

Aus der Klinik für Nephrologie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. L. C. Rump

Differentielle Proteomanalyse der Niere mittels 2D-Gelelektrophorese
und
Untersuchung des glomerulären Proteoms in einem Mausmodell der
chronischen Niereninsuffizienz

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin

Der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sebastian Alexander Potthoff

2010

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

Gez: Univ.-Prof. Dr. med. J. Windolf

Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. L. C. Rump

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. M. Schott

Widmung

Diese Dissertation ist meiner Mutter, Frau Karola Potthoff, gewidmet.

In Gedenken an meinen Vater, Herrn Prof. Dr. med. Peter Christian Potthoff.

1 Inhaltsverzeichnis

<u>1 Inhaltsverzeichnis</u>	<u>IV</u>
<u>2 Liste der Abkürzungen</u>	<u>VIII</u>
<u>3 Einleitung</u>	<u>1</u>
<u>4 Methoden</u>	<u>5</u>
4.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung	5
4.2 Schein-Operation und subtotale Nephrektomie	6
4.3 Stoffwechselkäfige / Sammelurin	7
4.4 Blutdruckmessung	7
4.5 Glomeruliextraktion mittels isoliert-perfundierter Mäuseniere	8
4.5.1 Vorbereitung	8
4.5.2 Isoliert-perfundierte Mäuseniere	8
4.5.3 Gewebeaufbereitung und Isolierung der Glomeruli	9
4.6 Interner Standard für die differentielle Proteinanalyse und Protein-Identifizierung	11
4.6.1 Interner Standard – Versuche SNx vs. Sham	11
4.6.2 Interner Standard – Versuche zur Etablierung glomerulärer Proteinanalyse	12
4.7 Quantitative Albuminbestimmung im Serum	12
4.8 Quantitative Kreatininbestimmung im Serum/Urin	12
4.9 Quantitative Harnstoffbestimmung Serum	13
4.10 Albuminbestimmung im Urin	14
4.11 Lasermikrodissektion	14
4.12 Differenzielle 2D-Gelelektrophorese	15
4.12.1 Proteinmarkierung	15
4.12.2 2D-Gelelektrophorese	16
4.12.3 Bildakquisition und -analyse	16
4.12.4 In-Gel Verdau und Proteinidentifizierung mittels nanoLC-ESI-MS/MS	16

4.13	Immunhistochemie	17
	4.13.1 Paraffinschnitte	17
	4.13.2 Immunhistochemie	18
	4.13.3 Immunhistologischer Nachweis proliferierender Zellen mittels BrdU	18
4.14	RNA-Extraktion aus Glomeruli	19
4.15	Reverse Transkription – cDNA	19
4.16	Real-Time-PCR (qPCR) / PCR	20
	4.16.1 Primer	20
4.17	Glomeruligröße	20
4.18	Statistische Auswertung	21
<u>5 Ergebnisse</u>		<u>22</u>
5.1	Mausmodell	22
	5.1.1 Physiologische Parameter	22
	5.1.2 Größenzunahme Glomeruli	24
	5.1.3 Proliferation – Nachweis mittels Immunfluoreszenzhistologie BrdU	25
5.2	Etablierung der glomerulären Proteinanalyse	25
	5.2.1 2D-Gelelektrophorese von glomerulärem Protein nach Magnetpartikel-Extraktion	25
	5.2.2 Identifizierung differentiell exprimierter Proteine aus renalem Kortex und Glomeruli (FVB-Maus)	26
	5.2.3 Isolierung von humanen Glomeruli aus kryokonservierten histologischen Schnitten durch Lasermikrodissektion	29
5.3	Differentielle Proteinexpression im Mausmodell der chronischen Niereninsuffizienz	30
	5.3.1 2-D-Gelelektrophorese des glomerulären Proteins (FVB-Maus: Sham vs. SNx)	30
	5.3.2 Identifizierung differentiell exprimierter glomerulärer Proteine (FVB-Maus: Sham vs. SNx)	31

5.4	Immunhistochemie differentiell exprimierter glomerulärer Proteine	34
5.4.1	Komplement C4	34
5.4.2	Galectin-1 (lectin, galactose binding soluble 1)	31
5.5	Real-Time-PCR (qPCR)	35
5.6	PCR-Nachweis von Meprin und Galectin-1 in Podozyten	36
6 Diskussion		37
6.1	Das Mausmodell	37
6.1.1	Voraussetzungen für ein Mausmodell	37
6.1.2	Adaptation der subtotalen Nephrektomie	38
6.1.3	Entwicklung einer chronischen Niereninsuffizienz nach subtotaler Nephrektomie im FVB-Stamm	39
6.2	Isolierung und Analyse glomerulärer Proteine	41
6.2.1	Notwendigkeit glomerulärer Proteinanalyse	41
6.2.2	Expressionsunterschiede Kortex vs. Glomerulum	43
6.2.3	Analyse minimaler Proteinmengen aus Humangewebe mittels Lasermikrodissektion	43
6.3	Differentielle glomeruläre Proteinanalyse der chronischen Niereninsuffizienz im Mausmodell	44
6.3.1	Glomeruläre Proteinanalyse	45
6.3.2	Meprin	45
6.3.3	Galectin-1	47
6.3.4	Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase 1 – DDAH 1	49
6.3.5	Komplement C4	52
6.4	Real-Time-PCR – Immunhistochemie	53
6.4.1	Real-Time-PCR (qPCR)	43
6.4.2	Immunhistochemie	54
6.5	Ausblick	54
7 Zusammenfassung		56

<u>8 Literaturverzeichnis</u>	<u>57</u>
<u>Danksagung</u>	<u>63</u>
<u>Lebenslauf</u>	<u>64</u>

2 Liste der Abkürzungen

% = Prozent

µg = Mikrogramm

µl = Mikroliter

µm = Mikrometer

µM = Mikromol

2D = zweidimensional

2D-DIGE = differentielle 2D-Gelelektrophorese

Abb. = Abbildung

ADMA = asymmetrisches Dimethylarginin (asymmetric dimethylarginine)

ADPS = N-Ethyl-N-(3-Sulphopropyl)-3-Methoxyanilin, Natriumsalz

bp = Basenpaare

BrdU = Bromdesoxyuridin

ca. = zirka

cDNA = complementary DNA

CHAPS = 3[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-Propanesulfon Säure

CT = Cycle Threshold (Zyklusschwellenwert)

Cy3 = Fluoreszenzfarbstoff CyDye

Cy5 = Fluoreszenzfarbstoff CyDye

DDAH 1= Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase 1

die = Tag

DIGE = Differential in Gel Electrophoresis

DMF = Dimethylformamid

DNA = Desoxyribonukleinsäure

dNTP = Desoxyribonukleosidtriphosphate

DTT = Dithiothreitol

EHSTP = N-Ethyl-N-(2(-Hydroxy-3-Sulfopropyl)-m-Toluidin

eNOS = endotheliale NO-Synthase

G = Erdbeschleunigung

g = Gramm

GAPDH = Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase

GFR = glomeruläre Filtrationsrate

Grp. = Gruppe

H₂O = Wasser

IEF = Isoelektrische Fokussierung

K/DOQI = Kidney Disease Outcomes Quality Initiative

kD = Kilo-Dalton

kg = Kilogramm

KG = Körpergewicht

l = Liter

LCM = Laser Capture Microdissection (Lasermikordissektion)

mg = Milligramm

min = Minute

ml = Milliliter

mm = Millimeter

mM = Millimol

mm² = Quadratmillimeter

mmHg = Millimeter Quecksilbersäule

mRNA = messenger-RNA

MW = Molekulargewicht

n = Anzahl der Versuchseinheiten (hier: Anzahl der Mäuse pro Versuchsgruppe)

N° = Nummer

NaCl = Natriumchlorid

NAD = oxidiertes Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid

NADH = reduziertes Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid

nanoLC-ESI-MS/MS = nano Liquid Chromatography elektrospray Ionisation
massspectrometry

NCBI = National Center for Biotechnology Information U.S. National Library of Medicine

NG = Nierengewicht

nm = Nanometer

nmol = Nanomol

NO = Stickstoff-Monoxid

O₂ = Sauerstoff

Oligo(dt) = Oligo (dT)-Primer

PBS = phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Natriumchloridlösung)

PCR = Polymerasekettenreaktion

qPCR = quantitative PCR

RNA = Ribonukleinsäure

RT-PCR = Reverse Transkriptase PCR

S = Serumkonzentration

SD = Standardabweichung

SDS-PAGE = sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis

Sham = scheinoperiert

SNx = subtotale Nephrektomie

t = Zeit

Tab. = Tabelle

TCEP = Tris-(2-carboxyethyl)-Phosphorwasserstoff-Hydrochlorid

Tris = Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

U = Urinkonzentration

V = Volumen

vs. = versus

3 Einleitung

Die Niere ist ein paarig angeordnetes retroperitoneal gelegenes Organ. Im Organismus übernimmt sie eine Vielzahl an Funktionen, die man grob in drei Bereiche aufteilen kann: Erstens beinhaltet dies die Exkretion harnpflichtiger Substanzen, die endogen entstehen oder exogen zugeführt und gegebenenfalls verstoffwechselt werden. Zweitens ist die Niere verantwortlich für die Aufrechterhaltung der Homöostase des Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushaltes. Drittens ist die Niere an der humoralen Regulation des Organismus beteiligt. Sie bildet das Enzym Renin im juxtaglomerulären Apparat, das eine zentrale Funktion im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System einnimmt, und damit eine wichtige Rolle in der Blutdruckregulation und im Elektrolythaushalt spielt. In der Niere wird das Hormon Erythropoetin gebildet, das über die Bindung an den Epo-Rezeptor an Stammzellen des Knochenmarks die Reifung von Erythrozyten stimuliert. Damit ist die Niere ein wichtiger Bestandteil der Blutneubildung. Mit der Hydroxylierung von Calcidiol zu Calcitriol, der aktiven Form des Vitamin D₃, durch die 1- α -Hydroxylase im Bereich der Nierentubuli kommt der Niere eine weitere wichtige humorale Funktion im Vitamin-D-Stoffwechsel und dem Calcium-Haushalt zu.

Grundlegende anatomische Einheit zur Umsetzung von Exkretion und Homöostase ist das Nephron. Dieses besteht aus einem Glomerulum und einem drainierenden tubulären System. Das Glomerulum ist die primäre Funktionseinheit des Nephrons, die für die Primärharnbildung verantwortlich ist. Es ist aus drei wesentlichen Bestandteilen aufgebaut, die die Grundlage für die Exkretionsleistung der Niere bilden. So besteht das Glomerulum aus einem Konvolut aus Kapillarschlingen, welches aus einer afferenten und einer efferenten Arteriole entspringt. Die Kapillarschlingen sind mit einem speziellen, fenestrierten Endothel ausgekleidet, das auf einer Basalmembran liegt. Dieser Basalmembran von außen aufliegend sitzen die Podozyten, deren interdigitierenden Fußfortsätze Grundlage für die podozytäre Schlitzmembran liefern. Diese Schlitzmembran überspannt den Spalt, der sich zwischen den Fußfortsätzen zweier Podozyten bildet. Zusammen mit der Basalmembran und dem fenestrierten Endothel bildet die podozytäre Schlitzmembran die glomeruläre Filtereinheit, die für die selektive Exkretion harnpflichtiger Substanzen aus dem Blutplasma verantwortlich ist. Die Ursache für die

Spezifität der Filtereinheit als auch deren genaue Mechanismen spezifischer Stofftransporte ist bisher nur unzureichend geklärt. Eingebettet sind die glomerulären Kapillarschlingen in das Mesangium. Dieses bildet mit seinen Mesangialzellen das Stützgewebe der Kapillarschlingen. Es ist darüber hinaus für die Homöostase des Glomerulum verantwortlich. Die Außenseite der von Podozyten bedeckten Kapillarschlingen grenzt an das Lumen der Bowman-Kapsel, dessen Epithel das Glomerulum umhüllt und in den proximalen Tubulus des Nephrons mündet. Afferente und efferente Arteriole liegen mit ihrem Gefäßpol einem Abschnitt der Pars recta des distalen Tubulus an, der zusammengenommen den sogenannten juxtaglomerulären Apparat bildet. Diese endokrine Struktur hochspezialisierter Zellen dient durch die Bildung des Hormonenzym Renin der Steuerung des Elektrolyt- und des Wasserhaushalts sowie des Blutdrucks.

Alle Strukturen des Glomerulums können von einer Schädigung betroffen sein. Vor allem die Schädigung von Endothel, Basalmembran und/oder Podozyten führt zu einer akuten oder chronischen Einschränkung der Filterfunktion. Dies kann zum Übertritt von Proteinen in den Primärharn führen (Proteinurie) und konsekutiv je nach Schädigungsgrad bis zum Verlust der Exkretionsleistung (Anurie) führen. Ursächlich können dabei primäre Erkrankungen der einzelnen Strukturen sein oder es kommt durch einen systemischen Prozess zur lokalen Schädigung des Glomerulums.

Die chronische Schädigung des Glomerulums geht mit einer fortschreitenden Niereninsuffizienz einher. Der Verlust von Exkretionsleistung äußert sich in einer verminderten glomerulären Filtrationsrate. Es kommt zur Retention harnpflichtiger Substanzen. Die Kreatinin-Clearance, das pro Zeiteinheit von Kreatinin befreite Plasmavolumen, dient als ein wichtiger endogener Parameter zur Beurteilung der Nierenexkretionsleistung. Der fortschreitende Verlust der Nierenfunktion geht mit einer Störung der Homöostase des Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushaltes einher, welche mit dem Grad des Funktionsverlusts korreliert.

Die Mechanismen, die zu fortschreitender glomerulärer Schädigung führen, sind bisher nur unzureichend geklärt. Ohne ein Verständnis für die pathophysiologischen und molekularbiologischen Prozesse, welche zur progredienten Nierenfunktionsverschlechterung führen, kann keine gezielte Prävention vorgenommen werden.

Grundlegende Methoden zur Analyse molekularbiologischer Prozesse sind Untersuchungen der Expression einzelner Gene oder Proteine mittels Polymerase-Kettenreaktion oder Western Blot und Antikörper-Target-Bindung. Diese Methoden sind jedoch auf einzelne Ziele limitiert. Ein umfassender Einblick in einen molekularbiologischen Zustand auf Ebenen eines physiologisch definierten Kompartiments kann auf diese Weise nicht erfolgen.

Mittels differentieller 2D-Gelelektrophorese (DIGE) ist es möglich eine Fülle von Proteinen einer definierten Probe im Vergleich zu einer anderen zu untersuchen. Die Einschränkung ein einzelnes Ziel zu untersuchen, wird zu Gunsten der differentiellen Proteinbestimmung ad acta gelegt. Die Methode ist sehr gut geeignet, um spezifische Veränderungen des Proteoms aufzudecken. Arthur et al. [1] haben in einer Pionierarbeit die Proteinexpression zwischen renaler Medulla und renalem Kortex verglichen und differentielle Expressionsmuster nachweisen können. 2005 ist es Yoshida et al. [2] gelungen mittels 2D-Gelelektrophorese das glomeruläre Proteom in humanen Gewebeproben zu beschreiben.

Ein wesentlicher Aspekt, der diese Analysetechnik beschränkt, stellt die Verfügbarkeit von Gewebematerial dar. Eine humane Niere bietet zwar per se eine große Anzahl an Glomeruli, jedoch ist in der alltäglichen medizinischen Diagnostik in der Regel nur eine geringe Probenmenge zugänglich, die zum Beispiel mittels Biopsie gewonnen werden kann. Um im medizinischen Alltag eine suffiziente, reproduzierbare glomeruläre Proteinanalyse zu ermöglichen, muss die Möglichkeit geschaffen sein, eine Analyse auch kleinster Gewebeproben zu realisieren.

Für eine systematische Untersuchung grundlegender Mechanismen ist ein robustes und reproduzierbares Modell unabdingbar. Eine humane Untersuchungspopulation ist aufgrund der unterschiedlichen Ursachen einer chronischen Niereninsuffizienz und der interindividuellen Unterschiede ungeeignet. Ein Tiermodell hat die Vorteile eines konstanten Phänotyps, einer einfachen Probengewinnung und einer reproduzierbaren Pathogenese.

Um diese beiden Voraussetzungen zu erfüllen, wird in dieser Arbeit die Entwicklung eines Mausmodells der chronischen Niereninsuffizienz mittels subtotaler Nephrektomie demonstriert und eine Methode zur differentiellen Proteomanalyse geringster Proteinmengen aus Maus- sowie aus humanen Gewebeproben etabliert. Diese Analysemethode wiederum dient im weiteren Verlauf zur differentiellen glomerulären Proteinanalyse im etablierten Tiermodell. Ziel dieser Analyse ist es, Proteine zu identifizieren, die mittelbar oder unmittelbar an den pathophysiologischen Prozessen auf molekularbiologischer Ebene der chronischen Niereninsuffizienz beteiligt sind.

4 Methoden

4.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Für alle Experimente zur Proteinanalyse wurden männliche Mäuse des Inzuchtstamms FVB, Firma *Janvier, Belgien* verwendet. (Der FVB-Stamm leitet sich von einer 1935 bestehenden Schweizer Zuchtpopulation ab. Anfang der siebziger Jahre wurde dieser Inzuchtstamm etabliert und dessen Sensitivität auf das Friend-Leukämie-Virus entdeckt, woraufhin eine Inzucht in Richtung Fv1^b-Allele erfolgte. Die Bezeichnung des Allels war Ursprung des Namens „FVB“.)

Des Weiteren wurden männliche Mäuse der Inzuchtlinie C57BL/6 (eine seit 1921 etablierte Labormauslinie) aus der institutseigenen Zucht, dessen erste Pärchen von *Charles River Deutschland GmbH* erworben wurden, verwendet. Diese Tiere dienten der Etablierung der subtotalen Nephrektomie im Mausmodell.

Aufzucht und Haltung der Tiere erfolgte entsprechend der Institutskriterien nach artgerechten, gesundheitlichen und qualitativen Kriterien in transparenten, 377 x 215 x 150 mm (Länge x Breite x Höhe) großen Polycarbonat-Käfigen mit einer Bodenfläche von 810 cm² in der Institut-eigenen Versuchstierhaltung. Die Tiere wurden bei einer Raumtemperatur von 20 – 22 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 45 % und einem Tag-Nacht-Zyklus von 12 Stunden gehalten. Als Einstreu wurde Altromin-Tiereinstreu-Granulat verwendet. Wasser und Tiernahrung standen ad libitum zur Verfügung. Als Tiernahrung kam während der Aufzucht und außerhalb des Versuchszeitraums pelletiertes Trockenfutter (Altromin 1314: 20 % Proteinanteil, 0.4 % NaCl) zum Einsatz. Ein bis maximal zwei Tage vor dem chirurgischen Eingriff sowie während des gesamten Versuchszeitraums erhielten die Versuchstiere modifiziertes Trockenfutter mit erhöhtem Protein- und Salzanteil (40 % Proteinanteil, 0.6 % NaCl), welche zu gleichen Teilen dem Kohlenhydrat- sowie Fettanteil abgezogen wurden. Sonstige Bestandteile blieben unverändert.

Im Alter von 4 Wochen wurden die Mäuse abgesetzt, nach Geschlechtern getrennt und in Gruppen von jeweils 5-6 Tieren pro Käfig unter den beschriebenen Haltungsbedingungen von den dortigen Tierpflegern aufgezogen. Lediglich männliche Tiere im Alter von 65-70 Tagen und einem Gewicht von ca. 21-26 g gingen in die Versuchsreihen ein.

4.2 Schein-Operation und subtotale Nephrektomie

Die Versuchstiere wurden im Alter von 65-70 Tagen operiert. Im Rahmen der Operation erfolgte die Verwendung eines beheizbaren Kleintier-OP-Tisches, Fadenmaterial Seide 0.5 mm, Nahtmaterial Prolene 0.2 mm, Hautdesinfektionsmittel, sterile Unterlagen, sterile Handschuhe, sterile Kompressen. Das Operationsbesteck (Nadelhalter, anatomische Pinzetten, Schere) stand vor OP autoklaviert zur Verfügung. Zwischen den Operationen wurde es mittels alkoholischer Lösung gereinigt und desinfiziert. Der OP-Tisch wurde steril abgedeckt.

Zur Narkose der Tiere erfolgte die intraperitoneal Injektion einer Dosis von 0.168 mg/gKG Ketamin und 8 µg/gKG Xylazinhydrochlorid in physiologischer Kochsalzlösung. Der Grad der Narkose wurde mittels Schmerzstimulus interdigital im Bereich der Hinterläufe geprüft. Die Augen der Tiere wurden paraoperativ mittels Bepanthen-Augensalbe behandelt. Vor Operation erfolgte die Rasur der Tiere im Operationsbereich.

Die Schein-Operation (im Weiteren *Sham*) war bis auf die Entfernung der Nierenkapsel und der Organentnahme mit der subtotalen Nephrektomie (im Weiteren SNx) identisch, welche im Folgenden beschrieben wird:

Nach Hautdesinfektion und sterilem Abdecken des Versuchstieres erfolgte zuerst ein kutaner Flankenschnitt rechts paravertebral unter dem Rippenbogen mittels chirurgischer Schere. Nach Ablösung der Haut von der darunterliegenden Faszie der Bauchmuskulatur, erfolgte deren stumpfe Durchtrennung über dem Nierenlager. Die Niere rechts wurde aus der Nierenloge nach außen luxiert und sodann deren Kapsel vorsichtig entfernt. Es erfolgte die Ligatur des Organs mittels sterilen Seidenfadens am Hilus und die Resektion des gesamten Organs. Das Gewicht der entnommenen Niere wurde ermittelt. Die Bauchmuskulatur wurde mittels zweier Einzelknopfnähte verschlossen, nachdem der Gefäßstumpf zurück in den Bauchraum verlagert wurde. Nach primärem Wundverschluss der Haut durch drei Einzelknopfnähte wurde die Wundstelle gesäubert und erneut desinfiziert.

Die Operation auf der linken Seite entsprach bis auf folgendes der rechtsseitigen Prozedur: Nach Präparation der Nierenkapsel erfolgte die subtotale Nephrektomie mittels Ligatur des oberen und unteren Nierenpols und die Abtrennung beider Pole, so dass zirka 60 % des linken Nierengewebes und damit zirka 5/6 des funktionellen

Gesamtnierengewebes entfernt wurden. Das entnommene Gewebe wurde gewogen. Es erfolgte die Rückverlagerung des Restorgans in den Bauchraum mit anschließendem Verschluss der Köperschichten. Die OP-Zeit betrug im Mittel 25-35 Minuten.

Am Ende jeder OP erfolgte die Gabe von ca. 0.5 ml NaCl 0.9 % subkutan zur Flüssigkeitssubstitution. Zudem erfolgte eine analgetische Therapie mittels Buprenorphin (0.05 - 0.1 mg/kgKG). Um Auskühlung zu verhindern, wurden die Tiere bis zum Erwachen aus Narkose mit einer Infrarot-Wärmelampe bestrahlt und anschließend in frischen Käfigen unter Versuchsbedingungen weiterversorgt (s. 2.1).

4.3 Stoffwechselkäfige / Sammelurin

Der Versuchszeitraum betrug 35 ± 2 Tage. Am Tag vor Organentnahme wurden die Tiere für 24 Stunden in Stoffwechselkäfigen (*Techniplast GmbH, Hohenpeißenberg*) gehalten. Die Tiere hatten freien Zugang zu Flüssigkeit sowie pulverisierter Tiernahrung. Der Urin wurde über 24 Stunden gesammelt und der weiteren Analyse zugeführt.

4.4 Blutdruckmessung

Zwei Tage vor Organentnahme erfolgte bei den Versuchstieren die nicht-invasive systolische Blutdruckmessung mittels Schwanzmanschette unter Verwendung des *Blood Pressure Analysis System SC1000 (Hatteras Instrumentes, USA)*. Die Tiere wurden zuvor über 4 Tage an die Messung gewöhnt. Diese erfolgte zur gleichen Tageszeit und unter identischen Versuchsbedingungen. Entsprechend der Standardvorgaben des Herstellers erfolgte die 10-malige Blutdruckmessung mit Bestimmung der Herzfrequenz. Die Blutdruckmessung wurde nur in den FVB-Versuchsgruppen durchgeführt.

4.5 Glomeruliextraktion mittels isoliert-perfundierter Mäuseniere

Die Glomeruliextraktion mittels isoliert-perfundierter Mäuseniere ist eine eigenständige Weiterentwicklung einer zuvor beschriebenen Methode [3].

4.5.1 Vorbereitung

Nach einem Versuchszeitraum von 35 ± 2 Tage post-operativ wurde den Tieren ca. 500-800 μ l Blut entnommen. Das Blut wurde zentrifugiert und das überstehende Plasma abpipettiert. Das Plasma wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Analyse gelagert.

4.5.2 Isoliert-perfundierte Mäuseniere

Die Narkose erfolgte wie in 4.2 beschrieben.

Als Perfusionslösung wurde steriles PBS bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ bereitgehalten. Als Embolisationslösung wurden Magnetpartikel (*Dynabeads, Dynal Biotech/Invitrogen, Deutschland*) in 5 ml sterilem $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ kaltem PBS (Konzentration ca. $4 \cdot 10^6$ Dynabeads/ml) gelöst. Die Perfusion erfolgte mittels Perfusor mit einem initialen Fluss von 1.5 ml/min, welcher bei Verwendung der Embolisationslösung auf 2 ml/min gesteigert wurde.

Das Versuchstier wurde unter einem Stereomikroskop (1-3-fache Vergrößerung) auf dem Rücken gelagert. Es erfolgten ein Medianschnitt und anschließend die Präparation der Haut von der Faszie der Bauchmuskulatur. Die Bauchmuskulatur wurde von caudal im Bereich der Blase bis cranial zum Xsiphoid gespalten. Es erfolgten Entlastungsschnitte nach lateral auf etwa halber Höhe. Die vier Quadranten der Bauchmuskulatur wurden nach außen geklappt und durch Klemmen fixiert.

Die Aorta und die „Restniere“ (SNx) bzw. beide Nieren (Sham) wurden frei präpariert. Es wurden Ligaturen sowohl kranial als auch caudal der Nierenarterien vorbereitet, um alle abführenden Gefäße abzubinden. Die Aorta wurde sodann caudal der linken Nierenarterie stumpf abgeklemmt. Caudal davon erfolgte eine kleine Inzision und die Kanülierung mittels Polyethylenschlauchs (*Portex, Großbritannien*; Innerer Durchmesser 0.28 mm), der mittels Ligatur fixiert wurde. Die Klemme caudal der linken Nierenarterie wurde gelöst, die Aorta und weitere drainierende Gefäße kranial der Nierenarterien

ligiert und die Nieren in situ unter Verwendung von sterilem, 4 °C kaltem PBS mit 1.5 ml/min perfundiert, um verbleibendes Blut aus den Gefäßen zu spülen. Um einen venösen Abfluss sicherzustellen, wurde ein Loch in die Vena cava inferior geschnitten. Zu diesem Zeitpunkt wurde das Tier durch Dekapitation getötet. Nach weiterer Präparation wurden die „Restniere“ bzw. die Nieren mit Embolisationslösung perfundiert, entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung in kaltem PBS aufbewahrt (Abb. 1-3).

4.5.3 Gewebeaufbereitung und Isolierung der Glomeruli

Die entnommenen Nieren wurden mittels steriler Rasierklinge in kleinste Gewebestücke zerkleinert. Diese Stücke wurden durch einen 100 µm-Zellfilter (BD Falcon, cell strainers 100 µm) gepresst und mit 5-10 ml sterilem, 4 °C kaltem PBS gespült. Dies wurde zwei bis dreimal wiederholt, bis eine homogene Lösung entstand. Zellmaterial, Kapselgewebe, Bindegewebe, die das Filter nicht passierten, wurde verworfen.

Die so gewonnene Lösung wurde bei ca. 2000 G für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Gewebespellet in zirka zwei Milliliter sterilem PBS gelöst und in ein 2-Milliliter Eppendorf-Röhrchen überführt. Die mit Magnetpartikeln embolisierten Glomeruli wurden mittels Magnetfänger und mehrmaliger PBS-Waschung isoliert, bis eine Aufreinigung unter mikroskopischer Kontrolle (*Zeiss Axiovert, Deutschland*) von ca. 95 % erfolgte (Abb. 3).

Die extrahierten Glomeruli wurden zur Hälfte in 20 µl 2D-Lysepuffer (30 mM Tris-HCl, 2 M Thioharnstoff, 4 % CHAPS, pH 8) lysiert und Ultraschall behandelt; die andere Hälfte wurde bei -20 °C für die RNA-Extraktion gelagert. Zur Entfernung der Magnetpartikel wurde das Lysat für 10 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford mittels *Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Deutschland)*. Zirka 20-60 µg glomeruläres Protein konnten so aus einer Niere gewonnen werden. Die Proben wurden bei -80 °C gelagert.

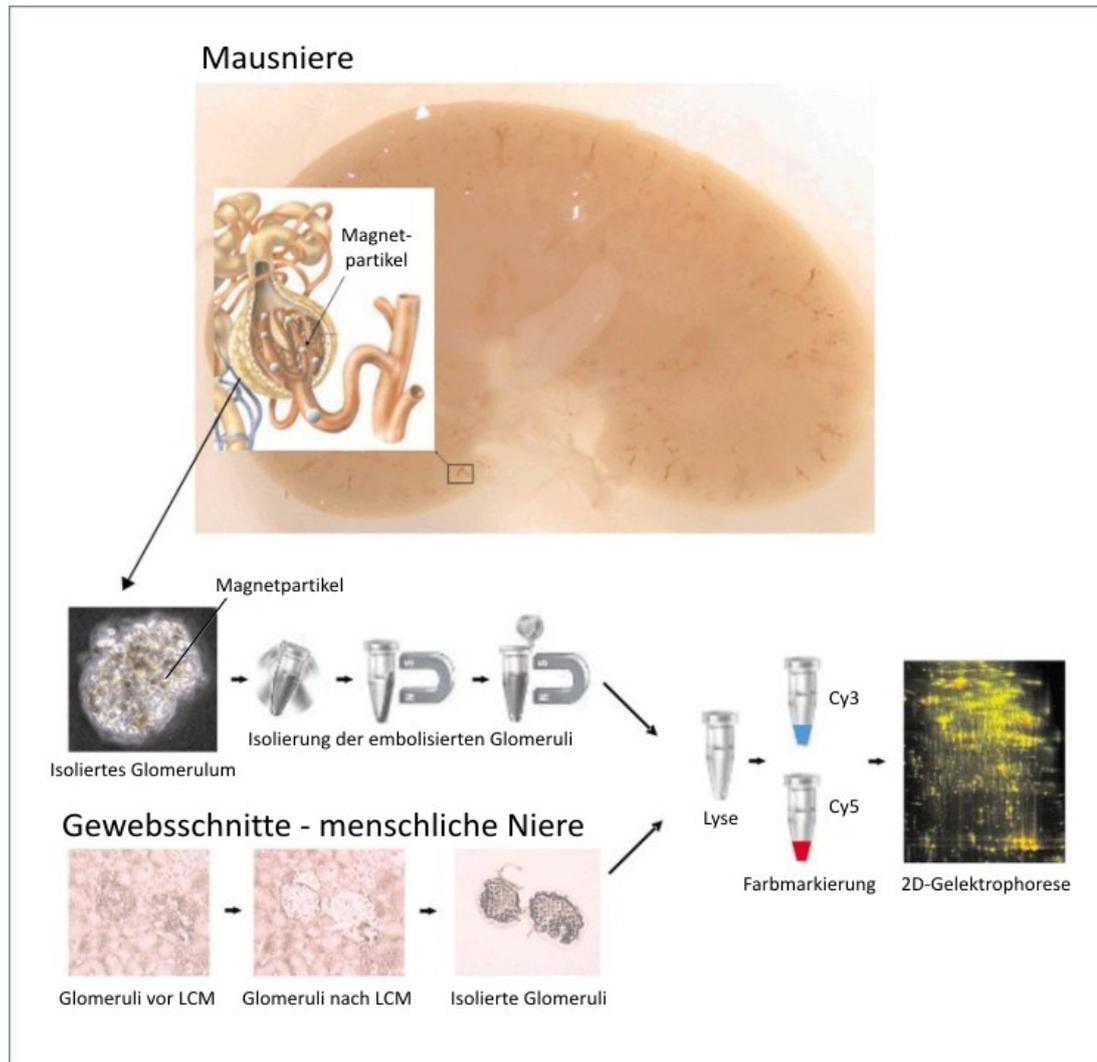


Abbildung 1: Die Abbildung zeigt schematisch die Methoden, wie sie in Punkt 4.5 und 4.11-12 beschrieben werden.

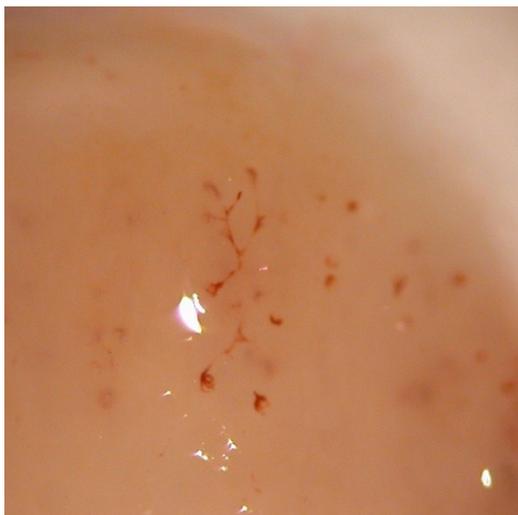


Abbildung 2: Die Abbildung zeigt den 30-fach vergrößerten Querschnitt einer kurz zuvor mit Magnetpartikeln isoliert-perfundierten Niere. Die embolisierten Glomeruli und deren zuführenden Aa. afferentes sind gut zu erkennen.

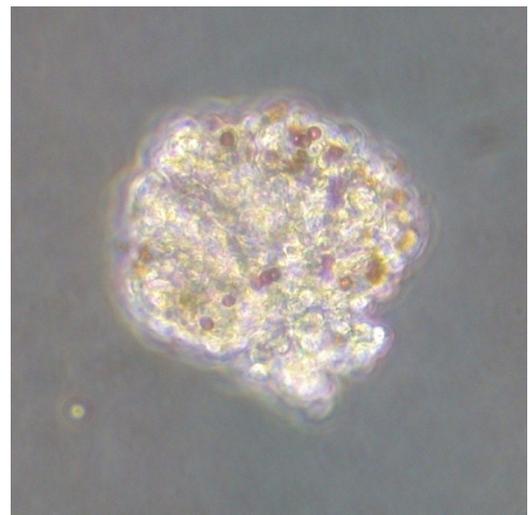


Abbildung 3: Ein mit Magnetpartikeln embolisiertes Glomerulum bei 1000-facher Vergrößerung. Die Magnetpartikel sind gut als rot-bräunliche Punkte in den Kapillarschlingen zu erkennen.

4.6 Interner Standard für die differentielle Proteinanalyse und Protein-Identifizierung

Um die Proteinlysate mittels 2D-Gelelektrophorese unabhängig voneinander analysieren zu können, wurden die Proben zusammen mit einem „internen Standard“ auf ein 2D-Gel aufgetragen (siehe 4.12). Dieser interne Standard dient als interne Referenz, auf die die jeweilige Proteinexpression in einem Gel bezogen wird. Dabei wird in einem Versuchsansatz für alle Proben der gleiche interne Standard verwendet, um letztlich die Proben miteinander vergleichen zu können. Durch die Auswahl des, dem internen Standard zu Grunde liegenden, Probenmaterials versucht man, ein möglichst breites Spektrum der erwarteten Proteine abzudecken. Daher besteht der interne Standard in der Regel aus Proteinlysate des untersuchten Ursprungsgewebes (siehe 4.6.1 und 4.6.2). Die Anwendung eines internen Standards ermöglicht es auf diese Weise, Proben einzeln zu analysieren. Im Gegensatz zu den analysierten Proben ist das Ausgangsmaterial für den internen Standard zumeist so gewählt, dass es in ausreichendem Maße zur Verfügung steht. Dadurch ist es möglich, sehr geringe Probenmengen zu untersuchen, und bei Übereinstimmung mit dem internen Standard, diesen für die Proteinidentifizierung zu benutzen, wofür in der Regel größere Mengen eines Proteins benötigt werden.

4.6.1 Interner Standard – Versuche SNx vs. Sham

Es wurden Mäusenieren von ca. 70-Tage alten männlichen FVB-Mäusen entnommen und in 4 °C kaltem PBS präpariert. Der Nierenkortex wurde makroskopisch vom Nierenmark getrennt. Das Kortexgewebe wurde zerkleinert und in 2D-Lysepuffer unter Ultraschallbehandlung lysiert. Das Proteinlysate wurde abzentrifugiert und bei -80 °C gelagert. Zur Beladung der präparativen Gele für die Proteinidentifizierung (Sham vs. SNx) wurde dasselbe Proteinlysate benutzt.

4.6.2 Interner Standard – Versuche zur Etablierung glomerulärer Proteinanalyse

Der Interne Standard für die Etablierung der glomerulären Proteinanalyse wurde wie in 4.6.1 beschrieben erstellt. Für die eigentliche Proteinanalyse (präparative Gele) wurde ein Proteingemisch aus 30 % glomerulärem Protein (wie in 4.5 beschrieben; von nicht nephrektomierten Nieren extrahiert) und 70 % Kortex-Protein verwendet, um gegebenenfalls ausschließlich in Glomeruli exprimierte Proteine zu identifizieren.

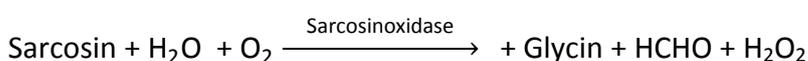
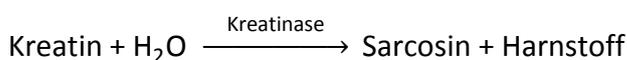
4.7 Quantitative Albuminbestimmung im Serum

Die Bestimmung von Albumin im Mäuseserum erfolgte mittels Bromkresolgrün-Methode. Das Prinzip basiert auf der Komplexbildung von Albumin mit Bromkresolgrün. Dabei bewirkt Serumalbumin in Anwesenheit von Bromkresolgrün in schwach saurem Milieu eine Farbveränderung des Indikators von gelb-grün zu grün-blau. Diese Farbänderung wird bei einer Wellenlänge von 546 nm photometrisch gemessen. Der entstehende Farbkomplex ist direkt proportional zur Albuminkonzentration. Es handelt sich um eine Endpunktmethode.

Die Albuminbestimmung erfolgte mittels Albumin-Assay-Kits der Firma *Randox*. Die Probenbestimmung erfolgte auf einer 96-Well-Platte gegen ein Standardserum (jeweils Doppelbestimmung). Die Reaktion fand bei Raumtemperatur statt. Die photometrische Auswertung erfolgte in einem Mikrotiterplatten-Photometer (*TECAN Sunrise*).

4.8 Quantitative Kreatininbestimmung im Serum/Urin

Die Bestimmung von Kreatinin im Serum erfolgte mittels enzymatischem Peroxidase-Anti-Peroxidase-Farbtests (PAP). Dabei liefen folgende Reaktionen ab:



Chinonimin ist ein roter Farbstoff, der photometrisch nachgewiesen werden kann (Wellenlänge: 550 nm). Zur Bestimmung wurde ein Kreatinin-Testkit der Firma *Labor+Technik* eingesetzt. Urinproben wurden für die Bestimmung 1:100 verdünnt, um im Messbereich der Bestimmungsmethode zu bleiben. Die Messung mit anschließender Auswertung erfolgte in einem Mikrotiterplatten-Photometer (*TECAN Sunrise*).

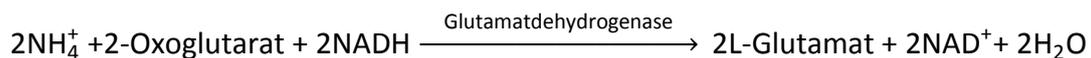
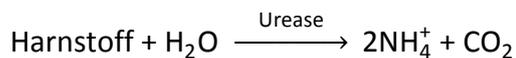
Die Kreatinin-Clearance wurde nach der Formel ermittelt:

$$\text{Kreatinin-Clearance (ml/min)} = \frac{U_{\text{Krea}} (\text{mg/dl}) \cdot V (\text{ml})}{S_{\text{Krea}} (\text{mg/dl}) \cdot t (\text{min})}$$

U_{Krea} = Kreatininkonzentration im Urin; S_{Krea} = Kreatininkonzentration im Serum; V = Sammelurinvolumen; t = Sammelzeit in Minuten

4.9 Quantitative Harnstoffbestimmung Serum

Die Bestimmung der Serum-Harnstoffkonzentration basiert auf der enzymatischen Reaktion mittels Urease:



Die NADH/NAD⁺-Reaktion verursacht eine Absorptionsänderung bei einer Wellenlänge von 340nm, die mit der Harnstoff-Konzentration in der Probe korreliert.

Verwendet wurde das Urea-Assay-Kit der Firma *Randox*. Die Probenbestimmung erfolgte auf einer 96-Well-Platte gegen ein Standardserum (jeweils Doppelbestimmung). Die Reaktion fand bei Raumtemperatur statt. Die photometrische Bestimmung erfolgte in einem Absorptionsdetektor (*TECAN Sunrise*).

4.10 Albuminbestimmung im Urin

Die Bestimmung von Albumin im Urin erfolgte extern im Zentrallabor des Marienhospitals Herne (*Klinikum der Ruhr-Universität Bochum*) mittels immunturbidimetrischem Testverfahren. Dabei wird die Lichtschwächung (Trübung) gemessen, die durch die Antigen-Antikörper-Reaktion verursacht wird. Die Stärke der Antigen-Antikörper-Reaktion (und damit die Trübung), welche mittels Turbidimeter bestimmt wird, ist abhängig von der Konzentration des Albumins in der Probe.

4.11 Lasermikrodissektion

Als Ausgangsgewebe wurde gesundes humanes Nierenparenchym verwendet, welches von einem Patienten stammte, bei dem aufgrund eines Nierenzellkarzinoms eine totale Nephrektomie erfolgte. Für die Lasermikrodissektion wurde nur gesundes, histologisch unverändertes Nierengewebe verwendet. Das Gewebematerial wurde unmittelbar nach OP in kleine Stücke geschnitten und in *Tissue-Tek OCT* eingebettet. Unmittelbar im Anschluss wurde die Gewebestücke in mit flüssigem Stickstoff gekühltem Isopentan (zirka -70 °C) eingefroren. Die Lagerung erfolgte in geschlossenen Gefäßen bei -80 °C.

Aus den Gewebelöcken wurden 6 µm-Serienschnitte angefertigt, die auf Trockeneis gelagert wurden. Die Schnitte wurden entsprechend dem *HistoGene LCM Frozen Section Staining Kit* (*Arcturus, USA*) fixiert, gefärbt und entwässert. Mit Hilfe eines Lasermikrodissektionsmikroskops (*AutoPix Automated LCM System, Firma Arcturus, USA*) wurden Glomeruli (n = 100, 75, 10) aus den Gewebeschnitten für die weitere Analyse gewonnen. Die isolierten Glomeruli wurden in 20 µl 2D-Lysepuffer (30 mM Tris-HCl, 2 M Thioharnstoff, 4 % CHAPS, pH 8.0) lysiert und mit Ultraschall behandelt. Das Proteinlysate wurde bis zur Analyse bei -80 °C gelagert.

4.12 Differenzielle 2D-Gelelektrophorese

4.12.1 Proteinmarkierung

Markierung von Maus-Proteinproben

Für die differentielle Proteinanalyse im Tiermodellversuch wurde das Proteinlysate von jeweils fünf Sham-Mäusen und fünf SNx-Mäusen eingesetzt. Für die differentielle Proteinanalyse der mikrodisezierten Glomeruli wurden drei unabhängig diszezierte Glomeruliproteinlysate und drei Kortexproteinlysate von FVB-Mäusen verwendet.

Zur Denaturierung erfolgte eine Cystein-Reduktion der Proben (je 3 µg Protein) durch Zugabe von 1 nmol Tris-(2-carboxyethyl)-Phosphorwasserstoff-Hydrochlorid (*TCEP*, *Sigma*) bei 37 °C für eine Stunde in Dunkelheit.

Die Sättigungsfarbstoffe (*Saturation CyDyes*, *Amersham Biosciences / GE Healthcare, Freiburg, Deutschland*), Cy3 und Cy5 wurden zunächst mit Dimethylformamid (DMF, 2 nmol/µl, *Sigma*) verdünnt und je 1 µl zu den reduzierten TCEP-Proben hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 30 min im Dunkeln. Um die Markierungsreaktion zu beenden, wurden 2 µl Dithiothreitol (DTT, 1.08 g/ml; *Bio-Rad*) zugefügt. Zur Optimierung der isoelektrischen Fokussierung (IEF) wurden die Proben anschließend mit Polyaminopolycarboxylsäuren (*Ampholine*, *GE Healthcare*) versehen.

Der Interne Standard, bestehend aus Kortexproteinlysate, wurde mittels Cy3 markiert. Die Glomeruliproteinlysate aus den Tierversuchen bzw. der Lasermikrodisektion wurden mit Cy5 markiert.

Für die präparativen Gele der mikrodisezierten Proben wurde ein Referenzproteinlysate von 400 µg (70 % Kortex-Gewebe, 30 % extrahierte Glomeruli) mit 105 nmol TCEP reduziert und mit 210 nmol Cy3 markiert.

Markierung humaner Proteinproben

Für die Markierung der humanen Proteinproben (siehe 4.11) mittels Sättigungsfarbstoff wurden drei Proteinproben (4.5 µg, 2.7 µg und 0.5 µg Proteingesamtmenge) mit 1 nmol TCEP reduziert und mit 2 nmol Cy5 behandelt.

4.12.2 2D-Gelelektrophorese

Die Separation der Proteine in der ersten Dimension erfolgte mittels ampholyt-basierter isoelektrischer Fokussierung (Fokussierungsgele, 20 cm x 1.5 mm) nach Kloise und Kobalz [4]. Nach Ablauf eines 21.25-stündigen Programms verschiedener Stromspannungen wurden die ausgestoßenen Fokussierungsgele in Äquilibriumspuffer (125 mM Tris, 40 % Glycerin, 3 % SDS, 65 mM DTT, pH 6.8) für 10 Minuten inkubiert. Die zweite Dimension wurde in einem Gelkammersystem (*Desaphor VA 300, Desaga*) mit Polyacrylamidgele (15.2 % Acrylamid, 1.3 % Bisacrylamid) durchgeführt [4]. Die Fokussierungsgele wurden auf die Polyacrylamidgele (20 cm x 30 cm x 1.5 mm) appliziert und mit 1%iger Agarose, welche 0.01 % Bromophenolblau (*Riedel deHaen, Seelze, Deutschland*) enthielt, fixiert. Das für die präparativen Gele (Proteinidentifikation) verwendete Gelsystem (IEF: 20 cm x 1.5 mm; SDS-PAGE: 20 cm x 30 cm x 1.5 mm) wurde unter den gleichen Bedingungen prozessiert.

4.12.3 Bildakquisition und -analyse

Für die Bildakquisition mit *Typhoon 9400 Fluoreszenzscanner (Amersham Biosciences / GE Healthcare)* verblieben die Gele zwischen den Glasplatten des Kammersystems. Die Anregungswellenlänge und die Emissionsfilter wurden spezifisch für die jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe gemäß den Herstellerangaben ausgewählt. Vor der computergestützten Bildanalyse (*DeCyder Software, Amersham Biosciences / GE Healthcare*) wurden die Bilder zurechtgeschnitten (*ImageQuant Software, Amersham Biosciences / GE Healthcare*). Die Proteinspotdetektion und Quantifizierung im Gel wurde mit Hilfe des *Differential In-gel Analysis (DIA)* Modus der *DeCyder Software* durchgeführt. Die für die Analyse notwendige geschätzte Proteinsportanzahl wurde auf 3000 gesetzt. Als Ausschlussfilter wurde der Anstieg der Spotflanke (slope) größer als 1.6 gewählt (Ausschlusskriterium der Software zur Detektion eines Proteinspots im Gel).

4.12.4 In-Gel Verdau und Proteinidentifizierung mittels nanoLC-ESI-MS/MS

Die Spots wurden aus einem präparativen Gel manuell ausgestochen. Um die Position der Spots im Gel zu bestimmen, wurde nach der Bildakquisition ein maßstabsgerechter

Gelausdruck unter das Gel platziert. Die Spots wurden anschließend enzymatisch mit Trypsin (*Promega, Mannheim, Deutschland*) im Gel verdaut und die Peptide wie nach Schäfer et al. beschrieben extrahiert [5]. Für die Peptidanalytik wurde ein System bestehend aus *FAMOS* (automatischer Probensammler), *Switchos* (Ladepumpe und Schaltventile), und *Ultimate* (Separationspumpe und UV-detektor) (*LC Packings Dionex, Amsterdam, Niederlande*) gekoppelt, mit dem Ionenfallen-Massespektrometer *LCQ Deca XP* (*Thermo Electron, San Jose, CA, USA*) ausgerüstet und mit einer nano-Elektrospray Ionquellen (*PicoView 100, New Objective Inc., Woburn, MA, USA*) und eine Silikat-Spitze (*SilicaTip FS360-20-10-D, New Objective Inc.*) verwendet.

Für die Proteinidentifizierung wurden die MS/MS-Spektren mithilfe des *SEQUEST* Algorithmus unter Berücksichtigung der folgenden Suchparameter mit der NCBI-Proteinsequenz Subdatenbank verglichen (*National Center for Biotechnology Information U.S. National Library of Medicine*) [6-8]. Hierbei wurden folgende Suchparameter berücksichtigt: Eine Massentoleranz von ± 1.5 wurde gewählt, da für Eltern- und Teilfragmente die Modifizierung aller Cysteine mit Cy3 eine Massenzunahme bewirkt. Proteine mit einem *SequestMetaScore* (*Proteinscape*) größer als 10 bei mindestens 3 identifizierten Fragmenten wurden als „identifiziert“ betrachtet.

4.13 Immunhistochemie

4.13.1 Paraffinschnitte

Zur Fixierung des Gewebes wurden die entnommenen Nieren in Einbettkassetten über Nacht in Paraformaldehyd (4%ig) gelegt. Das Nierengewebe wurde anschließend mittels Entwässerungsautomaten (*Leica TP1020*) entwässert und paraffiniert. Das paraffinierte Gewebe wurde mit einer Gießstation (*Leica EG 1160*) in Paraffinblöcke gegossen. Mit einem Mikrotom (*Leica RM 2155*) wurden von den Blöcken Serienschnitte mit einer Schnittdicke von 1 μm angefertigt. Diese wurden in einem 48 °C Wasserbad mit einem Pinsel gestreckt und danach auf einen Adhäsionsobjektträger (*Superfrost, Menzel-Gläser, Deutschland*) aufgebracht. Die immunhistochemischen Färbungen wurden an Paraffingewebeschnitten von Sham- und SNx-FVB-Mäusen vorgenommen.

4.13.2 Immunhistochemie

Die Färbung beruht auf der Streptavidin-Biotin-Methode, bei der die starke Affinität von Streptavidin zu Biotin genutzt wird.

Zuerst wurden die Gewebeschnitte mittels Xylol und Aceton entparaffiniert und dann in Tris-Pufferlösung (44 mM Tris-HCL, 6.5 mM Tris-BASE, 0.15 M NaCl) rehydriert. Die Antigendemaskierung erfolgte mittels *Target Retrieval Solution (Dako Nr. S1700)* für 30 Minuten im 98 °C warmen Wasserbad. Für 20 Minuten wurden die Schnitte bei Raumtemperatur gelagert und dann zweimalig für je 5 Minuten in Tris-Puffer gewaschen. Die Blockierung des endogenen Biotins erfolgte mittels Biotin-Blockierungs-System von Dako (*Dako Nr. X0590*). Mit Hilfe des Enzym-Blockierungs-Reagenz (*Dako Nr. S2003*) wurde die endogene alkalische Phosphatase blockiert. Unspezifische Proteinbindungen wurden durch serum-frei Proteinblockierungslösung (*Dako Nr. X090*) gesättigt.

Im Folgenden wurden die Schnitte mit Primär-Antikörper für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (*Antikörper: anti-Galectin-1-Antikörper [Santa Cruz Nr. sc-19277]*, Verdünnung 1:100 in Antikörperpuffer [*Dako Nr. S3022*]; *anti-C4-Antikörper [Santa Cruz Nr. sc-23483]*, Verdünnung 1:50 in Antikörperpuffer). Für weitere 30 Minuten erfolgte die Inkubation mit biotiniliertem Sekundär-Antikörper (*Esel-anti-Ziege; Dianova Nr. 705-065-147*) und anschließend mit Streptavidin (*Dianova Nr. 016-050-084*) in einer Konzentration von jeweils 1:1000. Die Entwicklung wurde mit Fuchsin Chromogen Substrat (*Dako Nr.K0625*) durchgeführt. Eine Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaunlösung nach Mayer.

4.13.3 Immunhistologischer Nachweis proliferierender Zellen mittels BrdU

In einem Pilot-Experiment wurde mittels *BrdU In-Situ Detection Kit (BD Biosciences Pharmingen)* qualitativ und exemplarisch die mitogene Aktivität innerhalb des Nierengewebes von kürzlich nephrektomierten Mäusen (10 Tage post op.) mit nicht-operierten Mäusen verglichen.

Durch die Inkorporation von Bromdeoxyuridin (BrdU) in der S-Phase des Zellzyklus konnten mittels anti-BrdU-spezifischen Antikörper proliferierende Zellen nachgewiesen werden [9].

Die Methode wurde entsprechend des Herstellerprotokolls an 6 µm Serienschnitten von kryokonservierten Nieren (FVB-Maus – Sham und SNx) durchgeführt.

4.14 RNA-Extraktion aus Glomeruli

Die RNA-Extraktion aus den gewonnenen Glomeruli erfolgte mittels Trizol-Reagenz (Invitrogen) 500µl sowie der Zugabe von 2µl eines Polyacrylmicrocarriers. Nach Zugabe von Chloroform (100µl), Homogenisierung sowie Schütteln wurde die Lösung für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Die RNA wurde dann in der asservierten wässrigen Phase mittels Isopropanol (250 µl) präzipitiert. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Gemisch bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das RNA-Pellet einmalig mit 100 µl 70%igem Ethanol gewaschen und erneut bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet (je nach Größe) in 10-100 µl RNase-freiem Wasser aufgelöst. Anschließend wurde die genomische DNA mittels DNase verdaut.

4.15 Reverse Transkription - cDNA

Reverse Transkription der extrahierten RNA (0.5-5 µg) erfolgte mittels *Enhanced Avian Reverse Transcriptase (eAMV-RT – Sigma-Aldrich)* entsprechend des Herstellerprotokolls. Im ersten Schritt erfolgte das Annealing für 10 Minuten bei 70 °C unter Zugabe eines dNTP-Mixes (1 µl) sowie von Oligo(dt) (3.5 µM – 1 µl) bei einem Gesamtvolumen von 10 µl (inkl. RNA und RNase-freiem Wasser). Im zweiten Schritt wurde die reverse Transkription unter Zugabe von eAMV-RT (1 µl), RNase Inhibitor (1 µl *RNaseOUT – Invitrogen*), eAMV-RT-Puffer (2 µl *Sigma-Aldrich*) sowie DNase-freiem Wasser (6 µl) bei 50 °C für 50 Minuten durchgeführt.

4.16 Real-Time-PCR (qPCR) / PCR

Für die Real-Time-PCR wurde cDNA stammend von je vier SNx- und Sham- Glomeruli-Proben (FVB-Mäuse) verwendet. Zum Einsatz kam ein *7300 Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*, Deutschland) unter Verwendung von *TaqMan Gene Expression Assays* (*Applied Biosystems*, Deutschland). Die real-time-PCR wurde entsprechend des Assay-Protokolls durchgeführt. Als Ergebnis wird der mittlere Zyklusschwellenwert angegeben (CT-Wert).

Für die herkömmliche PCR wurde cDNA aus immortalisierten Podozyten gewonnen [10].

4.16.1 Primer

Als Real-Time-PCR-System inklusive Primer wurden *TaqMan Gene Expression Assays* (*Applied Biosystems*) angewendet. Es wurden nur Maus-spezifische Primer verwendet.

- 1.) Meprin 1 alpha (Assay ID: Mm00484970_m1)
Länge des PCR-Produktes: 94 bp
- 2.) Lectin, galactose binding, soluble 1 (Galectin-1) (Assay ID: Mm00839408_g1)
Länge des PCR-Produktes: 100 bp
- 3.) Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) (Assay ID: Mm99999915_g1)
Länge des PCR-Produktes: 107 bp

4.17 Glomeruligröße

Gefrierschnitten von Mausnieren (C57BL/6: Kontrolle und SNx 10 Tage post OP) mit einer Schichtdicke von 6 μm wurden mittels Hämalaunlösung nach Mayer gefärbt. In beiden Gruppen wurde aus insgesamt 6 Schnitten die Fläche von 30 Glomeruli mittels *Arcturus Autopix Software* (*Arcturus*, USA) bestimmt. In der Annahme einer kreisrunden Querschnittsfläche wurde der Durchmesser berechnet.

4.18 Statistische Auswertung

Die statistische und graphische Auswertung der physiologischen Daten aller Versuchsgruppen (Blutdruck, Nierengewicht, Größe der Glomeruli) und der Laborparameter (Kreatinin im Serum und Urin, Harnstoff im Serum und Urin, Albumin im Serum, Albumin im Urin) sowie der errechneten Parameter (Kreatinin-Clearance, Albumin-Kreatinin-Ratio, 24-h-Albuminekretion) erfolgte unter Zuhilfenahme der Auswertungssoftware *SigmaPlot 9.0* (*SigmaPlot*, USA). Dabei erfolgte der Vergleich zwischen den untersuchten Stichproben bei Annahme einer Normalverteilung mittels Zweistichproben t-Test. Die Nullhypothese wurde verworfen, falls der p-Wert kleiner 0.05 war. Für dieses Ergebnis wurde ein signifikanter Unterschied der verglichenen Parameter angenommen.

Für die statistische Auswertung der zweidimensionale Gelelektrophorese und der Proteinbestimmung wurde jeweils die dem Detektionssystem zugehörige Auswertungssoftware verwendet. Die genaue Beschreibung wurde bereits in den entsprechenden Abschnitten des Methodenteils abgehandelt.

5 Ergebnisse

5.1 Mausmodell

5.1.1 Physiologische Parameter

Zur Erhebung der physiologischen Parameter wurde den Versuchstieren vor Organentnahme Blut abgenommen und zuvor 24-Stunden-Sammelurin gewonnen. Zudem erfolgte die Blutdruckmessung wie in 4.4 beschrieben. Die physiologischen Parameter sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Physiologische Parameter der Versuchstiere nach Ablauf des Versuchszeitraums von 35 ± 2 Tagen unter Angabe der einfachen Standardabweichung (Ausnahme: Nierengewicht post-operativ). *)Das Nierengewicht der Sham-Gruppe entspricht dem halben Gesamtgewicht beider diesen Tieren entnommenen Nieren, um eine vereinfachte Vergleichbarkeit mit dem Nierengewicht der Einzelniere in der SNx-Gruppe zu erreichen. (Vergleich Sham vs. SNx: † = $p < 0.05$; †† = $p < 0.01$)

		FBV-Stamm		C57BL/6-Stamm	
		Sham n=5	SNx n=5	Sham n=6	SNx n=5
NG - post-operativ (Tag der OP)	[mg]	195.0 ± 21.7 *)	82.0 ± 13.0		
NG - 5 Wochen post-operativ	[mg]	337.5 ± 10.6 *)	277.0 ± 31.0		
Blutdruck <small>systolisch</small>	[mmHg]	146 ± 7	165 ± 13 †		
24h-Sammelurin Volumen	[ml/24h]	2.90 ± 0.7	7.52 ± 2.1 ††	0.71 ± 0.09	8.93 ± 1.6 ††
$U_{\text{Kreatinin}}$	[mg/dl]	26.11 ± 5.00	4.74 ± 0.67 †	39.0 ± 2.5	7.89 ± 1.3 †
$U_{\text{Harnstoff}}$	[mg/dl]	15612 ± 2087	4015 ± 901 †	12325 ± 570	4268 ± 994 †
$U_{\text{Mikroalbumin}}$	[mg/dl]	9.6 ± 4.3	151.5 ± 20.1 †	6.5 ± 0.6	5.6 ± 3.6
Albuminexkretion in 24h	[mg/die]	0.26 ± 0.09	11.5 ± 3.55 ††	0.31 ± 0.47	0.17 ± 0.12
Albumin-Kreatinin-Ratio	[mg/mg]	0.37 ± 0.18	32.70 ± 7.40 ††		
$S_{\text{Kreatinin}}$	[mg/dl]	0.52 ± 0.14	2.22 ± 1.15 ††	0.19 ± 0.07	1.22 ± 0.74
$S_{\text{Harnstoff}}$	[mg/dl]	127.0 ± 37.4	621.7 ± 127.3 ††	75.2 ± 5.4	249.8 ± 39.6 ††
S_{Albumin}	[mg/dl]	19.4 ± 3.8	14.8 ± 1.4	25.58 ± 5.0	31.56 ± 2.8
Kreatininclearance	[ml/min]	0.104 ± 0.037	0.015 ± 0.001††	0.129 ± 0.078	0.055 ± 0.030

Bei den Mäusen des FVB-Stamms zeigte sich eine signifikante Zunahme an Nierengewebe von zirka 330 % in der SNx-Gruppe (Vergleich Nierengewicht am OP-Tag zum Gewicht nach 5 Wochen), wohingegen die Zunahme in der Sham-Gruppe bei zirka 170 % lag ($p < 0.01$). Mit 19 mmHg mittlerer systolischer Blutdruckdifferenz ($p < 0.05$) zeigte sich in der nephrektomierten Gruppe ein Blutdruckanstieg. Die 24-h-Urinausscheidung war bei den SNx-Mäusen mit zirka 7.5 ml/die im Vergleich zu den Sham-Mäusen (zirka 2.9 ml/die) deutlich erhöht ($p < 0.01$). Bei einem signifikanten Anstieg der Serumretentionsparameter (Kreatinin und Harnstoff; $p < 0.01$) entwickelten die nephrektomierten FVB-Tiere eine Albuminurie mit einer Exkretion von zirka 11.5 mg/die (Sham-Gruppe: 0.26 mg/die) bei deutlich reduzierter Kreatininclearance ($p < 0.01$) (Abb. 4-6).

Bei den Mäusen des C57BL/6-Stamms zeigt sich ebenfalls eine signifikante Zunahme der Urinausscheidung (Sham vs. SNx [ml]: 0.71 ± 0.09 vs. 8.93 ± 1.6 ; $p < 0.01$). Trotz Anstiegs der Serumretentionswerte in der SNx-Gruppe, entwickeln die C57BL/6-Tiere keine Albuminurie (Abb. 4-6).

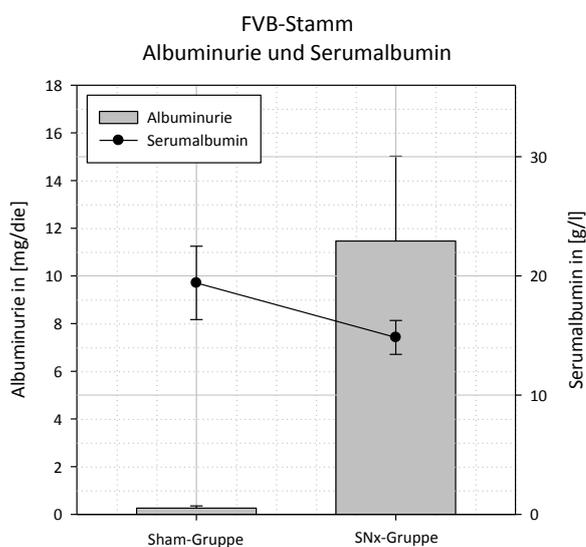


Abbildung 4: Dargestellt ist die Serumalbuminkonzentration und Albuminurie von Sham- und SNx-Mäusen des FVB-Stamms.

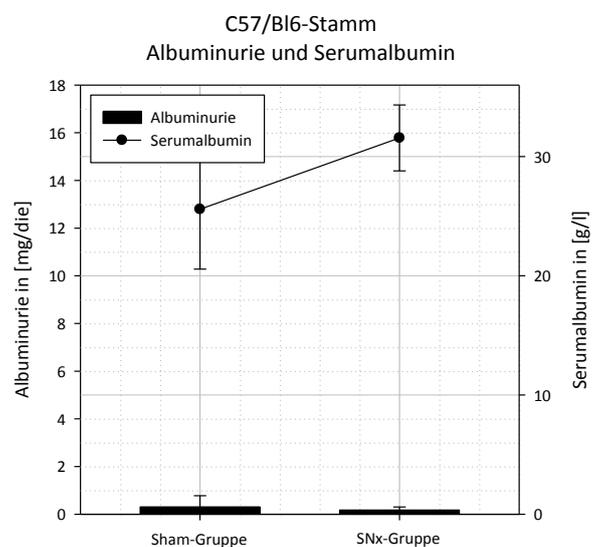


Abbildung 5: Dargestellt ist die Serumalbuminkonzentration und Albuminurie von Sham- und SNx-Mäusen des C57BL/6-Stamms.

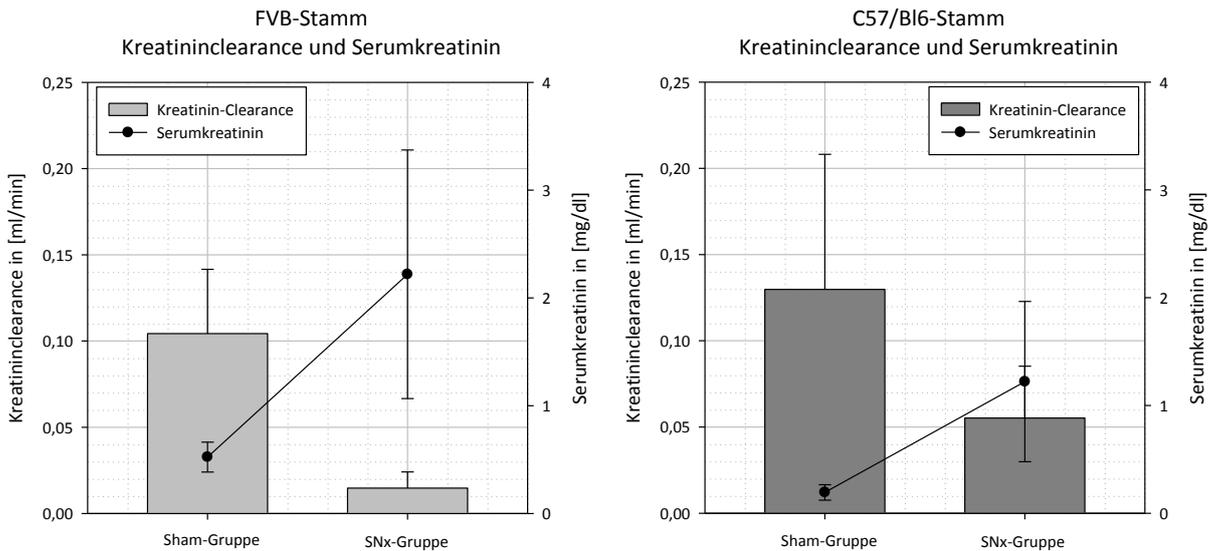


Abbildung 6: FVB-Stamm vs. C57BL/6-Stamm - Dargestellt ist die Kreatinin-Clearance bei gleichzeitiger Angabe der Kreatinin-Konzentration im Serum.

5.1.2 Größenzunahme Glomeruli

In der Anfangsphase der Etablierung des Mausmodells der chronischen Niereninsuffizienz wurde die Größenzunahme von Glomeruli 10 Tage post-operativ bestimmt. Als messbaren Parameter wählten wir die Fläche eines Glomerulum (n = 30) im histologischen Querschnitt. Daraus bestimmten wir den Durchmesser. Im Mittel zeigte sich eine Größenzunahme im Durchmesser von 102.43 μm (± 3.91) auf 130.70 μm (± 4.05) nach 10 Tagen. Dies entspricht einem Zuwachs des Durchmessers von ca. 27 %. Wird für das Glomerulum die Idealform einer Kugel angenommen, so vergrößerte sich das Volumen ca. um den Faktor 2 (Abb. 7).

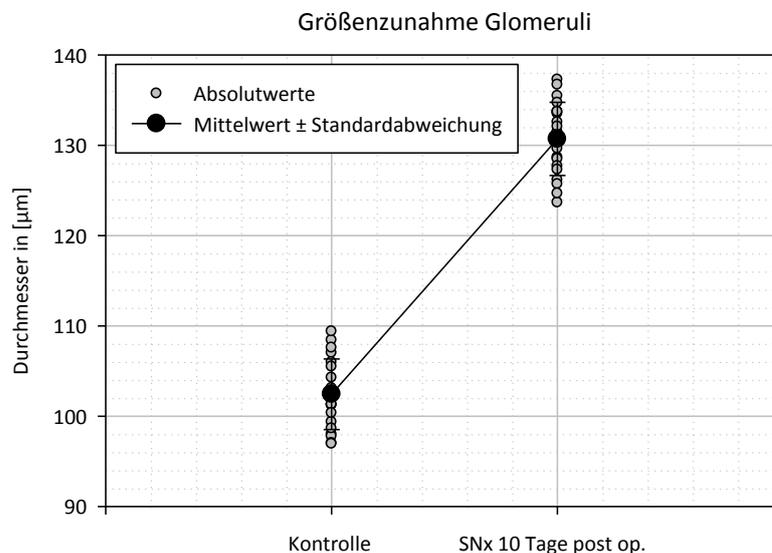


Abbildung 7: Größenzunahme von Glomeruli 10 Tage nach subtotaler Nephrektomie – C57BL/6-Stamm

5.1.3 Proliferation – Nachweis mittels Immunfluoreszenzhistologie BrdU

Als Pilotversuch wurde exemplarisch und qualitativ die Proliferationsaktivität in kürzlich nephrektomierten Nieren mittels *BrdU Detection Kit* nachgewiesen (Abb. 8 A, B).

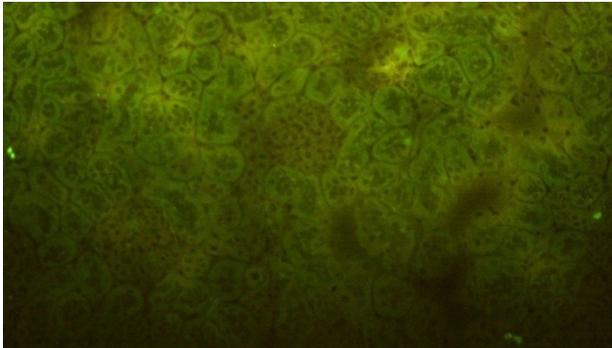


Abbildung 8A: Immunfluoreszenz Sham-Gruppe 10 Tage nach Sham-OP (Nierengewebe – 200-fache Vergrößerung)

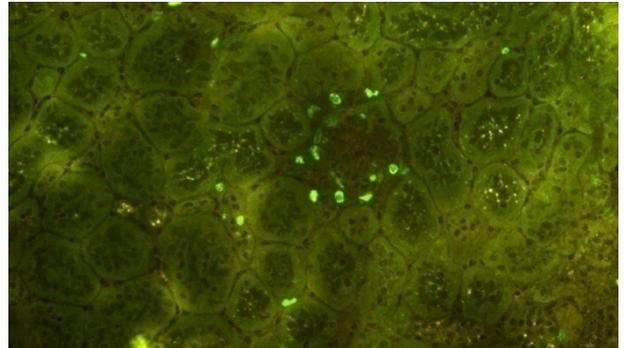


Abbildung 8B: Immunfluoreszenz SNx-Gruppe 10 Tage post op. (Nierengewebe – 200-fache Vergrößerung)

Im Vergleich zur Abbildung 8A, auf der sich nur vereinzelt BrdU-positive Zellen finden, sind auf Abbildung 8B vor allem im Bereich des Glomerulum viele BrdU-positive Zellen zu erkennen.

5.2 Etablierung der glomerulären Proteinanalyse

5.2.1 2D-Gelelektrophorese von glomerulärem Protein nach Magnetpartikel-Extraktion

Die Embolisation von Glomeruli durch isolierte Perfusion der Nierengefäße mittels ferromagnetischen Mikropartikeln ermöglicht die gezielte Isolierung von Glomeruli (Reinheit > 90 %) und stellt somit eine robuste Methode zur Isolierung glomerulären Proteins für die 2D-Gelelektrophorese dar. Das auf diese Weise gewonnen Proteinlysate wurde mittels Cy-Farbstoffen markiert und im Anschluss je 3 µg glomeruläres Protein bzw. Interner Standard der differentiellen 2D-Gelelektrophorese zugeführt. Nach der Elektrophorese und Bildaquisition mittels konfokalen Fluoreszenzscanners konnten im Mittel ca. 2900 Protein-Spots detektiert werden. Die Standardabweichung betrug 30.32 % der Spot-Anzahl für drei voneinander unabhängige Ansätze (Tab. 2, Abb. 9 A, B).

Tabelle 2: Vergleich zwischen Glomeruli und renalem Kortextgewebe (FVB-Maus / je 3 Gele) - Differentiell exprimierte Proteinspots (n = 48; p < 0.05 für einen mindestens 1.5-fachen Expressionsunterschied)

Anzahl an detektierten Spots	2900
Anzahl in allen Gelen (n=3x2) analysierter Spots	1900
Anzahl der sehr stark exprimierten Spots in Glomeruli (>5-fach höhere Expression im Vergleich zu Kortex)	4
Anzahl stark exprimierter Spots in Glomeruli (>1.5 fach <5-fach höhere Expression im Vergleich zu Kortex)	23
Anzahl sehr stark exprimierter Spots in Kortextgewebe (>5-fach höhere Expression im Vergleich zu Glomeruli)	14
Anzahl stark exprimierter Spots in Kortextgewebe (>1.5 fach <5-fach höhere Expression im Vergleich zu Glomeruli)	7

5.2.2 Identifizierung differentiell exprimierter Proteine aus renalem Kortex und

Glomeruli (FVB-Maus)

Nach Etablierung eines Protokolls zur reproduzierbaren Präparation von glomerulärem Protein erfolgte die differentielle Proteomanalyse zwischen glomerulärem Protein und renalem Kortex-Protein, um unterschiedlich exprimierte Proteine zu finden. Vor Analyse des glomerulären und kortikalen Proteoms mittels 2D-Gelelektrophorese wurden die Markierungsbedingungen optimiert [11].

Für die differentielle Proteomanalyse wurden je drei voneinander unabhängig gewonnene Glomeruli- bzw. Kortexproteinlysate mit Cy5 markiert und im Vergleich mit Cy3-markiertem Internen-Standard getrennt analysiert, um eine möglichst hohe Proteinquantifizierung zu erhalten. Für das Kortex-Proteom (Abb. 9A) und das glomeruläre Proteom (Abb. 9B) wurden 2800 und 2900 Proteinspots ermittelt (Abb. 9, Tab. 2). Abbildung 9A zeigt ein repräsentatives Gel, auf dem Kortex-Proteom (Cy5, rot markiert) gegen Internen-Standard (Cy3, grün markiert) aufgetragen ist. Abbildung 9B zeigt glomeruläres Proteom (Cy5, rot markiert) im Vergleich zum Internen Standard (Cy3, grün markiert).

In Tabelle 2 und 3 sind signifikante Unterschiede der Proteinexpression aufgelistet. Insgesamt fanden sich 48 differentiell exprimierte Protein-Spots ($p < 0.05$) mit mindestens 1.5-facher Über- oder Unterexpression (Tab. 2). Für 27 der ermittelten Protein-Spots zeigte sich eine höhere Expression im glomerulären Proteom (positive Expressions-Ratio), während sich für 21 der Protein-Spots eine erhöhte Expression im Kortex-Proteom (negative Expression-Ratio) zeigte. Mittels nanoLC ESI-MS/MS, konnten 23 Proteine mit unterschiedlicher biochemischer Funktion identifiziert werden (Tab.3).

Tabelle 3: Identifizierte Proteine des differentiellen Glomeruli- und Kortex-Proteoms unter Angabe der Massen-Daten, der Signifikanz, der Expressionsänderung und der Proteinsequenzidentifizierung

No.	Spot-name	NCBI Accession	Protein	pI experimental	Mw (v)	pI theoretical	Mw [kDa]	T-test	Fold change	Sequence Coverage [%]	Peptide count
Stark exprimierte Proteine im Glomerulum-Proteom											
1	2227	27369886	chloride intracellular channel 5 NADH dehydrogenase 1 alpha	6.0	27.9	5.5	28.3	0.012	5.59	17.1	3
2	1709	13195624	subcomplex 10 enoyl Coenzyme A hydratase,	6.9	39.4	7.7	40.6	0.0032	2.85	8.5	2
3	2298	29789289	short chain, 1	7.2	26.3	8.8	31.3	0.022	4.14	41.3	9
4	1261	809561	gamma-actin	5.6	49.1	5.6	41	0.041	6.24	11.4	3
5	868	6680027	glutamate dehydrogenase 1	7.1	59.7	8.5	61.3	0.0054	2.86	11.5	4
6	1181	13385454	glycine amidinotransferase 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitoch.	6.9	51.5	9	48.3	0.009	3.19	6.4	3
7	1897	21704140	precursor	6.4	35.2	8.4	35.4	0.019	4.11	8	2
8	905	54114929	D-lactate dehydrogenase	6.3	58.6	6.1	51.8	0.041	3.97	5.4	2
9	791	346883	lamin A	6.5	61.9	6.4	74.2	0.022	2.56	5.1	3
10	873	31982755	vimentin	5.4	59.5	5.1	53.7	0.0041	4.46	45.5	18
11	877	31982755	vimentin	5.4	59.5	5.1	53.7	0.046	3.64	52.6	16
Stark exprimierte Proteine im Kortex-Proteom											
12	1135	6680117	glutathione synthetase	5.9	52.4	5.7	52.2	0.038	-6.59	9.1	2
13	3109	62185646	heat-responsive protein 12	6.78	7.4	8.7	14.2	0.0055	-2.91	20	3
14	2044	319837	malate dehydrogenase	6.3	32.3	6.3	36.5	0.014	-2.19	12	5
Kontaminierende Proteine											
15	3057	4760586	hemoglobin beta-1 chain	7.3	8.2	7.7	15.8	0.0068	-24.55	14.4	2
16	3061	4760586	hemoglobin beta-1 chain	7.5	8.2	7.7	15.8	0.055	-9.18	53.1	4
17	3062	4760586	hemoglobin beta-1 chain	7.7	8.1	7.7	15.8	0.029	-14.96	63.7	7
18	3104	28175802	hemoglobin alpha	7.8	7.3	8.7	15.1	0.038	-13.89	31.7	5
19	3090	4760586	hemoglobin beta-1 chain	7.5	7.5	7.7	15.8	0.0057	-30.96	22	3
20	344	3647327	serum albumin	6.0	77.3	5.8	68.7	0.00014	-79.82	9.5	3
21	357	3647327	serum albumin	6.1	77.3	5.8	68.7	0.00005	-62.37	9.7	5
22	361	3647327	serum albumin	6.1	77.3	5.8	68.7	0.00051	-23.07	8.2	4
23	363	3647327	serum albumin	6.1	77.3	5.8	68.7	0.0016	-21.25	6.7	3

Die repräsentativen Gele illustrieren exemplarisch den Expressionsunterschied von Spot 357 und Spot 2227 (Abb. 9A, B genauere Angaben → siehe Beschreibung). Spot 357 konnte nach der Proteinidentifizierung einer großen Gruppe an Spots aus kontaminierendem Serumalbumin zugewiesen werden. Bei Spot 2227 handelt es sich um Chlorid-Kanal 5.

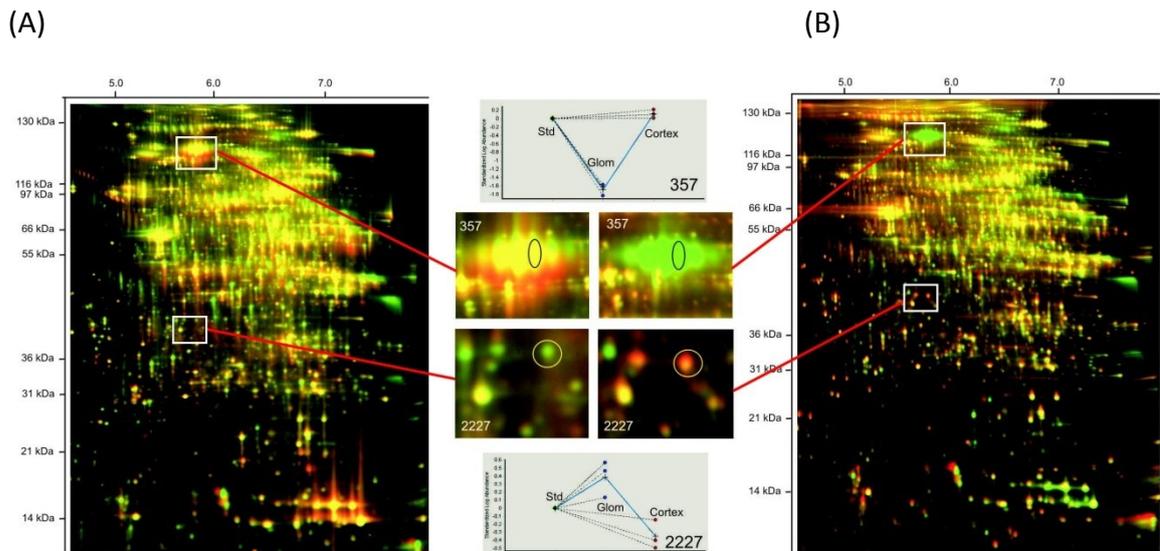


Abbildung 9A, B: (A) Abbildung A zeigt ein Gel, das mit 3,0µg Kortex-Proteom (Cy5, rot markiert) und 3,0µg internem Standard (Cy3, grün markiert) beladen ist. (B) Abbildung B zeigt ein Gel, welches mit 3,0µg glomerulärem Proteom (Cy5, rot markiert) und 3,0µg Internem Standard (Cy3, grün markiert) beladen ist. Die Angaben zwischen den Abbildungen bezeichnen die glomeruläre (Glom) und kortikale (Cortex) Expression der Proteinspots 357 und 2227 im Vergleich zum Internen Standard (Std). Die Angaben wurden mittels DeCyder-Software aus je drei unabhängigen Proben ermittelt. Der obere Spot 357 ist im Kortex-Proteom (rot markiert) wie auch im internen Standard (grün markiert) fast gleich stark exprimiert, was zur gelben Überlagerung führt. Die Expression im glomerulären Proteom (rechtes Gel, rot markiert) ist so gut wie nicht nachweisbar, weshalb lediglich der interne Standard (grün) zur Darstellung kommt. Der untere Spot 2227 zeigt ein gegenteiliges Expressionsmuster.

5.2.3 Isolierung von humanen Glomeruli aus kryokonservierten histologischen Schnitten durch Lasermikrodissektion

Humanes Nierengewebe wurde in *Tissue-TekOCT* eingebettet und kryokonserviert. Serienschnitte (6 μm) wurden fixiert und gefärbt. Mittels Lasermikrodissektion wurden Glomeruli in unterschiedlicher Anzahl (100, 75, 10) ausgeschnitten und isoliert. Die isolierte Fläche wurde durch die Acturus software angegeben. Für die exemplarische 2D-Gelelektrophorese wurde eine Fläche von 1.53 mm^2 für 100 Glomeruli (Abb. 10A, 1400 Spots), 0.91 mm^2 für 75 Glomeruli (Abb. 10B, 1350 Spots) und 0.18 mm^2 für 10 Glomeruli (Abb. 10C, 900 Spots) ausgeschnitten. Die Proteinmengen für die Markierung mittels Sättigungsfarbstoffen und die 2D-Gelelektrophorese betragen 4.5 μg , 2.7 μg und 0.5 μg respektive.

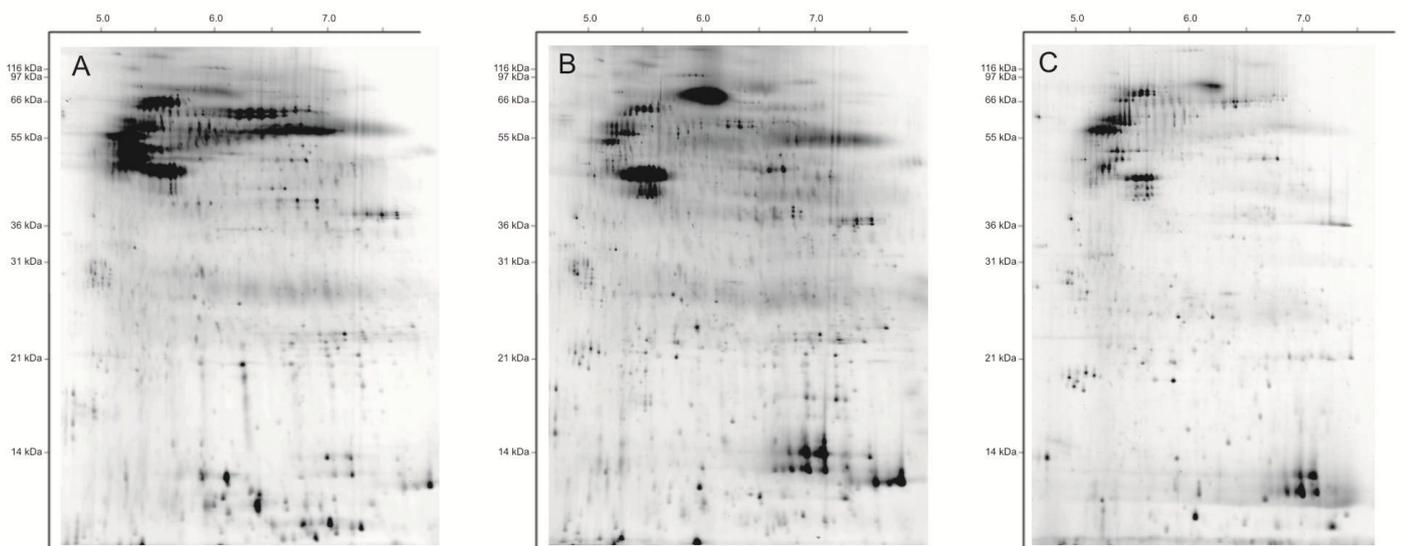


Abbildung 10: (A-C) Repräsentative 2D-Gele beladen mit humanem glomerulären Protein, das aus humanen Gewebeschnitten mittels Lasermikrodissektion gewonnen wurde. (A): 100 Glomeruli (4.5 μg , 1400 Spots), (B): 75 Glomeruli (2.7 μg , 1350 Spots), (C): 10 Glomeruli (0.5 μg , 900 Spots)

5.3 Differentielle Proteinexpression im Mausmodell der chronischen Niereninsuffizienz

5.3.1 2D-Gelelektrophorese des glomerulären Proteins (FVB-Maus: Sham vs. SNx)

Die Embolisation von Glomeruli durch isolierte Perfusion der Nierengefäße mittels ferromagnetischen Partikeln (*Dynabeads*) erfolgte an jeweils fünf Versuchstieren.

Im Anschluss an den Markierungsprozess wurden jeweils 3 µg glomerulären Proteins beider Versuchsgruppen gegen einen internen Standard auf ein Gel aufgetragen. Nach der differentiellen 2D-Gelelektrophorese und Bildaquisition mittels konfokalen Fluoreszenzscanners konnten im Mittel zirka 2100 Protein-Spots detektiert werden (Tab. 4).

Tabelle 4: Vergleich zwischen SNx-Glomeruli und Sham-Glomeruli (FVB-Maus / je 5 Gele) - Differentiell exprimierte Proteinspots (n=50; p < 0.05 für einen mindestens 1.5-fachen Expressionsunterschied)

Anzahl an detektierten Spots in den untersuchten Gelen (n=2x5)	2100
Anzahl der sehr stark hoch-regulierten Spots in SNx-Glomeruli (>5-fach höhere Expression im Vergleich zur Sham-Gruppe)	19
Anzahl der stark hoch-regulierten Spots in SNx-Glomeruli (>1.5 fach <5-fach höhere Expression im Vergleich zur Sham-Gruppe)	13
Anzahl sehr stark exprimierter Spots in Sham-Glomeruli (>5-fach höhere Expression im Vergleich zur SNx-Gruppe)	8
Anzahl stark exprimierter Spots in Sham-Glomeruli (>1.5 fach <5-fach höhere Expression im Vergleich zur SNx-Gruppe)	10

5.3.2 Identifizierung differentiell exprimierter glomerulärer Proteine (FVB: Sham vs. SNx)

Nach Etablierung der glomerulären Proteinanalyse als standardisiertes Verfahren wurde die differentielle glomeruläre Proteinexpression chronisch niereninsuffizienter Mäuse im Vergleich zu scheinoperierten Kontrollmäusen untersucht (Sham vs. SNx, n=5).

Tabelle 4 zeigt die Proteinquantifizierung nach Analyse durch DeCyder-Software mit 2100 detektierten Spots.

Abbildung 11 (A, B) zeigt ein repräsentatives Gel, auf welchem glomeruläres Protein (jeweils Cy5-markiert, rot) gegen den internen Standard (Kortexgewebe, Cy3 markiert, grün) aufgetragen ist.

In Tabelle 4 und 5 sind die signifikanten Unterschiede der Proteinexpression aufgelistet. Insgesamt konnten 50 differentiell exprimierte Proteinspots ermittelt werden, die mindestens eine 1.5- fache erhöhte bzw. verminderte Expression aufwiesen ($p < 0.05$). Für 18 Proteine fand sich eine Expressionsminderung in der SNx-Gruppe im Vergleich zur Sham-Gruppe (positive Expressionsratio). 32 Proteine zeigten im Vergleich zur Sham-Gruppe eine Expressionssteigerung in der SNx-Gruppe (negative Expressionsratio). Mittels nanoLC ESI-MS/MS konnten 35 Proteine mit zum Teil unterschiedlicher biochemischer Funktion identifiziert werden (Tab. 5).

(Die mehrfache Detektion eines Proteins ergibt sich aus dem unterschiedlichen Prozessierungsgrad des Proteins. Veränderungen des Ladungs-, Bindungs- und Phosphorylierungszustands führen zwangsläufig zu Änderungen in der Spotposition im 2D-Gel und können daher für ein und dasselbe Protein mehrere Spots verursachen.)

Tabelle 5: Identifizierte Proteine der differentiellen Proteinexpression Sham-Glomeruli und SNx-Glomeruli unter Angabe der Massen-Daten, der Signifikanz, der Expressionsänderung und der Proteinsequenzidentifizierung

No.	Spot-name	NCBI Accession	Protein	pI	Mw [kDa] experimental	pI	Mw [kDa] theoretical	T-test	Fold change	Sequence Coverage [%]
Vermindert exprimierte Proteine in der SNx-Gruppe										
1	162	gi 31982199	meprin 1 alpha	5.68	86349	5.9	85.7	0.0072	8.1	2.2
2	164	gi 31982199	meprin 1 alpha	5.78	86242	5.9	85.7	0.0049	9.98	2.2
3	165	gi 31982199	meprin 1 alpha	5.98	86242	5.9	85.7	0.00026	14.33	2.2
4	166	gi 31982199	meprin 1 alpha	5.89	86029	5.9	85.7	0.00012	21.63	2.2
5	293	gi 19072778	hydrophilic CFTR-binding protein	5.39	75438	4.9	56.2	5.30E-05	5.91	13.3
		gi 10946938	PDZ domain containing 1			5.2	56.5			13.1
6	295	gi 19072778	hydrophilic CFTR-binding protein	5.39	75438	4.9	56.2	5.30E-05	5.91	13.3
		gi 10946938	PDZ domain containing 1			5.2	56.5			13.1
7	298	gi 19072778	hydrophilic CFTR-binding protein	5.39	75438	4.9	56.2	5.30E-05	5.91	13.3
		gi 10946938	PDZ domain containing 1]			5.2	56.5			13.1
8	301	gi 19072778	hydrophilic CFTR-binding protein	5.39	75438	4.9	56.2	5.30E-05	5.91	13.3
		gi 10946938	PDZ domain containing 1			5.2	56.5			13.1
9	875	gi 31982755	vimentin	6.83	52533	5.1	53.7	0.00024	3.33	14.2
10	876	gi 13385454	glycine amidinotransferase	6.94	52468	8.5	46.6	0.00013	4.25	9.7
11	1006	gi 192065	argininosuccinate synthetase	7.52	48768	8.5	46.6	9.70E-05	4.39	22.8
12	1013	gi 21707669	Aldolase 2. B isoform	7.86	48467	8.5	39.5	9.40E-05	3.42	28
13	1192	gi 6996911	argininosuccinate synthetase	7.33	44384	8.5	46.6	7.40E-05	2.05	15
Gesteigert exprimierte Proteine in der SNx-Gruppe										
14	2056	IPI00111876.2	CCG1-interacting factor B	6.04	19759	5.6	22.5	0.00039	2.97	18.6
15	1945	gi 6678413	triosephosphate isomerase 1	7.16	22.8	7.1	26.7	7.30E-04	3.12	30.5
16	294	gi 3851614	succinate dehydrogenase Fp subunit	6.98	75251	6.2	58.3	0.00027	-3.85	5.8
			Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase. alpha subunit	7.47	72775	9.9	82.6	5.80E-05	-9.88	9.4
17	336	gi 54887356	Coenzyme A hydratase. alpha subunit	7.47	72775	9.9	82.6	5.80E-05	-9.88	9.4
			Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase. alpha subunit	7.47	72775	9.9	82.6	5.80E-05	-9.88	9.4
18	337	gi 54887356	Coenzyme A hydratase. alpha subunit	7.47	72775	9.9	82.6	5.80E-05	-9.88	9.4
			Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase. alpha subunit	7.47	72775	9.9	82.6	5.80E-05	-9.88	9.4
19	338	gi 54887356	Coenzyme A hydratase. alpha subunit	7.47	72775	9.9	82.6	5.80E-05	-9.88	9.4
20	432	gi 16923998	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	5.54	68064	5.1	66.8	0.00016	-3.69	15.7
21	433	gi 293689	lamin B	5.59	67896	5.1	66.9	9.20E-05	-5.82	14.6
22	495	gi 23958822	Glucose regulated protein	6.24	65256	5.9	56.7	5.60E-05	-2.27	18.8
23	499	gi 23958822	Glucose regulated protein	6.15	65094	5.9	56.7	0.00012	-2.58	18
			S41661 protein disulfide-isomerase (EC 5.3.4.1) ERp61 precursor - mouse	6.33	65175	5.9	56.7	0.00085	-7.23	13.7
24	500	gi 1083311	5.3.4.1) ERp61 precursor - mouse	6.33	65175	5.9	56.7	0.00085	-7.23	13.7
25	517	gi 15929761	Lamin A. isoform A	6.5	64452	6.6	74.2	9.20E-06	-13	8
26	955	gi 3198	vimentin	7.99	50365	5.1	53.7	0.00015	-3.41	14.2
27	1146	gi 17511847	ACTG1 protein	5.7	45611	5.6	41	0.0058	-3.29	16
28	1592	gi 19353393	Tpm2 protein	4.87	34341	4.6	33	2.20E-05	-5.81	18.3
29	1654	gi 38371755	dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	6.1	32884	5.8	31.4	1.80E-07	-161.55	10.5
30	1716	gi 30794164	clathrin. light polypeptide (Lcb)	4.83	30908	1.5	23.2	1.40E-05	-3.55	11.8
31	1875	gi 467517	collagen	7.93	24606	9.3	51.5	9.10E-08	-6.05	3.9
32	1904	gi 47894398	tropomyosin 4	4.88	23825	4.6	28.5	8.80E-05	-6.45	68.5
33	1977	gi 2944420	complement C4	6.4	21981	6.5	127.4	0.00032	-21.63	3.7
			Biphenyl hydrolase-like (serine hydrolase. breast epithelial mucin-associated antigen)]	7.83	22009	9.3	32.9	8.30E-05	-5.33	5.2
34	1978	gi 18606328	breast epithelial mucin-associated antigen]	7.83	22009	9.3	32.9	8.30E-05	-5.33	5.2
35	2238	gi 12805209	Galectin- 1 (Lectin. galactose binding soluble1	5.39	14785	5.2	14.9	1.60E-06	-23.61	43

In Tabelle 5 sind die identifizierten Proteine aus dem Vergleich des glomerulären Proteoms von Sham vs. SNx aufgelistet. Exemplarisch zeigt sich für das Protein Galectin-1 (*Lectin, galactose binding, soluble 1*) eine 23.6-fach erhöhte Expression in der SNx-Gruppe. Ebenfalls zeigt sich ein erhöhtes Vorkommen von Komplement-C4 (21.6-fach). Auch Kollagen ist mit einer 6.05-fach höheren Expression im SNx-Proteom vorhanden. Im Vergleich dazu ist die Metalloproteinase Meprin um den Faktor 13.51 ± 6.00 erniedrigt exprimiert. Dimethylarginine-Dimethylaminohydrolase 1 (DDAH 1) ist in der SNx-Gruppe ca. 160-fach stärker exprimiert.

In Abbildung 11 sind zwei repräsentative Gele dargestellt. Es wird exemplarisch der Expressionsunterschied von Spot 166 und 336 dargestellt (Abb. 11 A, B - genauere Angaben → siehe Beschreibung).

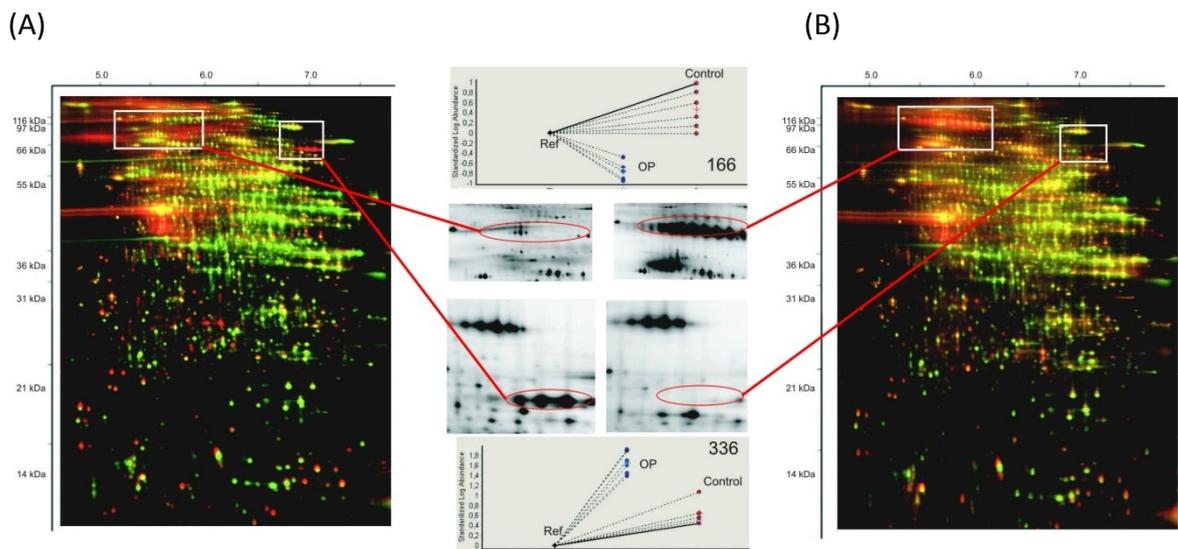


Abbildung 11 A, B: (A) Abbildung A zeigt ein Gel, das mit $3.0\mu\text{g}$ SNx-Proteom (Cy5, rot markiert) und $3.0\mu\text{g}$ internem Standard (Cy3, grün markiert) beladen ist. (B) Abbildung B zeigt ein Gel, das mit $3.0\mu\text{g}$ Sham-Proteom (Cy5, rot markiert) und $3.0\mu\text{g}$ internem Standard (Cy3, grün markiert) beladen ist. Die Angaben zwischen den Abbildungen bezeichnen die glomeruläre Expression in der nephrektomierten (OP) und Kontroll-Gruppe (Control) der Proteinspots 166 und 336 im Vergleich zum Internen Standard (Ref.). Die Angaben wurden mittels DeCyder-Software aus je fünf untereinander unabhängigen Proben ermittelt. Der obere Spot 166 ist im SNx-Proteom (Abb. A, rot markiert) im Vergleich zum Sham-Proteom (Abb. B, rot markiert) fast nicht exprimiert. Der Spot 336 zeigt ein gegenteiliges Expressionsmuster, wobei beide Spots im internen Standard nachweisbar sind.

5.4 Immunhistochemie differentiell exprimierter glomerulärer Proteine

Es erfolgte die immunhistologische Färbung von Paraffin-eingebettetem Nierengewebe auf Komplement C4 und Galectin-1. Der immunhistologische Nachweis der genannten Proteine diente der qualitativen Darstellung der in der 2D-Gelelektrophorese nachgewiesenen Proteine.

5.4.1 Komplement C4

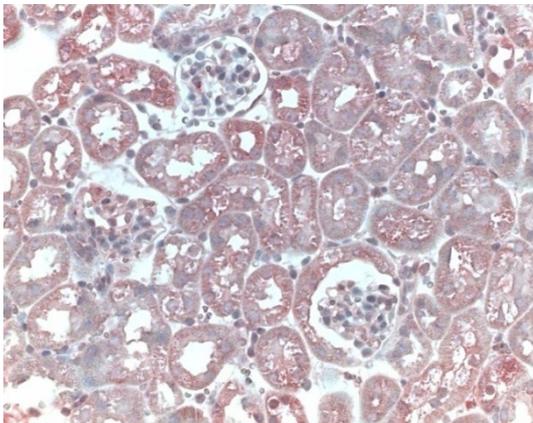


Abbildung 12: Immunhistochemie für Komplement C4 – Sham (Nierenkortex – 400-fache Vergrößerung)

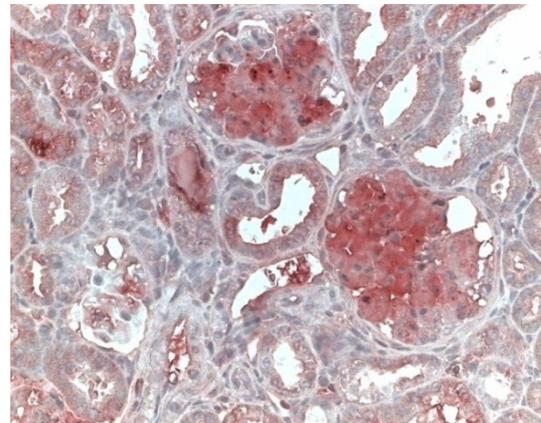


Abbildung 13: Immunhistochemie für Komplement C4 – SNx (Nierenkortex – 400-fache Vergrößerung)

Im Vergleich zeigt sich in der nephrektomierten Gruppe eine deutliche Färbung auf C4-Komplement im Bereich der Glomeruli.

5.4.2 Galectin-1 (lectin, galactose binding soluble 1)

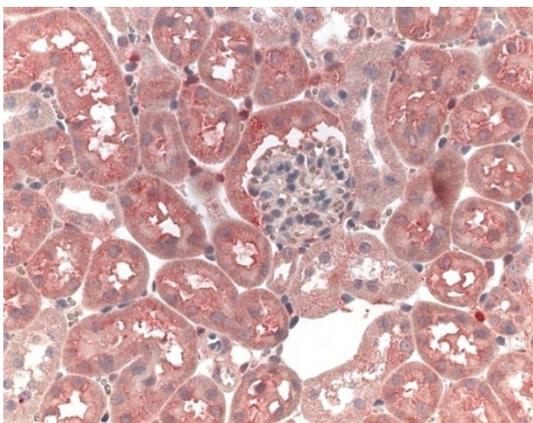


Abbildung 14: Immunhistochemie für Galectin-1 – Sham (Nierenkortex – 400-fache Vergrößerung)

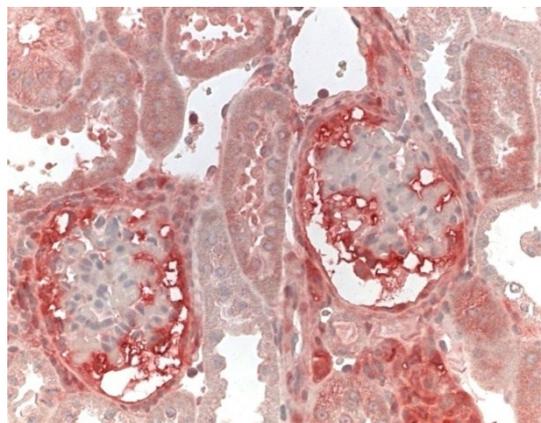


Abbildung 15: Immunhistochemie für Galectin-1 – SNx (Nierenkortex – 400-fache Vergrößerung)

Die Färbung auf Galectin-1 der SNx-Schnitte ergibt einen Nachweis im Bereich der Podozyten und Bowman-Kapsel (parietales Epithel), wohingegen sich in den Sham-Kontrollen kaum ein Nachweis erbringen lässt.

5.5 Real-Time-PCR Ergebnisse (qPCR)

Mittels Real-Time-PCR wurde untersucht, ob einzelne Proteine, entsprechend der Änderung ihrer Proteinexpression, eine Änderung der mRNA-Expression aufwiesen. Hierzu wurden jeweils 4 Proben von SNx- und Sham-DNA aus extrahierten Mausglomeruli (FVB-Stamm) miteinander verglichen. Als "Housekeeper-Gen" wurde GAPDH verwendet (Abb. 16). Die Ergebnisse werden als Mittelwerte des jeweiligen Zyklusschwellenwert (CT-Wert) angegeben.

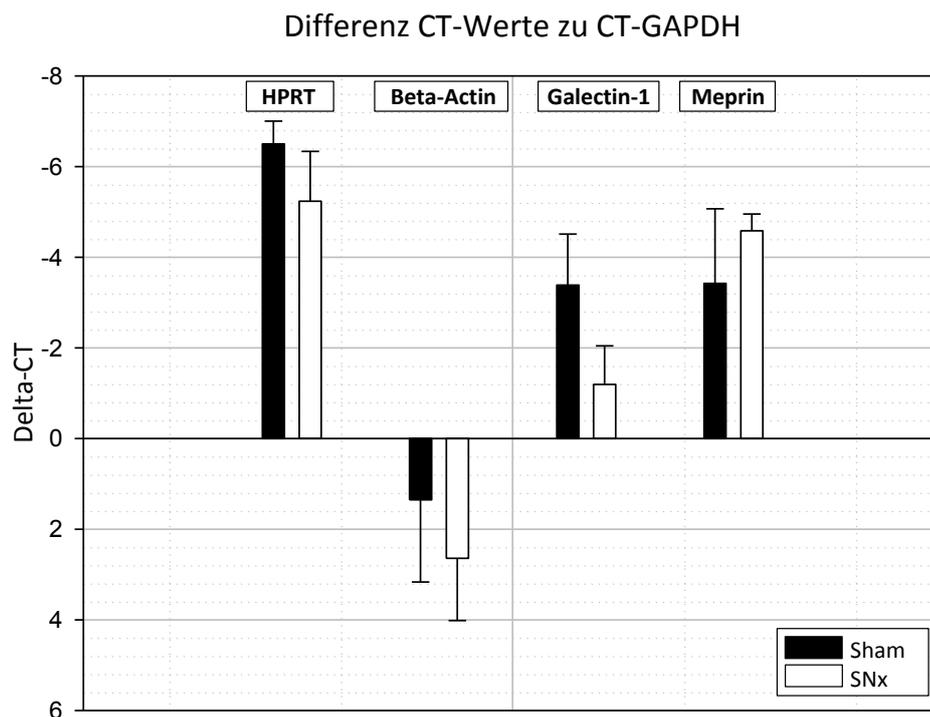


Abbildung 16: Dargestellt ist die Differenz zwischen Auto-CT-Werten und zum Auto-CT-Wert von GAPDH

Es zeigten sich signifikante Expressionsunterschiede für β -Actin und Galectin-1 zwischen der Sham- und der SNx-Gruppe ($p < 0.05$). Die Unterschiede zwischen HPRT und Meprin waren nicht signifikant.

Da aus der 2D-Gel-Analyse bekannt war, dass die Proteine Galectin-1 und Meprin gegenläufig reguliert waren (erhöhte Expression von Galectin-1, verminderte Expression

von Meprin), wird in Tabelle 6 die Differenz zwischen Galectin-1 und Meprin der CT-Werte dargestellt, um die gegenläufige Regulation auf mRNA-Ebene nachzuweisen.

Tabelle 6: Differenz der CT Werte zwischen Galectin-1 und Meprin

Meprin SNx Mittelwert CT	30.432 ± 3.53
Meprin Sham Mittelwert CT	25.095 ± 2.85
Galectin-1 SNx Mittelwert CT	27.041 ± 3.24
Galectin-1 Sham Mittelwert CT	25.057 ± 1.57
Δ CT Meprin-Galectin-1 SNx	3.391 ± 0.62
Δ CT Meprin-Galectin-1 Sham	0.035 ± 1.91

In der SNx-Gruppe zeigte sich mit einem Δ CT Meprin-Galectin-1 SNx von zirka 3.4 ein deutlich größerer Expressionsunterschied zwischen Meprin und Galectin-1 (zirka 10-facher Unterschied) als in der Sham-Gruppe.

5.6 PCR-Nachweis von Meprin und Galectin-1 in Podozyten

Zum Nachweis der mRNA-Expression von Meprin und Galectin-1 in glomerulären Zellen (Podozyten-Zellkultur) wurde eine PCR mit entsprechenden Primern durchgeführt (siehe 4.16.1). Die Positivkontrolle erfolgte mittels Primer für GAPDH.

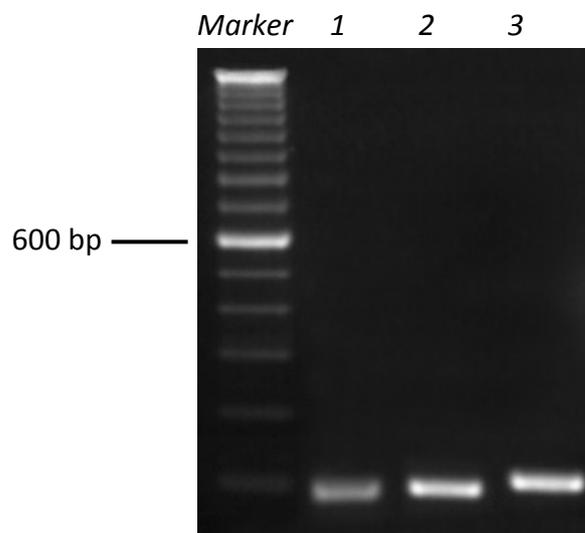


Abbildung 17: PCR-Nachweis von Meprin (1 = 94 bp) und Galectin-1 (2 = 100 bp) und GAPDH (3 = 107 bp) in Podozyten (100bp-Marker, *Invitrogen*).

6 Diskussion

Das Ziel dieser Doktorarbeit ist es, die pathologischen Prozesse, welche bei chronischer Niereninsuffizienz eine Rolle spielen, auf Ebene des Proteoms zu beleuchten.

Um die Veränderungen bei chronischer Niereninsuffizienz untersuchen zu können, muss ein reproduzierbares Tiermodell Grundlage sein. Sowohl klinisch-physiologische als auch histologische Bewertungskriterien müssen dem Krankheitsbild im Menschen entsprechen, damit mögliche Schlussfolgerungen tatsächlich die Grundlage für ein besseres Verständnis der humanen Pathophysiologie bilden können.

6.1 Das Mausmodell

6.1.1 Voraussetzungen für ein Mausmodell

Als ein suffizientes Tiermodell betrachten wir ein Versuchstier, welches folgende klinische Eigenschaften aufweist:

- 1.) eingeschränkte glomeruläre Filtrationsrate (adaptiert nach K/DOQI [12])
- 2.) Anstieg der Retentionsparameter im Serum (Kreatinin, Harnstoff)
- 3.) glomeruläre Schädigung mit konsekutiver Proteinurie

Um bei der Probenuntersuchung gleicher histologischer Herkunft deutliche Expressionsunterschiede im Proteom festzustellen, ist es erforderlich, ein Modell zu generieren, das entsprechend der obengenannten Parameter eine maximale Ausprägung der chronischen Niereninsuffizienz entwickelt. Im Rahmen einer präterminalen Niereninsuffizienz (Grad 4 nach K/DOQI) kommt es in der Niere zu (mal-)adaptiven Veränderungsprozessen. Die Aktivierung des sympathischen Nervensystems und des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, die glomeruläre Hyperfiltration, Gewebetransformation mit apoptotischen und proliferativen Prozessen sind dabei wichtige Faktoren [13-15]. Ein solches Modell ist daher die optimale Basis für die differentielle Proteinanalyse.

6.1.2 Adaptation der subtotalen Nephrektomie

Zu Beginn der experimentellen Arbeit war die subtotale Nephrektomie bei Ratten mit Entwicklung einer chronischen Niereninsuffizienz ein etabliertes Modell in Studien und im hiesigen Labor. Für die Etablierung eines Tiermodells, das für zukünftige Fragestellungen (siehe unten) geeignet ist, war es sinnvoll, das Modell auf Mäuse zu übertragen, welche als Versuchstiere vor allem den Vorteil bieten, dass im weiteren Verlauf Knock-Out-Stämme generiert werden können, um den Einfluss einzelner Gene auf die Progredienz der Niereninsuffizienz analysieren zu können.

Die Adaptation des Operationskonzeptes erfolgte zuerst an C57BL/6-Mäusen, jedoch war eine direkte Umsetzung nicht möglich. Der initiale Ansatz, durch thermische Koagulation die Blutung im Bereich der entstehenden Wundflächen der subtotal resezierten Niere zu versorgen, stellte sich aufgrund der geringen Organgröße mit vergleichsweise großflächiger thermischer Restorganschädigung als impraktikabel heraus und führte zu einer sehr geringen Überlebensrate. Die Operationsmethode wurde soweit optimiert, dass mittels Ligatur des unteren und oberen Pols der subtotal nephrektomierten Niere eine unmittelbare Blutstillung erreicht werden konnte (siehe Methodenteil). Dies bedingte kurze Operationszeiten mit einer hohen Überlebensrate.

Der initial verwendete C57BL/6-Stamm entwickelte nach subtotaler Nephrektomie eine chronische Niereninsuffizienz, die jedoch nicht mit einer Albuminurie und damit einer progredienten Schädigung der glomerulären Feinstruktur einherging. Da sowohl eine hohe Salzzufuhr als auch eine proteinreiche Kost bei bestehender Proteinurie die Nierenfunktion negativ beeinflussen, wurden die nephrektomierten C57BL/6-Mäuse im Weiteren mit salz- und proteinreichem Futter ernährt [16-19]. Die Tiere zeigten dennoch keine Albuminurie. Zu diesem Zeitpunkt der experimentellen Arbeit wurden Untersuchungen veröffentlicht, welche ebenfalls eine geringe Anfälligkeit des C57BL/6-Mausstammes für die Entwicklung einer glomerulären Schädigungen durch salzreiche Kost oder auch die Resistenz gegen die Entwicklung einer proteinurische Glomerulosklerose nach subtotaler Nephrektomie belegen konnten [20, 21]. Dies spiegelte sich in den physiologischen Parametern der C57BL/6-Mäuse wider. Sie entwickelten keine Albuminurie. Trotz reduzierter glomerulärer Filtrationsrate war die Niereninsuffizienz nicht progredient und der Anstieg der Retentionsparameter war vergleichsweise gering (FVB vs. C57BL/6 [siehe 5.1.1]).

6.1.3 Entwicklung einer chronischen Niereninsuffizienz nach subtotaler Nephrektomie im FVB-Stamm

Pillebout et al. zeigten in einer Arbeit aus dem Jahr 2001, dass Mäuse des FVB-Stamms nach subtotaler Nephrektomie deutliche tubulo-interstitielle Läsionen und proliferative Veränderungen im Sinne adaptiver Prozesse im renalen Kortex aufweisen [22]. Daher wurde die am C57BL/6-Stamm etablierte Operationsmethode auf FVB-Mäuse angewandt. Innerhalb des Versuchszeitraums von fünf Wochen entwickelten die subtotal nephrektomierten FVB-Mäuse (SNx) im Gegensatz zu scheinoperierten Kontrollmäusen (Sham) eine chronische Niereninsuffizienz Grad 4 (Tab. 7). (Aufgrund der zuvor festgelegten klinischen Parameter zur Etablierung des Mausmodells, wird in dieser Arbeit der Grad der chronischen Niereninsuffizienz adaptiert nach K/DOQI angegeben [12] – siehe Tabelle 7.)

Tabelle 7: Einteilung der chronischen Niereninsuffizienz adaptiert nach K/DOQI [12]

K/DOQI Stadium	Beschreibung	GFR – Mensch (ml/min/1.73m ²)	Prozent im Vergleich zur normalen GFR	Grp.	Kreatinin-Clearance FVB-Maus
1	Nierenschädigung mit normaler oder erhöhter GFR	>90	100 %	Sham	0.104 ml/min (=100%)
2	Nierenschädigung mit leicht eingeschränkter GFR	60-90	66-100 %		
3	Mittelgradig eingeschränkte GFR	30-59	33-65 %		
4	Stark eingeschränkte GFR	15-29	12.5-33 %	SNx	0.015 ml/min (=15%)
5	terminales Nierenversagen	<15 oder Dialyse	<12.5 %		

Die nephrektomierten Mäuse entwickelten einen signifikanten Anstieg der Retentionsparameter. Serum-Kreatinin und Serum-Harnstoff stiegen in der SNx-Gruppe im Vergleich zur Sham-Gruppe zirka um das Fünffache an.

Neben der Retention harnpflichtiger Substanzen entwickelten die nephrektomierten Mäuse eine Albuminurie. Das Auftreten einer Albuminurie ist ein früher und sensitiver Marker der glomerulären Schädigung und stellt einen Risikofaktor für die Entwicklung und Progression kardiovaskulärer und renaler Erkrankungen dar [23-25]. Albumin ist mit seiner relativ geringen Molekülgröße von 68 kD eines der ersten Proteine, das aufgrund einer Schädigung der glomerulären Filterfunktion in den Urin übertritt [26]. SNx-Mäuse entwickelten im Vergleich zur Sham-Gruppe eine 44-fach höhere Albuminexkretion. Daher ist davon auszugehen, dass in der SNx-Gruppe eine Schädigung des glomerulären Filters vorlag.

Mit Entwicklung einer chronischen Niereninsuffizienz kommt es durch Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System und durch Steigerung des Sympathikotonus zum Anstieg des Blutdrucks [13, 27, 28]. Am Ende des Beobachtungszeitraums wiesen die SNx-Mäuse im Mittel einen signifikant höheren systolischen Blutdruck als die Sham-Kontrollgruppe auf.

Neben der klinischen Manifestation einer chronischen Niereninsuffizienz entwickelten die Mäuse in dem hier etablierten Modell ein Glomerulosklerose. Die fibrotischen Veränderungen werden für die progredienten Funktionsverschlechterung verantwortlich gemacht [29, 30]. Da es in der Niere als Reaktion auf den Verlust von Organgewebe nicht zur Neubildung von Nephronen kommen kann, entwickelt sich durch Proliferation sowohl des funktionellen Nierengewebes als auch Akkumulation extrazellulärer Matrix eine Hypertrophie des Organs. Mit einer Gewichtszunahme von zirka 330% der Organmasse zeigte sich in der SNx-Gruppe ein größerer Zuwachs an Nierengewebe als in der Sham-Gruppe, in welcher der Zuwachs bei zirka 170% lag. Da die Mäuse zum Operationszeitpunkt zirka 65 Tage alt waren, kam es in der Kontrollgruppe durch weiteres Wachstum zur Größenzunahme. Die zusätzliche Größenzunahme in der SNx-Gruppe lässt sich zum einen durch die kompensatorische Größenzunahme des funktionellen Nierengewebes (Glomeruli, tubuläres System) und zum anderen durch den

fortschreitenden sklerotischen Umbau mit Zunahme der extrazellulären Matrix erklären. Zudem zeigte sich vor allem in der frühen post-operativen Phase eine deutliche proliferative Aktivität im Bereich der Glomeruli (Abb. 7 u. 8B). Daher scheinen vor allem frühe proliferative Prozesse zusammen mit Apoptose eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Glomerulosklerose zu spielen. Im weiteren Verlauf führen diese Prozesse fortschreitend zum Funktionsverlust der Niere [31].

Zusammenfassend zeigt sich, dass das hier etablierte Mausmodell die zu Beginn der Arbeit festgelegten Vorgaben erfüllt. Die subtotal nephrektomierten FVB-Mäuse entwickelten nach dem Beobachtungszeitraum von fünf Wochen eine präterminale Niereninsuffizienz, welche entsprechend klinischer Parameter mit dem Rückgang der glomerulären Filtrationsrate, dem Anstieg der Retentionsparametern, einer Albuminurie und einer renalen Hypertonie einherging. Darüber hinaus entwickelten die nephrektomierten Tiere eine Glomerulosklerose. Damit wies das Nierengewebe typische histologische Veränderungen auf, die mit dem klinischen Bild einer chronischen Niereninsuffizienz einhergehen.

Im nächsten Schritt erfolgte die Etablierung der differentiellen Proteinanalyse des glomerulären Proteoms.

6.2 Isolierung und Analyse glomerulärer Proteine

6.2.1 Notwendigkeit glomerulärer Proteinanalyse

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde eine neue Methode zur differentiellen Proteinanalyse geringster Gewebemengen aus Glomeruli entwickelt. Expressionsuntersuchungen einer Reihe renaler Proteine einschließlich einiger glomerulärer Proteine wurden bisher meist mittels Western Blot oder immunhistologischer Verfahren durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methoden lässt sich jedoch nur eine begrenzte Anzahl von Proteinen gleichzeitig untersuchen. Zusätzlich ist das Vorhandensein spezifischer Antikörper und damit die Kenntnis über das zu untersuchende Protein eine Grundvoraussetzung. Im Gegensatz dazu erlaubt die differenzielle 2D-Gelelektrophorese in Kombination mit der Methode der

Massenspektroskopie die Detektion und Identifizierung einer Vielzahl unbekannter Proteine einer zu untersuchenden Probe. Durch konsequente Weiterentwicklung lassen sich aktuell bis zu 10000 Polypeptid-Spots auf einem Gel differenzieren [4]. Mit Einführung der DIGE-Technologie konnte in der Proteomanalyse eine beispiellose Genauigkeit und Sensibilität erreicht werden [11, 32].

Obwohl die 2D-Gelelektrophorese eine hohe Auflösung in der Auftrennung des renalen Proteoms bietet, war bisher eine Proteinmenge von mindestens 75µg bzw. 500µg nötig, um 1095 bzw. 1713 Proteinspots darzustellen [1, 2]. Diese Anforderungen limitierten die Umsetzbarkeit der differentiellen Proteinanalyse erheblich. Vor allem bei der Analyse von glomeruläre Proteinproben kann man aufgrund des vergleichsweise geringen Anteils von Glomeruli am Gesamtnierengewebe nur auf sehr kleine Probenmengen zurückgreifen. Die Analyse von Nierenkortexgewebe ermöglicht aus diesem Grund nur einen unzureichenden Einblick in Prozesse, die sich im oder am Glomerulum abspielen. Für die Untersuchung glomerulärer Proteine muss die Möglichkeit der Analyse kleinster Proteinmengen eine Grundvoraussetzung sein.

Um die grundlegenden Mechanismen, die zu einer fortschreitenden Schädigung von Glomeruli führen und die pharmakologischen Behandlungskonzepte, die Einfluss auf die Progression von Nierenerkrankungen haben, zu verstehen, ist eine differentielle Analyse von glomerulärem Proteom ein entscheidender Ansatz [33]. Zurzeit gibt es keine Datenerhebung, welche die Änderungen des glomerulärem Proteoms mit Änderungen klinischer Parameter korreliert.

Aus diesem Grunde wurden im Rahmen dieser Arbeit neue Ansätze zur Gewinnung glomerulären Proteins und dessen spezifische Auftrennung mittels hoch sensitiver, sättigungsmarkierter differentieller 2D-Gelelektrophorese (2D-DIGE) entwickelt.

Die Extraktion der Glomeruli und damit die Gewinnung ausreichender Mengen glomerulärer Proteine wurden durch Modifikation und Weiterentwicklung einer vorbeschriebenen Methode zur Isolierung von Glomeruli mittels ferromagnetischer Partikel (Dynabeads) erreicht [3]. Durch die isolierte Perfusion von Mäusenieren mittels dieser Partikel (Diameter von 4.5 µm) wurden die Kapillaren im Bereich der Glomeruli embolisiert. Die so mit ferromagnetischen Partikeln angereicherten Glomeruli wurden mit Hilfe eines Magnetfängers nach Prozessierung des Nierengewebes isoliert. Im Vergleich

zur kleinen Organgröße konnte selbst aus subtotal nephrektomierten Organen eine ausreichende Proteinmenge gewonnen werden.

Im Vergleich dazu ist die klassische Siebmethode zur Anreicherung von Glomeruli aus kleinen Organen bzw. Organanteilen im Grad der Aufreinigung als auch der Effizienz der hier beschriebenen Methode unterlegen.

6.2.2 Expressionsunterschiede Kortex vs. Glomerulum

Bei Betrachtung der differentiellen Proteomanalyse (Tabelle 3) zeigen sich eine Reihe von mitochondrialen und dem Energiestoffwechsel zugeordneten Proteine, die verstärkt glomerulär exprimiert werden. Die Bedeutung einer intakten mitochondrialen Funktion für glomeruläre Endothelzellen wurde erst kürzlich hervorgehoben [34]. Die um Faktor drei bis vier erhöhte Expression von Vimentin, als ein typisches podozytäres Protein [35], beweist die Plausibilität dieser Methode, glomeruläres Protein zu isolieren und der Analytik zuzuführen. Interferierende Proteine wie Serumalbumin oder Hämoglobin, die in den nicht-perfundierten Kortexproteinlysaten enthalten sind, wurden durch vorherige Perfusion aus den Glomerulilysaten um den Faktor neun bis 79 reduziert. Der hohe Anteil solcher Kontaminanten, die aus Gewebe stammen, das nicht dem zu untersuchenden Zielgewebe zugeordnet ist, demonstriert, wie wichtig die gezielte Isolierung spezifischer Organkompartimente für die zielgerichtete Analyse und Beurteilung biomolekularer Prozesse ist.

6.2.3 Analyse minimaler Proteinmengen aus Humangewebe mittels

Lasermikrodissektion

Eine Extraktion humaner Glomeruli unter Verwendung von Magnetpartikel ist nicht umsetzbar, da humanes Gewebe in der Regel als Biopsat vorliegt. Die Lasermikrodissektion (LCM) bietet die Möglichkeit, Glomeruli aus renalen Gewebeproben auszuschneiden [36]. Die Proteomanalyse aus renalem LCM-Gewebe ist in diesem Kontext kaum etabliert. Die geringe Menge an isoliertem Protein stellt den limitierenden Faktor der Lasermikrodissektion für die Proteinanalyse mittels 2D-Gelelektrophorese dar.

In dieser Arbeit wurde mittels sättigungsmarkierter differentieller 2D-Gelelektrophorese glomeruläres Protein aus humanem Gewebe in einer Größenordnung von 0.5-4.0µg analysiert [11]. Mit Hilfe dieser Technik konnte die Sensitivität soweit gesteigert werden, dass eine differentielle Proteinanalyse aus einem 6µm dünnen Gewebeschnitt mit nicht mehr als 10 isolierten Glomeruli möglich wurde.

Die Proteinanalyse mittels sättigungsmarkierter 2D-Gelelektrophorese bietet somit die Möglichkeit aus kleinsten Gewebeproben (z.B. Nierenbiopsat) das funktionelle Proteom zu untersuchen und verschiedene pathologische Zustände und die damit verbundenen Änderungen der Proteinexpression zu untersuchen. In Verbindung mit der gezielten Isolierung von Mausglomeruli und deren Proteinanalyse lassen sich, wie im Folgenden, Experimente planen, die einen tiefen Einblick in die Proteinexpression sowohl in unterschiedlichen pathophysiologischen als auch pharmakologisch beeinflussten Zuständen bieten.

6.3 Differentielle glomeruläre Proteinanalyse der chronischen

Niereninsuffizienz im Mausmodell

Durch Etablierung des Mausmodells (6.1) und der differentiellen Proteinanalyse (6.2) ergab sich die Möglichkeit, gezielt die Expressionsänderungen des glomerulären Proteoms unter pathologischen Bedingungen zu untersuchen.

Die Analyse des Proteoms bietet im Gegensatz zur Analyse des Genoms den direkten Einblick in das Stoffwechselgeschehen von Zellen und Zellverbänden. Stellt die Untersuchung des Genoms nur die Analyse von „Blaupausen“ dar, so ist es mit Hilfe der Proteomanalyse möglich, prozessierte Proteine zu erfassen, welche als solche nicht im Genom kodiert sind, sondern erst in Interaktion mit anderen Proteinen und innerhalb von Stoffwechselkaskaden entstehen.

6.3.1 Glomeruläre Proteinanalyse

Ziel der differentiellen Proteinanalyse war es, Proteine zu finden, die eine wesentliche Rolle in der Pathophysiologie der chronischen Niereninsuffizienz spielen. Dabei war aufgrund der Vorarbeit ersichtlich (4.2.1), dass sich nur dann relevante Ergebnisse erzielen lassen, wenn die Untersuchung auf möglichst (funktionell) homogenes Gewebe konzentriert wird. Die gezielte Extraktion von Glomeruli mittels ferromagnetischer Partikel unter Nutzung der isoliert perfundierten Mausniere bot hierfür eine exzellente Grundlage. Durch die vorherige Perfusion mittels PBS-Lösung wurde die Kontamination durch Blut vermieden (4.2.2). Die gezielte Extraktion und hohe Anreicherung von Glomeruli ermöglichte die gezielte Untersuchung dieser funktionellen und histologischen Entität. In Hinblick auf die Pathogenese vieler Nierenerkrankungen stellt die differentielle Proteomanalyse von Glomeruli ein Werkzeug für das weitere Verständnis pathophysiologischer Zusammenhänge dar. Da der zu Grunde liegende Krankheitsprozess alle glomerulären Zellanteile betrifft, wurde eine deutliche Expressionsänderung des glomerulären Proteoms erwartet [14, 37] (Tabelle 5).

Die Proteinanalyse der Glomeruliprobe erbrachte 50 deutlich differentiell exprimierte Proteinspots. Diese wurden anschließend identifiziert, wobei einige Spots identische Proteine beinhalteten. Dies ist auf eine unterschiedliche Prozessierung der Proteine mit damit verbundenen Ladungsunterschieden und ggf. unterschiedlichen Molekülmassen zurückzuführen.

Es konnten in beiden Versuchsgruppen Expressionsunterschiede einzelner Proteine beobachtet werden, die im nachfolgenden bezüglich ihrer Eigenschaften und daraus resultierenden Funktionen in Berücksichtigung des zu Grunde liegenden pathophysiologischen Modells diskutiert werden.

6.3.2 Meprin

Die Metalloproteinase Meprin war in SNx-Glomeruli im Mittel um den Faktor 13.51 vermindert exprimiert. Diese Protease besteht aus zwei sehr ähnlichen Untereinheiten α und β , welche eine zu zirka 50 Prozent identische Aminosäuresequenz aufweisen. Die

Untereinheiten werden auf zwei unterschiedlichen Genen kodiert. Das Gen für die Untereinheit α liegt auf Chromosom 17 (Mensch 6) und für β auf Chromosom 18 (Mensch 18). Beide Untereinheiten können unabhängig oder gemeinsam exprimiert werden und bilden homo- oder heterogene Dimere oder auch Oligomere, die durch eine Disulfid-Brücke verbunden sind [38]. Meprin liegt in sekretorische Form als Oligomer der Untereinheit α oder in membranständiger Form als Heterodimer aus α - und β -Untereinheit vor.

Meprin wird renal in Epithelzellen und hier vor allem in im Bereich proximaler Tubuluszellen exprimiert, in denen es ein integrales Protein der Bürstensaummembran ist [39, 40]. In Studien an Rattennieren konnte gezeigt werden, dass die sekretorische Form der Metalloproteinase Meprin ein wichtiges Protein zum Abbau extrazellulärer Matrix ist [41, 42]. Im Rahmen von Organischämien steht eine hohe Konzentration von Meprin α im Bereich der Bürstensaummembran in Zusammenhang mit einer vermehrten Gewebsschädigung, wohingegen eine verminderte Gewebskonzentration an Meprin mit Organfibrose in Verbindung steht [41, 43, 44].

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Meprin auch ein glomerulär exprimiertes Protein ist. In vitro kann die Meprin-Expression auf mRNA-Ebene in Podozyten nachgewiesen werden (Abb. 17). Die Tatsache, dass die Expression mit Entwicklung der chronischen Niereninsuffizienz deutlich zurück geht, ist konkordant mit Ergebnissen früherer Arbeiten, welche im Rahmen von Nierenerkrankungen eine deutliche Verminderung sowohl in Bezug auf mRNA- als auch auf Protein-Expression nachweisen konnten [45, 46]. Im hier vorgestellten Modell der chronischen Niereninsuffizienz geht die Entwicklung einer fortschreitenden Glomerulosklerose mit einer geminderten Expression von Meprin einher. Als abbauendes Enzym der extrazellulären Matrix ist es vorstellbar, dass die verminderte Konzentration die Progression der Sklerose und damit den fortschreitenden Funktionsverlust zusätzlich bedingt. Trotz der erhöhten Gewebeschädigung durch eine gesteigerte Meprinkonzentration in akuten pathologischen Prozessen [43], scheint eine zu geringe Konzentration von Meprin bei chronischen Prozessen ebenso von Nachteil zu sein. Nimmt man vor dem Hintergrund der Tatsache, dass sich bei C57BL/6Mäusen mittels 5/6-Nephrektomie keine signifikante Glomerulosklerose und keine chronische Niereninsuffizienz erzeugen lässt, zur Kenntnis, dass C57BL/6Mäuse ca. drei Wochen nach Geburt eine erhöhte renale Expression von Meprin aufweisen [39, 47], ist zu postulieren,

dass die Metalloproteinase Meprin einen nephroprotektiven Effekt im Rahmen chronischer Nierenerkrankungen hat. Welche Mechanismen zur Expressionsminderung von Meprin führen, bleibt ungeklärt. Diese Expressionsminderung im Rahmen chronischer Nierenerkrankungen findet auch auf mRNA Ebene statt. Allerdings zeigte sich trotz eines positiven Einflusses auf die Progression der chronischen Niereninsuffizienz durch Hemmung der Sympathikusaktivität kein Wiederanstieg der Meprin-Expression [48, 49]. Weitere Studien sind notwendig, um die Rolle von Meprin auf die Entstehung einer chronischen Niereninsuffizienz bei fortschreitender Glomerulosklerose zu klären. Hierbei bietet sich der Einsatz etwaiger Meprin-Antagonist bzw. -Agonist an, die gegebenenfalls den Verlauf der chronischen Niereninsuffizienz positiv oder negativ beeinflussen würden.

6.3.3 Galectin-1

Ein weiteres Protein mit äußerst interessanten Eigenschaften ist Galectin-1. Dieses wird in der SNx-Gruppe im Gegensatz zur Metalloproteinase Meprin hochreguliert. Mit einem Faktor von 23.6 ist es eines der am stärksten hochregulierten Proteine in der nephrektomierten Versuchsgruppe.

Galectine sind kleine Proteine, die aus zirka 130 Aminosäuren aufgebaut sind, über eine Kohlenhydrat-Erkennungsdomäne verfügen und geringe Sequenzunterschiede untereinander aufweisen. Die Kohlenhydrat-Erkennungsdomäne ist für eine β -Galaktosid-Bindung verantwortlich. Bisher wurden 15 Galectine identifiziert. Allen Galectinen ist eine hohe Affinität zu N-Acetylactosamin gemein, das Bestandteil vieler Glykoproteinen ist, wobei die unterschiedlichen Galectine unterschiedlich modifizierte Versionen dieses Saccharid-Liganden erkennen [50]. Galectin-1 ist mit 135 Aminosäuren und einer Größe von zirka 29kDa das erste identifizierte Protein aus der Gruppe der Galectine [51]. Es hat eine Kohlenhydrat-Erkennungsdomäne und liegt als Monomer sowie Homodimer vor. Auf Chromosom 22 Abschnitt q12 liegt das Gen LSGALS1, das das Protein kodiert. Galectin-1 kommt sowohl als zytoplasmatisches Protein als auch als extrazelluläres Protein vor.

Eine erhöhte Expression von Galectin-1 findet sich auch bei Nierenerkrankungen, die mit einer fortschreitenden Nierenfunktionsverschlechterung einhergehen [52]. In der zitierten Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit Entwicklung der chronischen

Niereninsuffizienz und Glomerulosklerose die glomeruläre Expression von Galectin-1 sehr stark zunimmt.

Die Tatsache, dass eine erhöhte Expression von Galectin-1 mit einer zunehmenden Organfibrose sowie dessen Funktionsverlust einhergeht [53], bestätigt sich in unserer Proteomanalyse. Im Weiteren hat Galectin-1 eine anti-inflammatorische Wirkung durch Suppression der Interleukin-2-Sekretion, welches T-Helfer-Zellen zu aktivieren vermag. Es fördert die Sekretion von Interleukin-10, welches die Makrophagenfunktion hemmt [54, 55]. Es kann T-Zell-Funktion hemmen und so die Gewebeschädigung durch T-Zell-sekernierte proinflammatorische Zytokine vermindern [54]. Die Entwicklung chronisch entzündlicher Prozesse wird auf diese Weise gehemmt [53, 56, 57]. Galectin-1 hat zudem eine modulatorische Wirkung auf Zellwachstum und Zelldifferenzierung [58-62].

Die genannten Eigenschaften von Galectin-1 lassen vermuten, dass es in diesem Modell einen Einfluss auf die Entwicklung der Glomerulosklerose hat. Im Rahmen der pathohistologischen Gewebeveränderungen der renalen Sklerose ist eine stetige Apoptoserate glomerulärer, tubulärer und interstitieller Zellen ein entscheidender Faktor [31]. Trotz proliferativer Aktivität des Nierengewebes, die zu einer Hypertrophie führen kann, führen maladaptive Prozesse zu einer gesteigerten Apoptoserate, die zu einem Fortschreiten der Sklerose und Fibrose und somit einer Verminderung der Nierenfunktion führt. Auch hierbei spielt Galectin-1 eine Rolle. In Wechselwirkung mit β -Galaktosid-Liganden der Zelloberfläche kann das Protein sowohl mitogene als auch apoptotische Wirkung haben [63].

In einem Modell akuter Glomerulonephritis konnte eine Verbesserung der Nierenfunktion als auch eine Reduktion der histomorphologischen Veränderungen der akuten immunologischen Reaktion im Bereich des Glomerulums durch Behandlung mit Galectin-1 nachgewiesen werden [64].

Galectin-1 ist ein wichtiger Faktor der Zelladhäsion. Durch Verknüpfung von Integrinen mit Glykoproteinen wie zum Beispiel Laminin und Fibronectin erhöht Galectin-1 die zelluläre Bindung zur extrazellulären Matrix und vermag so die Bindung zur glomerulären Basalmembran zu erhöhen [65-67]. In der Tat haben Galectine eine große Bedeutung in der Organisation der glomerulären Basalmembran und der Adhäsion von Podozyten mittels Integrine [68]. Die akute Schädigung im Bereich der glomerulären Basalmembran mit der Entwicklung einer Proteinurie führt zur Lösung von Podozyten und podozytären

Fußfortsätzen von der Basalmembran. Dabei kommt es zum Teil zum Verlust von der Basalmembran aufliegenden Podozyten und zur Verklumpung deren Fußfortsätze [69-71]. Es gibt es Hinweise, dass im chronischen Verlauf die Adhäsion der Podozyten an die glomeruläre Basalmembran auch bei bestehender Verklumpung der Fußfortsätze stabil bleibt bzw. wiederhergestellt wird [72]. Dieser Zustand könnte durch gesteigerte Expression von Galectin-1 beeinflusst sein.

In welcher Weise die deutlich gesteigerte Expression von Galectin-1 in der nephrektomierten Versuchsgruppe in Hinblick auf die genannten Eigenschaften dieses Proteins einen Einfluss spielen, lässt sich in dieser Arbeit nicht abschließen klären. Es ist anzunehmen, dass die gesteigerte Expression im Bereich des Glomerulum eine Art „Escape“-Mechanismus darstellt, um den Veränderungen im Bereich der glomerulären Basalmembran als auch proliferativen sowie immunologischen Prozessen entgegenzuwirken. Ob dies ein primärer Prozess ist, der eine Folge der akuten post-operativen Gewebereaktion darstellt, oder ob diese Expressionssteigerung sekundär als Reaktion oder „Begleiterscheinung“ der sich entwickelnden Glomerulosklerose entsteht, bleibt offen. Welche Rolle Galectin-1 letztlich in der Entwicklung der chronischen Niereninsuffizienz und der histologischen Veränderungen spielt, muss daher Gegenstand weiterer Forschung sein.

6.3.4 Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase 1 – DDAH 1

Im glomerulären Proteom nephrektomierter Mäuse (SNx) zeigte sich eine deutliche Expressionssteigerung des Enzyms Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase 1 (DDAH 1). Es wurde eine 160-fach höhere Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe erreicht.

DDAH 1 ist entscheidend für den Abbau von asymmetrischem Dimethylarginin (asymmetric dimethylarginine – ADMA), einem endogenen NO-Synthase-Inhibitor, verantwortlich (Abb. 18 A). ADMA entstehen während der Proteolyse methylierter Proteine und wird daher ubiquitär im Organismus gebildet. Neben dem Abbau durch DDAH 1 führt eine renale Exkretion zur Elimination von ADMA [73]. Eine chronische Niereninsuffizienz geht sowohl beim Menschen als auch im Tiermodell mit einem erhöhten ADMA-Spiegel einher [74]. Die erhöhte ADMA-Konzentration führt zu einer Hemmung der endothelialen NO-Synthase (eNOS). Es kommt daher zu einer reduzierten

endothelialen NO-Freisetzung, die mit einem erhöhten Vasotonus einhergeht. Die Reduktion der NO-Bioverfügbarkeit ist ursächlich an der Entstehung einer Hypertonie beteiligt [75]. Die reduzierte NO-Bioverfügbarkeit ist zudem Korrelat einer endothelialen Dysfunktion, die zur weiteren glomerulären Funktionsverschlechterung führen kann [76, 77]. Da DDAH 1 meist zusammen mit der NO-Synthase exprimiert wird, müssen eine enge Kopplung und eine synergistische Eigenschaft dieser Enzyme in Bezug auf die Regulation des Vasotonus angenommen werden [78]. Als abbauendes Enzym des endogenen NO-Inhibitors ADMA nimmt DDAH 1 somit eine regulatorische Funktion in Bezug auf die NO-Freisetzung ein [79].

Bisherige Arbeiten wiesen eine reduzierte renale DDAH-Aktivität und DDAH-Expression im Rahmen chronischen Niereninsuffizienz nach [74, 80]. Diese Aktivitätsminderung führte zu einem Anstieg von ADMA, der mit dem Grad der Nierenfunktionsverschlechterung und dem Blutdruckanstieg korrelierte [74, 81] (Abb. 18 B).

In dieser Arbeit konnte ein deutlicher Expressionsanstieg von DDAH 1 im glomerulären Proteom nachgewiesen werden, der im Widerspruch zu bisherigen Studien zu stehen scheint. Da DDAH nicht nur im Bereich der Glomeruli, sondern auch im Tubulussystem, der Macula densa und weiteren Endothelien der Niere exprimiert wird, kann diese Aktivitätsminderung durch eine deutliche Expressionsminderung in diesen Bereichen aufgetreten sein [79]. Des Weiteren nimmt mit fortschreitender Glomerulosklerose der Anteil an funktionellem Nierengewebe im Vergleich zur Gesamtgewebsmasse ab, wodurch sich zusätzlich eine Gesamtaktivitätsminderung erklären lässt. Da durch die hier verwendete Methode der Glomeruliextraktion vor allem perfundierte, weniger sklerosierte Glomeruli gewonnen werden, ist der Anteil an funktionellem Gewebe in diesen Proben im Vergleich zum gesamten Nierengewebe besonders hoch. Dies kann die deutlich gesteigerte Expression von DDAH 1 als Antwort von vitalem, funktionellem Gewebe im Vergleich zu deutlich geschädigtem, funktionseingeschränktem Gewebe anderer Studien erklären.

Es kommt im Rahmen der chronischen Niereninsuffizienz zu einem reduzierten Angebot von L-Arginin, weshalb auch die NO-Synthese des Endothels reduziert ist [82, 83]. Dieser Zustand wird durch die erhöhte ADMA Konzentration weiter aggraviert. Frühere Studien belegen, dass durch ein erhöhtes Angebot an L-Arginin und damit verbundener NO-

Synthese eine Progredienz der Niereninsuffizienz vermieden werden kann [83]. Im vorliegenden Fall zeigte sich bei den operierten Mäusen eine sehr starke Induktion der DDAH 1. Da der Abbau von ADMA (durch DDAH 1) mit einer verstärkten NO-Freisetzung einhergeht, ist durch die Expressionssteigerung von einem Schutzmechanismus des glomerulären Endothels auszugehen, der möglichst eine normale Endothelfunktion aufrechterhalten soll (Abb. 18 C). Global gesehen scheint dieser Mechanismus allerdings nicht ausreicht, um das NO-Defizit auszugleichen. Allerdings ist anzunehmen, dass dieser Mechanismus den Progress der Erkrankung verlangsamt.

A) allgemein

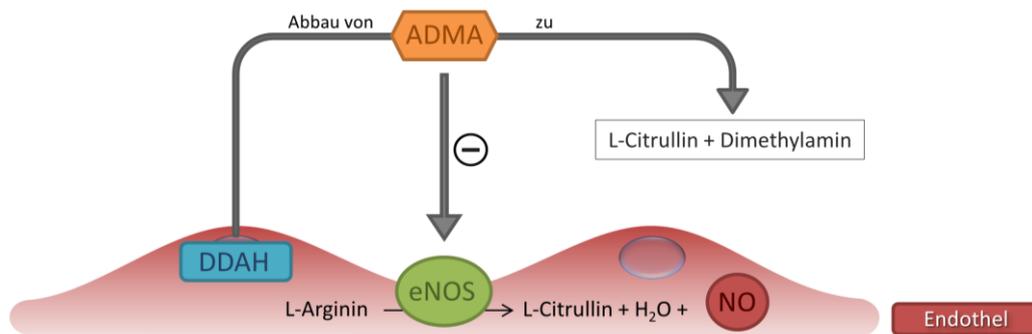


Abbildung 18 A: Dargestellt ist die Interaktion zwischen der endothelialen NO-Synthase, ADMA und DDAH im gesunden Glomerulum.

B) Chronische Niereninsuffizienz

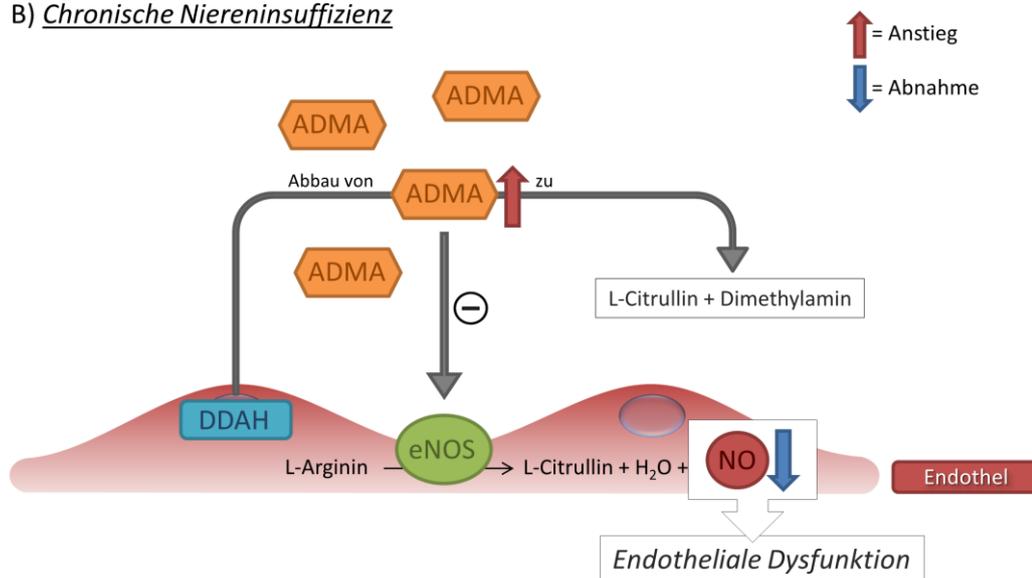


Abbildung 18 B: Hier ist der Anstieg von ADMA im Serum bei chronischer Niereninsuffizienz mit folglich stärkerer Inhibition der eNOS und konsekutiv verringerter NO-Freisetzung dargestellt.

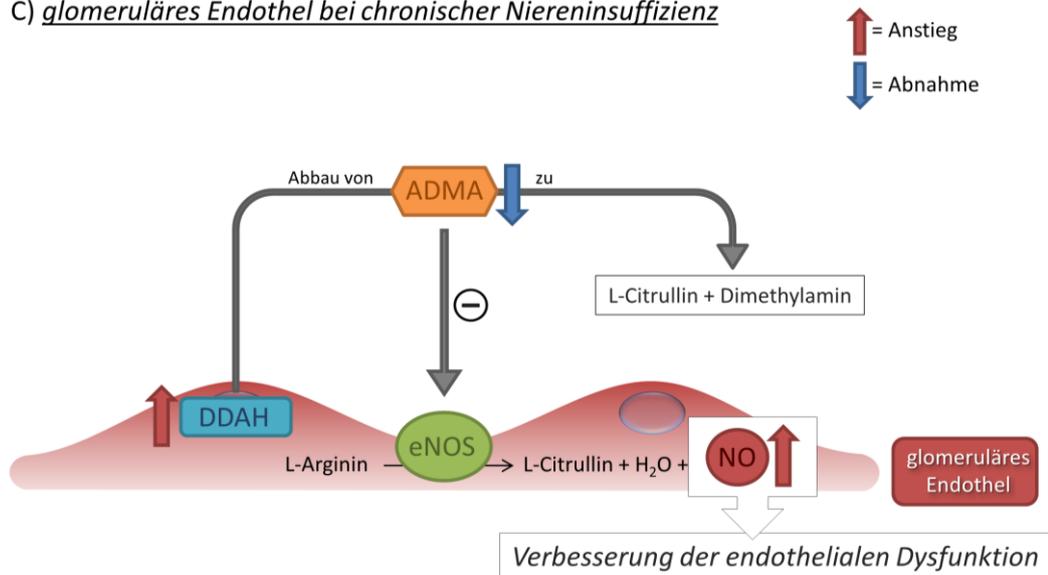
C) *glomeruläres Endothel bei chronischer Niereninsuffizienz*

Abbildung 18 C: Die Abbildung demonstriert den „Rescue“-Mechanismus im Bereich des glomerulären Endothels bei chronischer Niereninsuffizienz.

6.3.5 Komplement C4

Komplement C4 ist ein Protein, das in der SNx-Gruppe um den Faktor 21.6 vermehrt nachweisbar ist, jedoch nicht durch glomeruläre Zellen gebildet wird. Komplementfaktoren werden vorwiegend in Hepatozyten gebildet und zirkulieren im Serum. Ein geringer Teil wird auch in Zellen des Immunsystems und Endothelzellen sowie weiteren Zellen gebildet.

Komplement C4 ist Teil der Komplementkaskade des klassischen Aktivierungsweges und des durch das Mannose-bindende Lectin induzierten Weges. In aktivierter Form bildet es zusammen mit C2 die C3-Konvertase, um wiederum zusammen mit C3b die C5-Konvertase zu bilden. C5 wird durch die C5-Konvertase zu C5a und C5b gespalten. Letzteres erzeugt in der Komplementaktivierung in weiteren Schritten den Membranangriffskomplex.

Ob es tatsächlich zu einer weiteren Komplementaktivierung von C4 bis hin zum Membranangriffskomplex kommt, wurde hier nicht weiter untersucht. Die Ursache für die große Menge an C4 Protein in den Glomeruli der SNx-Gruppe kann eine gesteigerte Serumkonzentration von Mannose-bindendem Lectin sein, welches an Liganden der Zelloberflächen bindet, die bei renaler Schädigung im Bereich des Endothels exprimiert

werden [84, 85]. Die Schädigung könnte durch weitere Aktivierung der Komplementkaskade aggraviert werden.

Wie bereits dargestellt, spielt Apoptose eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung einer Glomerulosklerose. Das Komplementsystem ist ein wichtiger Faktor in der Opsonisierung und Beseitigung apoptotischer Zellen und „apoptotic bodies“ [86, 87]. Homozygote C1q-Defizienz führt zur Akkumulation von apoptotischen Zellresten und zur progredienten Nierenschädigung [88]. C1q ist integraler Bestandteil der humoralen Komplementkaskade. Komplement C4 spielt auch hier eine wichtige Rolle. Die hohe Konzentration von C4 im glomerulären Proteom der SNx-Mäuse lässt daher auf einen wichtigen Einfluss auf die histomorphologischen Veränderungen schließen. Wie auch bei anderen Glomerulopathien scheint auch hier eine Immunkomplexbindung einen Rolle zu spielen, die zusätzlich zur humoralen Immunantwort auch eine zelluläre Immunreaktion mit Infiltration von immunkompetenten Zellen begünstigt.

6.4 Real-Time-PCR – Immunhistochemie

6.4.1 Real-Time-PCR (qPCR)

Die vorgestellten Proteine zeigen eine deutliche Expressionsänderung auf Proteom-Ebene. Diese beruht zumeist auf der Änderung der genetischen Expression. Um diesen Umstand nachzuweisen, wurde die glomeruläre mRNA-Expression von Galectin-1 und Meprin mittels Real-Time-PCR analysiert. Eigentliches Ziel dieser Untersuchung war es, die Expressionsänderung relativ zu einem sogenannten „Housekeeper“ darzustellen. Dabei zeigten sich zwar signifikanten Unterschiede für Galectin-1 und β -Actin zwischen SNx- und Sham-Gruppe, jedoch nicht für Meprin. Da „Housekeeper“ als interner Standard abhängig von Gewebe und pathologischem Hintergrund ebenso der Regulation unterliegen können wie die erwartet regulierten Gene, wurde die mRNA-Expression von Meprin und Galectin-1 in beiden Gruppen daher direkt verglichen (Tab. 6) [89]. Es zeigte sich, dass die Expression von Galectin mRNA in der SNx-Gruppe im Vergleich zu Meprin zirka 10-fach erhöht war, während sich in der Sham-Gruppe kein signifikanter Unterschied nachweisen ließ. Dieses Ergebnis bestätigt indirekt die hier vorgelegten Ergebnisse der glomerulären Proteinanalyse.

6.4.2 Immunhistochemie

Aufgrund der deutlichen Expressionsänderung einiger Proteine erfolgte zusätzlich der immunhistochemische Nachweis. Die immunhistochemische Untersuchung von Galectin-1 und Komplement C4 unterstützen die Ergebnisse der Proteinanalyse.

Entsprechend der immunhistochemischen Färbung scheint Galectin-1 vor allem an der Oberfläche der Kapillarschlingen und im Bereich der Bowmanschen Kapsel vorhanden zu sein. Dies entspricht weitestgehend der Lokalisation des parietalen Epithels des Glomerulums, welches im Bereich der Kapillarschlingen von den Podozyten gebildet wird. Dies unterstützt die Annahme, dass Galectin-1 eine Rolle in der Adhäsion der Podozyten an die glomeruläre Basalmembran spielt.

Komplement C4 ist ein wichtiger Faktor des Komplementsystems, welches ein elementarer Bestandteil der angeborenen Immunität darstellt. In der immunhistochemischen Färbung konnte es in SNx-Mäusen vermehrt im Bereich der Kapillarschlingen nachgewiesen werden. Dies lässt darauf schließen, dass es zu einer Komplementaktivierung im Bereich des Endothels und der lumenseitigen glomerulären Basalmembran kommt [90]. Die Ursache hierfür ist unklar. Ob es im Rahmen der Pathogenese auch zu einer Antikörper-vermittelten Komplementaktivierung kommt, wie der Nachweis von C4 vermuten lässt, muss in zukünftigen Studien geklärt werden.

6.5 Ausblick

Mit Hilfe der subtotalen Nephrektomie von FVB-Mäusen konnte ein Tiermodell der chronischen Niereninsuffizienz etabliert werden, das sich durch die gezielte Isolierung von Glomeruli in umfassendem Maße für die differentielle glomeruläre Proteinanalyse eignet. Das Problem der geringen Verfügbarkeit glomerulären Gewebes konnte durch Anpassung und Optimierung der sättigungsmarkierten differentiellen 2D-Gelerlektrophorese gelöst werden.

In der hier vorgestellten Arbeit konnte dargestellt werden, in welchem hohem Maße die sättigungsmarkierte 2D-Gelelektrophorese geeignet ist, auch aus geringster Probenmenge eine Vielzahl von Proteinen zu detektieren. Gerade in Bezug auf humane

Gewebeproben, welche im Rahmen der klinischen Diagnostik nur in kleinsten Mengen gewonnen werden können, bietet sich hiermit ein neues Hilfsmittel, welches es zukünftig erlaubt, passend zur Gewebeherkunft und dessen pathologischen Status einen spezifischen „Proteom-Fingerabdruck“ zu erstellen, der eine detaillierte diagnostische Zuordnung erlaubt. Einen Schritt in diese Richtung zeigten Fogo et al. in einer Arbeit, die mit Hilfe der differentiellen glomerulären Proteinanalyse das Protein Thymosin- β 4 als einen frühen Marker zur Glomerulosklerose-Entwicklung identifizieren [91].

Die hier vorgestellte Doktorarbeit zeigt eindrücklich, wie die differentielle Proteinanalyse in der Erforschung glomerulärer Erkrankungen eingesetzt werden kann. Als Träger definierter Funktionen sind Proteine Teil von Signal- und Stoffwechselwegen auf zellulärer und interzellulärer Ebene. Die Änderungen der glomerulären Proteinexpression im Mausmodell der chronischen Niereninsuffizienz deckte Proteine auf, welche mittelbar oder unmittelbar an der Pathogenese der chronischen Niereninsuffizienz beteiligt sind und somit Grundlage weiterer Forschung bieten.

Die vorgestellte Methode wird helfen zelluläre Mechanismen der Pathogenese und der pharmakologischen Therapie glomerulärer Erkrankungen zu identifizieren und weiter zu erforschen. Zukünftig bietet dieses Modell die Möglichkeit, die Wirkung bekannter nephroprotektiver Medikamente zu untersuchen. Ziel einer solchen Arbeit kann es sein, Proteine zu finden, die Teil protektiver Regelkreise sind und somit der Entwicklung einer chronischen Niereninsuffizienz entgegenwirken. Mit Hilfe der differentiellen Analyse lassen sich synergistische Effekte ähnlich wirkender Medikamente demaskieren. Im Weiteren können Veränderungen der Proteinexpression in Knock-Out-Modellen untersucht werden, welche Rückschlüsse auf die beeinflussten Signal- und Stoffwechselwegen des ausgeschalteten Gens geben.

Mit den Proteinen Mepripin, Galectin-1 und DDAH-1 wurden Proteine identifiziert, die mit hoher Wahrscheinlichkeit eine wichtige Rolle in der Entwicklung und der Progredienz der chronischen Niereninsuffizienz spielen. Ihren genauen Einfluss in Bezug auf ihre vielfältigen Funktionen und Signalwege gilt es, in zukünftigen Projekten zu erforschen.

7 Zusammenfassung

Der Nierenfunktionsverlust ist häufig mit einer glomerulären Schädigung assoziiert. Die differentielle Analyse des glomerulären Proteoms ermöglicht es, pathophysiologische Vorgänge der chronischen Niereninsuffizienz besser zu verstehen.

Durch subtotalen Nephrektomie (SNx) in FVB-Mäusen konnte ein reproduzierbares Tiermodell einer progressiven chronischen Niereninsuffizienz entwickelt werden. Durch Perfusion mit ferromagnetischer Partikel konnten aus Nieren von FVB-Mäusen 5 Wochen nach Schein-OP (Sham) oder Nephrektomie Glomeruli isoliert werden. Mittels Lasermikrodissektion wurden humane Glomeruli aus Gefrierschnitten extrahiert. Mittels differentieller farbstoffmarkierte 2D-Gelelektrophorese wurde in der Studie die Voraussetzung geschaffen, kleinste Mengen des glomerulären Proteoms zu analysieren. Proteine wurden mit nanoLC-ESI-MS/MS identifiziert. Realtime PCR und Immunhistochemie dienten der unabhängigen Bestätigung der Methode.

Die SNx-Gruppe entwickelten eine signifikante Albuminurie und Reduktion der Kreatinin-Clearance auf weniger als 15%. Die 2D-Gelelektrophorese von Glomerulilysaten der SNx-Gruppe zeigte im Vergleich zur Sham-Gruppe 32 Proteinspots, die mindestens 1.5-fach stärker exprimiert, und 18 Proteinspots, die mindestens 1.5-fach schwächer exprimiert waren. Es wurden 35 Proteine identifiziert. Die 2D-Gelelektrophorese von Lysaten aus 100, 75 bzw. 10 lasermikrodissezierten humane Glomeruli konnte 1400, 1350 bzw. 900 Proteinspots detektierten.

Die identifizierten Proteine aus dem Vergleich zwischen SNx- und Sham-Gruppe spielen wahrscheinlich eine Rolle bei der Pathophysiologie der chronischen Niereninsuffizienz. Galectin-1, beteiligt an Immunmodulation, Apoptose, Proliferation sowie Zelladhäsion, wurde im glomerulären Proteom der SNx-Gruppe 23-fach stärker exprimiert und lässt auf eine Rolle in der Entwicklung einer Funktionsstörung des glomerulären Filters schließen. Die reduzierte Expression (13.5-fach) der Metalloproteinase Meprin in der SNx-Gruppe, welche mit Organfibrose einhergeht, scheint für die Entwicklung der Glomerulosklerose ein wichtiger Faktor zu sein. Die deutliche Expressionssteigerung von DDAH 1 in der SNx-Gruppe weist auf einen Schutzmechanismus des glomerulären Endothels hin.

Die Lasermikrodissektion humaner Glomeruli und die Proteinalyse mit hochsensitiver differentieller 2D-Gelelektrophorese erlauben die Identifizierung neuer Marker und Stoffwechselwege bei der Pathophysiologie der chronischen Niereninsuffizienz.

8 Literaturverzeichnis

1. Arthur, J.M., et al., *Differential expression of proteins in renal cortex and medulla: a proteomic approach*. *Kidney Int*, 2002. **62**(4): p. 1314-21.
2. Yoshida, Y., et al., *Two-dimensional electrophoretic profiling of normal human kidney glomerulus proteome and construction of an extensible markup language (XML)-based database*. *Proteomics*, 2005. **5**(4): p. 1083-96.
3. Takemoto, M., et al., *A new method for large scale isolation of kidney glomeruli from mice*. *Am J Pathol*, 2002. **161**(3): p. 799-805.
4. Klose, J. and U. Kobalz, *Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome*. *Electrophoresis*, 1995. **16**(6): p. 1034-59.
5. Schaefer, H., et al., *Tryptic transpeptidation products observed in proteome analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *Proteomics*, 2005. **5**(4): p. 846-52.
6. Eng, J.K., McCormack, A.L., Yates, JR, *An approach to correlate tandem mass-spectral data of peptides with amino-acid-sequences in a protein database*. *J. Am. Soc. Mass Spectrom*, 1994. **5**: p. 976-989.
7. Yates, J.R., 3rd, J.K. Eng, and A.L. McCormack, *Mining genomes: correlating tandem mass spectra of modified and unmodified peptides to sequences in nucleotide databases*. *Anal Chem*, 1995. **67**(18): p. 3202-10.
8. Yates, J.R., 3rd, et al., *Method to correlate tandem mass spectra of modified peptides to amino acid sequences in the protein database*. *Anal Chem*, 1995. **67**(8): p. 1426-36.
9. Gratzner, H.G., *Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication*. *Science*, 1982. **218**(4571): p. 474-5.
10. Mundel, P., et al., *Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines*. *Exp Cell Res*, 1997. **236**(1): p. 248-58.
11. Sitek, B., et al., *Application of fluorescence difference gel electrophoresis saturation labelling for the analysis of microdissected precursor lesions of pancreatic ductal adenocarcinoma*. *Proteomics*, 2005. **5**(10): p. 2665-79.
12. *K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification*. *Am J Kidney Dis*, 2002. **39**(2 Suppl 1): p. S1-266.
13. Hausberg, M., et al., *Sympathetic nerve activity in end-stage renal disease*. *Circulation*, 2002. **106**(15): p. 1974-9.
14. Fogo, A.B., *Glomerular hypertension, abnormal glomerular growth, and progression of renal diseases*. *Kidney Int Suppl*, 2000. **75**: p. S15-21.
15. Makino, H., H. Sugiyama, and N. Kashihara, *Apoptosis and extracellular matrix-cell interactions in kidney disease*. *Kidney Int Suppl*, 2000. **77**: p. S67-75.
16. Al Banchaabouchi, M., et al., *The effect of high protein diet on urea and guanidino compound levels in renal insufficient mice*. *Amino Acids*, 2001. **21**(4): p. 401-15.

17. Levey, A.S., et al., *Effects of dietary protein restriction on the progression of advanced renal disease in the Modification of Diet in Renal Disease Study*. Am J Kidney Dis, 1996. **27**(5): p. 652-63.
18. Hostetter, T.H., et al., *Chronic effects of dietary protein in the rat with intact and reduced renal mass*. Kidney Int, 1986. **30**(4): p. 509-17.
19. Cianciaruso, B., et al., *Salt intake and renal outcome in patients with progressive renal disease*. Miner Electrolyte Metab, 1998. **24**(4): p. 296-301.
20. Ma, L.J. and A.B. Fogo, *Model of robust induction of glomerulosclerosis in mice: importance of genetic background*. Kidney Int, 2003. **64**(1): p. 350-5.
21. Hartner, A., et al., *Strain differences in the development of hypertension and glomerular lesions induced by deoxycorticosterone acetate salt in mice*. Nephrol Dial Transplant, 2003. **18**(10): p. 1999-2004.
22. Pillebout, E., et al., *Proliferation and remodeling of the peritubular microcirculation after nephron reduction: association with the progression of renal lesions*. Am J Pathol, 2001. **159**(2): p. 547-60.
23. McKenna, K. and C. Thompson, *Microalbuminuria: a marker to increased renal and cardiovascular risk in diabetes mellitus*. Scott Med J, 1997. **42**(4): p. 99-104.
24. Segura, J., C. Campo, and L.M. Ruilope, *Proteinuria: an underappreciated risk factor in cardiovascular disease*. Curr Cardiol Rep, 2002. **4**(6): p. 458-62.
25. Ruggenenti, P. and G. Remuzzi, *Time to abandon microalbuminuria?* Kidney Int, 2006. **70**(7): p. 1214-22.
26. Mathieson, P.W., *The cellular basis of albuminuria*. Clin Sci (Lond), 2004. **107**(6): p. 533-8.
27. Rump, L.C., et al., *Sympathetic overactivity in renal disease: a window to understand progression and cardiovascular complications of uraemia?* Nephrol Dial Transplant, 2000. **15**(11): p. 1735-8.
28. Ljubic, D. and P. Kes, *The role of arterial hypertension in the progression of non-diabetic glomerular diseases*. Nephrol Dial Transplant, 2003. **18 Suppl 5**: p. v28-30.
29. Waldherr, R. and N. Gretz, *Natural course of the development of histological lesions after 5/6 nephrectomy*. Contrib Nephrol, 1988. **60**: p. 64-72.
30. Fogo, A. and I. Ichikawa, *Evidence for the central role of glomerular growth promoters in the development of sclerosis*. Semin Nephrol, 1989. **9**(4): p. 329-42.
31. Thomas, G.L., et al., *Cellular apoptosis and proliferation in experimental renal fibrosis*. Nephrol Dial Transplant, 1998. **13**(9): p. 2216-26.
32. Alban, A., et al., *A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard*. Proteomics, 2003. **3**(1): p. 36-44.
33. Bonventre, J.V., *The kidney proteome: a hint of things to come*. Kidney Int, 2002. **62**(4): p. 1470-1.
34. Tanaka, T., et al., *Hypoxia-induced apoptosis in cultured glomerular endothelial cells: involvement of mitochondrial pathways*. Kidney Int, 2003. **64**(6): p. 2020-32.

35. Pavenstadt, H., W. Kriz, and M. Kretzler, *Cell biology of the glomerular podocyte*. *Physiol Rev*, 2003. **83**(1): p. 253-307.
36. Kohda, Y., et al., *Analysis of segmental renal gene expression by laser capture microdissection*. *Kidney Int*, 2000. **57**(1): p. 321-31.
37. Fogo, A., et al., *Glomerular hypertrophy in minimal change disease predicts subsequent progression to focal glomerular sclerosis*. *Kidney Int*, 1990. **38**(1): p. 115-23.
38. Bertenshaw, G.P., M.T. Norcum, and J.S. Bond, *Structure of homo- and hetero-oligomeric meprin metalloproteases. Dimers, tetramers, and high molecular mass multimers*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(4): p. 2522-32.
39. Kumar, J.M. and J.S. Bond, *Developmental expression of meprin metalloprotease subunits in ICR and C3H/He mouse kidney and intestine in the embryo, postnatally and after weaning*. *Biochim Biophys Acta*, 2001. **1518**(1-2): p. 106-14.
40. Marchand, P., J. Tang, and J.S. Bond, *Membrane association and oligomeric organization of the alpha and beta subunits of mouse meprin A*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(21): p. 15388-93.
41. Carmago, S., S.V. Shah, and P.D. Walker, *Meprin, a brush-border enzyme, plays an important role in hypoxic/ischemic acute renal tubular injury in rats*. *Kidney Int*, 2002. **61**(3): p. 959-66.
42. Walker, P.D., G.P. Kaushal, and S.V. Shah, *Meprin A, the major matrix degrading enzyme in renal tubules, produces a novel nidogen fragment in vitro and in vivo*. *Kidney Int*, 1998. **53**(6): p. 1673-80.
43. Trachtman, H., et al., *The role of meprin A in the pathogenesis of acute renal failure*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995. **208**(2): p. 498-505.
44. Sadlier, D.M., et al., *Sequential extracellular matrix-focused and baited-global cluster analysis of serial transcriptomic profiles identifies candidate modulators of renal tubulointerstitial fibrosis in murine adriamycin-induced nephropathy*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(28): p. 29670-80.
45. Ricardo, S.D., et al., *Expression of subunits of the metalloendopeptidase meprin in renal cortex in experimental hydronephrosis*. *Am J Physiol*, 1996. **270**(4 Pt 2): p. F669-76.
46. Kieran, N.E., et al., *Modification of the transcriptomic response to renal ischemia/reperfusion injury by lipoxin analog*. *Kidney Int*, 2003. **64**(2): p. 480-92.
47. Bond, J.S., et al., *Meprin metalloprotease expression and regulation in kidney, intestine, urinary tract infections and cancer*. *FEBS Lett*, 2005. **579**(15): p. 3317-22.
48. Vonend, O., et al., *Modulation of gene expression by moxonidine in rats with chronic renal failure*. *Nephrol Dial Transplant*, 2004. **19**(9): p. 2217-22.
49. Amann, K., et al., *Effects of low dose sympathetic inhibition on glomerulosclerosis and albuminuria in subtotaly nephrectomized rats*. *J Am Soc Nephrol*, 2000. **11**(8): p. 1469-78.
50. Ahmad, N., et al., *Thermodynamic binding studies of bivalent oligosaccharides to galectin-1, galectin-3, and the carbohydrate recognition domain of galectin-3*. *Glycobiology*, 2004. **14**(9): p. 817-25.

51. Barondes, S.H., et al., *Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins*. Cell, 1994. **76**(4): p. 597-8.
52. Valkova, N., et al., *Nek8 mutation causes overexpression of galectin-1, sorcin, and vimentin and accumulation of the major urinary protein in renal cysts of jck mice*. Mol Cell Proteomics, 2005. **4**(7): p. 1009-18.
53. Santucci, L., et al., *Galectin-1 exerts immunomodulatory and protective effects on concanavalin A-induced hepatitis in mice*. Hepatology, 2000. **31**(2): p. 399-406.
54. Rabinovich, G.A., et al., *Specific inhibition of T-cell adhesion to extracellular matrix and proinflammatory cytokine secretion by human recombinant galectin-1*. Immunology, 1999. **97**(1): p. 100-6.
55. van der Leij, J., et al., *Dimeric galectin-1 induces IL-10 production in T-lymphocytes: an important tool in the regulation of the immune response*. J Pathol, 2004. **204**(5): p. 511-8.
56. Santucci, L., et al., *Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice*. Gastroenterology, 2003. **124**(5): p. 1381-94.
57. Rabinovich, G.A., et al., *Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis*. J Exp Med, 1999. **190**(3): p. 385-98.
58. Vas, V., et al., *Biphasic effect of recombinant galectin-1 on the growth and death of early hematopoietic cells*. Stem Cells, 2005. **23**(2): p. 279-87.
59. Adams, L., G.K. Scott, and C.S. Weinberg, *Biphasic modulation of cell growth by recombinant human galectin-1*. Biochim Biophys Acta, 1996. **1312**(2): p. 137-44.
60. Battig, P., et al., *Enhanced apoptotic activity of a structurally optimized form of galectin-1*. Mol Immunol, 2004. **41**(1): p. 9-18.
61. Chan, J., et al., *Galectin-1 induces skeletal muscle differentiation in human fetal mesenchymal stem cells and increases muscle regeneration*. Stem Cells, 2006. **24**(8): p. 1879-91.
62. Andersen, H., et al., *A proteome study of secreted prostatic factors affecting osteoblastic activity: galectin-1 is involved in differentiation of human bone marrow stromal cells*. J Bone Miner Res, 2003. **18**(2): p. 195-203.
63. Scott, K. and C. Weinberg, *Galectin-1: a bifunctional regulator of cellular proliferation*. Glycoconj J, 2004. **19**(7-9): p. 467-77.
64. Tsuchiyama, Y., et al., *Efficacy of galectins in the amelioration of nephrotoxic serum nephritis in Wistar Kyoto rats*. Kidney Int, 2000. **58**(5): p. 1941-52.
65. Ellerhorst, J., et al., *Differential expression of endogenous galectin-1 and galectin-3 in human prostate cancer cell lines and effects of overexpressing galectin-1 on cell phenotype*. Int J Oncol, 1999. **14**(2): p. 217-24.
66. Moiseeva, E.P., et al., *Galectin-1 modulates attachment, spreading and migration of cultured vascular smooth muscle cells via interactions with cellular receptors and components of extracellular matrix*. J Vasc Res, 1999. **36**(1): p. 47-58.
67. van den Brule, F., et al., *Galectin-1 accumulation in the ovary carcinoma peritumoral stroma is induced by ovary carcinoma cells and affects both cancer cell proliferation and adhesion to laminin-1 and fibronectin*. Lab Invest, 2003. **83**(3): p. 377-86.

68. Murphy, K.M. and S.E. Zalik, *Endogenous galectins and effect of galectin hapten inhibitors on the differentiation of the chick mesonephros*. Dev Dyn, 1999. **215**(3): p. 248-63.
69. Inokuchi, S., et al., *Re-evaluation of foot process effacement in acute puromycin aminonucleoside nephrosis*. Kidney Int, 1996. **50**(4): p. 1278-87.
70. Messina, A., et al., *Glomerular epithelial abnormalities associated with the onset of proteinuria in aminonucleoside nephrosis*. Am J Pathol, 1987. **126**(2): p. 220-9.
71. Ryan, G.B. and M.J. Karnovsky, *An ultrastructural study of the mechanisms of proteinuria in aminonucleoside nephrosis*. Kidney Int, 1975. **8**(4): p. 219-32.
72. Lahdenkari, A.T., et al., *Podocytes are firmly attached to glomerular basement membrane in kidneys with heavy proteinuria*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(10): p. 2611-8.
73. Teerlink, T., *ADMA metabolism and clearance*. Vasc Med, 2005. **10 Suppl 1**: p. S73-81.
74. Matsuguma, K., et al., *Molecular mechanism for elevation of asymmetric dimethylarginine and its role for hypertension in chronic kidney disease*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(8): p. 2176-83.
75. Boger, R.H., *Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the "L-arginine paradox" and acts as a novel cardiovascular risk factor*. J Nutr, 2004. **134**(10 Suppl): p. 2842S-2847S; discussion 2853S.
76. Rennke, H.G., *Glomerular adaptations to renal injury or ablation. Role of capillary hypertension in the pathogenesis of progressive glomerulosclerosis*. Blood Purif, 1988. **6**(4): p. 230-9.
77. Yin, Q.F., et al., *Dimethylarginine dimethylaminohydrolase inhibition and asymmetric dimethylarginine accumulation contribute to endothelial dysfunction in rats exposed to glycosylated protein: Effects of aminoguanidine*. Atherosclerosis, 2007. **190**(1): p. 53-61.
78. Tojo, A., M. Kimoto, and C.S. Wilcox, *Renal expression of constitutive NOS and DDAH: separate effects of salt intake and angiotensin*. Kidney Int, 2000. **58**(5): p. 2075-83.
79. Tojo, A., et al., *Colocalization of demethylating enzymes and NOS and functional effects of methylarginines in rat kidney*. Kidney Int, 1997. **52**(6): p. 1593-601.
80. Okubo, K., et al., *Role of asymmetrical dimethylarginine in renal microvascular endothelial dysfunction in chronic renal failure with hypertension*. Hypertens Res, 2005. **28**(2): p. 181-9.
81. Zoccali, C. and J.T. Kielstein, *Asymmetric dimethylarginine: a new player in the pathogenesis of renal disease?* Curr Opin Nephrol Hypertens, 2006. **15**(3): p. 314-20.
82. Mendes Ribeiro, A.C., et al., *Abnormalities in L-arginine transport and nitric oxide biosynthesis in chronic renal and heart failure*. Cardiovasc Res, 2001. **49**(4): p. 697-712.
83. Ashab, I., et al., *Oral administration of L-arginine and captopril in rats prevents chronic renal failure by nitric oxide production*. Kidney Int, 1995. **47**(6): p. 1515-21.

-
84. Satomura, A., et al., *Significant elevations in serum mannose-binding lectin levels in patients with chronic renal failure*. *Nephron*, 2002. **92**(3): p. 702-4.
 85. Moller-Kristensen, M., et al., *Mannan-binding lectin recognizes structures on ischaemic reperfused mouse kidneys and is implicated in tissue injury*. *Scand J Immunol*, 2005. **61**(5): p. 426-34.
 86. Mevorach, D., et al., *Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages*. *J Exp Med*, 1998. **188**(12): p. 2313-20.
 87. Gaipf, U.S., et al., *Complement binding is an early feature of necrotic and a rather late event during apoptotic cell death*. *Cell Death Differ*, 2001. **8**(4): p. 327-34.
 88. Botto, M., et al., *Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies*. *Nat Genet*, 1998. **19**(1): p. 56-9.
 89. Thellin, O., et al., *Housekeeping genes as internal standards: use and limits*. *J Biotechnol*, 1999. **75**(2-3): p. 291-5.
 90. West, C.D., *Complement activation in renal disease*. *Uremia Invest*, 1984. **8**(3-4): p. 225-35.
 91. Xu, B.J., et al., *Proteomic patterns and prediction of glomerulosclerosis and its mechanisms*. *J Am Soc Nephrol*, 2005. **16**(10): p. 2967-75.

9 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. med. L. C. Rump für die Überlassung dieser Dissertation und seine großzügige Unterstützung.

Ich danke Herrn PD Dr. med. O. Vonend für seine kontinuierliche Betreuung dieser Dissertation. Seine Diskussionsbereitschaft und sein stetiger Enthusiasmus haben meinen Blick für wissenschaftliche Fragestellungen und Zusammenhänge geschärft.

Des Weiteren danke ich Frau Diplom-Biologin Dr. B. Sitek und Herrn PD Dr. K. Stühler für Ihre Unterstützung bei der Proteinanalyse.

Im Weiteren möchte ich Frau B. Priesch und Frau B. Duvnjak für ihre Hilfe in Fragen der Labortechnik, der histologischen Färbungen und der Versuche danken.

Ich danke meiner Mutter, Frau Karola Potthoff, für ihre Unterstützung und den Rückhalt, der mich durch mein Studium und bisherigen wissenschaftlichen Werdegang begleitet hat.

Ich danke meinem verstorbenen Vater, Herrn Prof. Dr. med. Peter Christian Potthoff.

Danken möchte ich meinen Geschwistern für Ihre fortwährende Zuwendung, Ihren Rückhalt und Ihre Unterstützung.

10 Lebenslauf

Sebastian Alexander Potthoff

Geboren: 21. Dezember 1977

Geburtsort: Günzburg, Bayern

1. Schule

1984 – 1986	Grundschule in Günzburg (Bayern)
1986 – 1988	Grundschule in Gelsenkirchen (NRW)
1988 – 1997	Max-Planck-Gymnasium, Gelsenkirchen – Buer
1997	Abitur (Max-Planck-Gymnasium, Gelsenkirchen-Buer)

2. Ausbildung

September 1997 – Juli 2001	Ausbildung zum Tanzlehrer ADTV ADTV Tanzschule Seidel, Gelsenkirchen
----------------------------	--

3. Universität

Seit Oktober 1999	Studium der Medizin Ruhr-Universität-Bochum
August 2001	Physikum Ruhr-Universität-Bochum
März 2002	Einmonatige Famulatur in der Inneren Medizin, Abteilung für Endokrinologie/ Diabetologie Prof. Dr. med. Schatz, Bergmannsheil Bochum
2003	Doktorarbeit auf dem Gebiet der Experimentelle Nephrologie und Hypertensiologie Prof. Dr. med. L. C. Rump, Ruhr-Universität Bochum

Februar 2003	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung Ruhr-Universität-Bochum
September 2003	Einmonatige Famulatur in der Chirurgischen Abteilung Prof. Dr. med. Schütter, St. Elisabeth Hospital, Herten
September 2004	Einmonatige Famulatur an der Saitama Medical School Moroyama, Japan
Februar 2005	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
April – August 2005	PJ-Tertial am Hopital d’Hautepierre Straßburg, Frankreich
September – November 2005	PJ-Tertial am NYU Downtown Hospital New York, USA
Dezember 2005 – März 2006	PJ-Tertial an der Universitätsklinik Marienhospital Herne, Deutschland
Mai 2006	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung und Erteilung der Approbation

4. Beruf

Juni 2006 – Januar 2007	Assistenzarzt der Medizinischen Klinik I (Innere Medizin) Universitätsklinik Marienhospital Prof. Dr. med. L. C. Rump (Direktor der Klinik) Herne, Deutschland
Februar 2007 – Juni 2008	Forschungsstelle im Bereich der experimentellen Nephrologie / Nierenpathologie A. B. Fogo, MD (Professor of Pathology, Medicine & Pediatrics) Vanderbilt University, Nashville, Tennessee, USA
Seit Juli 2008	Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Klinik für Nephrologie der Universitätsklinik Düsseldorf Prof. Dr. med. L. C. Rump (Direktor der Klinik) Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf, Deutschland

5. wissenschaftlicher Werdegang

- 2003 - 2007 **Doktorarbeit auf dem Gebiet der Experimentelle Nephrologie und Hypertensiologie**
(Abschluss der experimentellen Arbeit und Verfassen der Dissertation Januar 2007)
Prof. Dr. med. L. C. Rump, Ruhr-Universität Bochum
- Februar 2007 – Juni 2008 **Forschungsstelle im Bereich der experimentellen Nephrologie / Nierenpathologie**
A. B. Fogo, MD (Professor of Pathology, Medicine & Pediatrics)
Vanderbilt University, Nashville, Tennessee, USA
- Seit Juli 2008 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter der experimentellen Nephrologie**
Prof. Dr. med. L. C. Rump (Direktor der Klinik)
Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf, Deutschland
- Jan 2010 **Promotionsantrag**
Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf, Deutschland
Prof. Dr. med. L. C. Rump, Düsseldorf

6. Ämter / Positionen

- Seit November 2009 **Vorsitzender des „Forum Junge Hypertensiologie“ der Deutschen Hochdruckliga (DHL) / Deutsche Hypertonie Gesellschaft**

7. Veröffentlichungen

PROTEOMICS, Juli 2006

„Novel approaches to analyse glomerular proteins from smallest scale murine and human samples using DIGE saturation labelling“

Autoren: Sebastian A. Potthoff, Barbara Sitek, Thomas Schulenburg, Johannes Stegbauer, Tobias Vinke, Lars-Christian Rump, Helmut E. Meyer, Oliver Vonend, Kai Stühler

PROTEOMICS, Juli 2008

„The glomerular proteome in a model of chronic kidney disease“

Autoren: Sebastian A. Potthoff, Barbara Sitek , Johannes Stegbauer, Thomas Schulenburg, Katrin Marcus, Ivo Quack, Lars C. Rump, Helmut E. Meyer, Kai Stühler, Oliver Vonend

JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY, November 2009

“The PPARgamma agonist pioglitazone ameliorates aging-related progressive renal injury”

Autoren: Yang HC, Deleuze S, Zuo Y, Potthoff SA, Ma LJ, Fogo AB.

8. Preise

Dezember 2006	Förderpreis der Sophia & Fritz Heinemann Stiftung, Ruhr-Universität Bochum
Januar 2007	Forschungsstipendium des Marienhospital Herne (Universitätsklinikum der Ruhr-Universität Bochum)
November 2007	Young Investigator Award – DHL Hypertonie Kongress 2007
November 2009	Young Investigator Award – DHL Hypertonie Kongress 2009