlichen Aktivitäten der Katalase sind in Abb. 8 dargestellt. Das Alter der Mäuse hatte keinen Einfluss auf die Katalase Aktivität. Intensive körperliche Aktivität und ein zweiwöchiges Training hatten ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität des peroxisomalen Enzyms (Abb. 8). Lediglich Mäuse, welche mit einer MCT-basierten, fettmodifizierten Diät supplementiert wurden, zeigten eine Zunahme der Katalase Enzymaktivität, allerdings war diese nicht signifikant (Abb. 8).

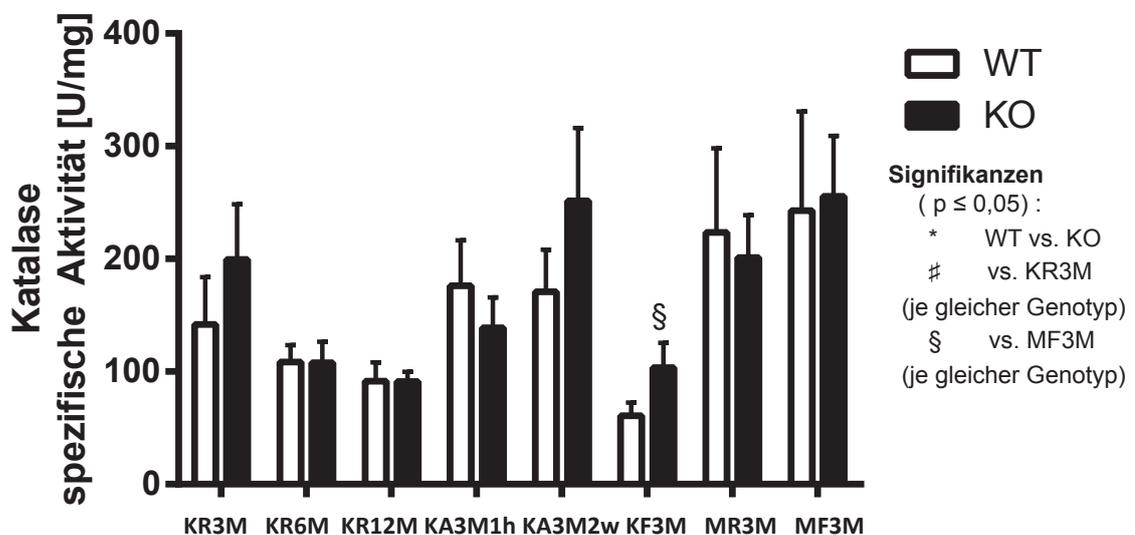


Abb. 8: Spezifische Aktivität der Katalase.

Gruppe 1: KR3M, Gruppe 2: KR6M, Gruppe 3: KR12M, Gruppe 4: KA3M1h, Gruppe 5: KA3M2w, Gruppe 6: KF3M, Gruppe 7: MR3M, Gruppe 8: MF3M; WT = Wildtyp-Mäuse; KO = VLCAD^{-/-}-Mäuse; die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben (n \geq 5). Werte gelten als signifikant, wenn gilt: p \leq 0,05 (two way ANOVA und T-Test).

3.3.2 NAD(P)H Chinon-Oxidoreduktase

Wie in Abb. 9 zu sehen ist, ergaben die Messungen der Aktivität der NAD(P)H Chinon-Oxidoreduktase kaum Unterschiede, weder bei den verschiedenen Genotypen noch unter den unterschiedlichen Stressbedingungen. Lediglich 24 Stunden Fasten induzierte bei Wildtypen eine signifikante Zunahme der NAD(P)H Chinon-Oxidoreduktase Aktivität im Vergleich zu Wildtypen der Kontrollgruppe ($914,21 \pm 178,59$ vs. $657,19 \pm 162,21$ mU/mg; $p \leq 0,05$).

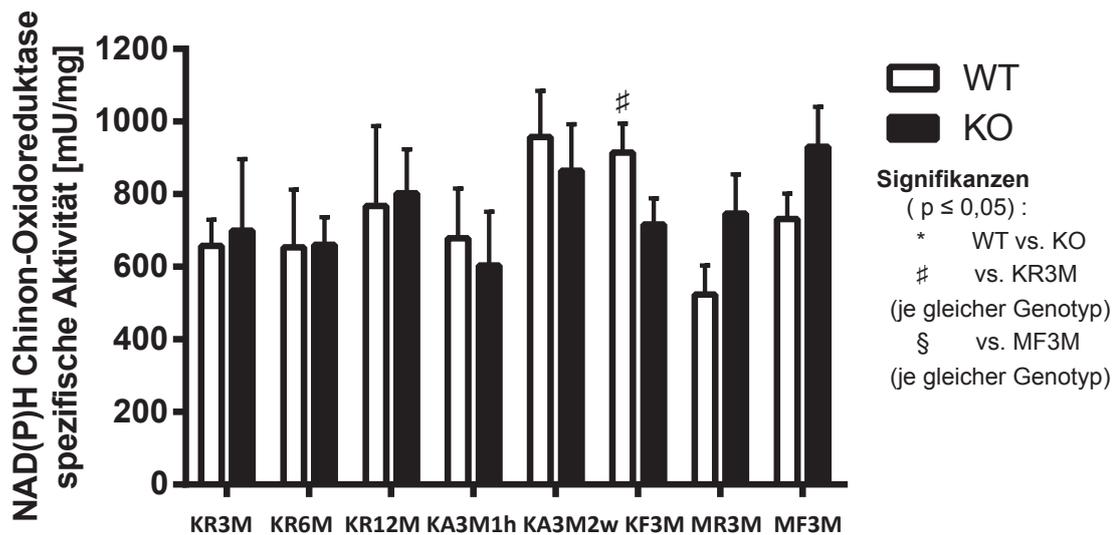


Abb. 9: Spezifische Aktivität der NAD(P)H Chinon-Oxidoreduktase.

Gruppe 1: KR3M, Gruppe 2: KR6M, Gruppe 3: KR12M, Gruppe 4: KA3M1h, Gruppe 5: KA3M2w, Gruppe 6: KF3M, Gruppe 7: MR3M, Gruppe 8: MF3M; WT = Wildtyp-Mäuse; KO = VLCAD^{-/-}-Mäuse; die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben ($n \geq 5$). Werte gelten als signifikant, wenn gilt: $p \leq 0,05$ (two way ANOVA und T-Test).

3.3.3 Glutathionperoxidase (GPX)

Das Ausmaß des mitochondrialen, oxidativen Stresses wurde durch die Messung der Glutathionperoxidase Aktivität quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Abb. 10 zusammengefasst. Die Aktivität der GPX war bei den VLCAD^{-/-}-Mäusen im Alter von zwölf Monaten deutlich höher als bei Wildtypen; allerdings waren diese Abweichungen nicht signifikant. Bei den VLCAD^{-/-}-Mäusen nach körperlicher Aktivität war die Aktivität der GPX signifikant höher als bei Wildtypen ($16,24 \pm 4,79$ vs. $8,83 \pm 1,82$ U/mg; $p \leq 0,05$).

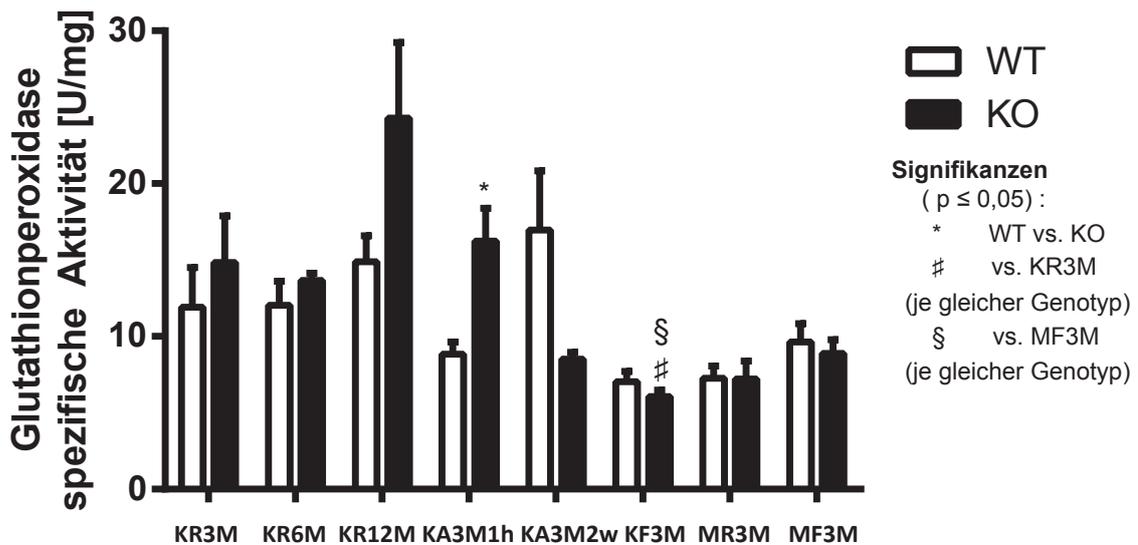


Abb. 10: Spezifische Aktivität der Glutathionperoxidase.

Gruppe 1: KR3M, Gruppe 2: KR6M, Gruppe 3: KR12M, Gruppe 4: KA3M1h, Gruppe 5: KA3M2w, Gruppe 6: KF3M, Gruppe 7: MR3M, Gruppe 8: MF3M; WT = Wildtyp-Mäuse; KO = VLCAD^{-/-}-Mäuse; die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben ($n \geq 5$). Werte gelten als signifikant, wenn gilt: $p \leq 0,05$ (two way ANOVA und T-Test).

Interessanterweise zeigten Mäusen, welche mit einer MCT-basierten, fettmodifizierten Diät supplementiert wurden, insgesamt deutlich niedrigere Aktivitätsraten der GPX im Vergleich zu der Kontrollgruppe unter normaler Diät. VLCAD^{-/-}-Mäuse der Fastengruppe zeigten signifikant niedrigere GPX Aktivitäten im Vergleich zu den VLCAD^{-/-}-Mäusen der Kontrollgruppe unter normaler Diät ($6,07 \pm 0,90$ vs. $14,85 \pm 6,81$ U/mg; $p \leq 0,05$), allerdings war die GPX Aktivität auch bei Wildtyp-Mäusen nach Fasten niedriger als unter Ruhebedingungen in der Kontrollgruppe.

Zusammenfassend besteht eine Tendenz zu verstärktem mitochondrialen, oxidativen Stress bei Knockout Mäusen in höherem Lebensalter (zwölf Monate) und nach körperlicher Aktivität. Signifikante Unterschiede fanden sich jedoch nicht.

3.4 Gen-Expression

Eine Übersicht aller hier aufgeführten Gene und deren dazugehörigen Bezeichnungen sowie Enzyme finden sie im Abkürzungsverzeichnis.

3.4.1 β -Oxidation: Acyl-CoA Dehydrogenase Medium Chain (ACADM), Acyl-CoA Dehydrogenase Long Chain (ACADL), Acyl-CoA Oxidase (AOX)

Um zu untersuchen, ob andere Enzyme die Aufgabe der VLCAD übernehmen, wurden die Expressionsraten auf RNA-Ebene von drei verschiedenen Enzymen gemessen, welche eine überlappende Substratspezifität aufweisen.

Die Expressionsraten von ACADM (Abb. 11), dem Gen, welches für MCAD kodiert, waren bei VLCAD^{-/-}-Mäusen verglichen mit Wildtyp-Mäusen in fast allen Gruppen nicht erhöht. Allerdings konnte eine Tendenz zu höherer Expression von ACADM bei älteren Mäusen (12 Monate), sowie nach körperlicher Aktivität und Fasten beobachtet werden (Abb. 11).

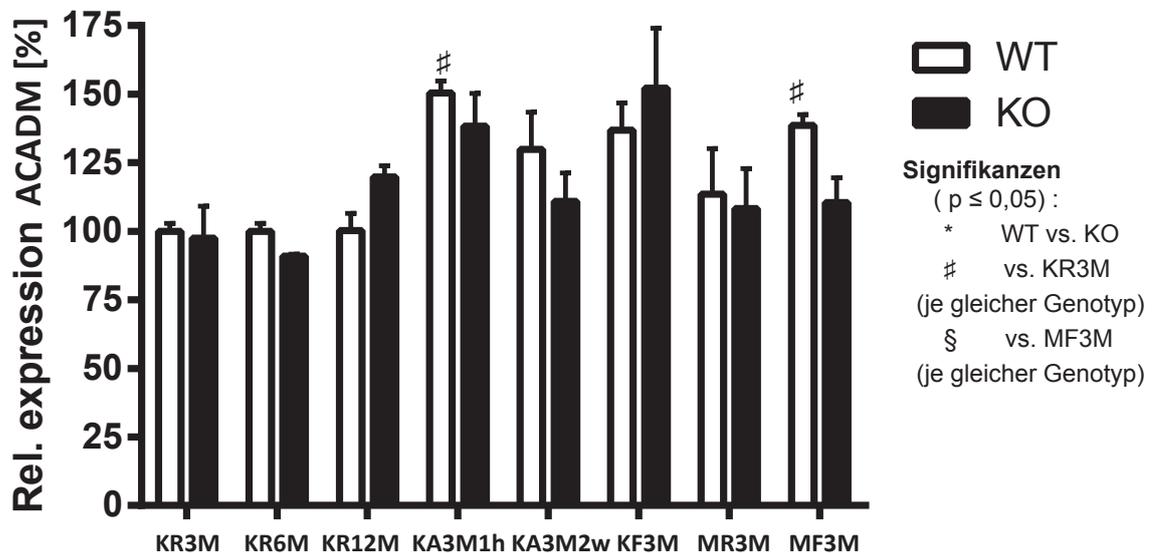


Abb. 11: Relative Expression von ACADM; dem Gen, welches für MCAD kodiert.

Gruppe 1: KR3M, Gruppe 2: KR6M, Gruppe 3: KR12M, Gruppe 4: KA3M1h, Gruppe 5: KA3M2w, Gruppe 6: KF3M, Gruppe 7: MR3M, Gruppe 8: MF3M; WT = Wildtyp-Mäuse; KO = VLCAD^{-/-}-Mäuse; die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben (n \geq 5). Werte gelten als signifikant, wenn gilt: p \leq 0,05 (two way ANOVA und T-Test).

ACADL ist das Gen, welches für LCAD kodiert. Wie in Abb. 12 zu sehen, bestand eine signifikante Zunahme der ACADL-Genexpression bei einjährigen VLCAD^{-/-}-Mäusen unter der Kontrolldiät im Vergleich zu entsprechenden Wildtypen ($145,69 \pm 7,55$ vs. $100,24 \pm 10,77$; $p \leq 0,05$).

Zusätzlich zeigte sich ein Anstieg der ACADL-Expressionsrate nach Fasten, und zwar sowohl bei den VLCAD^{-/-}-Mäusen als auch bei den Wildtyp-Mäusen, während längere körperliche Aktivität zu verminderten Expressionsraten bei Mäusen beider Genotypen führte.

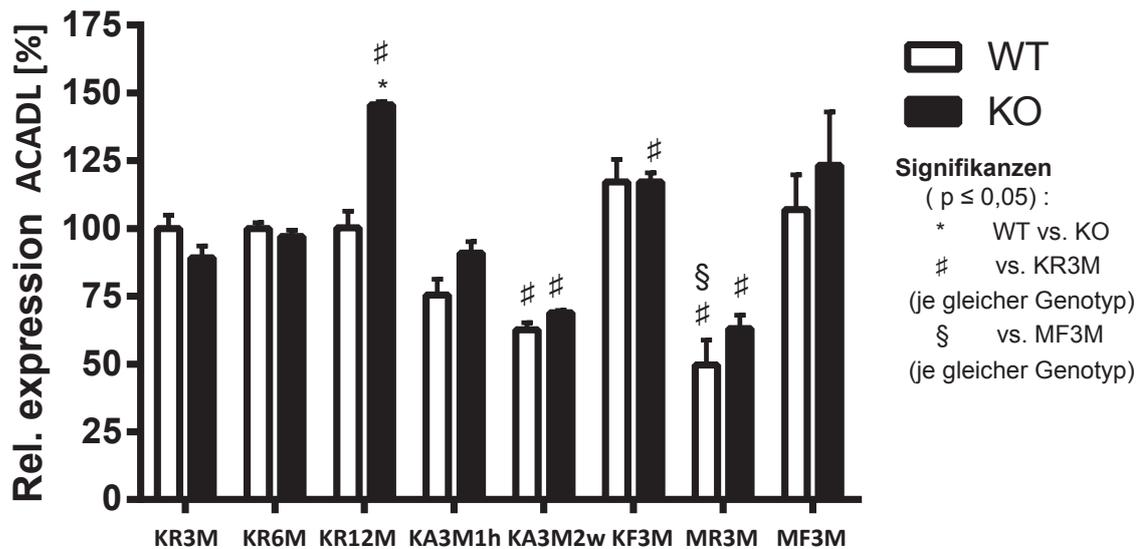


Abb. 12: Relative Expressionsrate von ACADL; dem Gen, welches für LCAD kodiert.

Gruppe 1: KR3M, Gruppe 2: KR6M, Gruppe 3: KR12M, Gruppe 4: KA3M1h, Gruppe 5: KA3M2w, Gruppe 6: KF3M, Gruppe 7: MR3M, Gruppe 8: MF3M; WT = Wildtyp-Mäuse; KO = VLCAD^{-/-}-Mäuse; die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben ($n \geq 5$). Werte gelten als signifikant, wenn gilt: $p \leq 0,05$ (two way ANOVA und T-Test).

Die Acyl-CoA Oxidase ist ein Enzym der peroxisomalen β -Oxidation langkettiger Fettsäuren. Eine Hochregulation des AOX-Gens könnte ein peroxisomaler Kompensationsmechanismus bei fehlender oder reduzierter mitochondrialer β -Oxidation sein. Sehr unerwartet konnten wir nachweisen, dass VLCAD^{-/-}-Mäuse signifikant niedrigere Expressionsraten im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zeigten (Abb. 13). Die Expression von AOX war besonders niedrig bei Mäusen im Alter von einem Jahr ($53,48 \pm 1,95$ vs. $99,96 \pm 5,28$; $p \leq 0,01$). Während das einmalige Laufen keine Auswirkungen auf die Expressionsrate von AOX bei VLCAD^{-/-}-Mäusen hatte, führte ein Training über zwei Wochen zu einer signifikant niedrigeren Expressionsrate bei VLCAD^{-/-}-Mäusen verglichen mit Wildtypen ($55,92 \pm 2,99$ vs. $64,69 \pm 1,12$; $p \leq 0,05$).

Nach 24 Stunden Fasten sah man unabhängig von der Diät deutlich höhere Expressionsraten von AOX bei beiden Genotypen. Die Expressionen waren vierfach höher im Vergleich zur Kontrollgruppe. Da es sich allerdings um eine Genotypen unspezifische Veränderung handelt, ist dieser Effekt nicht auf den VLCAD-Mangel zurückzuführen.

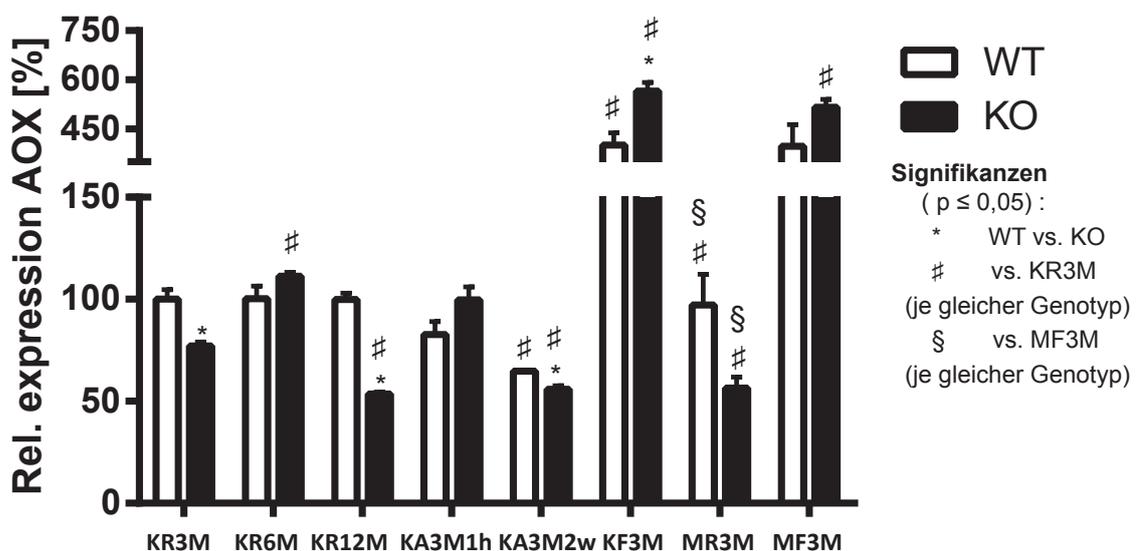


Abb. 13: Relative Expressionsrate von AOX.

Gruppe 1: KR3M, Gruppe 2: KR6M, Gruppe 3: KR12M, Gruppe 4: KA3M1h, Gruppe 5: KA3M2w, Gruppe 6: KF3M, Gruppe 7: MR3M, Gruppe 8: MF3M; WT = Wildtyp-Mäuse; KO = VLCAD^{-/-}-Mäuse; die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben ($n \geq 5$). Werte gelten als signifikant, wenn gilt: $p \leq 0,05$ (two way ANOVA und T-Test).

Zusammenfassend ergab sich, dass sowohl ACADM und ACADL bei einjährigen Tieren in verstärktem Maße exprimiert waren, was auf langsame Adaptationsprozesse im zeitlichen Verlauf sprechen kann. Außerdem wurde die peroxisomale β -Oxidation in den Nieren durch Fasten signifikant gesteigert, unabhängig vom zugrundeliegenden Phänotyp.

3.4.2 Transkriptionsfaktoren Kohlenhydratstoffwechsel: Peroxisome Proliferative Activated Receptor γ Coactivator 1 α (PPARGC1A; PGC1 α), Pyruvate Dehydrogenase Kinase Isoenzyme 4 (PDK4), Pyruvat Carboxylase und Phosphoenolpyruvat Carboxykinase

Um Adaptationsvorgänge im Kohlenhydratstoffwechsel zu untersuchen, wurden die Expressionsraten von vier Enzymen auf RNA-Ebene gemessen. Bei den Enzymen handelte es sich um: PPARGC1A, PDK4, Pcx und Pck1.

PPARGC1A oder PGC1 α ist ein Kofaktor für die Transkription von Genen des Energiestoffwechsels. Es steigert und koordiniert unter anderem die Genexpression der mitochondrialen Biogenese und der hepatischen Glukoneogenese [54, 55].

Abb. 14 zeigt die unterschiedlichen Expressionsraten von PPARGC1A im Nierengewebe von Wildtyp- und VLCAD^{-/-} Mäusen unter verschiedenen Bedingungen. Mit Ausnahme der Gruppe der sechs Monate alten Mäuse ergab sich bei den VLCAD^{-/-}-Mäusen eine Tendenz zu höheren Expressionsraten im Vergleich zu Wildtypen. Bei den sechs Monate alten VLCAD^{-/-}-Mäusen kam es jedoch zu signifikant niedrigeren Expressionsraten von PPARGC1A (54,26 \pm 11,53 vs. 100,06 \pm 6,40; $p \leq 0,01$).

Die Laufbandaktivität über 2 Wochen hinweg resultierte in signifikant höheren Expressionsraten von PPARGC1A bei VLCAD^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Zusätzlich schienen sowohl Fasten als auch eine fettmodifizierte Diät einen stimulierenden Einfluss auf die Expressionsrate von PPARGC1A zu haben.

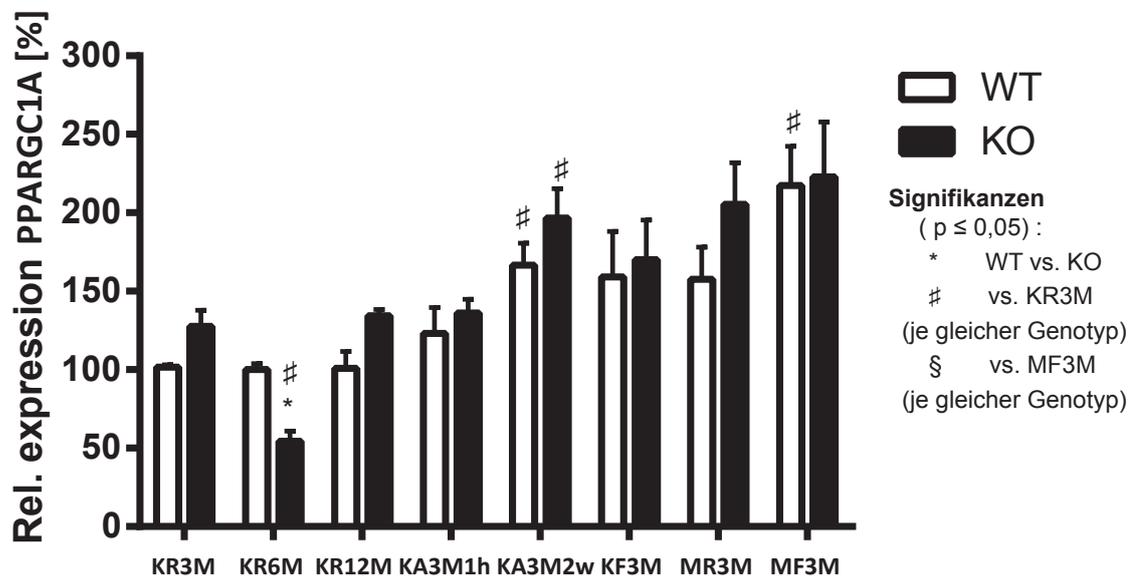


Abb. 14: Relative Expressionsrate von PPARGC1A.

Gruppe 1: KR3M, Gruppe 2: KR6M, Gruppe 3: KR12M, Gruppe 4: KA3M1h, Gruppe 5: KA3M2w, Gruppe 6: KF3M, Gruppe 7: MR3M, Gruppe 8: MF3M; WT = Wildtyp-Mäuse; KO = VLCAD^{-/-}-Mäuse; die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben (n \geq 5). Werte gelten als signifikant, wenn gilt: $p \leq 0,05$ (two way ANOVA und T-Test).

Das Protein des Gens PDK4 ist ein mitochondriales Protein, welches durch Phosphorylierung die Pyruvat Dehydrogenase inhibiert [56]. Die Pyruvat Dehydrogenase katalysiert die Reaktion von Pyruvat zu Acetyl-CoA. Sie verbindet also die Glykolyse mit dem Zitratzyklus [57]. Kommt es zu einer Hochregulierung von PDK4, führt das zur Phosphorylierung und somit zur Inhibition der Glykolyse [58]. Das hat zur Folge, dass zwar bei körperlicher Aktivität viel Glukose bereitgestellt werden kann, diese aber nicht oxidiert wird.

Bei drei Monate alten VLCAD^{-/-}-Mäusen zeigten sich höhere Expressionsraten für PDK4 im Vergleich zu Wildtypen (Abb. 15). Dies traf nicht auf sechs und zwölf Monate alte Tiere zu. Im Gegenteil induzierte höheres Lebensalter bei VLCAD^{-/-}-Mäusen signifikant niedrigere Expressionsraten von PDK4 im Vergleich zu Wildtypen (6 Monate: 86,23 ± 3,36 vs. 99,97 ± 3,69; p ≤ 0,01 und 12 Monate: 52,71 ± 1,44 vs. 100,27 ± 10,99; p ≤ 0,05). Diese Daten lassen vermuten, dass der Kohlenhydratmetabolismus im Verlauf des Alters eine größere Rolle spielt.

Sehr deutlich war der Anstieg von PDK4 nach körperlicher Aktivität und Fasten bei beiden Genotypen, insbesondere bei VLCAD^{-/-}-Mäusen. Signifikante Unterschiede fanden sich nach körperlicher Aktivität zwischen den Genotypen. Dieses Ergebnis ist sehr erstaunlich, da der Kohlenhydratmetabolismus als Energiequelle bei akut erhöhtem Energiebedarf offensichtlich ausscheidet.

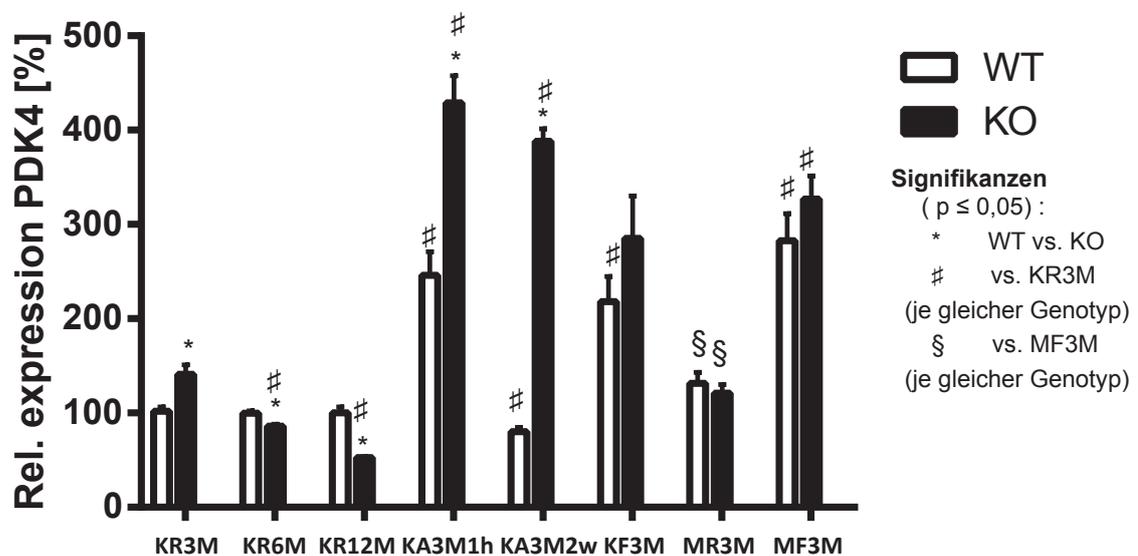


Abb. 15: Relative Expressionsrate von PDK4.

Gruppe 1: KR3M, Gruppe 2: KR6M, Gruppe 3: KR12M, Gruppe 4: KA3M1h, Gruppe 5: KA3M2w, Gruppe 6: KF3M, Gruppe 7: MR3M, Gruppe 8: MF3M; WT = Wildtyp-Mäuse; KO = VLCAD^{-/-}-Mäuse; die Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben (n ≥ 5). Werte gelten als signifikant, wenn gilt: p ≤ 0,05 (two way ANOVA und T-Test).

Die Pcx ist das erste Enzym der Glukoneogenese und katalysiert unter ATP-Verbrauch und mit Hilfe von CO₂ die Reaktion Pyruvat zu Oxalacetat. Im zweiten Schritt der Glukoneogenese entsteht mithilfe von Guanosinriophosphat (GTP) und unter Abspaltung von CO₂ Phosphoenolpyruvat. Diese Reaktion wird durch die Pck1 katalysiert.

In Abb. 16 sind die relativen Expressionsraten der Pcx dargestellt. Parallel zu den Ergebnissen von PDK4 kam es bei den älteren VLCAD^{-/-}-Tieren zu niedrigeren Expressionsraten verglichen mit den jeweiligen Wildtyp-Mäusen (sechs Monate alte Mäuse: 78,62 ± 9,06 (SD) vs. 100,00 ± 4,85 (SD); p ≤ 0,05 und 12 Monate alte Mäuse: 56,84 ± 2,83 (SD) vs. 100,03 ± 4,85 (SD); p ≤ 0,01). Fasten induzierte jedoch bei den VLCAD^{-/-}-Tieren mit Kontrolldiät signifikant höhere Expressionsraten für Pcx im Vergleich zu Wildtypen (305,57 ± 19,82 vs. 219,80 ± 12,92; p ≤ 0,01).

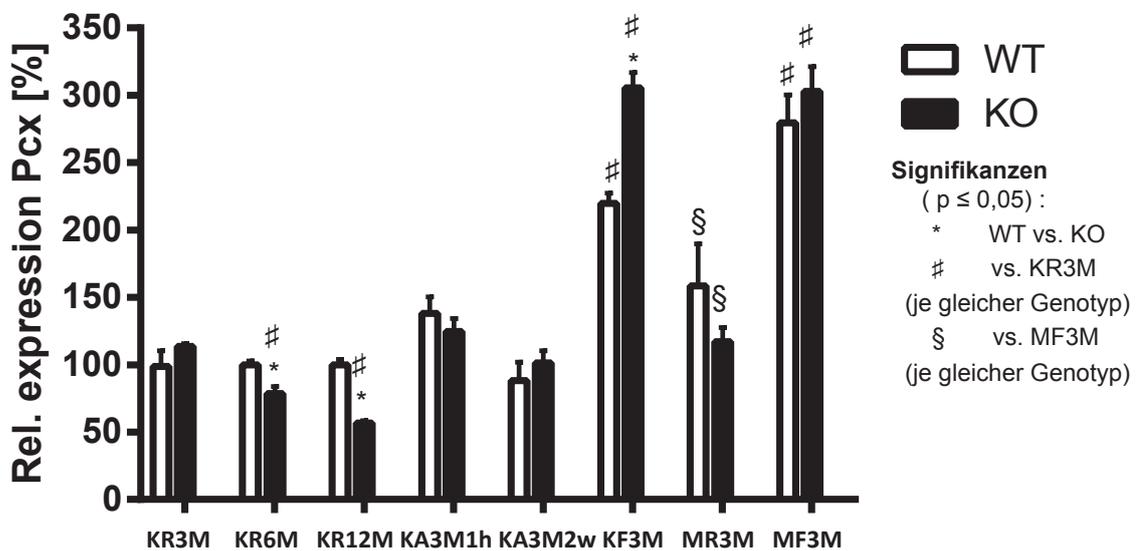


Abb. 16: Relative Expressionsrate von Pcx.

Gruppe 1: KR3M, Gruppe 2: KR6M, Gruppe 3: KR12M, Gruppe 4: KA3M1h, Gruppe 5: KA3M2w, Gruppe 6: KF3M, Gruppe 7: MR3M, Gruppe 8: MF3M; WT = Wildtyp-Mäuse; KO = VLCAD^{-/-}-Mäuse; die Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben (n ≥ 5). Werte gelten als signifikant, wenn gilt: p ≤ 0,05 (two way ANOVA und T-Test).

Bei der Untersuchung der Expressionsraten von Pck1 (Abb. 17) zeigten sich signifikant niedrigere Werte bei den VLCAD^{-/-}-Mäusen der Kontrollgruppe (65,76 ± 12,79 vs. 100,00 ± 8,16; p ≤ 0,05), bei den einjährigen Mäusen (78,62 ± 3,53 vs. 100,42 ± 11,90; p ≤ 0,05), sowie bei den Mäusen mit fettmodifizierter Diät in Kombination mit 24 Stunden Fasten (354,06 ± 23,87 vs. 421,89 ± 25,95; p ≤ 0,05), jeweils im Vergleich zu Wildtypen der selben Gruppe.

Besonders auffällig sind die vierfach höheren Pck1 Expressionsraten, welche durch Fasten induziert wurden und zwar unabhängig davon, ob es sich um Wildtyp- oder VLCAD^{-/-}-Mäuse handelte, wobei die Expression bei den Knockout Mäusen jeweils höher lag als bei den Wildtyp-Mäusen.

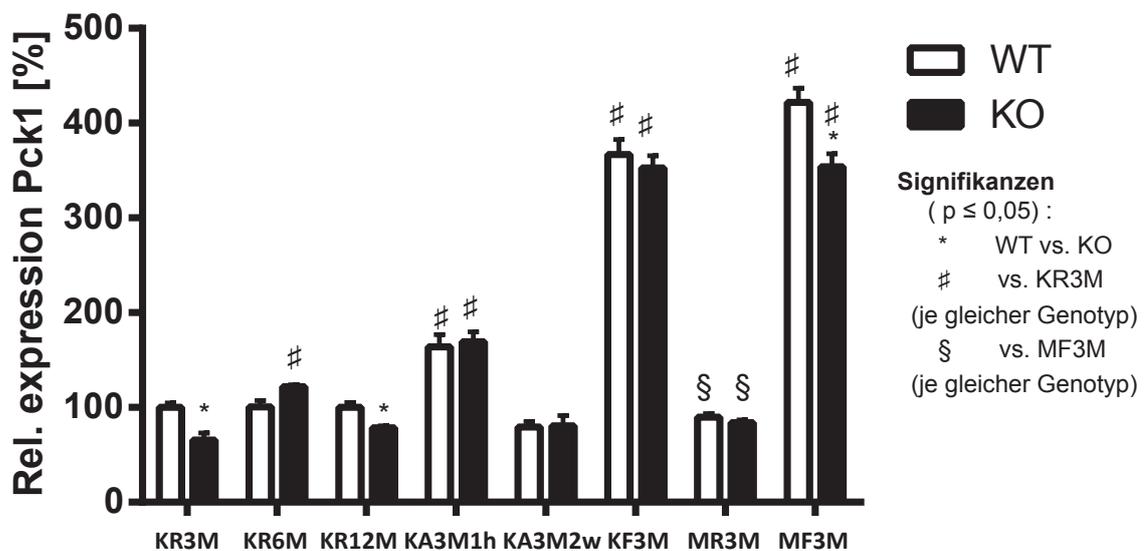


Abb. 17: Relative Expressionsrate von Pck1.

Gruppe 1: KR3M, Gruppe 2: KR6M, Gruppe 3: KR12M, Gruppe 4: KA3M1h, Gruppe 5: KA3M2w, Gruppe 6: KF3M, Gruppe 7: MR3M, Gruppe 8: MF3M; WT = Wildtyp-Mäuse; KO = VLCAD^{-/-}-Mäuse; die Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben (n ≥ 5). Werte gelten als signifikant, wenn gilt: p ≤ 0,05 (two way ANOVA und T-Test).

Zusammenfassend zeigten sich gesteigerte Expressionsraten von PPARGC1A und PDK4 bei VLCAD^{-/-}-Mäusen, während die Expression von Pcx und Pck1 eher erniedrigt war. Fasten steigerte unabhängig vom Genotyp die Expressionsraten von Pcx und Pck1.

3.4.3 Nierenversagen: Heme Oxygenase 1 (HMOX1), Lipocalin 2 (LCN2) und Hepatitis A Virus Cellular Receptor 1 (HAVCR1)

Um ein mögliches Nierenversagen nachzuweisen, wurde auf RNA-Ebene die Genexpressionsrate folgender Enzyme untersucht: Hemoxygenase-1 (Ho-1), Neutrophil gelatinase-associated Lipocalin (Ngal) und Kidney-Injury Molecule 1 (KIM1).

Hemoxygenase-1 ist ein Enzym, welches bei Vorliegen von oxidativem Stress in der Niere vermehrt gebildet wird [59, 60]. Abb. 18 zeigt die unterschiedlichen Expressionsraten von HMOX1, dem korrespondierenden Gen zu Ho-1. Insgesamt waren kaum signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp- und VLCAD^{-/-}-Mäusen innerhalb der verschiedenen Mausgruppen zu erkennen. Lediglich zeigten sich bei den einjährigen VLCAD^{-/-}-Mäusen signifikant niedrigere Expressionsraten ($70,69 \pm 1,74$ vs. $122,14 \pm 4,01$; $p \leq 0,01$) und bei den Tieren mit regelmäßiger körperlicher Aktivität (Laufbandversuch über zwei Wochen) signifikant höhere Expressionsraten ($98,88 \pm 9,23$ vs. $55,22 \pm 15,5$; $p \leq 0,05$). Einen deutlichen Effekt auf die Expressionsrate von HMOX1 zeigte das Fasten. Sowohl die Mäuse unter der Kontrolldiät als auch die Mäuse unter der fettmodifizierten Diät wiesen vierfach höhere Expressionsraten von HMOX1 im Vergleich zu beiden Genotypen der Kontrollgruppe auf.

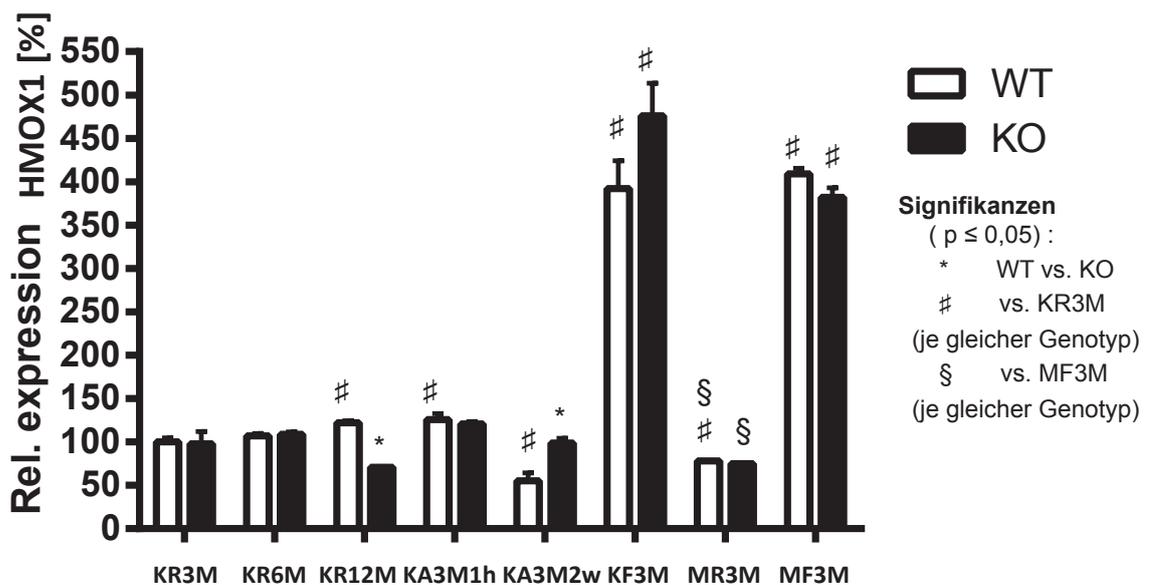


Abb. 18: Relative Expressionsrate von HMOX; dem Gen, welches für Ho-1 kodiert.

Gruppe 1: KR3M, Gruppe 2: KR6M, Gruppe 3: KR12M, Gruppe 4: KA3M1h, Gruppe 5: KA3M2w, Gruppe 6: KF3M, Gruppe 7: MR3M, Gruppe 8: MF3M; WT = Wildtyp-Mäuse; KO = VLCAD^{-/-}-Mäuse; die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben ($n \geq 5$). Werte gelten als signifikant, wenn gilt: $p \leq 0,05$ (two way ANOVA und T-Test).

Ngal (Lipocalin 2) ist ein unspezifischer, aber sensitiver Marker für Ischämie im Nierengewebe. Akutes Nierenversagen kann zu einer vermehrten Expression von Lipocalin 2 RNA in Nieren führen [61]. Die Messungen der Expressionsraten im Nierengewebe von LCN2, dem Gen, welches für Ngal kodiert, ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen (Abb. 19). Eine Ausnahme zeigten die Tiere des einmaligen Laufbandversuches. Hier kam es bei den VLCAD^{-/-}-Mäusen zu signifikant niedrigeren Expressionsraten im Vergleich zu Wildtypen ($88,58 \pm 5,84$ vs. $100,69 \pm 3,30$; $p \leq 0,05$).

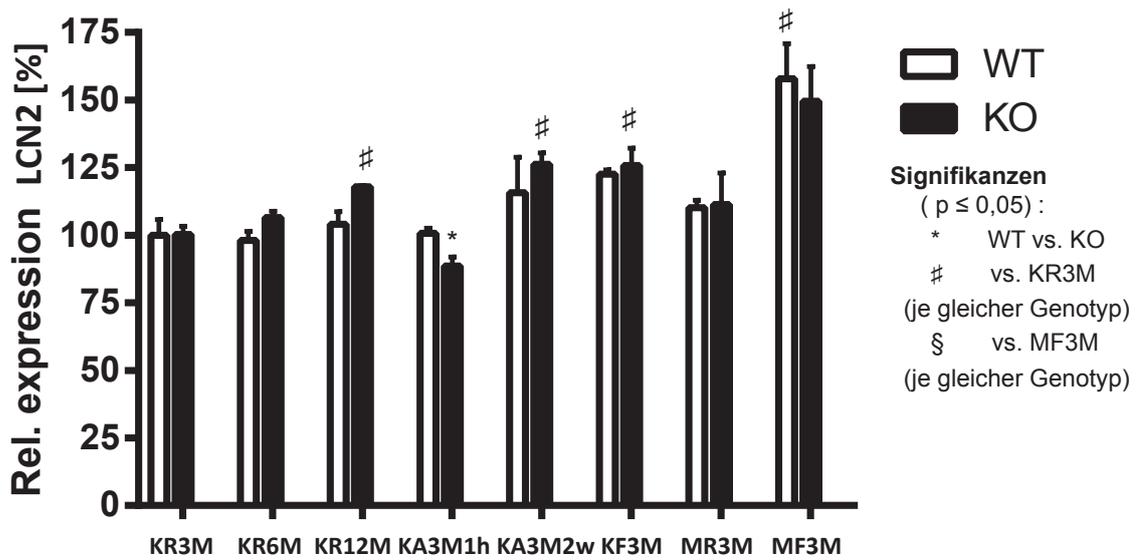


Abb. 19: Relative Expressionsrate von LCN2; dem Gen, welches für Ngal kodiert.

Gruppe 1: KR3M, Gruppe 2: KR6M, Gruppe 3: KR12M, Gruppe 4: KA3M1h, Gruppe 5: KA3M2w, Gruppe 6: KF3M, Gruppe 7: MR3M, Gruppe 8: MF3M; WT = Wildtyp-Mäuse; KO = VLCAD^{-/-}-Mäuse; die Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben (n ≥ 5). Werte gelten als signifikant, wenn gilt: $p \leq 0,05$ (two way ANOVA und T-Test).

KIM-1 gilt als Biomarker für eine chronische Schädigung der Nieren [62] und konnte nicht in gesundem Nierengewebe nachgewiesen werden [63]. Abb. 20 zeigt die Messung von HAVCR1 bei den unterschiedlichen Mausgruppen. HAVCR1 ist das Gen, welches für KIM-1 kodiert. Die Expressionsrate bei VLCAD^{-/-}-Mäusen im Ruhezustand verglichen mit Wildtyp-Mäusen war signifikant niedriger ($22,40 \pm 2,77$ (SD) vs. $100,00 \pm 11,95$ (SD); $p \leq 0,01$). Auch Laufen auf dem Laufband sowie Fasten, unabhängig von der zugeführten Diät, führte bei VLCAD^{-/-}-Mäusen zu signifikant geringeren Expressionsraten im Vergleich zu den jeweiligen Wildtypen ($27,14 \pm 4,26$ (SD) vs. $108,94 \pm 3,52$ (SD); $p \leq 0,01$ Laufen auf dem Laufband).

Das hohe Alter (zwölf Monate) führte bei VLCAD^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtypen zu einer signifikanten Erhöhung der Expressionsrate von HAVCR1 auf RNA Ebene ($91,52 \pm 10,94$ (SD) vs. $10,52 \pm 0,59$ (SD); $p \leq 0,01$). Dieses Ergebnis wurde relativiert durch die erstaunlicherweise sehr niedrige Expressionsrate von HAVCR1 bei den einjährigen Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu den drei Monate alten Wildtyp-Mäusen. Auch die Expressionsrate bei Mäusen mit der fettmodifizierten Diät war im Vergleich zu den jeweiligen Wildtyp-Mäusen signifikant höher ($174,54 \pm 17,10$ (SD) vs. $131,54 \pm 13,27$ (SD); $p \leq 0,05$).

Unsere Untersuchungen zeigten ebenfalls, dass ein höheres Alter (sechs und zwölf Monate) bei den VLCAD^{-/-}-Mäusen eine vermehrte Expression von HAVCR1 im Vergleich zu den VLCAD^{-/-}-Mäusen der Kontrollgruppe zur Folge hatte. Dies traf auch bei den VLCAD^{-/-}-Mäusen der Gruppe des Laufbandversuches über zwei Wochen, sowie bei den VLCAD^{-/-}-Mäusen der fettmodifizierten Diät zu. Daraus wird sichtbar, dass ein höheres Alter, sowie Ausdauertraining und die fettmodifizierte Diät einen möglichen Nierenschaden bei VLCAD^{-/-}-Mäusen induzieren.

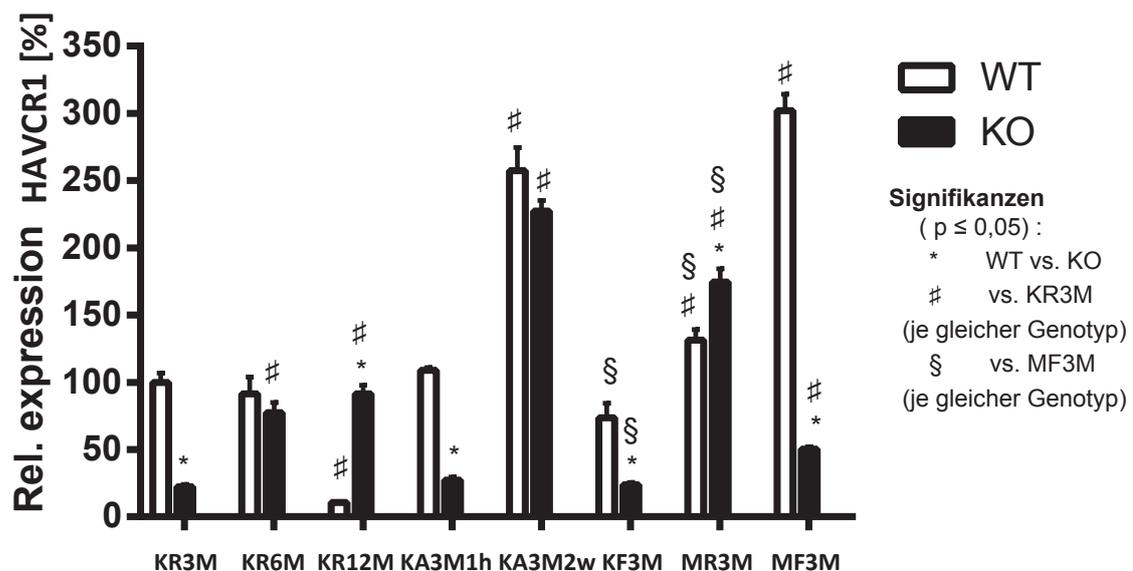


Abb. 20: Relative Expressionsrate von HAVCR1; dem Gen, welches für KIM1 kodiert.

Gruppe 1: KR3M, Gruppe 2: KR6M, Gruppe 3: KR12M, Gruppe 4: KA3M1h, Gruppe 5: KA3M2w, Gruppe 6: KF3M, Gruppe 7: MR3M, Gruppe 8: MF3M; WT = Wildtyp-Mäuse; KO = VLCAD^{-/-}-Mäuse; die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben ($n \geq 5$). Werte gelten als signifikant, wenn gilt: $p \leq 0,05$ (two way ANOVA und T-Test).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass auf RNA Ebene kein Hinweis auf ein akutes Nierenversagen bei VLCAD^{-/-}-Mäusen bestand. Allenfalls zeigten unsere Untersuchungen eine erhöhte Expressionsrate von KIM-1 bei den VLCAD^{-/-}-Mäusen im hohen Alter (zwölf Monate) oder mit der fettmodifizierten Diät.

3.4.4 Lipidakkumulation: Steroyl Element Binding Protein-1c (SREBP-1c), Fatty Acid Synthase (FASN) und Acetyl-CoA Carboxylase α (ACACA)

Um den Nachweis für eine Lipidakkumulation geben zu können, wie es in der Leber von VLCAD^{-/-}-Mäusen unter einer fettmodifizierten Diät und nach einer 24 stündigen Fastenzeit beobachtet wurde, wurden die Expression von SREBP-1c, FASN und ACACA gemessen. SREBP-1c ist ein Regulator für die Lipidhomöostase, die Biosynthese von Fettsäuren und den Glukosemetabolismus [64]. Acetyl-CoA Carboxylase 1 α (ACC1 α) und FASN kodieren für Gene der *de novo* Synthese und Elongation von Fettsäuren. Ihre Expressionsraten auf mRNA Ebene sind direkt proportional zur Triacylglycerid-Akkumulation in den Nieren [65].

Wie Abb. 21 zeigt, ist eine Tendenz zu niedrigeren Expressionsraten von SREBP-1c bei den VLCAD^{-/-}-Mäusen der unterschiedlichen Gruppen im Vergleich zu den korrespondierenden Wildtypen zu erkennen. Signifikant niedrigere Raten zeigten sich bei den VLCAD^{-/-}-Mäusen der Kontrollgruppe (71,83 \pm 4,71 vs. 100,00 \pm 3,94; $p \leq 0,01$), der sechs Monate alten Mäuse, beider Mausgruppen mit den Laufbandversuchen und den Mäusen mit der fettmodifizierten Diät in Kombination mit 24 Stunden Fasten. Lediglich bei den einjährigen VLCAD^{-/-}-Mäusen, den Fasten-Tieren und den Tieren mit der fettmodifizierten Diät unter Ruhebedingungen kam es zu signifikant höheren Expressionsraten von SREBP-1c im Vergleich zu Wildtypen.

Der einmalige Laufbandversuch, Fasten in Kombination mit der Kontrolldiät oder in Kombination mit der fettmodifizierten Diät induzierten bei den Mäusen beider Genotypen signifikant kleinere Expressionsraten für SREBP-1c im Vergleich zur Kontrollgruppe.

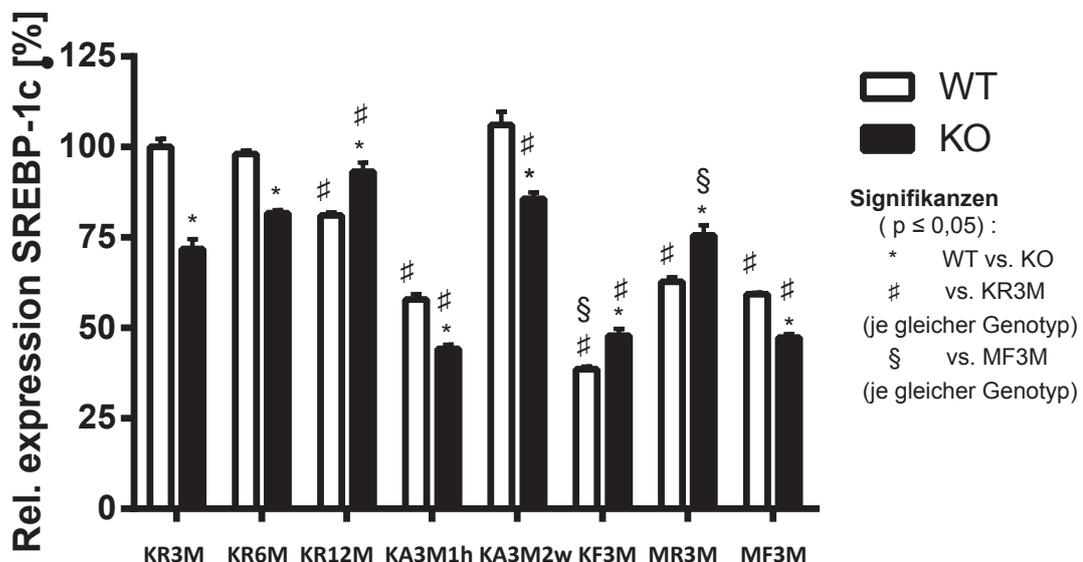


Abb. 21: Relative Expressionsrate von SREBP-1c.

Gruppe 1: KR3M, Gruppe 2: KR6M, Gruppe 3: KR12M, Gruppe 4: KA3M1h, Gruppe 5: KA3M2w, Gruppe 6: KF3M, Gruppe 7: MR3M, Gruppe 8: MF3M; WT = Wildtyp-Mäuse; KO = VLCAD^{-/-}-Mäuse; die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben (n \geq 5). Werte gelten als signifikant, wenn gilt: $p \leq 0,05$ (two way ANOVA und T-Test).

Abb. 22 zeigt die relativen Expressionsraten von FASN. Im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen der Kontrollgruppe kam es bei allen anderen Gruppen zu ca. 50% niedrigeren Expressionsraten. Die VLCAD^{-/-}-Mäuse der Kontrollgruppe zeigten eine signifikant niedrigere Expression als ihre Wildtyp-Tiere (55,25 ± 2,68 vs. 100,00 ± 6,43; p ≤ 0,01). Parallel dazu kam es sowohl bei den Mäusen mit der einmaligen Aktivität und der Mausgruppe mit fettmodifizierter Diät in Kombination mit 24 Stunden Fasten zu signifikant niedrigeren Expressionsraten in den VLCAD^{-/-}-Tieren im Vergleich zu Wildtypen. Das Lebensalter von einem Jahr, das Fasten unter Kontrolldiät und die fettmodifizierte Diät unter Ruhebedingungen erbrachten in den VLCAD^{-/-}-Mäusen verglichen mit den jeweiligen Wildtypen signifikant höhere Expressionsraten (KR12M: 49,38 ± 2,57 vs. 35,35 ± 4,29; p ≤ 0,05 und KF3M: 35,65 ± 2,05 vs. 19,91 ± 1,34; p ≤ 0,01 und MR3M: 56,38 ± 4,39 vs. 30,27 ± 1,88; p ≤ 0,01).

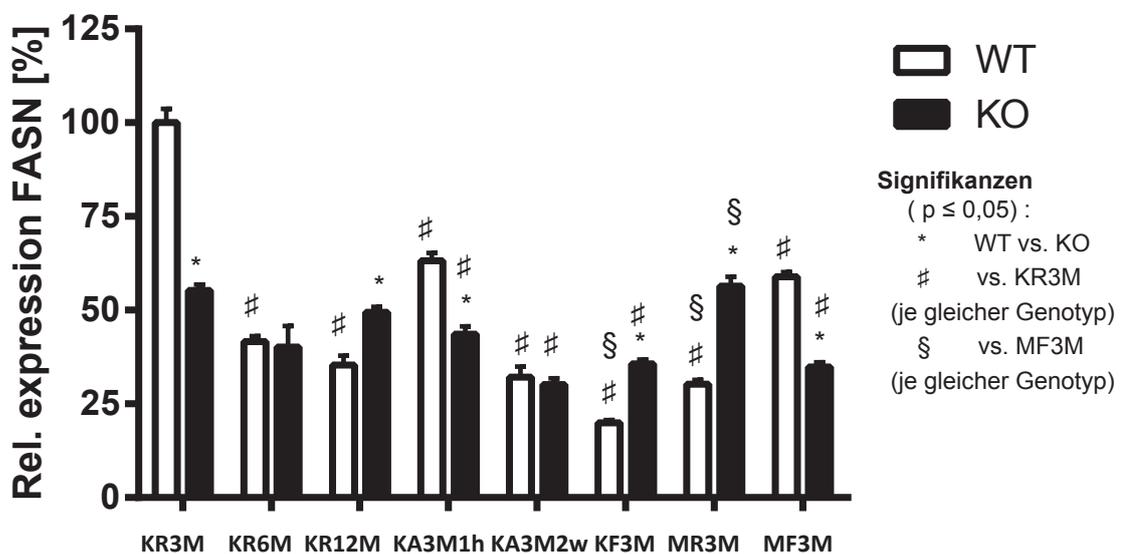


Abb. 22: Relative Expressionsrate von FASN.

Gruppe 1: KR3M, Gruppe 2: KR6M, Gruppe 3: KR12M, Gruppe 4: KA3M1h, Gruppe 5: KA3M2w, Gruppe 6: KF3M, Gruppe 7: MR3M, Gruppe 8: MF3M; WT = Wildtyp-Mäuse; KO = VLCAD^{-/-}-Mäuse; die Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben (n ≥ 5). Werte gelten als signifikant, wenn gilt: p ≤ 0,05 (two way ANOVA und T-Test).

Ähnliche Ergebnisse zeigten die Daten der Expressionsrate von Acetyl-CoA Carboxylase α . Hier kam es ebenfalls zu deutlich niedrigeren Expressionsraten aller Gruppen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen der Kontrollgruppe (siehe Abb. 23). Analog zu den Daten zu FASN waren die Expressionsraten bei den VLCAD^{-/-}-Mäuse der Kontrollgruppe signifikant niedriger als bei den Wildtyp-Tieren ($50,95 \pm 1,93$ vs. $100,00 \pm 5,32$; $p \leq 0,01$). Signifikant höhere, aber dennoch relativ niedrigere Expressionsraten von ACACA, zeigten sich bei den VLCAD^{-/-}-Mäusen der Gruppe des Laufbandversuches über zwei Wochen hinweg, der Fasten-Tiere mit Kontrolldiät und der Mäuse mit der fettmodifizierten Diät.

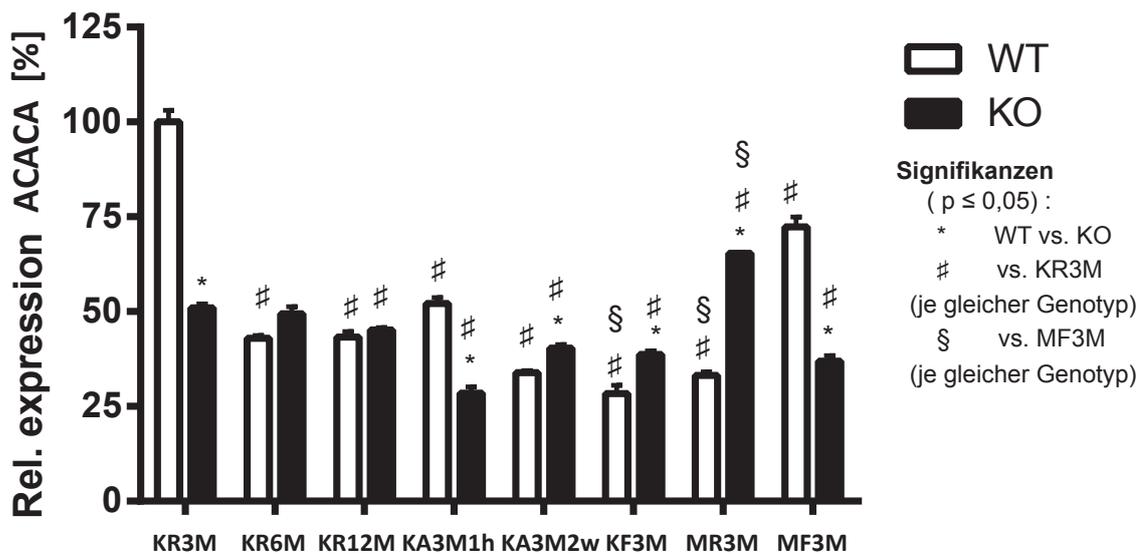


Abb. 23: Relative Expressionsrate von ACACA; dem Gen, welches für ACC1 α kodiert.

Gruppe 1: KR3M, Gruppe 2: KR6M, Gruppe 3: KR12M, Gruppe 4: KA3M1h, Gruppe 5: KA3M2w, Gruppe 6: KF3M, Gruppe 7: MR3M, Gruppe 8: MF3M; WT = Wildtyp-Mäuse; KO = VLCAD^{-/-}-Mäuse; die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben ($n \geq 5$). Werte gelten als signifikant, wenn gilt: $p \leq 0,05$ (two way ANOVA und T-Test).

Zusammenfassend zeigten sich keine Hinweise für eine stimulierte Lipogenese im Nierengewebe der VLCAD^{-/-}-Mäuse.

3.5 Acylcarnitine

3.5.1 C0, Freies Carnitin:

Um den Verbrauch an freiem Carnitin in den VLCAD^{-/-}-Mäusen unter den verschiedenen Stressoren zu messen, wurde der C0-Gehalt im Nierengewebe getestet.

Abb. 24 zeigt den freien Carnitingehalt im Nierengewebe bei den verschiedenen Mausgruppen. Die Konzentration von freiem Carnitin im Nierengewebe der Kontrollgruppe betrug durchschnittlich 5,54 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ \pm 0,86. Auch wenn nicht signifikant, war eine tendenziell höhere Konzentration von freiem Carnitin bei den VLCAD^{-/-}-Mäusen zu erkennen (6,04 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ \pm 0,83).

Bei den sechs Monate alten Mäusen, den Mäusen mit dem Laufbandversuch über zwei Wochen hinweg und den Mäusen mit fettmodifizierter Diät in Kombination mit 24 Stunden Fasten zeigte sich ein signifikanter Mangel an freiem Carnitin der VLCAD^{-/-}-Tiere verglichen mit den jeweiligen Wildtypen (KR6M: 4,59 \pm 1,02 (SD) vs. 5,54 \pm 0,67 (SD); $p \leq 0,05$ und KA3M2w: 4,64 \pm 0,84 (SD) vs. 5,57 \pm 1,01 (SD); $p \leq 0,01$ und MF3M: 3,28 \pm 0,69 (SD) vs. 4,22 \pm 0,31 (SD); $p \leq 0,01$).

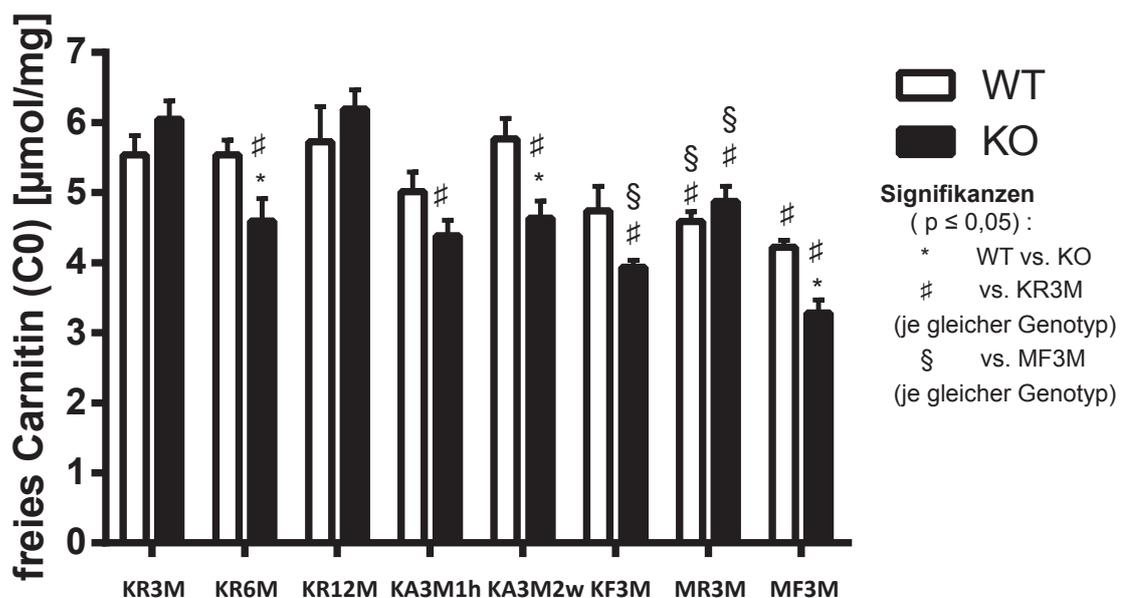


Abb. 24: Freies Carnitin (C0).

Gruppe 1: KR3M, Gruppe 2: KR6M, Gruppe 3: KR12M, Gruppe 4: KA3M1h, Gruppe 5: KA3M2w, Gruppe 6: KF3M, Gruppe 7: MR3M, Gruppe 8: MF3M; WT = Wildtyp-Mäuse; KO = VLCAD^{-/-}-Mäuse; die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben ($n \geq 5$). Werte gelten als signifikant, wenn gilt: $p \leq 0,05$ (two way ANOVA und T-Test).

Unsere Ergebnisse ergaben vor allem bei den sechs Monate alten Tieren und den Mausgruppen mit vermehrtem Stress erniedrigte Mengen von freiem Carnitin in den VLCAD^{-/-}-Mäusen.

3.5.2 C2, Acetylcarnitin:

Um das Ausmaß der Menge an Acetylcarnitin zu untersuchen, wurde die Konzentration von C2 gemessen.

Die durchschnittliche Konzentration von C2 betrug in den Wildtyp- und VLCAD^{-/-}-Mäusen der Kontrollgruppe entsprechend 16,46 $\mu\text{mol}/\text{mg} \pm 3,57$ und 19,29 $\mu\text{mol}/\text{mg} \pm 7,03$ (Abb. 25). Das hohe Alter (12 Monate) induzierte bei den VLCAD^{-/-}-Mäusen signifikant höhere Werte der akkumulierenden Acetylcarnitinen im Vergleich zu Wildtypen (18,86 $\pm 8,09$ vs. 11,80 $\pm 4,73$; $p \leq 0,05$). Bei den sechs Monate alten Tieren kam es zu signifikant niedrigeren Konzentrationen der Acetylcarnitinen im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Wildtyp: 10,72 $\pm 3,88$ (SD) vs. 16,46 $\pm 3,57$ (SD); $p \leq 0,01$ und VLCAD^{-/-}: 11,38 $\pm 2,89$ (SD) vs. 19,29 $\pm 7,03$ (SD); $p \leq 0,01$). Es ergaben sich jedoch keine genotypischen Unterschiede.

24 Stunden Fasten hatte keinen Einfluss auf die Akkumulation von Acetylcarnitinen. Die Acetylcarnitinwerte der Tiere mit der fettmodifizierten Diät, waren signifikant, aber Genotyp-unabhängig niedriger im Vergleich zu der Kontrollgruppe.

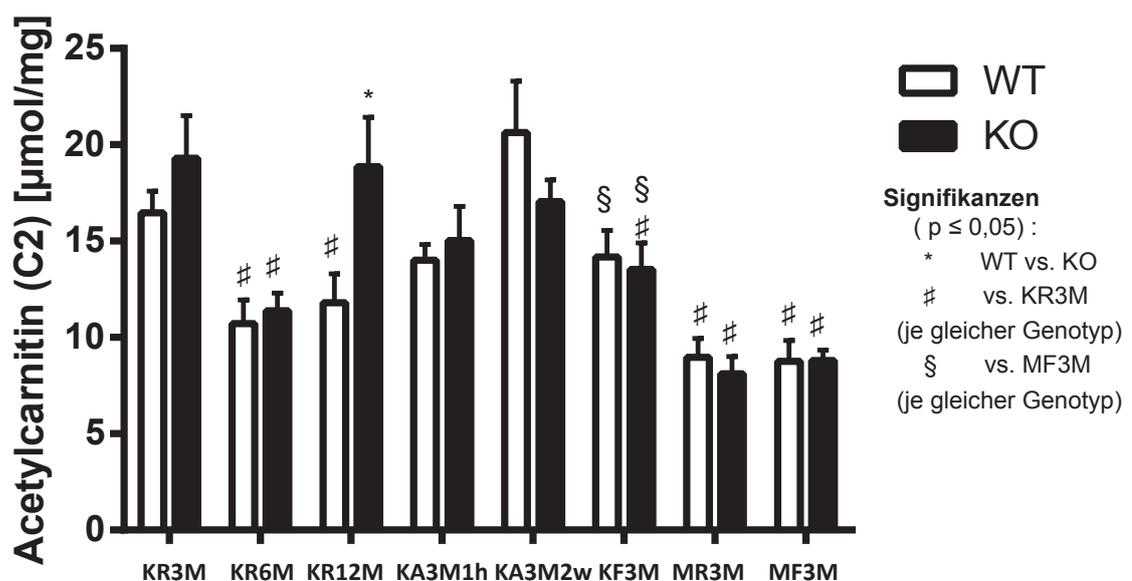


Abb. 25: Acetylcarnitin (C2).

Gruppe 1: KR3M, Gruppe 2: KR6M, Gruppe 3: KR12M, Gruppe 4: KA3M1h, Gruppe 5: KA3M2w, Gruppe 6: KF3M, Gruppe 7: MR3M, Gruppe 8: MF3M; WT = Wildtyp-Mäuse; KO = VLCAD^{-/-}-Mäuse; die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben ($n \geq 5$). Werte gelten als signifikant, wenn gilt: $p \leq 0,05$ (two way ANOVA und T-Test).

Zusammenfassend zeigte sich, dass die verschiedenen Stressoren keinen Mangel an sowie keine Akkumulation von Acetylcarnitin bei den VLCAD^{-/-}-Mäusen verursachten.

3.5.3 Langkettige Acylcarnitine

Um das Ausmaß der Akkumulation von langkettigen Fettsäuren innerhalb der verschiedenen Mausgruppen darzustellen, wurden in Abb. 26 die Summen der Acylcarnitine C12-C18OH erstellt. Hier wurden die Acylcarnitine von C12 bis C18OH einer jeweiligen Gruppe addiert und miteinander verglichen.

Bei den drei, sechs und zwölf Monate alten Tieren unter Ruhebedingungen kam es zu signifikant höheren Konzentrationen von langkettigen Acylcarnitinen in den VLCAD^{-/-}-Tieren verglichen mit den jeweiligen Wildtypen.

Nach einer 24 Stunden Fastenzeit konnten wir eine signifikante Abnahme der Konzentration der langkettigen Acylcarnitinen insbesondere bei den VLCAD^{-/-}-Mäusen beobachten ($1,28 \pm 0,41$ vs. $0,33 \pm 0,06$; $p \leq 0,01$). Interessanterweise führte eine fettmodifizierte Diät im Vergleich zu der Kontrolldiät zu höheren Konzentrationen von langkettigen Acylcarnitinen (Abb. 26).

In den anderen Gruppen waren zwischen den Genotypen keine Unterschiede festzustellen.

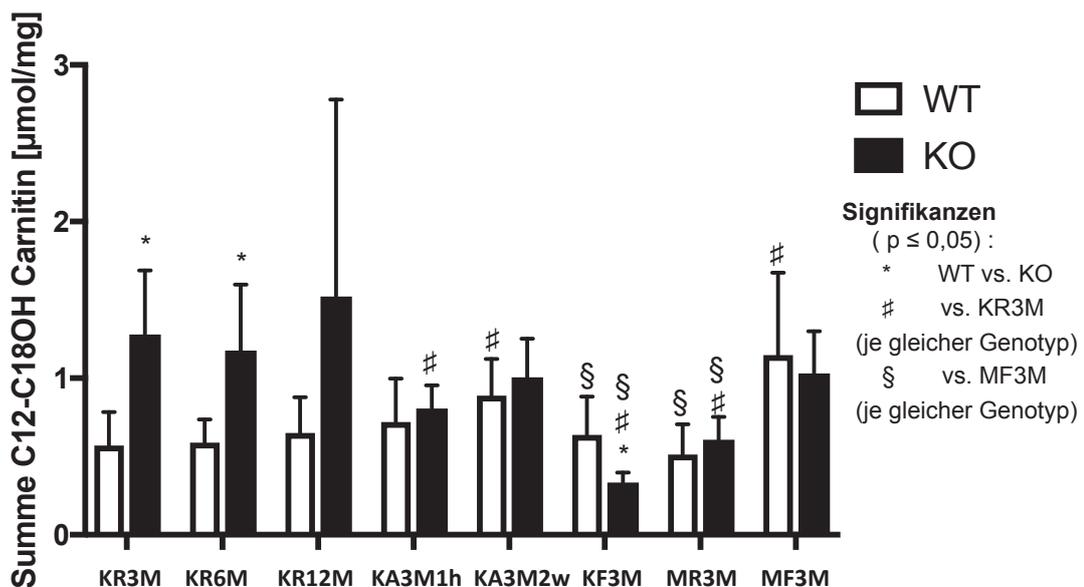


Abb. 26: Summe langkettiger Acylcarnitine C12-C18OH.

Gruppe 1: KR3M, Gruppe 2: KR6M, Gruppe 3: KR12M, Gruppe 4: KA3M1h, Gruppe 5: KA3M2w, Gruppe 6: KF3M, Gruppe 7: MR3M, Gruppe 8: MF3M; WT = Wildtyp-Mäuse; KO = VLCAD^{-/-}-Mäuse; die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben ($n \geq 5$). Werte gelten als signifikant, wenn gilt: $p \leq 0,05$ (two way ANOVA und T-Test).

Die Messungen ergaben, dass auch im Nierengewebe der VLCAD^{-/-}-Mäuse langkettige Acylcarnitine akkumulieren. Prolongierte Stressfaktoren induzierten jedoch keine erhöhte Akkumulation von langkettigen Acylcarnitinen in den VLCAD^{-/-}-Mäusen.

3.6 Glykogengehalt

Um die Menge an anfallendem Glykogen im Nierengewebe zu messen, wurde der Glykogengehalt in den Nieren der verschiedenen Mausgruppen bestimmt.

Wir konnten keine altersabhängigen Unterschiede des Glykogengehaltes zwischen Wildtyp- und VLCAD^{-/-}-Mäusen beobachten (Abb. 27).

Das Laufen auf dem Laufband induzierte signifikant niedrigere Konzentrationen von Glykogen bei den VLCAD^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtypen (KA3M1h: $1,71 \pm 0,68$ vs. $3,43 \pm 0,50$; $p \leq 0,01$ und KA3M2w: $2,05 \pm 0,28$ vs. $4,53 \pm 0,60$; $p \leq 0,01$). Ähnliche Ergebnisse wurden auch nach einer 24-stündigen Fastenperiode beobachtet (KF3M: $2,92 \pm 0,53$ (SD) vs. $4,70 \pm 1,22$ (SD); $p \leq 0,05$ und MF3M: $3,01 \pm 0,18$ (SD) vs. $4,70 \pm 1,22$ (SD); $p \leq 0,05$). Zusätzlich zeigte sich, dass eine 24-stündige Fastenperiode zusammen mit der fettmodifizierten Diät im Vergleich zu Wildtypen zu signifikant niedrigeren Konzentrationen des Glykogens bei VLCAD^{-/-}-Mäusen führte ($3,01 \pm 0,18$ vs. $4,86 \pm 1,47$; $p \leq 0,01$).

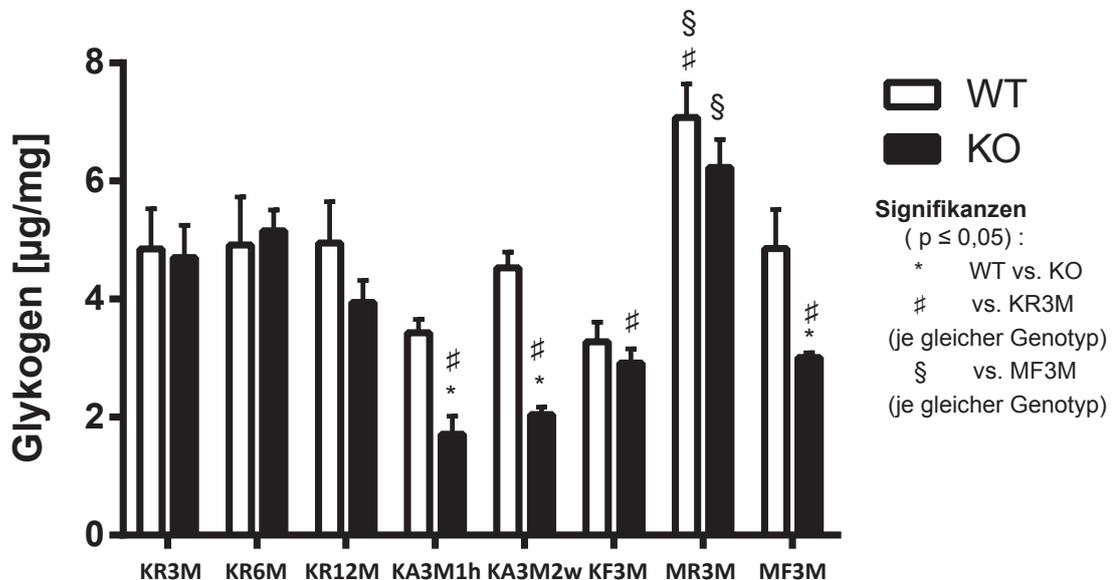


Abb. 27: Glykogengehalt im Nierengewebe.

Gruppe 1: KR3M, Gruppe 2: KR6M, Gruppe 3: KR12M, Gruppe 4: KA3M1h, Gruppe 5: KA3M2w, Gruppe 6: KF3M, Gruppe 7: MR3M, Gruppe 8: MF3M; WT = Wildtyp-Mäuse; KO = VLCAD^{-/-}-Mäuse; die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben ($n \geq 5$). Werte gelten als signifikant, wenn gilt: $p \leq 0,05$ (two way ANOVA und T-Test).

Zusammenfassend zeigte sich, dass der Glykogengehalt vor allem in den VLCAD^{-/-}-Mäusen der Laufbandversuche am niedrigsten war. Dies deutet darauf hin, dass die Niere von VLCAD^{-/-}-Mäusen bei akuter Aktivität auf die Energiebereitstellung aus Glykogen zurückgreift.

4 Diskussion

Beim VLCAD-Mangel kommt es im Rahmen von katabolen Stoffwechsellagen wie nach Infekten, körperlicher Anstrengung oder nach längeren Nüchternperioden zu kardialen, hepatischen und muskulären Symptomen [2, 29, 42, 66]. Diese Symptome finden sich sowohl bei Patienten mit dieser Erkrankung als auch im VLCAD^{-/-}-Mausmodell [8, 29, 30]. Obwohl es bei der Maus ein Enzym mit überlappender Substratspezifität gibt, die Long-chain acyl-CoA Dehydrogenase (LCAD) [28, 67], welche die Palmitoyl-CoA Oxidation zu einem Teil sicherstellt, ist die Energieversorgung der Zellen beeinträchtigt. Ungeklärt ist, warum die Niere in katabolen Stoffwechsellagen im Gegensatz zu anderen Organen keine Symptome aufweist. Ziel dieser Arbeit ist, am Mausmodell den nephrologischen Phänotyp systematisch zu untersuchen.

VLCAD^{-/-}- und Wildtyp-Mäuse wurden aus diesem Grund in unterschiedlichem Lebensalter, nach einer fettmodifizierten Diät, sowie nach Fasten und körperlicher Aktivität untersucht. Ziel war es, die Niere in Zustände mit erhöhtem Energiebedarf zu versetzen, um einen etwaigen Nierenphänotyp auszulösen oder Kompensationsmechanismen zu induzieren, um diesem Phänotyp vorzubeugen.

4.1 Kompensationsmechanismen in der Niere

Frühere Arbeiten konnten zeigen, dass VLCAD^{-/-}-Mäuse in verschiedenen Organen Strategien entwickeln, um den VLCAD-Mangel zu kompensieren [67].

In der Leber ist die Palmitoyl-CoA Oxidationsrate bei VLCAD^{-/-}-Mäusen signifikant niedriger als bei Wildtyp-Mäusen, sie ist aber nicht gleich Null, obwohl das Enzym VLCAD nicht mehr gebildet wird [67]. Dieses deutet darauf hin, dass andere Enzyme die Oxidation von C16-CoA zumindest in Teilen übernehmen. Eine normale Palmitoyl-CoA Oxidationsrate bei fehlender VLCAD im Herzen führen Tucci et al. auf eine vollständige Kompensation durch LCAD zurück. Diese Anpassungen sind jedoch nicht in der Lage die progressive kardiale Dysfunktion im Langzeitverlauf bei der VLCAD^{-/-}-Maus zu vermeiden [30]. Im Muskel dagegen ist die Palmitoyl-CoA Oxidation durch das Enzym LCAD nicht normalisiert. Als Anpassungsmechanismus finden sich stattdessen strukturelle Veränderungen der Zusammensetzung der Muskelfasern mit einer Zunahme glykolytischer Muskelfasern [68]. Glykolytische Muskelfasern sind nicht auf eine intakte β -Oxidation angewiesen, sondern können die zur Verfügung stehenden intakten Stoffwechselwege des Kohlenhydratmetabolismus zur Energieproduktion nutzen.

In der vorliegenden Studie fand sich in der Niere bei VLCAD^{-/-}-Mäusen im Alter von 3 Monaten ebenfalls eine herabgesetzte Aktivität der C16-CoA Oxidationsrate, was als eine eingeschränkte Kompensation durch LCAD gedeutet werden kann [69].

Bei Mäusen im Alter von einem Lebensjahr war die C16-CoA Oxidationsrate weiterhin signifikant niedriger als bei Wildtyp-Mäusen, trotz deutlich erhöhter Expressionsrate von ACADL auf RNA Ebene in diesem Alter. Dies deutet darauf hin, dass eine verstärkte RNA Expression von ACADL nicht automatisch mit einer gesteigerten Funktion des Enzyms LCAD und erhöhter Palmitoyl-CoA Oxidationsrate einhergeht [67]. Studien zeigen, dass die Aktivität von verschiedenen mitochondrialen Proteinen durch posttranslationale Modifikationen wie Acetylierung reguliert wird [70], was in diesem Fall die inkongruenten Ergebnisse der ACADL-Expressionsrate und der Palmitoyl-CoA Oxidationsrate erklären kann. Um diese Annahme bestätigen zu können, müssen weitere Untersuchungen auf Proteinebene an VLCAD^{-/-}-Mäusen folgen - zum Beispiel im Rahmen von Western Blots.

Im Mausmodell des VLCAD-Mangels konnte in Leber- und Herzgewebe gezeigt werden, dass es vor allem im Rahmen eines Energiemangels wie nach Fasten und nach körperlicher Aktivität zu einer starken Hochregulierung der RNA-Transkriptionsrate von ACADM und ACADL kam [67]. In den hier durchgeführten Untersuchungen im Nierengewebe zeigten sich keine erhöhten Expressionsraten von ACADM, ACADL oder AOX nach körperlicher Aktivität. Allerdings fand sich bei VLCAD^{-/-}-Mäusen nach 24 Stunden Fasten eine signifikant höhere Expressionsrate auf mRNA Ebene für AOX in der Niere. Dieses wurde zuvor bereits für die Leber nachgewiesen [42]. Im Rahmen von Fasten kam es zum Einstrom von Lipiden in die Leber, welche bei Vorliegen eines VLCAD-Mangels nicht oder nur mangelhaft oxidiert werden konnten und akkumulierten. Die Notwendigkeit des weiteren Abbaus dieser Fettsäurenmetabolite kann zur verstärkten Expression von Genen führen, die eine Rolle in der mitochondrialen und peroxisomalen Oxidation von Fettsäuren spielen, wie z.B. der AOX. Das Enzym AOX stellt also eine Alternative zur Verstoffwechslung von freien Fettsäuren dar. Diese Oxidation geht mit der Bildung von freien Radikalen und im weiteren Verlauf mit vermehrtem oxidativen Stress einher [42]. Allerdings liegen bisher keine entsprechenden Hinweise auf vermehrten oxidativen Stress in den Nieren vor.

Tucci et al. [67] zeigten in früheren Studien, dass es in der Leber bei Wildtyp-Mäusen unter einer fettmodifizierten Diät mit Supplementierung mittelkettiger Fettsäuren zu einer gesteigerten Oxidationsrate von C16-CoA kommt. Die Fettsäurenoxidation spielt also zur Energieproduktion unter diesen Bedingungen eine große Rolle. Im Gegensatz dazu stehen die Erkenntnisse zu den Untersuchungen des Nierengewebes mit Supplementierung von mittelkettigen Fettsäuren. Hier kam es sowohl bei VLCAD^{-/-}- als auch bei Wildtyp-Mäusen zu einer herabgesetzten mitochondrialen Fettsäurenoxidation. Interessanterweise zeigten VLCAD^{-/-}- wie Wildtyp-Mäuse sowohl mit einer fettmodifizierten Diät als auch mit der Kontrolldiät nach einer Fastenzeit von über 24 Stunden, ebenso eine niedrigere Aktivitätsrate der Palmitoyl-CoA Oxidation in den Nieren. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei längerem Fasten und unter Supplementierung mittelkettiger Fettsäuren vermutlich andere Stoffwechselwege zur Energieproduktion aktiviert werden [69].

PGC1 α (oder PPARGC1A) ist ein Kofaktor für die Transkription von Genen des Energiestoffwechsels. Er steigert und koordiniert unter anderem die Genexpression von

Enzymen der mitochondrialen Biogenese und der hepatischen Glukoneogenese [54, 55]. Obwohl die Palmitoyl-CoA Oxidation in den Nieren reduziert ist, findet sich jedoch keine gesteigerte Expression von PPARGC1A als übergeordnetes Zeichen eines Energiemangels. Allerdings geben die Verminderung der Expression von PDK4 im Verlauf des Alters sowie die gesteigerte PDK4 Expression nach körperlicher Aktivität Hinweise auf die Rolle des Glukosestoffwechsels in den Nieren. PDK4 ist ein mitochondriales Protein, welches durch Phosphorylierung die Pyruvat Dehydrogenase inhibiert [56]. Die Pyruvat Dehydrogenase katalysiert die Reaktion von Pyruvat zu Acetyl-CoA. Sie verbindet also die Glykolyse mit dem Zitratzyklus [57]. Kommt es zu einer Hochregulierung von PDK4, führt das zur Phosphorylierung und somit zur Inhibition der Glykolyse [58]. Das hat zur Folge, dass zwar bei körperlicher Aktivität viel Glukose bereitgestellt werden kann, diese aber nicht zur Energieproduktion genutzt werden kann. Im Verlauf des Alters scheint die Glukoseoxidation in den Nieren stattdessen eine größere Rolle zu spielen, möglicherweise als effektiver Kompensationsmechanismus.

4.2 Toxizität und Energiemangel

Die Acylcarnitine sind ein wichtiger Parameter zur Beurteilung der Stoffwechsellage bei Fettsäureoxidationsstörungen. Auch die Konzentration des freien Carnitins spielt bei dieser Beurteilung eine wichtige Rolle, da Carnitin für den Transport von aktivierten langkettigen Fettsäuren über die Mitochondrienmembran essentiell ist. Anders ist dieses für mittelkettige Fettsäurenmetabolite wie C8- und C10-Acylcarnitine, die in der Lage sind, die Mitochondrienmembran auch ohne Carnitin zu passieren. Die Akkumulation von Acylcarnitinen und Acyl-CoA Estern in Geweben in katabolen Stoffwechsellagen und niedrige Konzentrationen an freiem Carnitin sind bekannt [2]. Spiekerkoetter et al. [34] konnten zeigen, dass eine Korrelation der Konzentration der Acylcarnitine in Blut und Geweben mit dem Ausmaß der Symptome eines VLCAD-Mangels besteht. Neben potentiell toxischen Effekten dieser akkumulierenden Metabolite besteht ein Energiemangel, der zum einen durch die fehlerhafte β -Oxidation und zum anderen durch einen Mangel an Acetyl-CoA und Ketonkörpern bedingt ist [2].

Auch in den Nieren zeigten sich deutlich erhöhte langkettige Acylcarnitin-Konzentrationen, wobei erniedrigte Konzentrationen an freiem Carnitin nur nach Fasten nachzuweisen waren. Fasten führt damit auch in den Nieren zu einem stärkeren biochemischen Phänotyp als körperliche Aktivität oder das Altern. Nicht eindeutig geklärt werden konnte, welche Langzeiteffekte in den Nieren durch die Acylcarnitin-Akkumulation und die niedrigen Carnitin-Konzentrationen insbesondere nach längeren Fastenperioden zu erwarten sind.

Die Nieren spielen insgesamt eine wichtige Rolle im Glukosehaushalt des Organismus: zum einen durch die Filtration und Reabsorption von Glukose aus dem Primärharn und zum anderen durch die Bereitstellung von Glukose durch Glukoneogenese [69]. Neben der Leber ist die Niere das zweitwichtigste Organ für die Glukoneogenese und trägt zu 40% an der Glykogen-Biosynthese des gesamten Organismus bei. Damit ist die Niere *in*

vivo ein glukoneogenetisches Organ, welches ebenso bedeutend wie die Leber ist [71, 72]. Besonders im Rahmen von Fastenperioden, wenn die Glykogenspeicher aufgebraucht werden, wird die Glukoneogenese aus Fett und Protein bedeutsam, um die Energieversorgung aufrechtzuhalten [73]. Es kommt zur Induktion von Genen der Glukoneogenese. Diese Annahme korreliert mit unseren Ergebnissen zu der Analyse von *Pcx* und *Pck1* in *VLCAD*^{-/-}-Mäusen. Die *Pcx* ist das erste Enzym der Glukoneogenese und katalysiert unter ATP-Verbrauch und mit Hilfe von CO₂ die Reaktion Pyruvat zu Oxalacetat. Im zweiten Schritt der Glukoneogenese entsteht mithilfe von Guanosintriphosphat (GTP) und unter Abspaltung von CO₂ Phosphoenolpyruvat. Diese Reaktion wird durch die *Pck1* katalysiert. Unsere Untersuchungen zeigten deutlich gesteigerte Expressionsraten von *Pcx* und *Pck1* bei *VLCAD*^{-/-}-Mäusen nach 24 Stunden Fasten, um den gesteigerten Energiebedarf zu decken. Der Kortex der Niere wird also angeregt, Glukoneogenese zu stimulieren, um mehr Glukose für den Organismus bereitzustellen.

Auch wenn wir die Glykogen-Biosynthese nicht direkt gemessen haben, konnten wir nachweisen, dass im Rahmen von katabolen Situationen, wie Laufen auf dem Laufband, die Glykogenkonzentration in den Nieren bei *VLCAD*^{-/-}-Mäusen deutlich niedriger war als in der Kontrollgruppe [69]. Diese Ergebnisse deuten sehr klar darauf hin, dass der Glukosestoffwechsel induziert ist und Glykogen anders als bei Wildtyp-Mäusen zur regelmäßigen Energiebereitstellung erforderlich ist. Die Energieversorgung der Niere unter Stress oder in Fastensituationen scheint also vornehmlich auf der Oxidation von Glukose zu beruhen und nicht auf der Oxidation von Fettsäuren. [69]

4.3 Oxidativer Stress, Nierenversagen und Lipidakkumulation

Die Katalase ist ein peroxisomales Enzym und ist dafür zuständig, die Wasserstoffperoxide der AOX zu Wasser und Sauerstoff zu entgiften [42]. Die NAD(P)H Chinon-Oxidoreduktase schützt die Zelle vor Radiation und oxidativem Stress [46]. Kommt es zu einem Mangel des Enzyms, ist oxidativer Stress die Folge. Die Glutathionperoxidase ist für die Entgiftung von mitochondrialen Wasserstoffperoxiden zuständig [50].

Frühere Untersuchungen der Leber zeigten, dass 24 stündiges Fasten [42] und eine fettmodifizierte Diät mit mittelkettigen Triglyceriden [42, 74] eine signifikant höhere Aktivitätsrate der Glutathionperoxidase bei *VLCAD*^{-/-}-Mäusen induzieren. Auch eine erhöhte Katalase-Aktivität deutet insbesondere nach längerem Fasten auf oxidativen Stress in der Leber bei *VLCAD*^{-/-}-Mäusen hin [42].

Im Gegensatz zur Leber [21] finden sich in den Nieren keine Hinweise auf oxidativen Stress [69]. In der Tat haben die Messungen der antioxidationsaktiven Enzyme in den drei verschiedenen Zellkompartimenten (Mitochondrium, Peroxisomen und Zytosol) keine Unterschiede zwischen *VLCAD*^{-/-}- und Wildtyp-Maus gezeigt [69]. Diese Ergebnisse sind kongruent zu den Ergebnissen der Untersuchungen von *Ngal*, *KIM-1* und *Ho-1*, die allesamt als Marker für einen Nierenschaden untersucht wurden und

Zeichen einer chronischen Nierenschädigung ausschließen [69]. Ngal (Lipocalin 2) ist ein unspezifischer, aber sensitiver Marker für Ischämie im Nierengewebe. Akutes Nierenversagen kann zu einer vermehrten Expression von Lipocalin 2 RNA in Nieren führen [61]. KIM-1 ist ein Typ 1 transmembranes Glykoprotein, welches nach toxischen oder ischämischen Schäden in entdifferenzierten Nierenepithelzellen der proximalen Tubuli exprimiert wird [75]. Han et al. zeigten erhöhte Genexpressionsraten von HAVCR1, dem Gen, welches für KIM-1 kodiert, bei Ratten in proximalen Tubuli im postischämischen Zustand. HAVCR1 RNA konnte nicht in gesundem Nierengewebe nachgewiesen werden [63]. Demzufolge gilt KIM-1 als Biomarker für eine chronische Schädigung der Nieren [62]. Im Urin und Serum gemessene Konzentrationen von Lipocalin 2 und KIM-1 werden im klinischen Bereich unter anderem als Biomarker für vorliegende Nephrotoxizität genutzt [76]. Ho-1 ist ein Enzym, welches bei Vorliegen von oxidativem Stress vermehrt exprimiert wird, um die Zelle vor diesem oxidativem Stress zu schützen [59, 60].

In der Literatur finden sich bei Patienten mit einem VLCAD-Mangel keine Hinweise auf einen nephrologischen Phänotyp, wobei in der Vergangenheit, bevor der VLCAD-Mangel als Zielkrankheit in das erweiterte Neugeborenen Screening aufgenommen wurde, viele Patienten bereits im Kindesalter verstorben sind. In der Literatur sind jedoch zwei Fälle von akutem, myoglobinurischem Nierenversagen bei VLCAD-defizienten Patienten beschrieben worden [77]. In beiden Fällen wurde das akute Nierenversagen nach moderater körperlicher Anstrengung diagnostiziert und war auf eine Rhabdomyolyse zurückzuführen. In der vorliegenden Studie konnten wir zeigen, dass in Abwesenheit von Rhabdomyolyse die Nieren bei VLCAD^{-/-}-Mäusen klinisch nicht von einem akuten Nierenversagen betroffen waren. Allerdings induzierte ein 24 stündiges Fasten unabhängig vom Genotyp eine Induktion von HMOX1, dem korrespondierenden Gen für Ho-1. Dieses deutet für eine Zunahme von oxidativem Stress nach Fasten auch in der Niere hin [69]. Das Ausdauertraining über 2 Wochen induzierte ebenfalls in beiden Genotypen eine gesteigerte Expressionsrate von HMOX1, was auf einen toxischen oder ischämischen Schaden in den Nierenepithelien der proximalen Tubuli hinweist [69].

Da katabole Situationen wie sportliche Aktivität und Fasten nicht nur in oxidativen Stress, sondern auch in gesteigerter Lipolyse und somit in einer reversiblen Lipidakkumulation in der Leber resultieren [42], wurden ebenfalls Marker für die Lipogenese auf RNA-Ebene in Nierengewebe untersucht. SREBP1c ist ein Regulator für die Lipidhomöostase, die Biosynthese von Fettsäuren und den Glukosemetabolismus [64]. ACC1 α und FASN kodieren für Gene der *de novo* Synthese und Elongation von Fettsäuren. Ihre Expressionsraten auf mRNA Ebene sind direkt proportional zur Triacylglycerid-Akkumulation in den Nieren [65].

Obwohl VLCAD^{-/-}-Mäuse bereits nach 24 Stunden Fasten eine Hepatosteatosis entwickeln, zeigten unsere Untersuchungen keine verstärkte Fettspeicherung in der Niere unter Ruhebedingungen. Hier kam es stattdessen zu einer starken Herabsetzung der Gene für die Lipogenese bei den VLCAD^{-/-}-Mäusen [69]. Gleichzeitig stehen diese Daten im Widerspruch zu den publizierten Daten des diätinduzierten Fettleibigkeits-

Mausmodells [65, 69]. Hier wird ein Zusammenhang zwischen Fettleibigkeit und Hepatosteatosis sowie Glomerulosklerose beschrieben. Diese Glomerulosklerose geht unter anderem mit einer Hochregulierung von SREBP1c und den Zielgenen von SREBP1c einher [65]. Entsprechende Ergebnisse finden sich lediglich bei einjährigen VLCAD^{-/-}-Mäusen sowie der Mausgruppe nach 24 Stunden Fasten unter Kontrolldiät. Bei diesen beiden Mausgruppen konnten wir einen signifikanten Unterschied, allerdings ohne physiologische Relevanz, zwischen VLCAD^{-/-}-Mäusen und Wildtypen darstellen. Frühere Untersuchungen konnten ebenfalls zeigen, dass eine fettmodifizierte Diät die Lipogenese induziert und dadurch die Plasmakonzentration von langkettigen Fettsäuren erhöht wird [66, 78]. Dies steht im Einklang zu den hier dargestellten Ergebnissen.

4.4 Therapieeffekte

Ein wichtiges Therapieziel beim VLCAD-Mangel ist die Vermeidung kataboler Stoffwechsellagen. Zusätzlich ist eine fettreduzierte und fettmodifizierte Diät Bestandteil der Therapie. Diese Fettmodifikation beinhaltet unter anderem die Anreicherung der Nahrung mit mittelkettigen Triglyceriden. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine Therapie vor allem in Form von Bolusgaben mit mittelkettigen Triglyceriden unmittelbar vor körperlicher Aktivität die kardialen und muskulären Symptome reduzieren konnten [79]. Im Rahmen einer Langzeittherapie mit fettmodifizierter Diät kann sich eine hypertrophe Kardiomyopathie komplett zurückbilden [80]. Die langfristige Gabe von MCT über den aktuellen Energiebedarf hinaus führt allerdings, wie Tucci et al. am VLCAD^{-/-}-Mausmodell zeigen konnten, zu einer Aggravation der hepatischen und auch kardialen Symptome [42]. Mittelkettige Triglyceride induzieren die Oxidation von freien Fettsäuren über AOX. Das wiederum fördert die Bildung von freien Radikalen und kann somit in einer Leberschädigung münden [81, 82]. Dieser Prozess wird verstärkt durch zusätzliches Fasten. Unsere Untersuchungen der Nieren konnten keinen oxidativen Stress oder ein akutes Nierenversagen im Rahmen der fettmodifizierten Diät nachweisen. Jedoch zeigten die Ergebnisse auch, dass eine fettmodifizierte Diät bei Vorliegen eines VLCAD-Mangels keinen Einfluss auf den Energiestoffwechsel der Nieren hat.

5 Schlussfolgerung

In dieser Studie konnten wir zeigen, dass die Nieren der VLCAD^{-/-}-Maus die vorhandene Fettsäureoxidationsstörung kompensieren kann [69]. Das Nierengewebe ändert bei Vorliegen eines VLCAD-Mangels seine Energieversorgung in Richtung Glykolyse; die verstärkte Glykogen Nutzung wirkt protektiv und der Energiebedarf kann so komplett gedeckt werden. Insbesondere auch nach Ausdauertraining findet ein *Substrat-Switch* statt. [69]

Parallel zu Untersuchungen anderer Organe zeigte sich in den Nieren eine verstärkte Akkumulation von Acylcarnitinen aufgrund einer fehlerhaften Oxidation der Fettsäuren, dessen Auswirkungen im Langzeitverlauf noch unklar sind. Insgesamt spielt die Glukoneogenese in der Niere eine große Rolle, um den Gesamtorganismus, insbesondere bei Vorliegen einer Fettsäureoxidationsstörung, mit Glukose zu versorgen. Trotz niedrigerer C16-CoA Oxidationsrate, zeigen die VLCAD^{-/-}-Mäuse keine Hinweise auf oxidativen Stress oder Hinweise auf ein Nierenversagen, auch nicht in kataboler Stoffwechsellage. Fasten führt in der Niere im Gegensatz zur Leber zu keiner Lipidakkumulation. Die Lipogenese ist nicht induziert. [69]

Zusammenfassend zeigen die hier erhobenen Daten, dass in den Nieren bei Vorliegen eines VLCAD-Mangels zwar eine insuffiziente Energiebereitstellung durch Fettsäuren vorliegt, welche auch funktionell abbildbar ist, ein Energiemangel kann aber kompensiert werden. Gleichzeitig fand sich eine Akkumulation langkettiger Fettsäurenmetabolite, deren langfristige Auswirkungen weiterhin unbekannt bleiben. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Nieren im Rahmen von Ausdauertraining eine deutlich gesteigerte Glukoneogenese aufweisen, um den Organismus mit Glukose zu versorgen. VLCAD^{-/-}-Mäuse entwickeln keinen nephrologischen Phänotyp; auch nicht mit steigendem Lebensalter. [69]

Die Untersuchung der Mitochondrien Morphologie wird zukünftig weitere Hinweise liefern, welche Rolle die VLCAD-Defizienz für den Energiehaushalt der Niere spielt. Auch weitere Untersuchungen an Nierenzellen von Patienten müssen folgen, um die Relevanz der Befunde im Mausmodell zu festigen.

6 Literaturverzeichnis

1. Matsubara, Y., et al., *Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNAs encoding the precursors of rat long chain acyl-coenzyme A, short chain acyl-coenzyme A, and isovaleryl-coenzyme A dehydrogenases. Sequence homology of four enzymes of the acyl-CoA dehydrogenase family.* J Biol Chem, 1989. **264**(27): p. 16321-31.
2. Spiekerkoetter, U., *Störung der Fettsäurenoxidation.* Monatsschrift Kinderheilkunde, 2006(12).
3. Stryer, L., *Biochemie.* Vol. 3. Auflage. 1990, Heidelberg: Spektrum der Wissenschaft mbH.
4. Gregersen, N., et al., *Mutation analysis in mitochondrial fatty acid oxidation defects: Exemplified by acyl-CoA dehydrogenase deficiencies, with special focus on genotype-phenotype relationship.* Hum Mutat, 2001. **18**(3): p. 169-89.
5. Rinaldo, P., D. Matern, and M.J. Bennett, *Fatty acid oxidation disorders.* Annu Rev Physiol, 2002. **64**: p. 477-502.
6. Arnold, G.L., et al., *A Delphi clinical practice protocol for the management of very long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency.* Mol Genet Metab, 2009. **96**(3): p. 85-90.
7. Lindner, M., G.F. Hoffmann, and D. Matern, *Newborn screening for disorders of fatty-acid oxidation: experience and recommendations from an expert meeting.* J Inherit Metab Dis, 2010. **33**(5): p. 521-6.
8. Spiekerkoetter, U., et al., *MS/MS-based newborn and family screening detects asymptomatic patients with very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency.* J Pediatr, 2003. **143**(3): p. 335-42.
9. Wilcken, B., et al., *Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry.* N Engl J Med, 2003. **348**(23): p. 2304-12.
10. Mathur, A., et al., *Molecular heterogeneity in very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency causing pediatric cardiomyopathy and sudden death.* Circulation, 1999. **99**(10): p. 1337-43.
11. Andresen, B.S., et al., *Clear correlation of genotype with disease phenotype in very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency.* Am J Hum Genet, 1999. **64**(2): p. 479-94.
12. Evans, M., et al., *VLCAD deficiency: Follow-up and outcome of patients diagnosed through newborn screening in Victoria.* Mol Genet Metab, 2016. **118**(4): p. 282-7.
13. Spiekerkoetter, U., et al., *Management and outcome in 75 individuals with long-chain fatty acid oxidation defects: results from a workshop.* J Inherit Metab Dis, 2009. **32**(4): p. 488-97.
14. Laforet, P., et al., *Diagnostic assessment and long-term follow-up of 13 patients with Very Long-Chain Acyl-Coenzyme A dehydrogenase (VLCAD) deficiency.* Neuromuscul Disord, 2009. **19**(5): p. 324-9.
15. Millington, D.S., et al., *Tandem mass spectrometry: a new method for acylcarnitine profiling with potential for neonatal screening for inborn errors of metabolism.* J Inherit Metab Dis, 1990. **13**(3): p. 321-4.
16. Zschocke, J. and G.F. Hoffmann, *Vademecum Metabolicum; Diagnose und Therapie erblicher Stoffwechselkrankheiten.* Vol. 3. Auflage. 2004: Milupa Schattauer.
17. Spiekerkoetter, U., et al., *Treatment recommendations in long-chain fatty acid oxidation defects: consensus from a workshop.* J Inherit Metab Dis, 2009. **32**(4): p. 498-505.
18. Spiekerkoetter, U., *Effects of a fat load and exercise on asymptomatic VLCAD deficiency.* J Inherit Metab Dis, 2007. **30**(3): p. 405.
19. Primassin, S., et al., *Carnitine supplementation induces acylcarnitine production in tissues of very long-chain acyl-CoA dehydrogenase-deficient mice, without replenishing low free carnitine.* Pediatr Res, 2008. **63**(6): p. 632-7.

20. Liebig, M., et al., *Carnitine supplementation induces long-chain acylcarnitine production--studies in the VLCAD-deficient mouse*. J Inherit Metab Dis, 2006. **29**(2-3): p. 343-4.
21. Exil, V.J., et al., *Very-long-chain acyl-coenzyme a dehydrogenase deficiency in mice*. Circ Res, 2003. **93**(5): p. 448-55.
22. Cox, K.B., et al., *Gestational, pathologic and biochemical differences between very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency and long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in the mouse*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(19): p. 2069-77.
23. Schuler, A.M. and P.A. Wood, *Mouse models for disorders of mitochondrial fatty acid beta-oxidation*. Ilar j, 2002. **43**(2): p. 57-65.
24. Maher, A.C., et al., *Low expression of long-chain acyl-CoA dehydrogenase in human skeletal muscle*. Mol Genet Metab, 2010. **100**(2): p. 163-7.
25. Goetzman, E.S., et al., *Long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency as a cause of pulmonary surfactant dysfunction*. J Biol Chem, 2014. **289**(15): p. 10668-79.
26. Kurtz, D.M., et al., *Targeted disruption of mouse long-chain acyl-CoA dehydrogenase gene reveals crucial roles for fatty acid oxidation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(26): p. 15592-7.
27. Spiekerkoetter, U. and P.A. Wood, *Mitochondrial fatty acid oxidation disorders: pathophysiological studies in mouse models*. J Inherit Metab Dis, 2010. **33**(5): p. 539-46.
28. Chegary, M., et al., *Mitochondrial long chain fatty acid beta-oxidation in man and mouse*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1791**(8): p. 806-15.
29. Spiekerkoetter, U., et al., *Tissue carnitine homeostasis in very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase-deficient mice*. Pediatr Res, 2005. **57**(6): p. 760-4.
30. Tucci, S., et al., *Development and pathomechanisms of cardiomyopathy in very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficient (VLCAD(-/-)) mice*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1842**(5): p. 677-85.
31. Guerra, C., et al., *Abnormal nonshivering thermogenesis in mice with inherited defects of fatty acid oxidation*. J Clin Invest, 1998. **102**(9): p. 1724-31.
32. Xiong, D., et al., *Cardiac-specific VLCAD deficiency induces dilated cardiomyopathy and cold intolerance*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2014. **306**(3): p. H326-38.
33. Spiekerkoetter, U., et al., *Evidence for impaired gluconeogenesis in very long-chain acyl-CoA dehydrogenase-deficient mice*. Horm Metab Res, 2006. **38**(10): p. 625-30.
34. Spiekerkoetter, U., et al., *Changes in blood carnitine and acylcarnitine profiles of very long-chain acyl-CoA dehydrogenase-deficient mice subjected to stress*. Eur J Clin Invest, 2004. **34**(3): p. 191-6.
35. Exil, V.J., et al., *Abnormal mitochondrial bioenergetics and heart rate dysfunction in mice lacking very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(3): p. H1289-97.
36. Stumvoll, M., et al., *Renal glucose production and utilization: new aspects in humans*. Diabetologia, 1997. **40**(7): p. 749-57.
37. Klinke, et al., *Physiologie*. Vol. 6. Auflage.
38. Schmidt, R.F., F. Lang, and M. Hackmann, *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. Vol. 31. Auflage.
39. Chung, S.W. and M.A. Perrella, *Role of HO-1 in renoprotection: location, location, location*. Kidney Int, 2004. **65**(5): p. 1968-9.
40. Primassin, S., S. Tucci, and U. Spiekerkoetter, *Hepatic and muscular effects of different dietary fat content in VLCAD deficient mice*. Mol Genet Metab, 2011. **104**(4): p. 546-51.
41. ter Veld, F., et al., *Corresponding increase in long-chain acyl-CoA and acylcarnitine after exercise in muscle from VLCAD mice*. J Lipid Res, 2009. **50**(8): p. 1556-62.
42. Tucci, S., S. Primassin, and U. Spiekerkoetter, *Fasting-induced oxidative stress in very long chain acyl-CoA dehydrogenase-deficient mice*. Febs j, 2010. **277**(22): p. 4699-708.

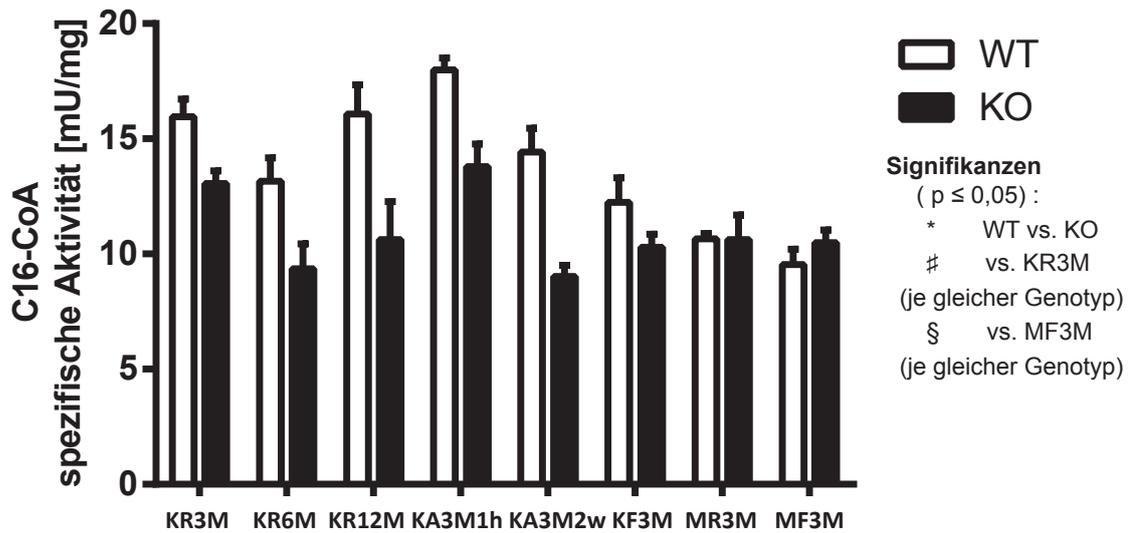
43. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
44. Mohanty, J.G., et al., *A highly sensitive fluorescent micro-assay of H2O2 release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative*. J Immunol Methods, 1997. **202**(2): p. 133-41.
45. Zhou, M., et al., *A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases*. Anal Biochem, 1997. **253**(2): p. 162-8.
46. Milder, J.B., L.P. Liang, and M. Patel, *Acute oxidative stress and systemic Nrf2 activation by the ketogenic diet*. Neurobiol Dis, 2010. **40**(1): p. 238-44.
47. Xu, J. and A.K. Jaiswal, *NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) competes with 20S proteasome for binding with C/EBPalpha leading to its stabilization and protection against radiation-induced myeloproliferative disease*. J Biol Chem, 2012. **287**(50): p. 41608-18.
48. Mantha, S.V., et al., *Antioxidant enzymes in hypercholesterolemia and effects of vitamin E in rabbits*. Atherosclerosis, 1993. **101**(2): p. 135-44.
49. Lawrence, R.A. and R.F. Burk, *Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver*. 1976. Biochem Biophys Res Commun, 2012. **425**(3): p. 503-9.
50. Pessayre, D., A. Mansouri, and B. Fromenty, *Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. V. Mitochondrial dysfunction in steatohepatitis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002. **282**(2): p. G193-9.
51. Schafer, C., et al., *Osmotic regulation of betaine homocysteine-S-methyltransferase expression in H4IIE rat hepatoma cells*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **292**(4): p. G1089-98.
52. van Vlies, N., R.J. Wanders, and F.M. Vaz, *Measurement of carnitine biosynthesis enzyme activities by tandem mass spectrometry: differences between the mouse and the rat*. Anal Biochem, 2006. **354**(1): p. 132-9.
53. Systems, B., *EnzyChrom™ Glycogen Assay Kit (Cat# E2GN-100) Quantitative Colorimetric/Fluorimetric Glycogen Determination*, in [https://www.bioassaysys.com/NAD-NADH-Assay-Kit-\(E2ND-100\).html](https://www.bioassaysys.com/NAD-NADH-Assay-Kit-(E2ND-100).html), B. Systems, Editor. 2008. p. 1.
54. NCBI. *PPARGC1A PPARG coactivator 1 alpha [Homo sapiens (human)]* [web page] 2016 20-Aug-2016 [cited 2016 29-Aug-2016]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10891>
55. NCBI. *Ppargc1a peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha [Mus musculus (house mouse)]* 2016 25-Aug-2016 [cited 2016 29-Aug-2016]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/19017>.
56. NCBI. *PDK4 pyruvate dehydrogenase kinase 4 [Homo sapiens (human)]*. 2016 8-Aug-2016 [cited 2016 29-Aug-2016]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5166>.
57. NCBI. *PDHX pyruvate dehydrogenase complex component X [Homo sapiens (human)]* 2016 25-Aug-2016 [cited 2016 29-Aug-2016]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8050>.
58. Handschin, C. and B.M. Spiegelman, *The role of exercise and PGC1alpha in inflammation and chronic disease*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 463-9.
59. Maines, M.D., *The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1997. **37**: p. 517-54.
60. Morse, D. and A.M. Choi, *Heme oxygenase-1: the "emerging molecule" has arrived*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2002. **27**(1): p. 8-16.
61. Chakraborty, S., et al., *The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1826**(1): p. 129-69.

62. Huo, W., et al., *Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a novel kidney-specific injury molecule playing potential double-edged functions in kidney injury*. *Transplant Rev (Orlando)*, 2010. **24**(3): p. 143-6.
63. Han, W.K., et al., *Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury*. *Kidney Int*, 2002. **62**(1): p. 237-44.
64. Strable, M.S. and J.M. Ntambi, *Genetic control of de novo lipogenesis: role in diet-induced obesity*. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2010. **45**(3): p. 199-214.
65. Jiang, T., et al., *Diet-induced obesity in C57BL/6J mice causes increased renal lipid accumulation and glomerulosclerosis via a sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent pathway*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(37): p. 32317-25.
66. Tucci, S., et al., *Medium-chain triglycerides impair lipid metabolism and induce hepatic steatosis in very long-chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD)-deficient mice*. *Mol Genet Metab*, 2010. **101**(1): p. 40-7.
67. Tucci, S., et al., *Tissue-specific strategies of the very-long chain acyl-CoA dehydrogenase-deficient (VLCAD^{-/-}) mouse to compensate a defective fatty acid beta-oxidation*. *PLoS One*, 2012. **7**(9): p. e45429.
68. Tucci, S., et al., *Mitochondrial fatty acid biosynthesis and muscle fiber plasticity in very long-chain acyl-CoA dehydrogenase-deficient mice*. *FEBS Lett*, 2018. **592**(2): p. 219-232.
69. Tucci, S., et al., *Renal response to short- and long-term exercise in very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase-deficient (VLCAD^{-/-}) mice*. *Mol Cell Pediatr*, 2014. **1**(1): p. 5.
70. Hirschey, M.D., et al., *SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation*. *Nature*, 2010. **464**(7285): p. 121-5.
71. Krebs, H.A., *RENAL GLUCONEOGENESIS*. *Adv Enzyme Regul*, 1963. **1**: p. 385-400.
72. Meyer, C., et al., *Renal substrate exchange and gluconeogenesis in normal postabsorptive humans*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002. **282**(2): p. E428-34.
73. Ekberg, K., et al., *Contributions by kidney and liver to glucose production in the postabsorptive state and after 60 h of fasting*. *Diabetes*, 1999. **48**(2): p. 292-8.
74. Tucci, S., et al., *Disrupted fat distribution and composition due to medium-chain triglycerides in mice with a beta-oxidation defect*. *Am J Clin Nutr*, 2011. **94**(2): p. 439-49.
75. Bailly, V., et al., *Shedding of kidney injury molecule-1, a putative adhesion protein involved in renal regeneration*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(42): p. 39739-48.
76. Waring, W.S. and A. Moonie, *Earlier recognition of nephrotoxicity using novel biomarkers of acute kidney injury*. *Clin Toxicol (Phila)*, 2011. **49**(8): p. 720-8.
77. Cairns, A.P., et al., *Very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency--a new cause of myoglobinuric acute renal failure*. *Nephrol Dial Transplant*, 2000. **15**(8): p. 1232-4.
78. Jones, P.M., et al., *Medium-chain fatty acids undergo elongation before beta-oxidation in fibroblasts*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **346**(1): p. 193-7.
79. Roe, C.R., et al., *Treatment of cardiomyopathy and rhabdomyolysis in long-chain fat oxidation disorders using an anaplerotic odd-chain triglyceride*. *J Clin Invest*, 2002. **110**(2): p. 259-69.
80. Pervaiz, M.A., et al., *MCT oil-based diet reverses hypertrophic cardiomyopathy in a patient with very long chain acyl-coA dehydrogenase deficiency*. *Indian J Hum Genet*, 2011. **17**(1): p. 29-32.
81. Hardwick, J.P., et al., *PPAR/RXR Regulation of Fatty Acid Metabolism and Fatty Acid omega-Hydroxylase (CYP4) Isozymes: Implications for Prevention of Lipotoxicity in Fatty Liver Disease*. *PPAR Res*, 2009. **2009**: p. 952734.
82. Rao, M.S. and J.K. Reddy, *PPARalpha in the pathogenesis of fatty liver disease*. *Hepatology*, 2004. **40**(4): p. 783-6.

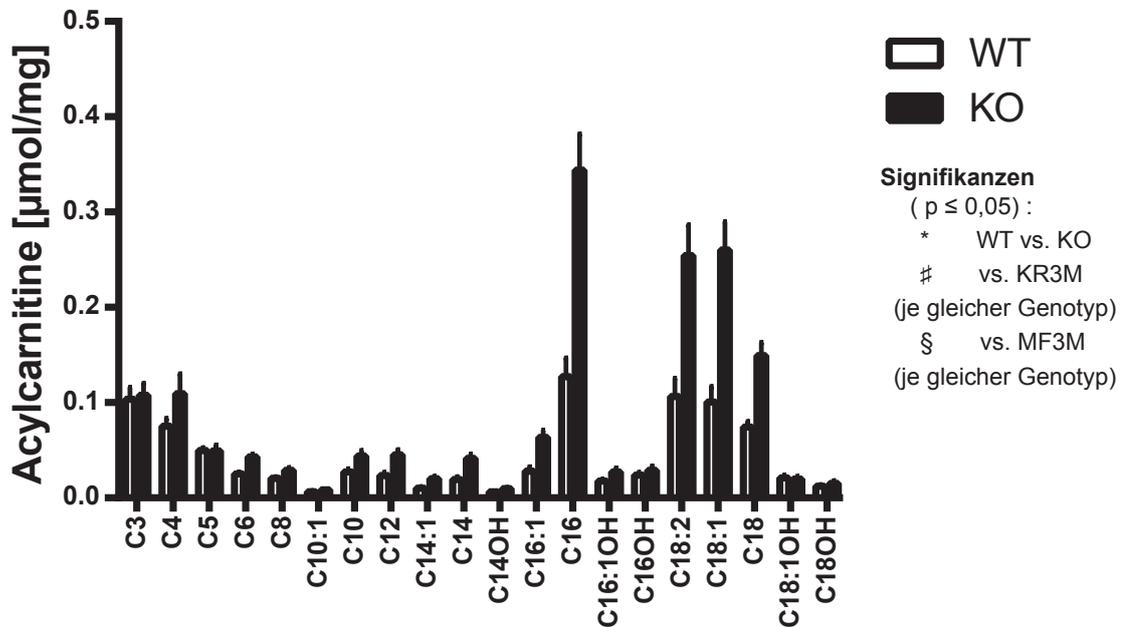
7 Anhang

7.1 Zusätzliche Grafiken

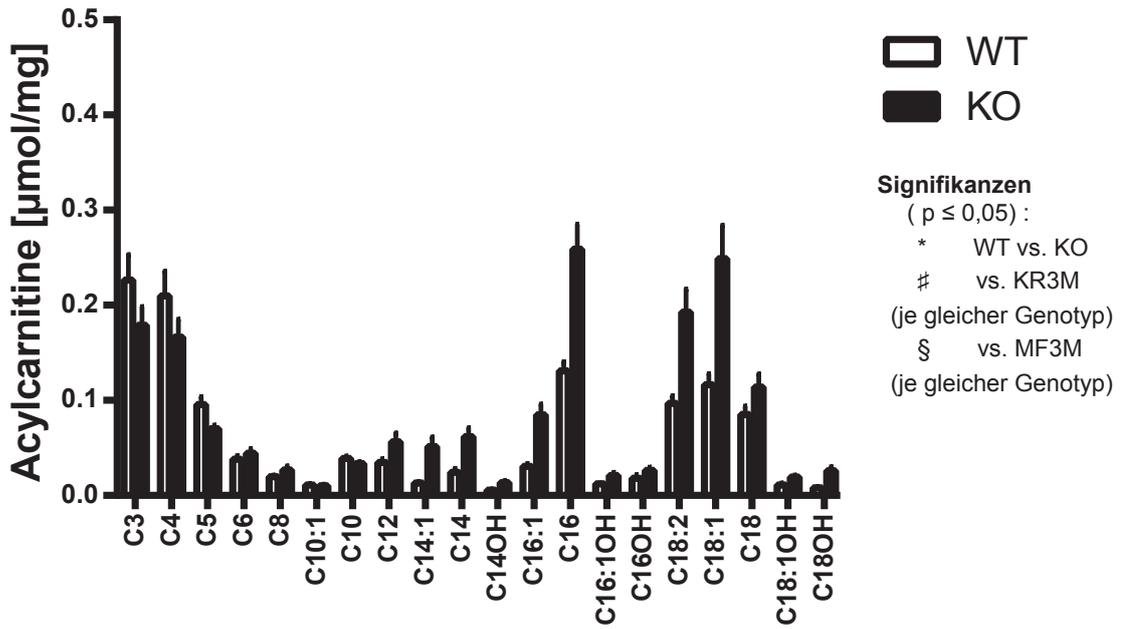
C16-CoA Aktivität



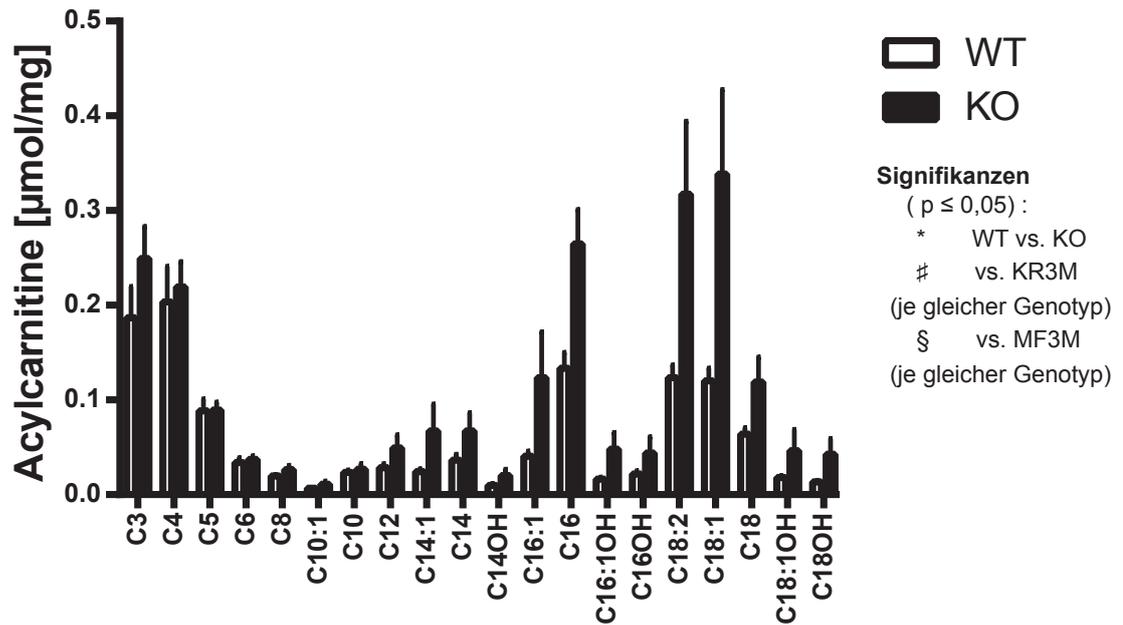
KR3M



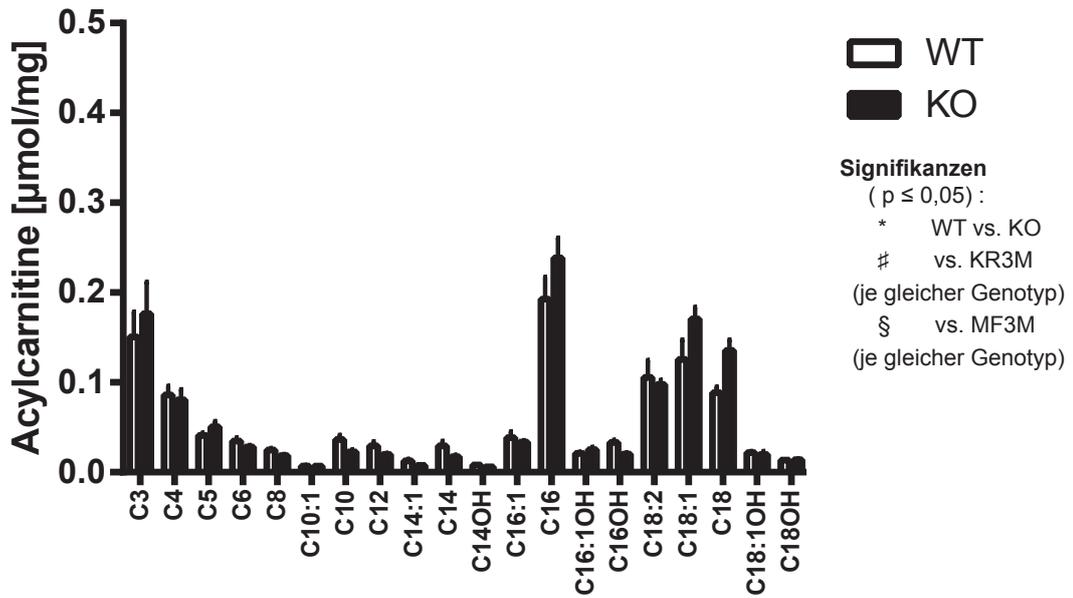
KR6M



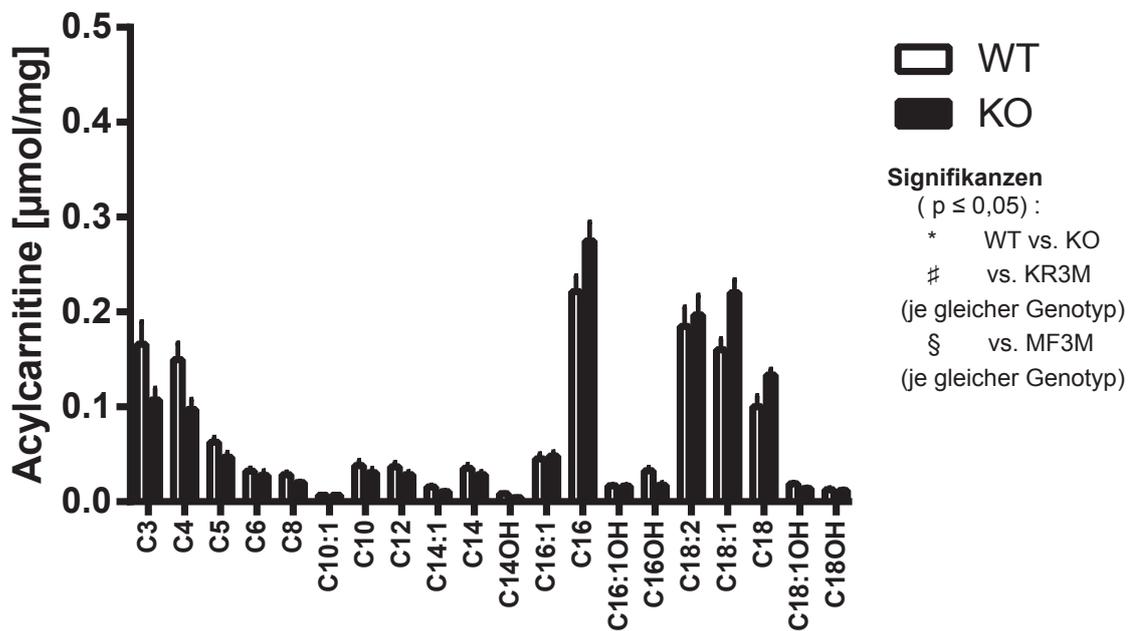
KR12M



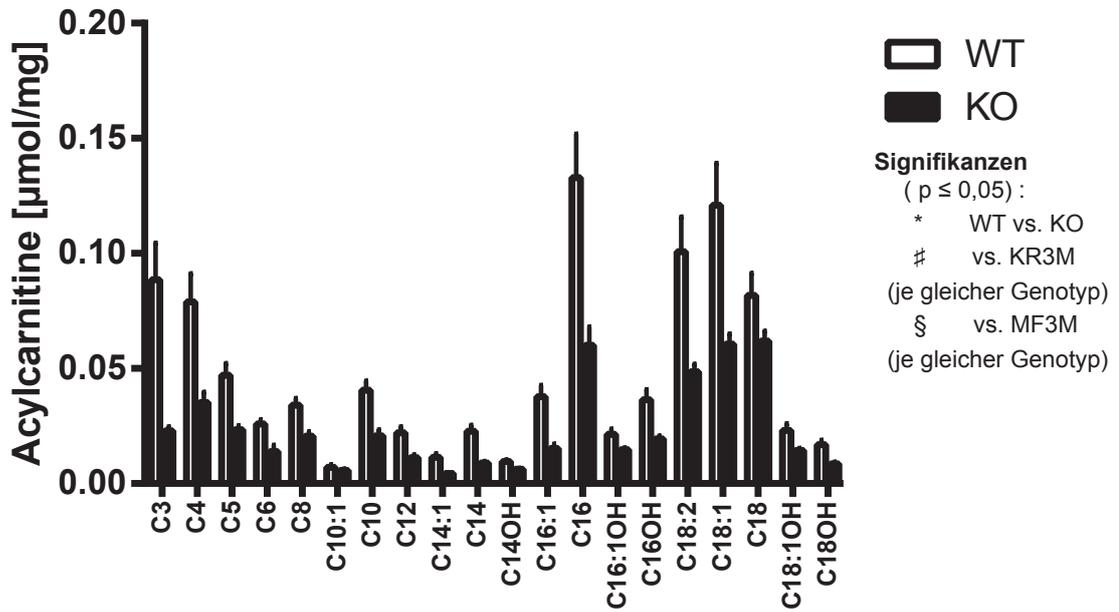
KA3M1h



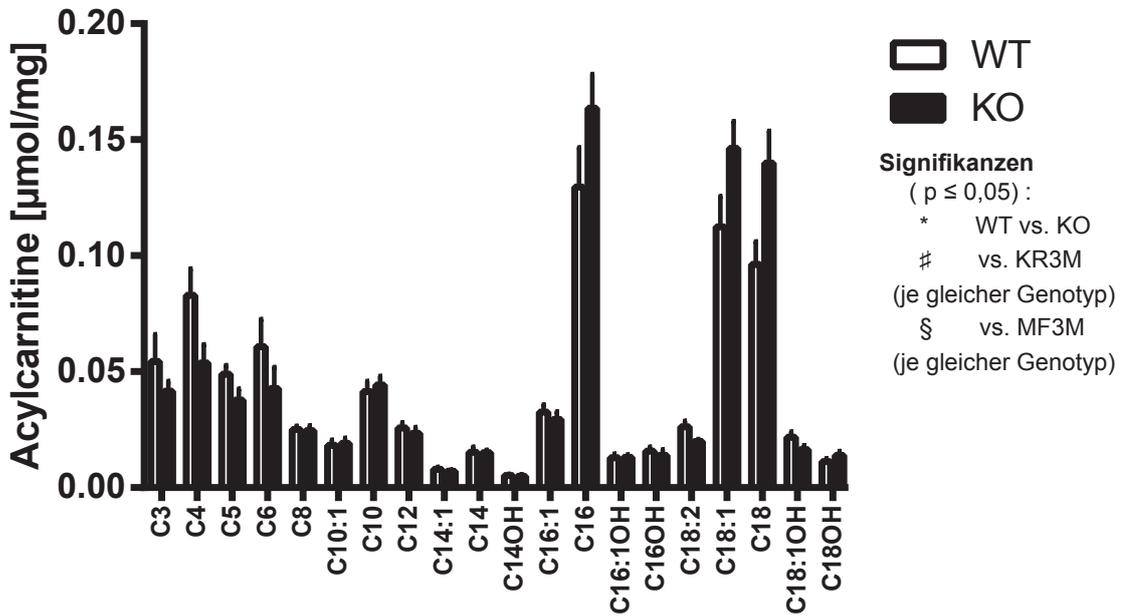
KA3M2w



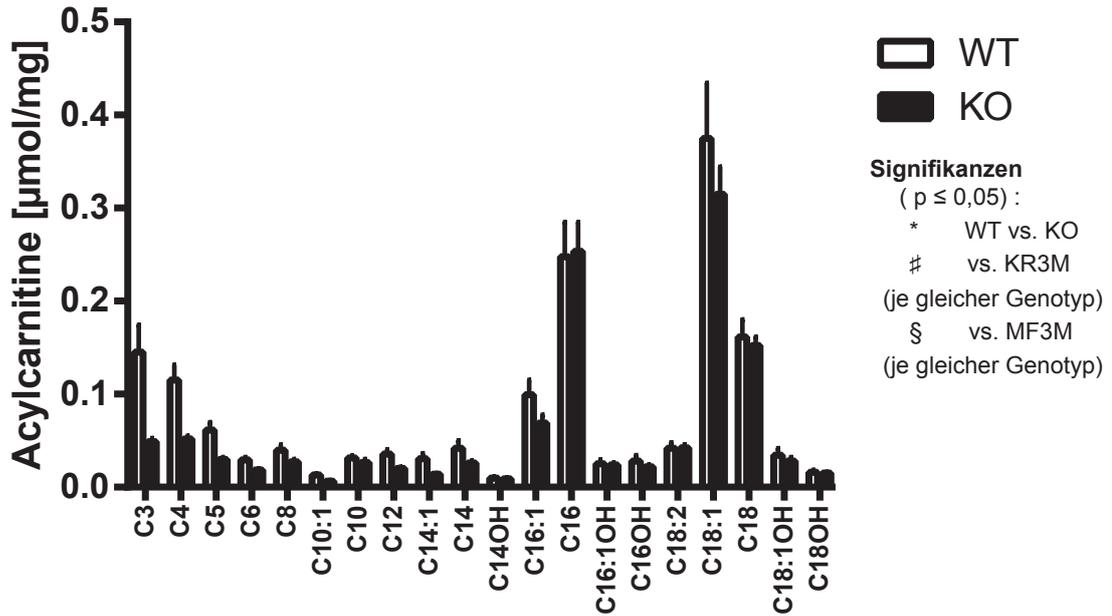
KF3M



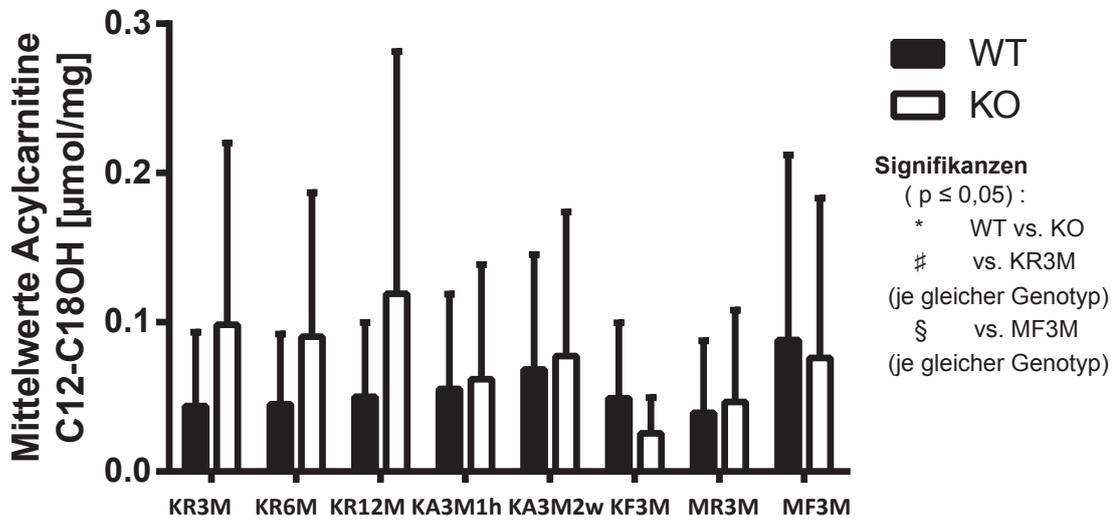
MR3M



MF3M



Acylcarnitin Mittelwerte



7.2 Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Frau Prof. Spiekerkötter, ärztliche Direktorin der Klinik für Allgemeine Kinder- und Jugendmedizin der Universitätsklinik Freiburg - bis Oktober 2012 Leiterin des Bereichs Pädiatrische Stoffwechselstörungen der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf - für die Möglichkeit bedanken, dieses spannende Thema unter Ihrer Leitung bearbeiten zu können. Neben der Bereitstellung eines Arbeitsplatzes bin ich über die gute Integration in das Thema und die stets hilfreichen und freundlichen Gespräche sehr dankbar. Ihre allzeit konstruktiven Vorschläge und Kritiken haben mich stets voran gebracht.

Zudem danke ich Frau Prof. Dr. Keitel-Anselmino von der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Universitätsklinik Düsseldorf für die freundliche und konstruktive Übernahme des Koreferats.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau PD. Dr. rer. nat. Sara Tucci für eine herausragende Betreuung und eine ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Deine stets geduldige und aufmunternde Art haben diese Arbeit mögliche gemacht. Ich bin Dir sehr verbunden, das du mich ins Stoffwechsellabor eingeführt hast sowie mir Deine Arbeitsweisen gezeigt und beigebracht hast. Ich konnte mich stets auf deine konstruktive Kritik in Düsseldorf, wie auf die vielen Telefonate und E-Mails aus Freiburg in den vergangenen Jahren verlassen. Danke für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens.

Außerdem möchte ich mich bei der Arbeitsgemeinschaft Spiekerkötter an der Universitätsklinik Düsseldorf für die angenehme Arbeitsatmosphäre und stete Hilfsbereitschaft bedanken. Insbesondere danke ich Dr. rer. nat. D. Herebian für die Durchführung der Messungen am Tandem Massenspektrometer.

Und zu guter Letzt gilt mein Dank meinen wunderbaren Eltern. Ohne Euch wäre mein ganzes Studium und erst recht diese Arbeit nicht möglich gewesen. Danke für Eure immerwährenden Motivationsreden, lieben Worte, Eure Geduld und die Korrekturvorschläge. Danke auch Dir lieber Max für Dein immer offenes Ohr und Deine lieben Worte. Ihr habt einen großen Teil daran, das ich die Arbeit so fertig stellen konnte.