

Aus dem Physiologischen Institut
der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. Michaela Kuhn

**Albuminurie stört die Kollagenhomöostase der proximalen
Tubuluszellen des Opossums**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Verena Wohlfarth
aus Pflaumloch

Würzburg, Februar 2010

Für meine Familie

Referentenblatt

Referent: Professor Dr. med. Michael Gekle

Korreferent: Professor Dr. med. Christoph Wanner

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 02.10.2010

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	iii
1 Einleitung	1
1.1 Chronische Niereninsuffizienz	1
1.2 Albumin	1
1.2.1 Albumineigenschaften	1
1.2.2 Albuminfiltration	2
1.2.3 Albuminendozytose	3
1.2.3.1 Nicht-Rezeptor vermittelte Endozytose (= fluid phase endocytosis oder Pinozytose)	4
1.2.3.2 Rezeptor-vermittelte Endozytose (= adsorptive endocytosis, coated pits vermittelte Endozytose)	4
1.2.4 Rezeptor-vermittelte Albuminendozytose	5
1.2.4.1 Megalin	5
1.2.4.2 Cubilin	6
1.2.4.3 pH-Abhängigkeit der Albuminendozytose: Bedeutung des NHE3	9
1.3 Proteinurie/Albuminurie	11
1.3.1 Entstehungsort der Proteinurie	11
1.3.1.1 Prärenale Proteinurie	11
1.3.1.2 Renale Proteinurie	11
1.3.1.3 Glomeruläre Proteinurie	11
1.3.1.4 Tubuläre Proteinurie	12
1.3.1.5 Postrenale Proteinurie	12
1.3.2 Albuminurie als Marker der Nierenfibrose	13
1.3.3 Albuminurie als Motor der Nierenfibrose	13
1.4 Zielsetzung der Arbeit	14
1.5 Validiertes Zellkultursystem	14
2 Material und Methoden	16
2.1 Zellkultur	16
2.1.1 Materialien für Zellkultur	16
2.1.2 Zelllinien	17
2.1.2.1 Opossum Kidney Wildtyp Zellen (Wildtyp-OK-Zellen)	17
2.1.2.2 Porcine Renal Proximal Tubule Zellen (LLC-PK ₁ -Zellen)	17

2.1.2.3	Immortalized Human Kidney Epithelial Zellen (IHKE1-Zellen)	17
2.1.2.4	Madine-Darby Canine Kidney Zellen (MDCK-Zellen), Subtyp C11 (C11 Klon)	17
2.1.2.5	Opossum Kidney NHE3-defiziente Zellen (OK-NHE3-def. Zellen)	18
2.1.3	Zellkultur am Beispiel der Opossum Kidney Wildtypzellen . .	18
2.1.4	Experimentalmedien/Hemmer	19
2.2	Ermittlung von Zellzahl und Zellgrösse mittels Coulter Counter . . .	19
2.3	Quantitative Bestimmung des Proteingehalts mittels Bicinchoninsäure	20
2.4	Bestimmung von sezerniertem Kollagen mittels Kollagenase-sensitiven Prolininkorporationsassay	21
2.5	Bestimmung von sezerniertem Kollagen mittels Kollagen-ELISA . . .	23
2.6	Bestimmung der Kollagensynthese mittels Kollagen Western Blot . .	25
2.7	Semiquantitative Bestimmung der Gelatinaseaktivität mittels Zymographie	27
2.8	Quantitative Bestimmung der Gelatinaseaktivität mittels Gelatinaseassay	29
2.9	Bestimmung der Radikalbildung mittels Radikalassay	30
2.10	Bestimmung der Aktivierung von Signaltransduktionswegen mittels SEAP-Reportergen-Assay	31
2.11	Statistik	33
3	Ergebnisse	34
3.1	Albumin-induzierte Wachstumsvorgänge der proximalen Tubuluszellen des Opossums	34
3.2	Einfluss der Proteinurie auf die Kollagenhomöostase der OK-Zellen .	35
3.2.1	Hintergrund: Kollagensynthese und Kollagen Degradation . . .	35
3.2.1.1	Kollagensynthese	35
3.2.1.2	Kollagen Degradation	37
3.2.2	TGF- β_1 -induzierte Kollagensekretion der OK-Zellen	38
3.2.3	Albumin-induzierte Kollagensekretion der OK-Zellen	39
3.2.4	Rolle der freien Fettsäuren bei der Albumin-induzierten Kollagensekretion	40
3.2.5	Bestimmung pathophysiologisch relevanter Kollagentypen . . .	41
3.2.6	Albumin-induzierte Kollagensynthese	43
3.2.7	Albumin-induzierter Kollagenabbau	44
3.2.7.1	Semiquantitative Bestimmung der Kollagenaseaktivität mittels Zymographie	44
3.2.7.2	Quantitative Bestimmung der Kollagenaseaktivität mittels Gelatinaseassay	45
3.3	Signaltransduktion der Albumin-induzierten Kollagensekretion	47
3.3.1	Pharmakologische Hemmung der Albumin-induzierten Kollagensekretion	47
3.3.2	Pharmakologische Hemmung der Wirkung von Albumin auf die Kollagenaseaktivität	47

3.3.3	Albumin-induzierte Aktivierung von Signaltransduktionswegen	50
3.3.3.1	NF- κ B	50
3.3.3.2	Activator-Protein 1 (AP-1)	51
3.3.3.3	Reactive Oxygen Species als Second Messenger	51
3.4	Zentrale Rolle der Albuminendozytose bei der Albumin-induzierten Kollagensekretion	54
3.4.1	Albumin-induzierte Kollagensekretion bei Zellen unterschiedlicher endozytotischer Aktivität	54
3.4.2	Pharmakologische Hemmung der Albuminendozytose	56
3.4.3	Abhängigkeit der Albumin-induzierten Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege von der Albuminendozytose	57
4	Diskussion	60
4.1	Zellkulturmodell	61
4.2	TGF- β_1 als profibrotischer Stimulus	61
4.3	Albumin-induzierte Störung der Kollagenhomöostase	62
4.4	Albumin-induzierte Signaltransduktionswege	64
4.5	Notwendigkeit der Albuminendozytose	67
5	Zusammenfassung	69
	Literaturverzeichnis	71
	Danksagung	83
	Lebenslauf	85

1 Einleitung

1.1 Chronische Niereninsuffizienz

Die chronische Niereninsuffizienz ist - unabhängig von ihrer Genese - als irreversibler Verlust der exkretorischen und inkretorischen Nierenfunktion charakterisiert. Sie führt im Terminalstadium zur Urämie und unbehandelt zum Tod. In Deutschland lag die Inzidenz für eine chronische Nierenersatztherapie im Jahr 2006 bei 213 pro 1 Mio Einwohner (FREI and SCHOBER-HALSTENBERG, 2006/2007). Die häufigste Ursache für eine chronische Niereninsuffizienz mit notwendiger Nierenersatztherapie in den Industrienationen ist heutzutage die diabetische Nephropathie mit einer nach wie vor sehr ungünstigen Prognose (5-Jahres-Überlebens-Rate eines dialysepflichtigen Patienten mit Diabetes mellitus nur etwa 20 %) (HASSLACHER, 2007). Die Entwicklung und Progression einer Nephropathie bis hin zur Urämie erstreckt sich meistens über Jahre und wird dabei durch zahlreiche Faktoren moduliert (Kohlenhydratstoffwechsel, Blutdruck, Dyslipoproteinämie, Rauchen, Anämie). Bei diesem Prozess kommt dem Auftreten bzw. Nachweis einer Proteinurie (insbesondere Mikroalbuminurie) eine zentrale Bedeutung zu.

1.2 Albumin

1.2.1 Albumineigenschaften

Albumin ist ein 69 000 Dalton großes Protein (PETERS, 1985), das in der Leber gebildet wird. Mit einer Plasmakonzentration von ca. 45 g/l macht Albumin mit etwa 60 % den größten Anteil der Plasmaproteine aus. In der Literatur wird es als

ein ca. 15 nm langes und ca. 3.8 nm breites, ellipsoid aufgebautes Molekül mit einer negativen Nettoladung von -15 beschrieben (PETERS, 1985). Die Hauptaufgabe von Albumin besteht in der Aufrechterhaltung des onkotischen Drucks. Weiterhin fungiert es als Transportvehikel für u. a. Hormone, Nährstoffe (z. B. Lipide), Vitamine, Elektrolyte, Stoffwechselprodukte (z. B. Bilirubin), Medikamente und Giftstoffe sowie durch seine Fähigkeit Protonen zu binden als Puffer.

1.2.2 Albuminfiltration

Der Siebkoeffizient (= Konzentration eines Stoffes im Ultrafiltrat im Verhältnis zum Plasmawasser) eines Stoffes ist abhängig von der Molekülmasse/Molekülgröße im Vergleich zum Porendurchmesser (effektiver Radius) sowie bei großen Molekülen von der elektrischen Ladung (COMPER and GLASGOW, 1995). Stoffe mit einer Molekülmasse von ca. 10000 Dalton werden in den Glomeruli frei filtriert (z. B. Inulin), d. h. der Siebkoeffizient beträgt 1. Stoffe mit einer Molekülmasse über 100000 Dalton werden bei intakter Filtrationsbarriere nicht filtriert (z. B. γ -Globuline), d. h. der Siebkoeffizient ist 0. Im Bereich zwischen 10000 und 100000 Dalton spielt die elektrische Ladung (Nettoladung) des zu filtrierenden Stoffes eine wichtige Rolle. Da die Filterbarriere durch anionische Glykosialoproteine fix negativ geladen ist, passieren in diesem Molekülbereich neutral bzw. positiv geladene Stoffe die glomeruläre Filtrationsbarriere besser als negativ geladene Stoffe (MAACK *et al.*, 1992). Bei einer Molekülmasse von 69 000 Dalton und einer elektrischen Netto-Ladung von -15 liegt die fraktionelle Filtration von Albumin bei intaktem Filter zwischen 0.05 und 0.1 % (MAACK *et al.*, 1992). Geht man von einer Plasmaalbuminkonzentration von 45 g/l und einer fraktionellen Filtration von 0.1 % aus, beträgt die Albuminkonzentration im Ultrafiltrat (= Primärharn) 45 mg/l (Abb. 1.1).

Dieser errechnete Wert deckt sich gut mit den Ergebnissen, die aus Mikropunktionsstudien zur Bestimmung der Albuminkonzentration im Ultrafiltrat ermittelt wurden (TOJO and ENDOU, 1992). Unter der Annahme einer glomerulären Filtrationsrate von 180 Litern pro Tag (gesunder Erwachsener) errechnet sich eine täglich filtrierte Albuminmenge von maximal 8100 mg. Dies entspricht ca. 5.5 % der Gesamtalbuminmenge im Plasma. Da mit dem Endharn eines gesunden Erwachsenen

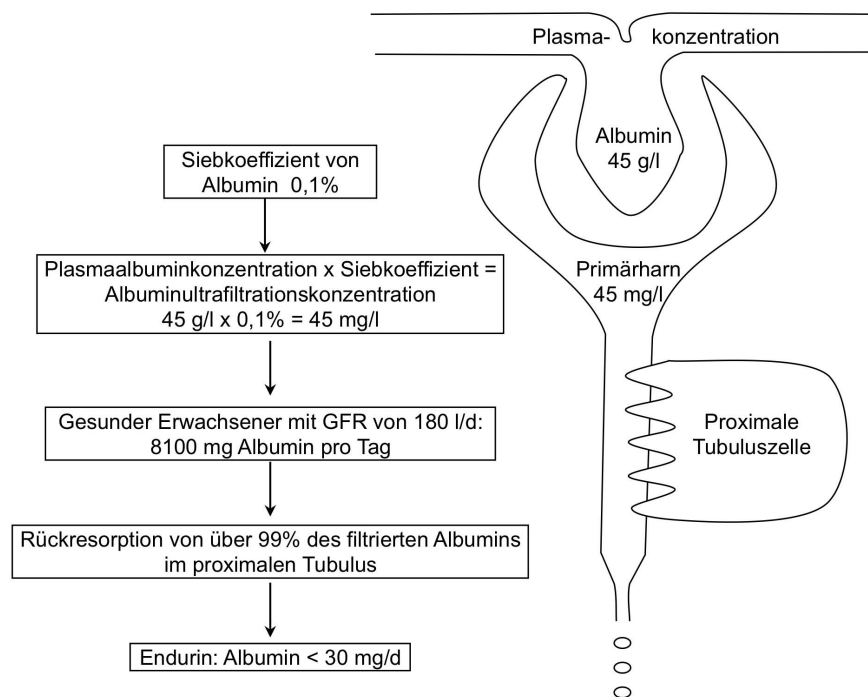


Abbildung 1.1 — Schematische Darstellung der täglichen Albuminfiltration modifiziert nach GEKLE, 1998.

maximal 30 mg Albumin pro Tag ausgeschieden werden, müssen über 99 % des filtrierte Albumins auf seinem Weg entlang des renalen Tubulussystems rückresorbiert werden. Der Hauptort der Rückresorption ist - wie sich in diversen Mikropunktionsstudien gezeigt hat - der proximale Tubulus (CARONE *et al.*, 1979; TOJO and ENDOU, 1992).

1.2.3 Albuminendozytose

Je nach Molekülgröße und -ladung stehen für die Rückresorption von filtrierte Stoffen zwei verschiedene Transportwege zur Verfügung (KLINKE and SILBERNAGL, 2001):

1. Transport der Substanz zwischen den Zellen hindurch, sog. parazellulärer Transport. Da dieser Weg vor allem von der Dichtigkeit der Schlussleisten (sog. tight junctions) abhängig ist, kommt er nur für kleine Moleküle (z. B. Wasser) und Ionen in Frage.

2. Transport durch die Zelle hindurch, sog. transzellulärer Transport. Die Effektivität dieses Transportes wird von der Oberfläche und Durchlässigkeit der apikalen und basolateralen Tubuluszellmembran bestimmt. Eine filtrierte Substanz wird entweder luminal in ihre Einzelteile/Aminosäuren aufgespalten (z. B. Angiotensin II) und über Transportmechanismen in die Zelle aufgenommen oder im Ganzen mittels Endozytose (z. B. Immunglobuline) resorbiert.

Der parazelluläre Transportweg fällt bei Albumin aufgrund seiner Molekülgröße weg. Aus der Literatur gibt es keinen Hinweis für eine Albumindegredation im Tubulussystem mit anschließendem transzellulärem Transport der einzelnen Aminosäuren, so dass als einziger Transportmechanismus die Endozytose in Frage kommt (MAACK *et al.*, 1992; TOJO and ENDOU, 1992). Prinzipiell unterscheidet man zwei Formen der Endozytose im proximalen Tubulus:

1.2.3.1 Nicht-Rezeptor vermittelte Endozytose (= fluid phase endocytosis oder Pinozytose)

Bei der Pinozytose wird wahllos und unspezifisch Extrazellulärflüssigkeit mit den darin enthaltenen Stoffen durch Abschnürung kleiner Vesikel aus der apikalen Zellmembran in die Zelle aufgenommen. Die Substratkonzentration in der Invagination entspricht der Substratkonzentration im Extrazellulärraum (= Tubulussystem), d. h. die Endozytoserate steigt proportional zur extrazellulären Substratkonzentration an. Ein Beispiel für die nicht Rezeptor-vermittelte Endozytose ist die Aufnahme des Polysaccharids Dextran.

1.2.3.2 Rezeptor-vermittelte Endozytose (= adsorptive endocytosis, coated pits vermittelte Endozytose)

Hierbei handelt es sich um einen spezifischen Prozess. An kleinen Einbuchtungen der apikalen Zellmembran (sog. pits), welche an ihrer Innenseite häufig mit dem Protein Clathrin bestückt sind (sog. coated pits), findet man die für die Rezeptor-vermittelte Endozytose spezifischen Rezeptoren (= integrale Zellmembranproteine) meist in hoher Dichte. Durch spezifische Bindung des Substrats an die entsprechenden Rezeptoren übertrifft die Substratkonzentration in der Invagination die

Substratkonzentration im Extrazellulärraum (= Tubulussystem). Dies gestaltet den Prozess der Rezeptor-vermittelten Endozytose sehr effektiv. Da Albumin wie bereits oben erwähnt zu über 99 % entlang des Tubulussystems rückresorbiert wird, kann dies nur über das effektive Transportsystem der Rezeptor-vermittelten Endozytose erfolgen (BAKALA *et al.*, 1990; GEKLE *et al.*, 1995a, 1996).

1.2.4 Rezeptor-vermittelte Albuminendozytose

Kinetische Studien zur Albuminendozytose zeigten bereits vor der endgültigen Identifizierung der für die Endozytose notwendigen Rezeptoren, dass es sich um einen sättigbaren, kompetitiv hemmbaren, pH- und Calcium- abhängigen Transportprozess handelt (GEKLE *et al.*, 1995b, 1996; BRUNSKILL *et al.*, 1997, 1998). Im Verlauf konnten die entsprechenden, an der Endozytose beteiligten Rezeptoren Megalin und Cubilin identifiziert werden (CUI *et al.*, 1996).

1.2.4.1 Megalin

Megalin wurde 1959 ursprünglich als Antigen in der Heymann Nephritis der Ratte identifiziert. Nach seiner Isolierung aus dem Bürstensaum der Rattenniere erhielt es entsprechend seines geschätzten Molekulargewichts die Bezeichnung gp 330 (KERJASCHKI and FARQUHAR, 1982). 1994 wurde das zugehörige Gen von SAITO *et al.*, 1994 geklont und Megalin genannt. 1996 gelang es Willnow *et al.*, Megalin defiziente Mäuse zu züchten. Diese starben aufgrund einer Fehlentwicklung des Frontalhirns und der Lunge meist kurz nach der Geburt. An den Überlebenden konnte die Funktion von Megalin im Detail studiert werden. In ultrastrukturellen Untersuchungen zeigte sich eine Atrophie des apikalen endozytotischen Apparates der proximalen Tubuluszelle und damit einhergehend eine Proteinurie (u. a. α 2-Mikroglobulin, Albumin) (WILLNOW *et al.*, 1996; HILPERT *et al.*, 1999; CHRISTENSEN *et al.*, 1999; NYKJAER *et al.*, 1999; CHRISTENSEN and WILLNOW, 1999).

Megalin ist ein 600 kD großes, transmembranäres Glykoprotein, welches der LDL-Rezeptor-Familie angehört. Die extrazelluläre Domäne umfasst vier Cystein-reiche Sequenzen, welche bei der Ligandenbindung eine wichtige Rolle spielen und weitere Cystein-arme Sequenzen mit YWTD-Motiven (CHRISTENSEN E. I., 2002). Diese

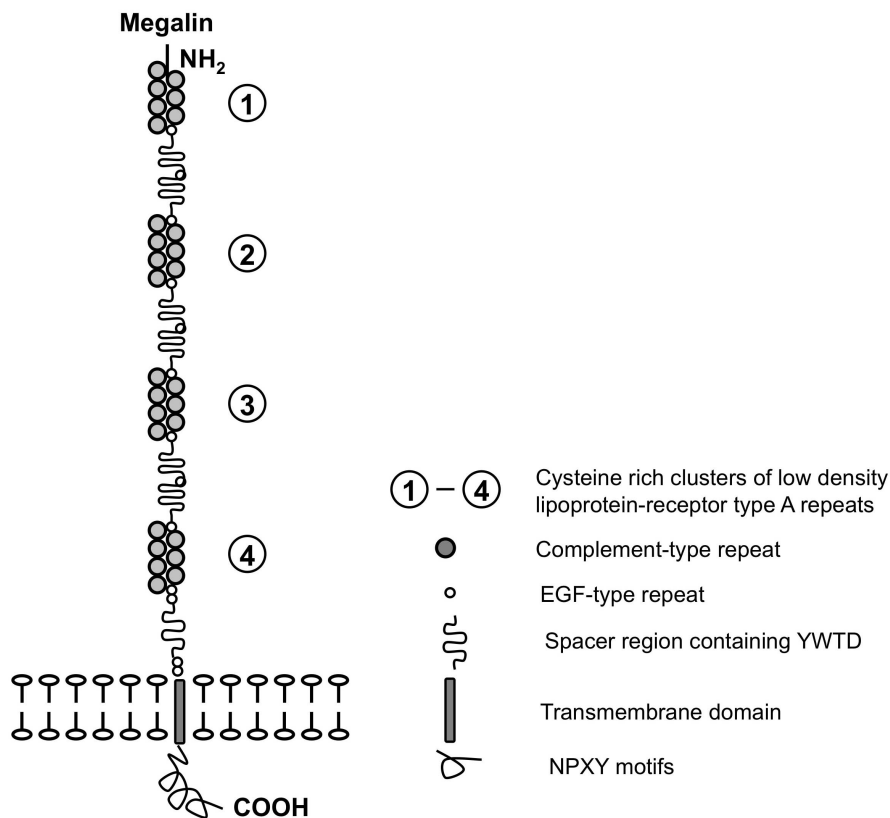


Abbildung 1.2 — Schematische Darstellung des Glykoproteins Megalin. Modifiziert nach CHRISTENSEN E. I., 2002.

sind für die pH-abhängige Dissoziation von Ligand und Rezeptor in den frühen Endosomen epithelialer Zellen verantwortlich (Abb. 1.2). Die intrazelluläre Domäne beinhaltet drei für die Initialisierung des endozytotischen Prozesses (Bildung der coated pits) wichtige NPXY-Motive. Weitere Src Homologien sind evtl. bei den intrazellulären Signalvermittlungen beteiligt (VERROUST and KOZYRAKI, 2001). Im menschlichen Genom ist Megalin auf Chromosom 2q24-q31 lokalisiert (KORENBERG *et al.*, 1994).

1.2.4.2 Cubilin

Cubilin wurde erstmalig als Angriffspunkt teratogener Antikörper in Kaninchen identifiziert und entsprechend seines geschätzten Molekulargewichts als gp 280 bezeichnet (SAHALI *et al.*, 1988). 1997 zeigte Seetharam, dass gp 280 mit dem intestinalen Rezeptor für Intrinsic Factor identisch ist (SEETHARAM *et al.*, 1997; BIRN

et al., 1997). Der Rezeptor wurde 1998 von Moestrup *et al.* geklont und erhielt die Bezeichnung Cubilin (MOESTRUP *et al.*, 1998). Die essentielle Bedeutung von Cubilin bei der Proteinendozytose konnte an Hunden veranschaulicht werden, bei denen ein genetischer Defekt in der Verarbeitung und im Einbau des Cubilins in die apikale Zellmembran epithelialer Zellen vorlag. Hier kam es zu einer ausgeprägten Albuminurie sowie zu einer Vitamin B12 Malabsorption (FYFE *et al.*, 1991a,b).

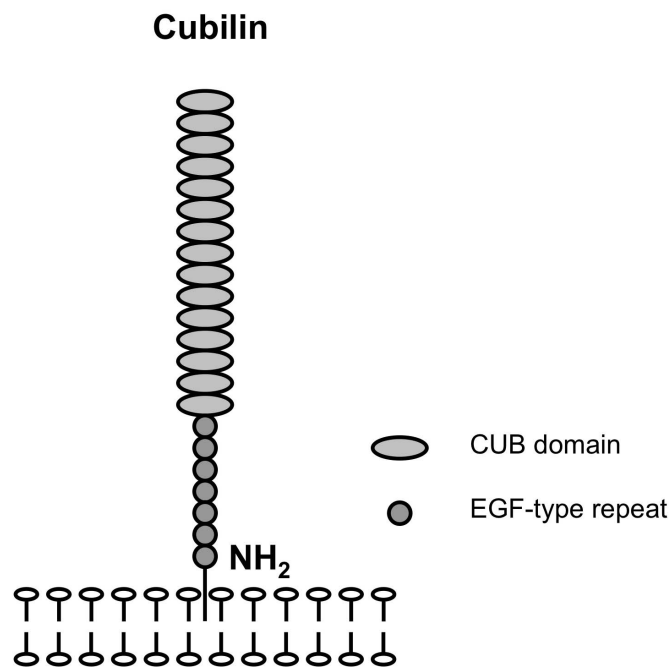


Abbildung 1.3 — Schematische Darstellung des Glykoproteins Cubilin. Modifiziert nach CHRISTENSEN E. I., 2002.

Bei Cubilin handelt es sich um ein 460 kD großes, peripheres Membranprotein, welches über sein N-terminales Ende an der Zellmembran verhaftet ist. Ein Bereich von 27 CUB-Domänen (Subkomponenten: C1r/C1s, Uegf, bone morphogenic protein-1) umfasst die Ligandenbindungsstellen (Abb. 1.3) (CHRISTENSEN E. I., 2002). Da Cubilin über keine transmembranäre oder cytosolische Domäne verfügt (MOESTRUP *et al.*, 1998), ist ein weiterer Rezeptor als Vermittler für die Internalisierung des Liganden-Rezeptorkomplexes und den weiteren intrazellulären Transport von Nöten. Untersuchungen haben gezeigt, dass diese Vermittlerfunktion Megalin

einnimmt (KOZYRAKI *et al.*, 1999). Cubilin ist im menschlichen Genom auf Chromosom 10p12.33-p13 lokalisiert (KOZYRAKI *et al.*, 1998).

Bei beiden Proteinen handelt es sich um Multiliganden-Rezeptoren. Tab. 1.1 gibt eine Übersicht über Megalin-/ Cubilin- gemeinsame und spezifische Liganden.

	Megalin	Cubilin
<u>Vitamin bindende Proteine</u>	Transcobalamin- Vitamin B12 Vitamin-D-bindendes Protein Retinol-bindendes Protein	Intrinsic factor- Vitamin B12
<u>Apolipoproteine</u>	Apolipoprotein B	HDL
<u>Peptide und Hormone</u>	PTH Insulin α 2-Mikroglobulin α 1-Mikroglobulin	
<u>Andere</u>	Albumin RAP (receptor-associated protein) Thyreoglobulin Plasminogen Calcium Enzyme α -Amylase	Albumin RAP Ig Leichtketten
<u>Medikamente</u>	Aminoglykoside Polymyxin B	

Tabelle 1.1 — Modifizierte Übersicht über gemeinsame und spezifische Liganden von Megalin und Cubilin nach CHRISTENSEN and BIRN, 2001; CHRISTENSEN E. I., 2002.

Im Hinblick auf die in Tab. 1.1 aufgeführten Liganden wird deutlich, welche zentrale Rolle den Rezeptoren Megalin und Cubilin bei der Prävention von Protein-,

Hormon- und Vitaminverlust zukommt (CHRISTENSEN and BIRN, 2001). Während Megalin in vielen Epithelzellen exprimiert wird, ist die Verbreitung von Cubilin deutlich restriktiver (Tab. 1.2).

	Megalin	Cubilin
<u>Kolokalisation</u>	Proximale Tubuluszelle (Mikrovilli der apikalen Zellmembran, clathrin coated pits, frühe Endosomen) Dünndarm Viszeraler Dottersack Zytotrophoblast der Plazenta	
<u>Einzellokalisierung</u>	Glomerulärer Podozyten Choroidaler Plexus Labyrinthzellen des Innenohrs Thyreoidale und parathyreoidale Zellen Endometriale Zellen Pneumozyten Typ II	— — — — — —

Tabelle 1.2 — Modifizierte Übersicht der Gewebsverteilung von Megalin/Cubilin nach KERJASCHKI and FARQUHAR, 1983; CHATELET *et al.*, 1986; ABBATE *et al.*, 1993; BACHINSKY *et al.*, 1993; ZHAI *et al.*, 2000.

1.2.4.3 pH-Abhängigkeit der Albuminendozytose: Bedeutung des NHE3

Essentiell für eine funktionierende Albuminendozytose im proximalen Tubulus ist die Aufrechterhaltung der pH-Homöostase in den frühen endosomalen Kompartimenten (pH zwischen 6-6,5) (MELLMAN *et al.*, 1986; GRUENBERG and MAXFIELD, 1995; MUKHERJEE *et al.*, 1997; GEKLE *et al.*, 2004). Es hat sich gezeigt, dass der Natrium-Protonen Austauscher Isotyp 3 (NHE3) einen entscheidenden Beitrag zu dieser pH-Homöostase leistet (D'SOUZA *et al.*, 1998; KAPUS *et al.*, 1994).

Der NHE3 zirkuliert ebenso wie die Endozytoserezeptoren Cubilin und Megalin zwischen der apikalen Zellmembran, den coated pits und den frühen Endosomen (Abb. 1.4). Nur durch eine adäquate Ansäuerung der frühen Endosomen ist

Proximale Tubuluszelle

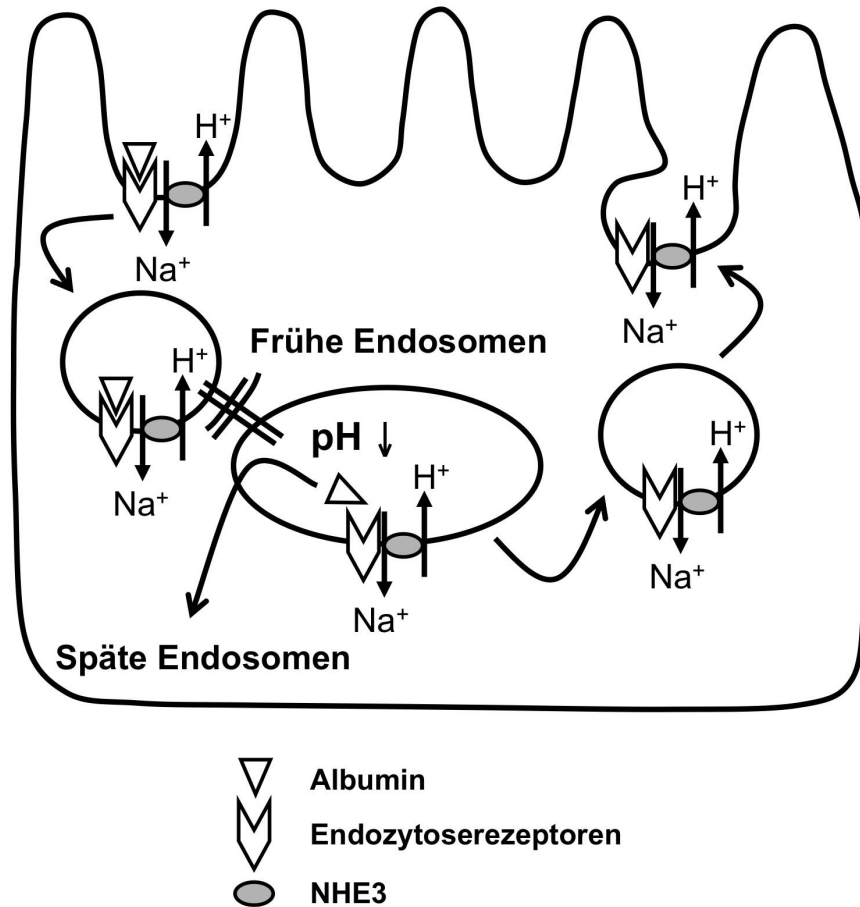


Abbildung 1.4 — Schematische Darstellung der pH-abhängigen Rezeptorvermittelten Albuminendozytose.

eine Rezeptor-Ligandendissoziation und somit das Recycling des notwendigen Endozytoseapparates gewährleistet (MELLMAN *et al.*, 1986; MUKHERJEE *et al.*, 1997). Durch eine pharmakologische Hemmung des NHE3 mit Ethylisopropylamilorid (EIPA) kommt es zu einer Alkalinisierung in den frühen Endosomen und zu einer dosisabhängigen Reduktion der Cubilin-/ Megalin-induzierten Albuminendozytose (GEKLE *et al.*, 1999, 2001).

1.3 Proteinurie/Albuminurie

Wie in der Einleitung erwähnt, geht ein Großteil der Nieren- aber auch der Systemerkrankungen mit einer vermehrten Protein-/ Albuminausscheidung einher. Unter einer Proteinurie versteht man eine Ausscheidung von über 150 mg Eiweiß pro Tag oder eine Abweichung vom physiologischen Proteinmuster. Von einer Albuminurie spricht man ab einer Ausscheidung von mehr als 30 mg Albumin pro Tag. Vor allem in der Diagnostik spielt die Albuminurie als frühes Zeichen der Nierenschädigung im Rahmen einer diabetischen Nephropathie oder benignen Nephrosklerose eine wichtige Rolle.

1.3.1 Entstehungsort der Proteinurie

Nach ihrer Entstehung unterscheidet man 3 Formen der Proteinurie: prärenal – renal (glomerulär – tubulär) – postrenal.

1.3.1.1 Prärenale Proteinurie

Wenn es zu einer pathologischen Konzentrationserhöhung bestimmter Proteine im Blutplasma kommt, ist durch dieses Mehrangebot an Proteinen die Endozytosekapazität im proximalen Tubulus überlastet und die Proteine erscheinen im Endurin. Ein Beispiel für eine prärenale Proteinurie wäre die Bence-Jones Proteinurie im Rahmen einer Plasmozytomerkrankung.

1.3.1.2 Renale Proteinurie

Am häufigsten findet eine Proteinurie ihren Ursprung in einer geschädigten Niere. Nach dem Entstehungsort wird zwischen einer glomerulären und einer tubulären Proteinurie unterschieden.

1.3.1.3 Glomeruläre Proteinurie

Bei der glomerulären Proteinurie kommt es durch eine Schädigung des Filters zu einer vermehrten Durchlässigkeit für Proteine. Die erhöhte Proteinmenge im Ul-

trafiltrat erschöpft wiederum die Resorptionskapazität der proximalen Tubuluszellen und erscheint im Endurin. Ein Beispiel für eine glomeruläre Proteinurie ist die Minimal-change-Nephropathie. Durch glomeruläre Entzündungsprozesse ändert sich die Wandladung im Filter (v. a. Podozyten), so dass jetzt v. a. das negativ geladene Albumin vermehrt filtriert wird (COTRAN *et al.*, 1999). Es kommt v.a. zur Ausbildung von Ödemen durch den Albuminverlust.

1.3.1.4 Tubuläre Proteinurie

Bei der tubulären Proteinurie kann durch eine Schädigung der Tubuluszelle die normale Proteinmenge im Ultrafiltrat nicht rückresorbiert werden und erscheint im Endurin. Ein Beispiel für eine tubuläre Proteinurie findet man beim Fanconi-Syndrom oder bei einer Cadmiumvergiftung.

1.3.1.5 Postrenale Proteinurie

Wenn im Bereich der ableitenden Harnwege vermehrt Protein durch einen Tumor, eine Blutung oder Bakterien anfällt, kann es auch zu dem seltenen Fall einer postrenalen Proteinurie kommen.

An diesem Punkt sei kurz auf die von RUSSO *et al.*, 2007 veröffentlichte Arbeit hingewiesen. Entgegen bisher bestehender Meinungen und Untersuchungen berichten die Autoren bereits unter physiologischen Bedingungen, bei nicht nephrotischen Ratten, über eine 40-fach höhere Albuminfiltration. Dies würde einem Albuminsiebkoeffizienten von 0.04 entgegen dem bisher angenommenen von 0,0005-0,0007 entsprechen. Rechnerisch ergäbe sich somit bei einer normalen glomerulären Filtrationsrate eine täglich filtrierte Albuminmenge von ca. 225 g bei einem Gesamtplasmaalbumingehalt von ca. 125 g. Somit müsste eine große Albuminmenge (ca. 200 % des totalen Plasmaalbumins) intakt - so von RUSSO *et al.*, 2007 postuliert - über das proximale Tubulusepithel transportiert werden. Dem gegenüber steht mit den Rezeptoren Cubilin und Megalin ein gut charakterisierter, sättigbarer Endozytoseapparat. Ein Transport von intaktem Albumin in Vesikeln mittels Transzytose – wie von Russo *et al.* beschrieben - konnte jedoch in allen bisherigen Studien nicht nachgewiesen werden, so dass die von Russo *et al.* gewonnenen Daten, welche ein Paradigmen-

hift in der Nierenphysiologie bedeuten würden, skeptisch betrachtet werden müssen (CHRISTENSEN *et al.*, 2007; GEKLE, 2007).

1.3.2 Albuminurie als Marker der Nierenfibrose

Der Nachweis einer persistierenden Mikroalbuminurie, d. h. einer Albuminausscheidung zwischen 20-200 mg/l bzw. 30-300 mg/d, fungiert als ein valider Parameter zur Frühdiagnose der diabetischen Nephropathie (MOGENSEN, 1987; BURTON and HARRIS, 1996; TOJO *et al.*, 2001; HASSLACHER *et al.*, 2007) und weist überdies - insbesondere beim Typ 2 Diabetes - auf eine stark erhöhte kardiovaskuläre Morbidität hin. Eine Therapie-induzierte Abnahme der Albuminurie kann als Prädiktor der renalen und kardiovaskulären Prognose herangezogen werden (CAMERON, 1990; RUGGENENTI *et al.*, 1998; DE ZEEUW *et al.*, 2004a,b).

1.3.3 Albuminurie als Motor der Nierenfibrose

In vitro als auch in vivo Experimente haben gezeigt, dass die Albuminurie nicht nur ein diagnostischer Parameter ist, sondern dass ein vermehrtes Angebot an Albumin über entzündliche und fibrotische Umbauprozesse im proximalen Tubulus zum Fortschreiten der tubulointerstitiellen Schädigung bis hin zur Nierenfibrose und somit zum Endstadium der Urämie führen kann. Die Albuminurie ist also nicht nur Marker, sondern vor allem auch Motor der Nierenfibrose (KLAHR *et al.*, 1988; REMUZZI, 1995; REMUZZI *et al.*, 1997; JERUMS *et al.*, 1997; ABBATE and REMUZZI, 1999). In diesem Prozess kommt der proximalen Tubuluszelle als Ort der Albuminrückresorption eine zentrale Bedeutung zu. Zum einen wird durch die im Krankheitsfall gesteigerte Proteinrückresorption ein übermäßiger Verlust an wichtigen Aminosäuren, Vitaminen und Hormonen verhindert, zum anderen führt gerade dieses Mehrangebot an Protein zur weiteren tubulointerstitiellen Schädigung. Die genauen Mechanismen sind bis jetzt noch nicht vollständig verstanden. Aktivierung und Genexpression verschiedener proinflammatorische Zytokine (TNF- α) (DRUMM *et al.*, 2002), Chemokine (Monocyte chemotactic protein-1, RANTES) (WANG *et al.*, 1997; ZOJA *et al.*, 1998), Wachstumsfaktoren (TGF- β) (YARD *et al.*, 2001) und Matrixkomponenten

(Kollagen I, III, IV) (ZOJA *et al.*, 1998; YARD *et al.*, 2001; WOHLFARTH *et al.*, 2003) sind beteiligt. Es können zwei Möglichkeiten als Beitrag des proximalen Tubulus an der Protein-induzierten Schädigung in Betracht gezogen werden:

1. Die Proteinurie setzt über ein verändertes tubuläres Signalling proinflammatorische und profibrotische Stimuli frei.
2. Die Proteinurie beeinflusst direkt die Kollagenhomöostase des proximalen Tubulus und führt somit zur Nierenfibrose.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel meiner Arbeit war es mit einem geeigneten Zellkulturmodell folgende drei Fragen systematisch zu untersuchen:

1. Beeinflussen filtrierte Proteine die Kollagenhomöostase proximaler Tubuluszellen?
2. Wenn ja, welche Signaltransduktionswege sind dabei involviert?
3. Ist die Endozytose der filtrierten Proteine für die oben vermittelten Prozesse notwendig?

1.5 Validiertes Zellkultursystem

Als Zellkulturmodell wurde die gut charakterisierte Zelllinie der proximalen Tubuluszellen des amerikanischen Opossums gewählt. Es handelt sich um polarisiert aufgebaute Zellen mit einem apikalen Mikrovillisaum (COURJAULT *et al.*, 1991). Sie besitzen die für die Protein-Endozytose notwendigen Komponenten: die Rezeptoren Cubilin und Megalin, welche analog der *in vivo* Situation vor allem im apikalen Bürstensaumbereich, den coated pits und den frühen Endosomen kolokalisiert sind (SCHWEGLER *et al.*, 1991; GEKLE *et al.*, 1996; NOEL, 1996; BRUNSKILL *et al.*, 1997; GEKLE *et al.*, 1997; BRUNSKILL *et al.*, 1998; ZHAI *et al.*, 2000). Zur Aufrechterhaltung der pH-Homöostase in den frühen Endosomen und somit zur Gewährleistung

einer funktionierenden Proteinresorption konnte der NHE3 in der apikalen Zellmembran nachgewiesen werden (AKHTER *et al.*, 2002). Die proximalen Tubuluszellen des Opossums weisen - wie frühere Untersuchungen gezeigt haben - eine sehr hohe, nahezu physiologische Endozytoserate (0.25 ng/min/mm^2) auf (GEKLE *et al.*, 1996).

Bei der Durchführung meiner Experimente wurde mit Albuminkonzentrationen in pathophysiologisch relevanten Bereichen, zwischen 100 und 10000 mg/l, gearbeitet, um möglichst in vivo Bedingungen zu simulieren.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Der Hauptteil der Versuche wurde an den Opossum Kidney Wildtyp-Zellen durchgeführt. Die zusätzlich aufgeführten Zelllinien wurden für Vergleichsstudien herangezogen. Sie unterscheiden sich vor allem in ihrer endozytotischen Aktivität.

2.1.1 Materialien für Zellkultur

- Zellkulturbrutschrank: Heraeus, Hanau, Deutschland
- Zellkulturflasche 75 cm², 6/24-Well-Platten, Filter mit Filterporengröße \varnothing 0,45 μ m: BD Falcon, New Jersey, USA
- Trypsin: Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Ethylendiamintetraacetat (EDTA): Merck, Darmstadt, Deutschland
- Foetal calf serum (FCS): PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich
- Minimal Essentiell Medium mit Earl's Salzen und 24 mmol/l NaHCO₃ (MEM): Biochrom, Berlin, Deutschland
- Dulbecco's Modified Minimal Eagle Medium (DMEM): Biochrom, Berlin, Deutschland
- DMEM/F12: DMEM ergänzt durch 15 mM HEPES (pH 7,3), 100 nM Hydrokortison, 5 mg/l (humanes Apo-) Transferrin, 5 mg/l (bovines) Insulin, 29 nM Na₂SeO₂, 10 mM NaHCO₃

2.1.2 Zelllinien

2.1.2.1 Opossum Kidney Wildtyp Zellen (Wildtyp-OK-Zellen)

Die Zellen wurden freundlicherweise von Dr. J. Biber, Institut für Physiologie, Zürich, Schweiz, zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um polarisierte Zellen, welche von Epithelzellen des proximalen Tubulus des amerikanischen Opossums abstammen.

Kulturmedium: Minimal essential medium mit 10 % fötalem Kälberserum (im Verlauf als MEM⁺ bezeichnet).

2.1.2.2 Porcine Renal Proximal Tubule Zellen (LLC-PK₁-Zellen)

Die Zellen wurden freundlicherweise von Dr. G. Gstraunthaler, Physiologisches Institut, Innsbruck, Österreich, zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um polarisierte Zellen, die von proximalen Tubuluszellen des Hausschweins abstammen. Auch sie besitzen den „Endozytoseapparat“ Cubilin, Megalin und den NHE3 (NIELSEN *et al.*, 1998; SHUGRUE *et al.*, 1999).

Kulturmedium: DMEM mit 10 % fötalem Kälberserum.

2.1.2.3 Immortalized Human Kidney Epithelial Zellen (IHKE1-Zellen)

Die Zellen wurden freundlicherweise von S. Mollerup, Toxikologisches Institut, Oslo, Norwegen, zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um immortalisierte humane Nierenepithelzellen.

Kulturmedium: Ham F-12/DMEM Medium: 1,1 g/l NaHCO₃, 3,57 g/l HEPES, 5 mg/l humanes Apotransferrin, 5 mg/l Rinderinsulin, 36 µg/l Hydrocortison, 10 µg/l Mäuse-EGF, 5 µg/l Natriumselenit, 10% fötales Kälberserum.

2.1.2.4 Madine-Darby Canine Kidney Zellen (MDCK-Zellen), Subtyp C11 (C11 Klon)

Hierbei handelt es sich ebenfalls um eine polarisierte Zelllinie. MDCK-Zellen wurden aus dem Sammelrohr einer Hundeniere isoliert und bestehen aus verschiedenen Subtypen. Aus dieser heterogenen Zellpopulation wurde von Gekle *et al.* (GEKLE

et al., 1994) verschiedene Subtypen kloniert. Für meine Versuche stand der Subtyp C11 zur Verfügung, welcher den interkalierenden Zellen des renalen Sammelrohrs ähnlich ist.

Kulturmedium: MEM mit 10 % fötalem Kälberserum, 0,292 g/l L-Glutamin, 26 mM NaCO₃.

2.1.2.5 Opossum Kidney NHE3-defiziente Zellen (OK-NHE3-def. Zellen)

Hierbei handelt es sich um NHE3 defiziente Opossum Kidney Zellen, welche durch die H⁺-Suicide Methode - im Original von POUYSSÉGUR *et al.*, 1984 beschrieben - entwickelt und ausführlich von GEKLE *et al.*, 2002 charakterisiert wurden.

Kulturmedium: MEM ergänzt durch 10 % fötales Kälberserum.

2.1.3 Zellkultur am Beispiel der Opossum Kidney Wildtypzellen

Sämtliche Arbeiten im Zellkulturbereich wurden an einer Sterilbank unter Laminar Flow durchgeführt. Die entsprechend nummerierte Passage der OK-Zelllinie wurde in einer 75 cm² Kulturflasche mit MEM⁺ als Kulturmedium unter standardisierten Bedingungen bei einer Temperatur von 37 °C, 100 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ Atmosphäre in einem Inkubator gehalten. Der Wechsel des Mediums erfolgte dreimal pro Woche, die Subkultivierung einmal pro Woche im Splitverhältnis 1:3 unter 10-minütiger Trypsinisierung (0.25 g/l) in Calcium- und Magnesiumfreier, EDTA-beinhaltender Ringerlösung. Für die entsprechenden Versuche wurden die Zellen in 6- oder 24-Well-Schalen angesät. Auch hier erfolgte der Mediumwechsel dreimal pro Woche. Die Zellen wurden 7 Tage nach Aussaat nach lichtmikroskopischer Kontrolle (Kriterien: Erreichen der Konfluenz, Monolayer, Intaktheit der Zellen) für die entsprechenden Experimente 24 Stunden mit Minusmedium (kein FCS; im Weiteren als MEM⁻ bezeichnet) zur Ruhigstellung und anschließend mit den entsprechenden Experimentalmedien (verdünnt in MEM⁻) für 24/48 Stunden inkubiert.

2.1.4 Experimentalmedien/Hemmer

- Bovines Serumalbumin (BSA): Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Fatty-acid free Albumin (FAF-BSA): Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- TGF- β 1: Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Dextran 70: Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Bisindolylmaleimide (BIM): Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- U 0126: Alexis Biochemicals, San Diego, Californien, USA
- Ethylisopropylamilorid (EIPA): Dr. J. Lang, Aventis, Frankfurt, Deutschland
- H89: Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC): Sigma, Deisenhofen, Deutschland

2.2 Ermittlung von Zellzahl und Zellgrösse mittels Coulter Counter

Materialien

- Z2 Coulter Counter: Beckman Coulter, Inc., California, USA
- Acuvettes: Beckman Coulter, Inc., California, USA
- EDTA: Merck, Darmstadt, Deutschland
- Trypsin: Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Triton X-100: Serva, Heidelberg, Deutschland
- Natriumchlorid (NaCl): Merck, Darmstadt, Deutschland
- Kaliumchlorid (KCl): Merck, Darmstadt, Deutschland
- Phosphat buffered saline (PBS): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 12 mM Gesamt-Phosphat (in Form von PO_4^{3-} und HPO_4^{2-}), pH 7.4

Versuchsaufbau

Mittels Bestimmung von Zellzahl, Zellgröße und Proteingehalt pro Zelle sollte untersucht werden, ob Albuminexposition zu einer Hyperplasie oder Hypertrophie der proximalen Tubuluszellen des Opossums führt. Der Coulter Counter bestimmt anhand elektrischer Widerstandsänderung in der Lösung Zellzahl und Zellgröße. Diese Methode wurde von Wallace H. Coulter 1947 entwickelt und nach ihm als Coulter-Prinzip bezeichnet. Hierfür wurden die Zellen - im Anschluss an die Inkubation mit unterschiedlichen Albuminkonzentrationen - einmalig mit PBS gewaschen, dann mit EDTA für 10 min inkubiert und anschließend mit 1 ml Trypsin abgelöst. Die Zellsuspension von 1 ml wurde mit 9 ml isotoner Lösung aufgefüllt und bis zur Durchführung der Messung von Zellzahl und -durchmesser mittels Z2 Coulter Counter auf Eis gestellt.

Zur Bestimmung des Proteingehalts wurden 5 ml der verdünnten Zellsuspension entnommen und bei 2000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, das verbliebene Pellet in 0,5 ml 0,1% Triton X-100 gelöst. Danach erfolgte die Proteinbestimmung mittels BCA (siehe unten). Aus den ermittelten Werten konnten Zellzahl, Zellvolumen und Proteingehalt pro Zelle ermittelt werden.

2.3 Quantitative Bestimmung des Proteingehalts mittels Bicinchoninsäure

Materialien

- Multiwell-Multilabel-Reader Victor² : Perkin Elmer Wallac GmbH, Freiburg, Deutschland
- BCA Reagenz (Reagenz A): Thermo Scientific Pierce Protein Research Products, Rockford, Illinois, USA

Versuchsaufbau

Dem Prinzip dieses Assays liegt die Tatsache zu Grunde, dass Proteine zweiwertiges Kupfer reduzieren. Das dabei entstandene einwertige Kupferion reagiert

mit der in der Lösung vorhandenen Bicinchoninsäure zu einem spezifischen Farbkomplex. Die Absorption des Farbkomplexes wird spektrophotometrisch erfasst. Die Farbintensität ist direkt proportional der Konzentrationen der reagierenden Gruppen. Zunächst wurden vom BCA Assay Kit 50 Teile Reagenz A von Pierce mit 1 Teil Reagenz B (CuSO_4 , hergestellt in unserem Labor) wie vom Hersteller beschrieben gemischt. In einer 96 well Schale wurden $30 \mu\text{l}$ der Probe aus dem Lysat mit $300 \mu\text{l}$ des Reagenz im Well gemischt und in gleichen Teilen Wasser dazugegeben. Dieser Ansatz wurde für 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert und bis zur Messung auf Eis gestellt. Anschliessend wurde die Extinktion am Multiwell-Multilabel-Reader Victor² bei 560 nm gemessen. Von den gemessenen Werten wurde der Blank-Wert (nur Lysepuffer) abgezogen. Weiterhin erfolgte die Erstellung einer Eichgeraden mittels eines Proteinstandards.

2.4 Bestimmung von sezerniertem Kollagen mittels Kollagenase-sensitiven Prolininkorporationsassay

Materialien

- Szintillationsspektrometer: Packard Instruments, Frankfurt, Deutschland
- Szintillationsflüssigkeit: Packard Instruments, Frankfurt, Deutschland
- $^3\text{[H]}$ -Prolin (37000 Bq/ml): Biotrend, Amersham Life Sciences, Buckinghamshire, Großbritannien
- Trichloressigsäure (TCA 10%, 40%): Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Triton X-100 (0,1%): Serva, Heidelberg, Deutschland
- N-Ethylmaleimide (2.5 mM): Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Ascorbinsäure (50 mg/l): Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- β -Aminopropionitrile (50 mg/l): Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- fötales Kälberserum (10%): Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Ethanol (80%): Merck, Darmstadt, Deutschland

- Natronlauge (NaOH 1 M): Merck, Darmstadt, Deutschland
- Kollagenase (5 mg/ml, *Clostridium histolyticum*): Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Assay-Puffer: 50 mM Tris HCl (pH 7.5), 5 mM CaCl₂, 2,5 mM N-ethylmaleimide
- Kollagen-Assay-Puffer: Assay-Puffer + 5 mg/ml Kollagenase

Versuchsaufbau

Der Kollagenase-sensitive Prolininkorporationsassay wurde wie bei EICKELBERG *et al.*, 1999 beschrieben durchgeführt. Es handelt sich hierbei um eine modifizierte Methode von AGELLI and WAHL, 1988. Bei dem Kollagenase-sensitiven-Prolininkorporationsassay macht man sich die Besonderheit des Kollagenaufbaus zunutze. Die Aminosäure Prolin und Hydroxyprolin wird in einer x-fach höheren Konzentration im Protein Kollagen im Vergleich zu anderen Proteinen eingebaut. Die bakterielle Kollagenase II setzt radioaktiv markiertes Prolin aus Kollagen, jedoch nicht aus anderen Proteinen frei. Dazu muss die verwendete Kollagenase frei von unspezifischer Proteinaseaktivität sein. Durch die Verwendung von N-ethylmaleimide (NEM) wird die durch Kontamination verbleibende proteolytische Aktivität der verwendeten Kollagenase gehemmt. Agelli beschreibt, dass nach einer Inkubationszeit von 20 Stunden Änderungen in der Proteinsynthese zu erkennen sind (AGELLI and WAHL, 1988).

Für die Versuche wurden die Zellen für 24/48 Stunden mit den entsprechenden Experimentalmedien zusammen mit ³[H]-Prolin mit einer Aktivität von 18500 Bq/ml sowie Ascorbinsäure in einer Konzentration von 50 mg/l und β -Aminopropionitrile in einer Konzentration von 50 mg/l (vermeidet Quervernetzungen) inkubiert. Die Bestimmung von gesamtsezerniertem Protein und gesamtsezernierten Kollagen wurde im Medium durchgeführt. 400 μ l Aliquots des Mediums von jedem Well wurden mit 100 μ l Kollagenase Assay Puffer für 4h bei 37 °C inkubiert. Parallel wurden 400 μ l Aliquot des Mediums von jedem Well mit 100 μ l Assay Puffer für 4 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde zu jeder Probe 50 μ l fötales Kälberserum und 100 μ l TCA hinzugegeben (Proteinfällung) und für 30 min auf Eis gestellt. Die Präzipitate

wurden 3 Mal mit 2 ml TCA und 2 Mal mit 80 % Ethanol gewaschen. Im Anschluss wurden die Präzipitate in 1 M NaOH gelöst und die Radioaktivität mittels Flüssigkeitsszintillation als desintegrations per minute (=dpm) bestimmt.

Die Menge des gesamtsezernierten Proteins ergibt sich als dpm im Medium ohne Kollagenase. Die Menge des gesamtsezernierten Kollagens errechnet sich als dpm ohne Kollagenase minus dpm mit Kollagenase. Der Anteil von gesamtsezernierten Kollagen am gesamtsezernierten Protein (% Kollagen, Kollagenfraktion) wurde folgendermaßen berechnet,

$$\% \text{ Kollagen} = (C/P) / [[5.4 \times (1 - C/P)] + (C/P)] \times 100$$

wobei C die Kollagen-assoziierte Aktivität im Medium und P die Kollagenase-insensitive Aktivität im Medium darstellt. Ein Korrekturfaktor von 5.4 für Nicht-Kollagenprotein wurde zum Ausgleich für den relativen Überschuss von Prolin und Hydroxyprolin im Kollagen benutzt. In der nachfolgenden Schemazeichnung sind die einzelnen Versuchsschritte nochmals aufgeführt (Abb. 2.1).

2.5 Bestimmung von sezerniertem Kollagen mittels Kollagen-ELISA

Materialien

- Multiwell-Multilabel-Reader Victor²: Perkin Elmer Wallac GmbH, Freiburg, Deutschland
- Nunc-Immuno Maxisorb Schalen: Nalgene Nunc International, Naperville, Illinois, USA
- Ascorbinsäure (50 mg/l): Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- β -Aminopropionitrile (50 mg/l): Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Carbonatpuffer (100 mM): 10.6 g/l Carbonat, pH 9.0
- Phosphat buffered saline (PBS): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 12 mM Gesamt-Phosphat (in Form von PO_4^{3-} und HPO_4^{2-}), pH 7.4

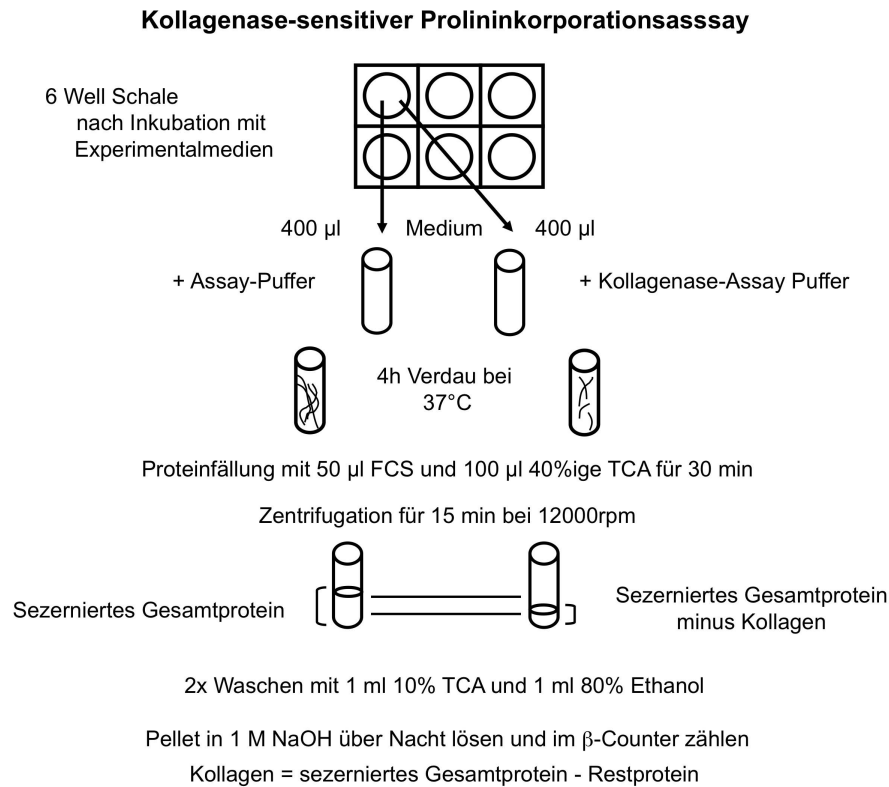


Abbildung 2.1 — Versuchsaufbau des Kollagenase-sensitiven Prolininkorporationsassay.

- Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween 20): Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Kaninchen Antikörper gegen Kollagen Typ I, III, IV (1:1000): Biotrend, Köln, Deutschland
- Horseradish peroxidase (HRP) konjugierter Zweitantikörper (1:5000): Biotrend, Köln, Deutschland
- *o*-phenylenediamine: Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Schwefelsäure (H_2SO_4 1 M): Merck, Darmstadt, Deutschland
- HRP Substrat: 1mg/ml *o*-phenylenediamine, 11,8 mg/ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 7,3 mg/ml Zitronensäure, 0,015 % H_2O_2 (in Seralwasser)
- Kollagenstandard: Sigma, Deisenhofen, Deutschland, 1 mg/ml in 0.5 M Essigsäure, in MEM⁻ verdünnen auf 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 ng/well

Versuchsaufbau

Zur Bestimmung des sezernierten Kollagentyps wurde ein Enzyme-linked-Immuno-sorbent-Assay nach den Protokollen von ESPOSITO *et al.*, 2000 und ZIYADEH *et al.*, 1990 durchgeführt. 100 μl Aliquot der Medien bzw. des Kollagen Standards (verdünnt in MEM⁻) wurden für 24 h in einer 96 well Nunc-Immuno-Maxisorb-Schale mit 100 μl Carbonatpuffer inkubiert, dann mit 2% bovinem Serumalbumin in PBS gewaschen und geblockt. Anschließend wurden die Schalen mit Kaninchen Antikörper gegen Kollagen Typ I, III, IV (1:1000) (verdünnt in 2 %-BSA-PBS) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 3 Waschgängen mit 0.05 % Tween 20 in PBS erfolgte die Inkubation mit dem Horseradish peroxidase (HRP) konjugierten Zweitantikörper (1:5000) in 2%-BSA-PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach weiteren 3 Waschgängen mit 0.05 % Tween 20 in PBS wurden die Schalen mit HRP-Substrat inkubiert und die Reaktion nach 15 min mit 1 M H₂SO₄ gestoppt. Anschließend wurde die Absorbance bei 490 nm am Multiwell-Multilabel-Reader Victor² gemessen.

2.6 Bestimmung der Kollagensynthese mittels Kollagen Western Blot

Materialien

- Ascorbinsäure (50 mg/ml): Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- β -Aminopropionitril (50 mg/ml): Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Natrium dodecylsulfate (SDS): Serva, Heidelberg, Deutschland
- Acrylamid, Bisacrylamid, Ammoniumpersulphat (APS): Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Tetramethylethyldiamin (TEMED): Amresco, Solon, Ohio, USA
- Redmix: Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Trishydroxymethyl-aminomethan (TRIS): Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Glycin: Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Nitrozellulosemembran, Gel-Blot-Papier: Schleicher und Schüll, Dassel, Deutschland

- Milchpulver: Naturaflor Töpfer, Dietmannsried, Deutschland
- Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween 20): Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Ethylendiamintetraacetat (EDTA 1 mM): Merck, Darmstadt, Deutschland
- Kaninchen Kollagen Antikörper Typ I, III und IV (1: 1000 verdünnt): Biotrend, Köln, Deutschland
- Horseradish Peroxidase (HRP) konjugierter Zweitantikörper (1:25000): Biotrend, Köln, Deutschland
- Proteinstandard: Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- ECL-Reagenz (Enhanced chemoluminescence): Amersham Life Sciences, Buckinghamshire, Großbritannien, bestehend aus zwei Reagenzien (Lösung 1 und 2)
- Blocking solution: 5 % Milchpulver in PBS, 0,1 % Tween 20
- Antikörperverdünnungslösung: 5 % BSA in PBS + 0.05 % Tween 20
- 10 x PBS: 80 g/l NaCl, 2 g/l KCl, 14.42 g/l Na₂HPO₄, 2 g/l KH₂PO₄
- RIPA Puffer: 50 mM TRIS, 150 mM NaCl, 1 % DOC, 0,1 % SDS, 1 % Triton X-100

SDS-PAGE-Gel:

- Sammelgel: 5 % Acrylamid, 0,13 % Bisacrylamid, 125 mM TRIS, 1 mM TEMED, 0,1% SDS, 0,05 % APS, pH 6,8
- Trenngel: 12 % Acrylamid, 0,32 % Bisacrylamid, 375 mM TRIS, 0,5 mM TEMED, 0,1 % SDS, 0,05 % APS, pH 8,8
- Bromphenolblau-Ladepuffer: 50 % Glycerin, 1 % Bromphenolblau, 1 % Xylenolcyanol
- SDS-Laufpuffer: 1 g/l SDS, 3,1 g/l TRIS-HCl, 11,4 g/l Glyzin
- Transferpuffer: 25 mmol/l Tris-Base, 150 mmol/l Glyzin, 10 % Methanol

Versuchsaufbau

Die Zellen wurden in 24-Well-Schalen angesät. Nach Erreichen der Konfluenz erfolgte die Ruhigstellung mit MEM⁻ für 24 Stunden, anschließend die Inkubation mit den entsprechenden Experimentalmedien sowie mit 50 mg/l Ascorbat und 50 mg/l β -Aminopropionitril. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit eiskaltem

PBS gewaschen und in eiskalten RIPA Puffer für 25 min bei 4 °C lysiert. Unlösliches Material wurde durch Zentrifugation bei 12 000 g für 15 min bei 4 °C entfernt. Die Proteine des Zellysats wurden in einem 3 %igen Sammelgel aufgetragen, auf einem 8%igem SDS-PAGE Gel (0,6 h bei 11 mA und 2 h bei 21 mA) aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulose Membran transferiert (0,5 h, Blotstrom 2 mA/cm² im Transferpuffer). Nach dem Blotten erfolgte eine 2-stündige Blockade in Blocking Solution, anschließend die Inkubation mit dem Erstantikörper. Die Membranen wurden hierfür nacheinander mit Kaninchen Kollagen Antikörper Typ I, III und IV (1: 1000) über Nacht bei 4 °C in Antikörperverdünnungslösung inkubiert. Danach wurde 2 Mal in Blocking Solution und 1 Mal in PBS/Tween 0.05 % gewaschen. Der primäre Antikörper wurde mittels Horseradish-peroxidase konjugiertem sekundärem Kaninchen IgG Antikörper (1:25.000) sichtbar gemacht (Inkubation für mindestens 120 min). Anschließend erfolgte ein nochmaliges Waschen 2 x 10 min in Blocking Solution, 2 x 10min in PBS/Tween 0.05% und 10 min in PBS. Das Ergebnis wurde mit Amersham Corp. Enhanced Chemiluminescence System visualisiert. Die Linearität des Signals wurde mittels Verdünnungsserien nach Herstellerempfehlung verifiziert. Für densitometrische Analysen wurde Sigmagel 1.05 (Jandel Scientific, Corte Madera, California, USA) benutzt.

2.7 Semiquantitative Bestimmung der Gelatina-seaktivität mittels Zymographie

Materialien

- Gelatine: Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Coomassie R250: Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- SDS: Serva Heidelberg, Deutschland
- Acrylamid, Bisacrylamid, APS, TEMED: Amresco, Solon, Ohio, USA
- Trishydroxymethyl-aminomethan (TRIS): Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Triton X-100: Serva, Heidelberg, Deutschland
- Lämmli-puffer: Sigma, Deisenhofen, Deutschland

- Ethanol, Methanol: Merck, Darmstadt, Deutschland
- Coomassie Färbung = Stain (1000ml): 425 ml Ethanol, 50 ml Methanol, 100 ml Essigsäure, 425 ml H₂O, 2 g Coomassie R250
- Entfärbelösung = Destain (1000ml): 200 ml Methanol, 75 ml Essigsäure, 725 ml H₂O
- Enzympuffer: 6,057 g TRIS, 1,11 g CaCl₂, 0,136 mg ZnCl₂, 1 ml Triton X-100, 0,2 g NaN₃ + 1000ml Seralwasser
- SDS-PAGE-Gel: s.o.
- Bromphenolblau-Ladepuffer: s.o.
- SDS-Laufpuffer: s.o.

Versuchsaufbau

Die Zymographie ist eine elektrophoretische Methode zur semiquantitativen Bestimmung proteolytischer Aktivität. Sie basiert auf einer SDS-PAGE, bei der in diesem Fall Gelatine als Substrat kopolymerisiert wird, um die Enzymaktivität von Gelatinasen im Medium der inkubierten Zellen aufzudecken. Innerhalb eines bestimmten Rahmens korreliert die Bandenintensität linear mit der Proteasenmenge. Zunächst wurden die Zellen für 24 Stunden mit MEM⁻ ruhig gestellt und anschließend für 24 Stunden gegenüber den entsprechenden Experimentalmedien exponiert. Die Aliquots der jeweiligen Medien wurden für 45 min mit Lämmli Probenpuffer bei 37 °C inkubiert (kein Kochen, kein reduzierendes Agens). Im Anschluss wurden die Proben mittels nichtreduzierender (kein Mercaptoethanol), aber denaturierender Gelatine-SDS-PAGE (10 %) aufgetrennt. Dazu wurde ein 0.1 % Gelatine-Gel hergestellt. Die Auftrennung erfolgte bei 25 mA/Gel für 2 Stunden. Nach der Elektrophorese wurde SDS durch eine einstündige Inkubation in 2.5 % Triton-X-100 aus dem Gel entfernt. Im Anschluss wurde das Gel für 18 Stunden im Enzympuffer bei 37 °C inkubiert. Zuletzt wurde das Gel mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Regionen mit Gelatinase-Aktivität weisen helle Banden auf.

2.8 Quantitative Bestimmung der Gelatinaseaktivität mittels Gelatinaseassay

Materialien

- Multiwell-Multilabel-Reader Victor²: Perkin Elmer Wallac GmbH, Freiburg, Deutschland
- EnzChek Gelatinase/Collagenase Assay Kit: Molecular Probes, Leiden, Niederlande bestehend aus
- DQ Gelatine von Schweinehaut, Fluorescein (fluoreszierender Farbstoff aus Gruppe der Xanthenfarbstoffe, pH-abhängige Fluoreszenzaktivität) konjugiert, Inhalt 1 mg Substrat
- 10 facher Reaktionspuffer: 0,5 M Tris-HCl, 1,5 M NaCl, 50 mM CaCl₂, 2 mM NaN₃, pH 7.6
- Kollagenase Typ IV von Clostridium histolyticum (500 U)

Versuchsaufbau

Dieser Gelatinase/Collagenase Assay Kit von Molecular Probes dient der quantitativen Bestimmung der Kollagenaseaktivität. Als Substrat dient Fluorescein-konjugiertes Gelatin. In Anwesenheit von entsprechenden Kollagenasen entstehen fluoreszierende Peptide. Die Fluoreszenz kann photometrisch gemessen werden, wobei die Fluoreszenzzunahme/Zeit proportional der proteolytischen Aktivität ist. Die Abbauprodukte des DQ-Gelatine-Substrats haben ihr Absorptionsmaximum bei 495 nm und Fluoreszenz-Emissionsmaximum bei 515 nm. Zunächst wurde eine Stammlösung der DQ-Gelatine hergestellt, indem der DQ-Trockensubstanz 1.0 ml deionisiertes Wasser hinzugefügt wurde. Der mitgelieferte Reaktionspuffer wurde mittels dH₂O 10-fach verdünnt. Im Folgenden wurde der Überstand der zunächst ruhig gestellten und im Anschluss mit entsprechenden Experimentalmedien inkubierten Zellen untersucht. Als Positivkontrolle erfolgte die stufenweise Verdünnung der mitgelieferten Kollagenase Stammlösung von 1000 U/mL (gelieferte Lösung in 0.5 ml Reaction buffer verdünnen). Für die Assay-Durchführung wurde 80 μ l Reaktionspuffer in ein Well gegeben, 20 μ l DQ-Gelatine-Lösung der Stammlösung (1 mg/ml) hinzugegeben (Endkonzentration 100 μ g/ml) und mit dem Reaktionspuffer

vermischt. Danach wurde äquivalent 100 μ l Aliquot der Proben hinzugefügt. Als Leerwert (sog. blank) diente der Reaktionspuffer. Die Proben wurden bei Raumtemperatur unter Lichtschutz inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Absorptionsmessung im Multiwell-Multilabel-Reader. Für jeden Zeitwert wurde der entsprechende Hintergrund-Fluoreszenzwert abgezogen.

2.9 Bestimmung der Radikalbildung mittels Radikalassay

Materialien

- 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure (HEPES-Ringer): Merck, Darmstadt, Deutschland
- Dichlorodihydrofluorescein-diacetate (DCF-DA) Stammlösung: Molecular probes, Leiden, Niederlande
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Lösungsmittel, Gefrierschutzmittel: Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Wasserstoffperoxid (H_2O_2): Merck, Darmstadt, Deutschland

Versuchsaufbau

Dichlorodihydrofluorescein-diacetate (DCF-DA) ist ein Zell permeierender Indikator für Reactive Oxygen Species. H₂-DCF-DA selbst ist nicht fluoreszierend. Nach Aufnahme in die Zellen wird die Acetatgruppe des 2', 7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetate (H₂-DCF-DA) durch intrazelluläre Esterasen hydrolysiert. Das nicht fluoreszierende, nicht Zell permeable Dichlorodihydrofluorescein (H₂-DCF) wird durch Reactive Oxygen Species (ROS) zum Fluorochrom Dichlorofluoreszin (DCF) oxidiert (Abb. 2.2; HEMPEL *et al.*, 1999). Durch Anregung mit Licht der Wellenlänge 488 nm kann die Fluoreszenz von DCF bei einer Emissionswellenlänge von 525 nm detektiert werden (HALLIWELL and WHITEMAN, 2004). Konfluente Zellen wurden nach Ruhigstellung (24 Stunden) mit entsprechenden Experimentalmedien für 48 Stunden inkubiert. Die Experimentalmedien wurden abgenommen und Petris mit HEPES-Ringer bei 4 °C gewaschen. Zu den Zellen wurden HEPES-Ringer und 20

μM DCF-DA gegeben (20 mM DCF-DA-Stammlösung in DMSO herstellen) und im Anschluss die Platte sofort in Victor gestellt und der DCF-DA Zeitverlauf bei 37°C gemessen.

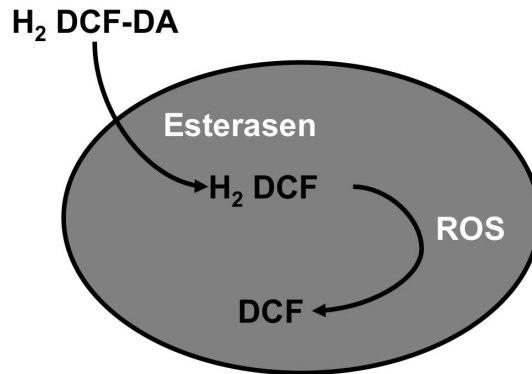


Abbildung 2.2 — Durch Hydrolyse von H₂-DCF-DA zu H₂-DCF und anschließender Oxydierung durch ROS entsteht das fluoreszierende DCF.

2.10 Bestimmung der Aktivierung von Signaltransduktionswegen mittels SEAP-Reporter-Gen-Assay

Materialien

- pEGFP (enhanced green fluorescent protein): Clontech, California, USA
- pXRE-SEAP (XRE-Secreted Alkaline Phosphatase): Clontech, California, USA
- QIAGEN Effectene-Reagenz: QIAGEN GmbH, Hilden, Germany
- MOPS/Triton-Lysepuffer: 20 mM MOPS = 3-(N-Morpholino)-Propan-sulfonsäure + 0,1% Triton-X-100 bei pH 7,4
- Secreted Alkaline Phosphatase Puffer (SEAP-Puffer): 60 mM L-Homoarginin, 3 mM MgCl₂, 0.2 mM ZnCl₂, 100 mM Tris-HCl (pH 9.3)
- AttoPhos-AP-Lösung: AttoPhos-Substrat mit AttoPhos-Puffer mischen (0.6 mg/ml)

Versuchsaufbau

Um das geeignete Konstrukt für die gewünschten Versuchsbedingungen zu erhalten, wurden die OK-Zellen mit den dementsprechenden Plasmiden transfiziert. Für die Transfektion wurde nach der Lipofektionsmethode QIAGEN Effectene-Reagenz entsprechend den Angaben des Herstellers vorgegangen. Dabei wurden folgende Plasmide verwendet: EGFP (enhanced green fluorescent protein) und ein Secreted alkaline phosphatase (SEAP)-XRE-Konstrukt mit dem jeweils entsprechenden responsiven Element (XRE, in unserem Fall: NF- κ B, AP-1, SRE, CRE) für einen Signalweg. In diesen Konstrukten ist am jeweiligen XRE die genetische Information für die sekretorische alkalische Phosphatase (SEAP) gekoppelt. Wird XRE aktiviert, kommt es zur vermehrten Transkription und Bildung dieser Phosphatase, die von den Zellen nach extrazellulär ins Medium abgegeben wird und deren Aktivität dort bestimmt werden kann. Dabei gilt: je stärker der Signalweg aktiviert wird, desto stärker wird auch das XRE-Element transaktiviert und desto größer ist die im Medium gemessene Aktivität der sekretorischen alkalischen Phosphatase. Die Aktivität der sekretorischen alkalischen Phosphatase wird hierbei mit Hilfe des AttoPhos-Systems von Promega bestimmt. Der Phosphatase wird ein geeignetes Substrat angeboten; nach dessen Verarbeitung kann seine Fluoreszenz (und somit die Aktivität der sekretorischen alkalischen Phosphatase) gemessen werden. Um den Erfolg der Transfektion abzuschätzen, wurde den Zellen EGFP als Kontrollplasmid zugegeben. Generell wurde wie folgt vorgegangen:

Die Zellen wurden in einer 24-Well-Schale angesät; nach 24 h wurden sie unter Benutzung von Minusmedium (kein FCS) transfiziert. Hierfür wurde ein Mastermix in sterilen Kryoröhrchen hergestellt aus $0,05 \mu\text{g}$ pXRE-SEAP ($x \mu\text{l}$) + $0,05 \mu\text{g}$ pEGF ($y \mu\text{l}$) + $10 \mu\text{l} - (x + y)$ Serum freies Medium sowie $1,5 \mu\text{l}$ Polyfect. Dieser wurde gut gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. In dieser Zeit wurden die Zellen einmalig mit Minusmedium gewaschen. Anschließend erfolgte eine 24-stündige Inkubation mit dem Mastermix, welcher mit Serum- und Substrat-freiem Medium auf $100 \mu\text{l}$ gestreckt wurde. Danach erfolgte die Inkubation mit den gewünschten Substanzen in Minusmedium. Nach weiteren 24 Stunden wurde das Medium von den Zellen abgenommen und die Zellen mit MOPS/Triton-Lysepuffer lysiert. Nach 30-minütiger

Inkubation wurden die Zellen abgekratzt, mit einer Pipette suspendiert und 10 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Mit dem Überstand wurde weitergearbeitet. Zur weiteren Aufbereitung der Probe wurden 60 μl der Probe mit 60 μl SEAP-Puffer für 30 min bei 65 °C inkubiert, um andere Proteine als die SEAP im Medium zu denaturieren. Anschließend wurde im Medium (100 μl) die Aktivität der sekretorischen alkalischen Phosphatase mittels Zugabe von AttoPhos-AP-Lösung (100 μl) als Substrat der alkalischen Phosphatase bestimmt. Es wurde die Fluoreszenzentwicklung über die Zeit gemessen (Anregung bei ca. 440 nm, Emission bei ca. 560 nm). Im Zelllysat wurde an einem Multiwell Counter (Victor2 Wallac) EGFP gemessen.

2.11 Statistik

Alle Berechnungen zur Auswertung der gewonnenen Daten wurden mit Microsoft Excel 97 bzw. 2000 durchgeführt. Die Graphen zu den Versuchen wurden mit Sigma Blot Software (Jandel Corte Madera, California, USA) erstellt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM (Standard Error of Means, mittlerer Fehler des Mittelwertes) angegeben. Die statistische Signifikanz der Ergebnisse wurde durch den einseitigen/zweiseitigen ungepaarten Student-t-Test geprüft, wobei die Ergebnisse ab einer Fehlerwahrscheinlichkeit von $p < 0.05$ als statistisch signifikant betrachtet wurden (im Graphen mit * gekennzeichnet). Die Anzahl der durchgeführten Versuche ist in jedem Graphen als n angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Albumin-induzierte Wachstumsvorgänge der proximalen Tubuluszellen des Opossums

Zu Beginn meiner Untersuchungen sollte die Frage geklärt werden, ob Albuminexposition das Wachstumsverhalten der proximalen Tubuluszellen des Opossums verändert. Für dieses Experiment wurden die Zellen für 48 Stunden mit bovinem Serumalbumin in den Konzentrationen 0,1, 1,0 und 10 g/l inkubiert. Anschließend wurde durch Messung mittels Coulter Counter Z2 Zellzahl und Zellvolumen und durch Messung mit der BCA Proteinbestimmungsmethode der Proteingehalt der Zellen ermittelt.

Eine Inkubation der OK-Zellen mit den unterschiedlichen BSA Konzentrationen führte – wie in Abb. 3.1 dargestellt - zu keiner ausgeprägten Änderung von Zellzahl, Zellvolumen oder Proteingehalt pro Zelle. Diese Versuchsergebnisse zeigen, dass eine Exposition der OK-Zellen gegenüber bovinem Serumalbumin keine wesentlichen Wachstumsveränderungen im Sinne einer Hyperplasie oder Hypertrophie zur Folge hat. Die im Verlauf zu beobachtenden Effekte sind also nicht auf eine Zunahme der Zellzahl oder des Proteingehalts der Zelle zurückzuführen.

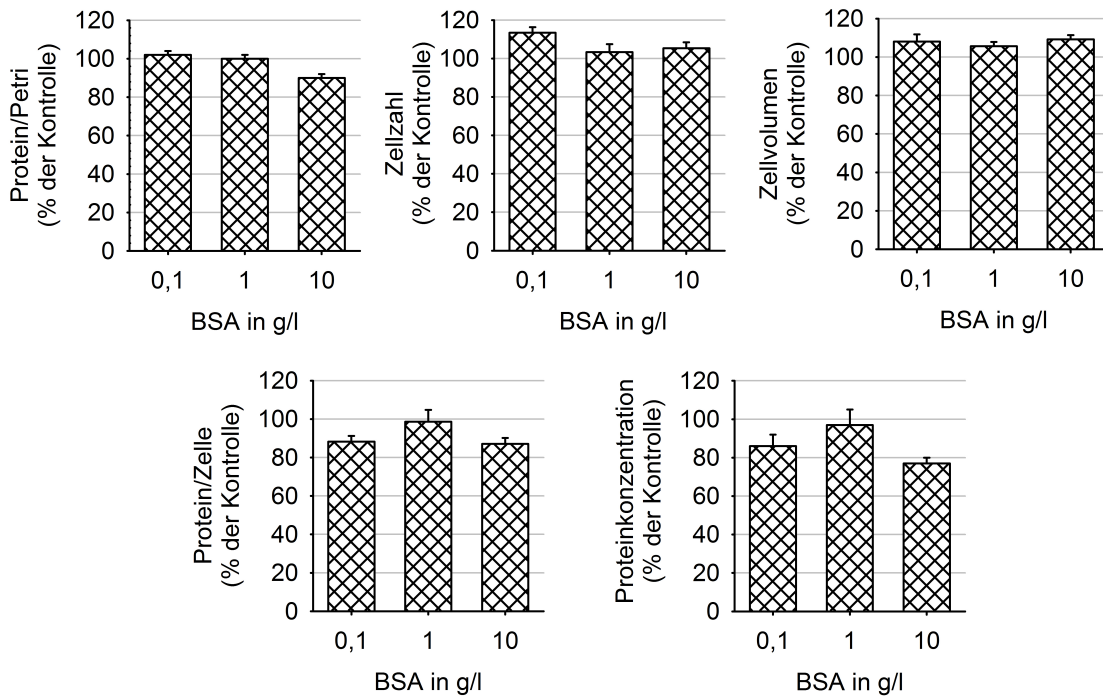


Abbildung 3.1 — BSA-induzierte Wachstumsveränderungen der OK-Zellen (obere Zeile: links Protein pro Petri, mittig Zellzahl, rechts Zellvolumen; untere Zeile: links Protein pro Zelle, rechts Proteinkonzentration). Ergebnisse jeweils dargestellt als Prozent der Kontrolle, wobei Kontrolle (Inkubation der Zellen mit MEM⁻) gleich 100 % gesetzt wurde. Inkubationsdauer 48 Stunden; n=12 (3 unterschiedliche Passagen).

3.2 Einfluss der Proteinurie auf die Kollagenhomöostase der OK-Zellen

3.2.1 Hintergrund: Kollagensynthese und Kollagen degradation

3.2.1.1 Kollagensynthese

Kollagen wird als Hauptstrukturprotein des Bindegewebes von unterschiedlichen, z. T. spezialisierten Zellen gebildet. Das charakteristische Merkmal aller Kollagentypen ist, dass zumindest ein Teil des Moleküls aus drei Polypeptidketten besteht, welche in Form einer rechtsgängigen Tripelhelix umeinander gewunden sind. Je-

de Polypeptidkette ist je nach Kollagentyp aus unterschiedlich vielen Aminosäuren zusammengesetzt. Die Primärstruktur setzt sich aus sich wiederholenden Gly-X-Y Untereinheiten zusammen. Jede dritte Position wird von der kleinsten Aminosäure Glycin eingenommen. Zwischen den Peptidketten werden Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet. Die X-Position wird häufig von Prolin eingenommen, welches an der Tripelhelixwindung und der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu Glycin mitverantwortlich ist. An der Y-Stelle steht oft Hydroxyprolin (Abb. 3.2).

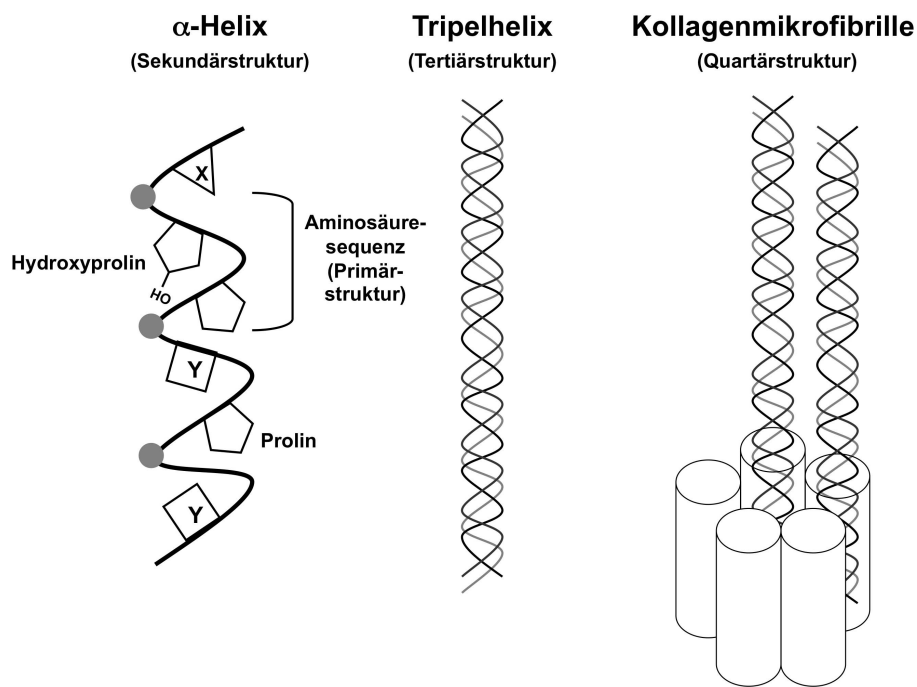


Abbildung 3.2 — Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur des Fibrillenkollagens modifiziert nach LÖFFLER and PETRIDES, 1997.

Die unterschiedlichen Polypeptidketten des Kollagens werden an den Ribosomen des rauhen endoplasmatischen Retikulums als sogenanntes Präprokollagen synthetisiert. Durch Abspaltung des Signalpeptids entsteht Prokollagen, das in den Golgi-Apparat aufgenommen wird. Hier findet die für die Tripelhelix-Ausbildung notwendige Hydroxylierung von Prolin zu Hydroxyprolin (wichtig für Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der Tripelhelix) und Lysin zu Hydroxylysin (wichtig für kovalente Quervernetzungen zwischen Kollagenmolekülen) statt. Hierfür ist die

Anwesenheit von Ascorbinsäure als Kofaktor von essentieller Bedeutung. Nur hydroxylierte Prokollagenmoleküle gelangen durch Sekretion ins Interstitium (LÖFFLER and PETRIDES, 1997). Im Extrazellulärraum spalten Prokollagenpeptidasen Propeptide am C- und N-terminalen Ende ab. So entsteht das Tropokollagen, welches sich im Falle von Kollagen Typ I zu Fibrillen zusammenlagert. Die Familie der Kollagene umfasst aktuell 26 biochemisch und strukturell unterschiedliche Kollagentypen (GELSE *et al.*, 2003). Zusätzlich sind ca. zehn weitere Proteine mit kollagenähnlicher Domäne zu verzeichnen.

3.2.1.2 Kollagenegradation

Der Kollagenabbau erfolgt über für die einzelnen Kollagentypen z.T. spezifische Kollagenasen. Da es sich bei diesen Enzymen um Zink abhängige Endopeptidasen handelt, werden sie auch als Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) bezeichnet. Sie sind aus einer N-terminalen Signalsequenz, einer Propeptid- und einer katalytischen Domäne aufgebaut. Die MMPs werden als inaktive Proenzyme in den Extrazellulärraum sezerniert. Ihre Aktivierung erfolgt durch Spaltung der Cystein-Zink-Verbindung im katalytischen Zentrum mit Ablösung der Propeptid-Domäne durch spezifische Proteinasen und nicht-proteolytische Agenzien wie z. B. quecksilberhaltige und denaturierende Stoffe sowie durch reaktive Sauerstoffspezies (VISSE and NAGASE, 2003). Die Inaktivierung erfolgt durch endogene Inhibitoren sog. Tissue Inhibitors of Matrixmetalloproteinasen (TIMPs). TIMPs sind spezifische Inhibitoren, welche MMPs in einer 1:1 Stöchiometrie binden. Bisher sind 4 TIMPs charakterisiert (VISSE and NAGASE, 2003). Die Regulation der MMP-Expression erfolgt auf verschiedenen Ebenen: Transkription, Aktivierung des latenten Zymogens (Pro-MMP), extrazelluläre Inhibition, Lokalisation inner- oder außerhalb der Zelle und Internalisierung durch Endozytose. Gross und Lapiere haben bereits 1962 erstmals ein Enzym beschrieben, welches in der Lage war, Kollagenfibrillen abzubauen (GROSS and LAPIERE, 1962). Bis dato sind 25 Vertreter bei Vertebraten nachgewiesen worden. Die Einteilung erfolgt nach Sekretion in den Extrazellulärraum (5 Strukturklassen) und membranständige MMPs (3 Strukturklassen). MMPs sind dafür bekannt, dass sie

die Aktivität vieler Zytokine und Wachstumsfaktoren regulieren (STERNLICHT and WERB, 2001; VISSE and NAGASE, 2003).

Ziel des ersten Teils meiner Arbeit war zu untersuchen, ob ein vermehrtes Angebot an Albumin zu einer veränderten Kollagenhomöostase der proximalen Tubuluszellen des Opossums führt. Mittels Kollagenase-sensitiven Prolininkorporationsassay wurde die Kollagensekretion der OK-Zellen nach einer vorgegebenen Inkubationsdauer mit den entsprechenden Experimentalmedien untersucht. Nachdem in der Literatur eine Veränderung der Kollagenproduktion nach ca. 20 Stunden beschrieben ist (AGELLI and WAHL, 1988; EICKELBERG *et al.*, 1999), wurde für die Versuche ein Inkubationszeitfenster von 24 und 48 Stunden ausgewählt. Bei den gewonnenen Ergebnissen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den unterschiedlichen Zeitfenstern, so dass sich die Versuchsergebnisse – falls nicht anders angegeben – auf eine 48-stündige Inkubation beziehen.

3.2.2 TGF- β_1 -induzierte Kollagensekretion der OK-Zellen

Als erstes wurde untersucht, ob die von uns ausgewählte Zelllinie auf einen typischen profibrotischen Stimulus (EDDY and GIACHELLI, 1995) - in unserem Fall TGF- β_1 in einer Konzentration von 3 $\mu\text{g}/\text{l}$ - positiv im Sinne einer vermehrten Kollagensekretion reagiert. YU *et al.*, 2003 hatten diesen Effekt bereits bei den epithelialen Tubuluszellen von Ratten nachgewiesen. Die Zellen wurden hierfür auf Filtern angesät und mit der gleichen TGF- β_1 Konzentration von 3 $\mu\text{g}/\text{l}$ apikal und basolateral für 24 Stunden inkubiert. Somit konnte eine zusätzliche Unterscheidung in apikale und basolaterale Kollagensekretion erfolgen.

Eine Inkubation der OK-Zellen mit TGF- β_1 führte zu einer signifikanten, präferentiell apikalen Zunahme der Kollagensekretion im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3.3). Das von uns gewählte Zellkulturmodell reagiert „adäquat“ im Sinne einer vermehrten Kollagensekretion auf einen typischen profibrotischen Stimulus.

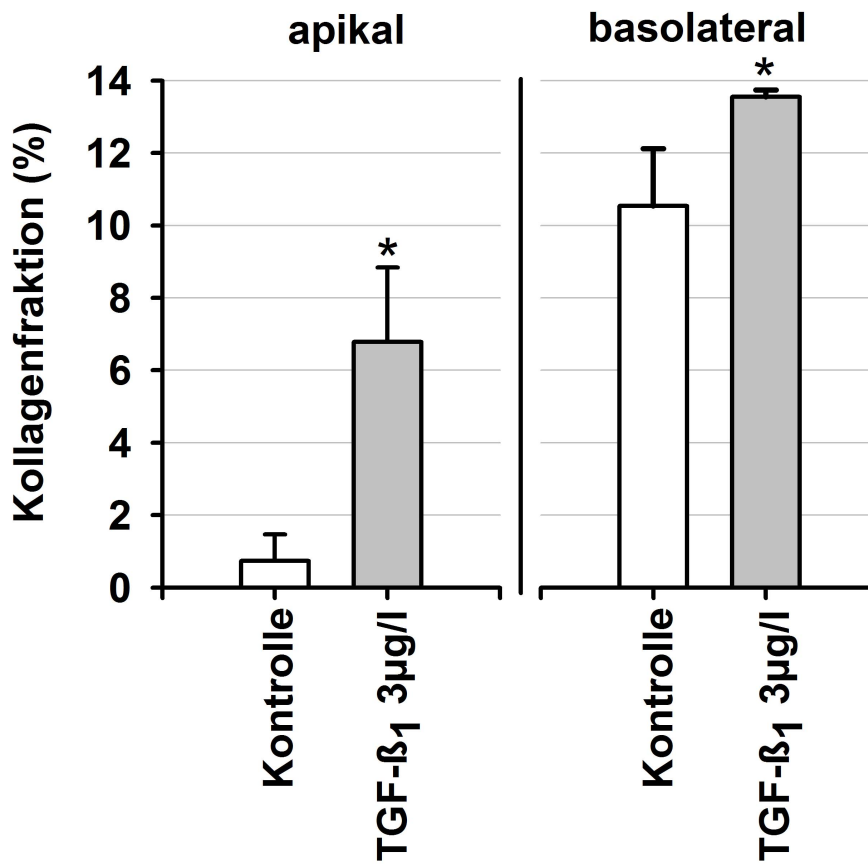


Abbildung 3.3 — TGF-β₁-induzierte Kollagenfraktion apikal – basolateral im Vergleich zur Kontrolle (Inkubation mit MEM⁻). Kollagenfraktion: Anteil des gesamtsezernierten Kollagens am gesamtsezernierten Protein. Inkubationsdauer 48 h. n=3 (1 Passage); * P<0,05 versus Kontrolle.

3.2.3 Albumin-induzierte Kollagensekretion der OK-Zellen

Als nächstes erfolgte die Inkubation mit bovinem Serumalbumin in unterschiedlichen – pathophysiologisch relevanten – Konzentrationen. Nach Inkubation der OK-Zellen mit steigenden BSA-Konzentrationen beobachtete man eine signifikante Zunahme von gesamtsezernierten Protein und gesamtsezernierten Kollagen im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3.4). Indem das gesamtsezernierte Kollagen auf das gesamtsezernierte Protein bezogen wurde (siehe Inlet), konnte gezeigt werden, dass die BSA-Exposition zu einer präferentiellen Zunahme der Kollagensekretion führte. Bereits bei einer Albuminkonzentration von 100 mg/l war eine signifikante Zunahme der Kollagenfraktion im Vergleich zur Kontrolle zu verzeichnen.

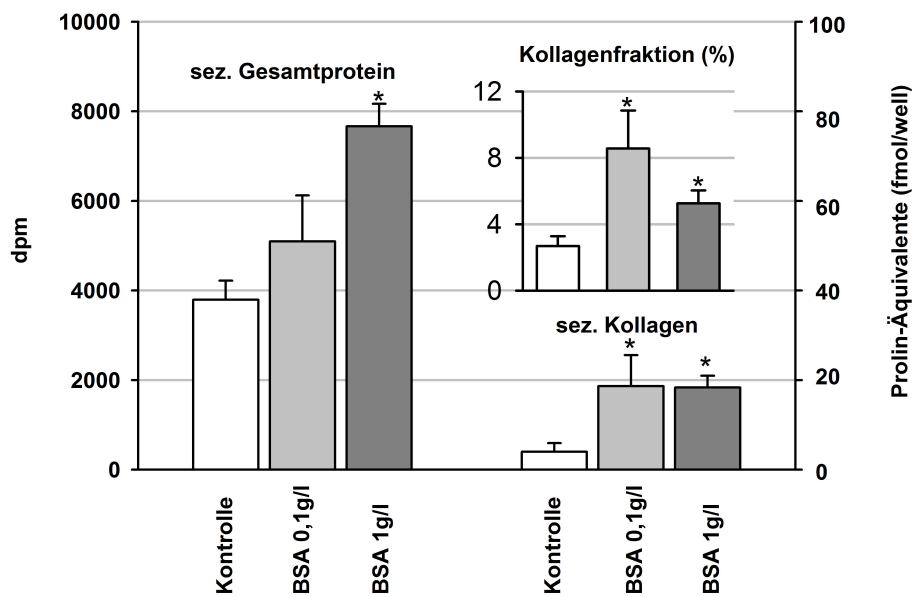


Abbildung 3.4 — Links: BSA-induziertes gesamtsezerniertes Protein, rechts BSA-induziertes gesamtsezerniertes Kollagen als desintegrations per minute (linke Y-Achse) bzw. als Prolin-Äquivalente fmol/well (rechte Y-Achse); Inlet: Albumin-induzierte Kollagenfraktion in Prozent: $\text{Kollagen \%} = \frac{C/P}{[5.4 \times (1 - C/P)] + (C/P)} \times 100$; C: Kollagenase-assoziierte Aktivität im Medium; P: Kollagenase-insensitive Aktivität im Medium. Inkubationsdauer 48 Stunden; n= 15 (5 unterschiedliche Passagen). * $P < 0,05$ versus Kontrolle.

3.2.4 Rolle der freien Fettsäuren bei der Albumin-induzierten Kollagensekretion

Albumin als bekanntes Transportprotein besitzt Bindungsstellen für freie Fettsäuren und fungiert somit als Lipoprotein. Freie Fettsäuren (lysophosphatitic acid) weisen durch Produktion von lipid chemoattractant factor Wachstumsfaktor-ähnliche Eigenschaften auf (HAMILTON *et al.*, 1991; THOMAS and SCHREINER, 1993; DIXON and BRUNSKILL, 1999b; THOMAS *et al.*, 2002; ARICI *et al.*, 2002). Um den Einfluss der freien Fettsäuren auf die Kollagensekretion zu untersuchen, erfolgte der gleiche Versuchsaufbau mit analogen FAF-BSA Konzentrationen.

Wie in Abb. 3.5 dargestellt, zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der fatty acid free und der nicht-fatty acid free Albumin-induzierten Kollagensekretion.

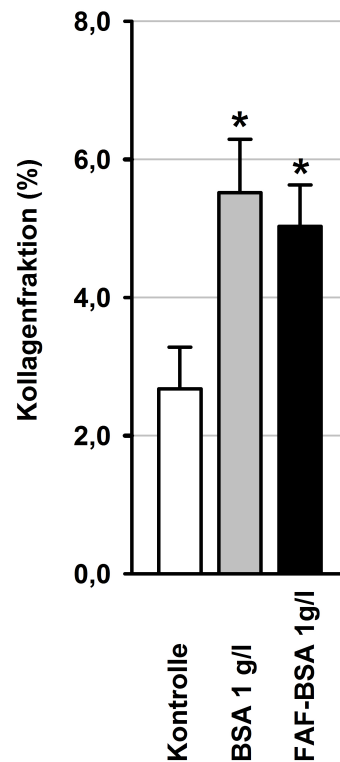


Abbildung 3.5 — Vergleich BSA- und FAF-BSA-induzierte Kollagenfraktion (%) mittels Kollagenase-sensitiven Prolininkorporationsassay. Kollagenfraktion: Anteil des gesamtsezernierten Kollagens am gesamtsezernierten Protein. Inkubationsdauer 48 Stunden. n=3 (1 Passage). * P<0,05 versus Kontrolle.

3.2.5 Bestimmung pathophysiologisch relevanter Kollagentypen

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass Albuminexposition zu einer vermehrten Kollagensekretion führt, stellte sich als nächstes die Frage, welcher Typ von Kollagen sezerniert wird. Wie bei Alexakis et al. aufgezeigt, ändert sich die Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix unter pathophysiologischen Bedingungen (ALEXAKIS *et al.*, 2006). Dabei kommt es zu einer Zunahme von Kollagen Typ I, III und IV (SOY-LEMEZOGLU *et al.*, 1997). Im Frühstadium der diabetischen Nephropathie sind vor allem Kollagen Typ IV, Fibronektin und Laminin im Bereich der glomerulären Basalmembran und im Mesangium erhöht (IHM *et al.*, 1992; PARK *et al.*, 1997). Im späteren Stadium sind vor allem fibrilläres und interstitielles Kollagen Typ I und III

sowie V und VI nachzuweisen (MAKINO *et al.*, 1994; GILBERT *et al.*, 1998; ROSSERT *et al.*, 2000). Mittels Kollagen-ELISA wurde der Überstand der mit unterschiedlicher Albuminkonzentration inkubierten OK-Zellen auf die pathophysiologisch relevanten Kollagentypen I, III und IV mit entsprechenden Kollagen Antikörpern vom Kaninchen untersucht.

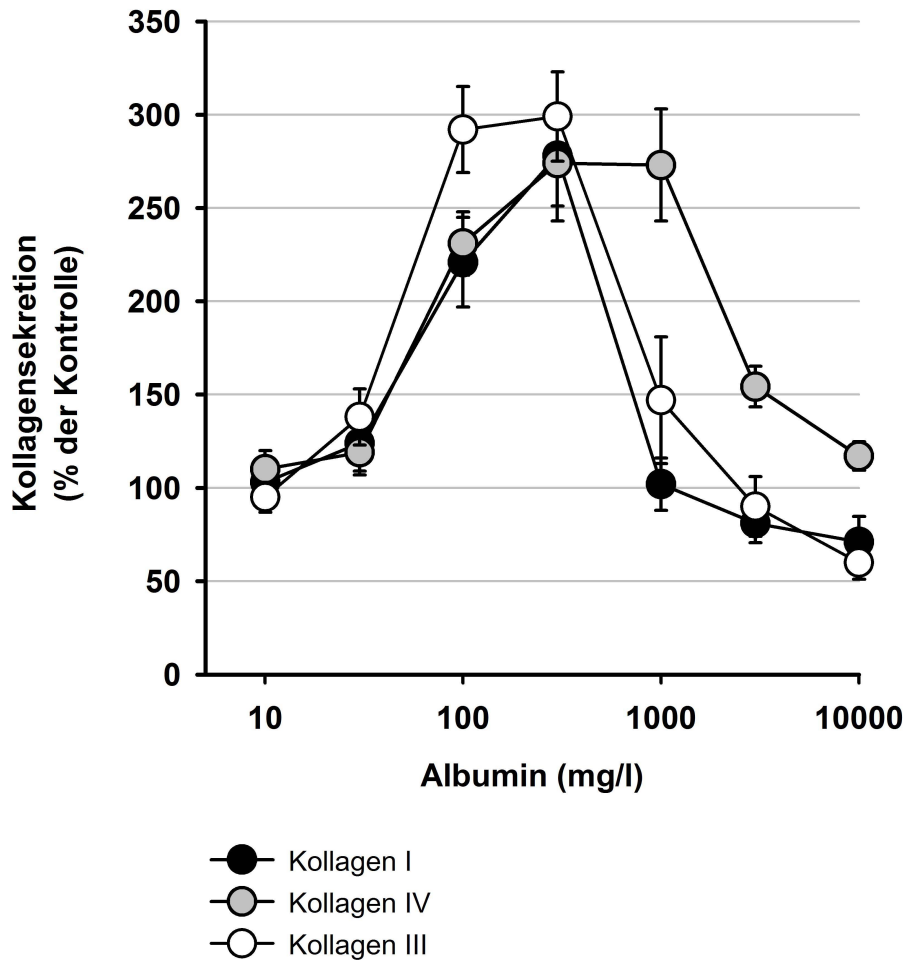


Abbildung 3.6 — BSA-induzierte Kollagen Typ I, III, IV Sekretion. Ergebnis dargestellt als % der Kontrolle, wobei Kontrolle (Inkubation mit MEM⁻) gleich 100 % gesetzt wurde. Inkubationsdauer 48 Stunden, n=12 (3 unterschiedliche Passagen).

Albuminexposition führte – wie in Abb. 3.6 gezeigt - bei einer BSA-Konzentration von 100 mg/l zu einem signifikanten Anstieg von sezerniertem Kollagen Typ I, III und IV. Bei einer Konzentration von 1000 mg/l BSA zeigte sich bei Typ III und IV noch immer eine signifikante Erhöhung der Kollagensekretion im Vergleich zur

Kontrolle, jedoch im Vergleich zur Konzentration von 100 mg/l BSA stellte sich bereits ein Rückgang der Kollagensekretion dar. Kollagen Typ I war im Vergleich zur Kontrolle bei einer BSA Konzentration von 1000 mg/l nicht signifikant zum Ausgangswert verändert. Eine Exposition gegenüber BSA 10000 mg/l reduzierte die Kollagensekretion von Typ I und III sogar unter den Ausgangswert. Für alle getesteten Kollagentypen bestand ein Konzentrations-abhängiger biphasischer Verlauf der Albumin-inudzierten Kollagensekretion.

3.2.6 Albumin-induzierte Kollagensynthese

Bisher konnte gezeigt werden, dass Albuminexposition zu einer Zunahme von Kollagen Typ I, III und IV im Medium führt. Als nächstes sollte untersucht werden, ob dieser Effekt auf eine vermehrte Kollagensynthese zurückzuführen ist. Hierfür wurden die OK-Zellen mit den entsprechenden Albuminkonzentrationen für 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurde aus dem Zellysate ein Western Blot gegen Kollagen Typ I, III und IV durchgeführt. In Abb. 3.7 (links) sind Ausschnitte aus Original Western Blots gegen Kollagen Typ I, III und IV abgebildet.

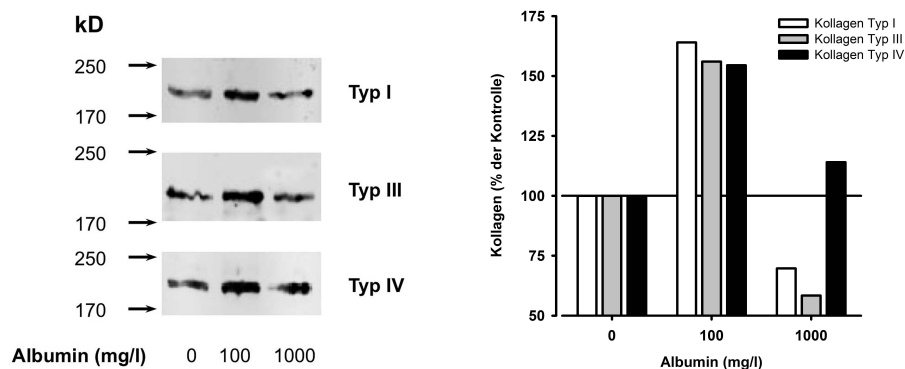


Abbildung 3.7 — Links: Ausschnitt aus Original Kollagen-Westernblots (Grössenbereich zwischen 170-250 kD); BSA-induzierte Kollagensynthese Typ I, III, IV aus Zellysaten der OK-Zellen. Inkubationsdauer 48 Stunden. Rechts: Graphische Darstellung der densitometrischen Ausmessung der Westernblotbanden mittels Sigma Gel. Dargestellt als Prozent der Kontrolle, wobei Kontrolle (Inkubation mit MEM⁻) als 100 % gesetzt wurde.

Bei einer Albuminkonzentration von 100 mg/l kam es für alle untersuchten Kollagentypen im Vergleich zur Kontrolle zu einer Verstärkung der Banden. Bei einer

Albuminkonzentration von 1000 mg/l erschienen die Banden von Typ I und III Kollagen schwächer als die Kontrollbanden. Eine densitometrische Auswertung mittels Sigma Gel bestätigte die visuellen Werte (Abb. 3.7 rechts). Albuminexposition führt zu einer vermehrten Synthese von Kollagen Typ I, III und IV. Ebenso wie bei der Kollagensekretion zeigte sich auch hier ein biphasischer Verlauf.

3.2.7 Albumin-induzierter Kollagenabbau

Bisher konnte nachgewiesen werden, dass Albuminexposition zu einer präferentiellen Zunahme der Kollagensekretion (Typ I, III, IV) durch eine vermehrte Kollagensynthese (Typ I, III, IV) führt. Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Vermehrung des sezernierten Kollagens ebenso auf einen verminderten Abbau zurückzuführen ist.

3.2.7.1 Semiquantitative Bestimmung der Kollagenaseaktivität mittels Zymographie

Um eine Aussage über den Albumin-induzierten Kollagenabbau machen zu können, wurde eine Zymographie aus dem Überstand der mit BSA-inkubierten OK-Zellen durchgeführt.

In Abb. 3.8 ist eine Originalzymographie dargestellt. Nach der Färbung mit Coomassie-Blue mit anschließendem Destain zeichneten sich zwei Banden unterschiedlicher Molekülgröße ab. Mittels eines mitlaufenden Proteinstandards zeigte sich für die nicht angefärbten Banden eine Molekülgröße von ca. 90 und 70 kD. In der Literatur liegt die Molekülgröße für die Matrixmetalloproteinase 2 (sog. Gelatinase A) bei ca. 72 kD, für die Matrixmetalloproteinase 9 (sog. Gelatinase B) bei ca. 95 kD. Unter steigender BSA-Konzentration kam es zu einer Abnahme der Bandenintensität sowohl für Gelatinase A als auch für Gelatinase B. Um eine quantitative Aussage über die Albumin-induzierte MMP-Aktivität (Gelatinaseaktivität) im Medium treffen zu können, erfolgte die Durchführung eines Gelatinase-Assays.

Zymographie

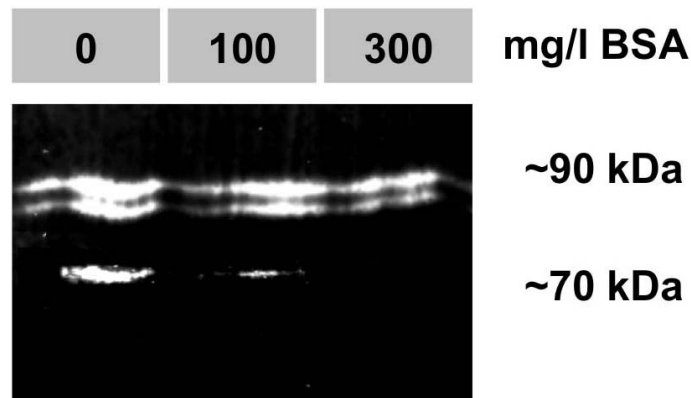


Abbildung 3.8 — Ausschnitt aus Originalzymographie mit Gelatine Gel 0.1 %, Coomassiefärbung. Darstellung der Kollagenaseaktivität nach Inkubation mit unterschiedlichen BSA Konzentrationen. Gelatinase A (= MMP2): Molekülgrösse von ca. 70 kD; Gelatinase B (= MMP9): Molekülgrösse von ca. 90 kD.

3.2.7.2 Quantitative Bestimmung der Kollagenaseaktivität mittels Gelatinaseassay

Um eine quantitative Aussage über die Albumin-induzierte MMP-Aktivität (Gelatinaseaktivität) im Medium treffen zu können, erfolgte die Durchführung eines Gelatinase-Assays. In Abb. 3.9 ist ein Gelatinaseassay im Originalverlauf als Fluoreszenzmessung über die Zeit aufgezeigt.

Eine Exposition der OK-Zellen gegenüber einer Albuminkonzentration von 1000 mg/l führte zu einer signifikanten Abnahme der Gelatinaseaktivität (Abb. 3.10, angegeben als Steigung im linearen Bereich).

Eine direkte Applikation von Albumin zu den Experimentalmedien zeigte keine Veränderung der zuvor gewonnenen Ergebnisse. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Albuminexposition zu einer gestörten Kollagenhomöostase im Sinne einer vermehrten Kollagensynthese und eines verminderten Kollagenabbaus führt.

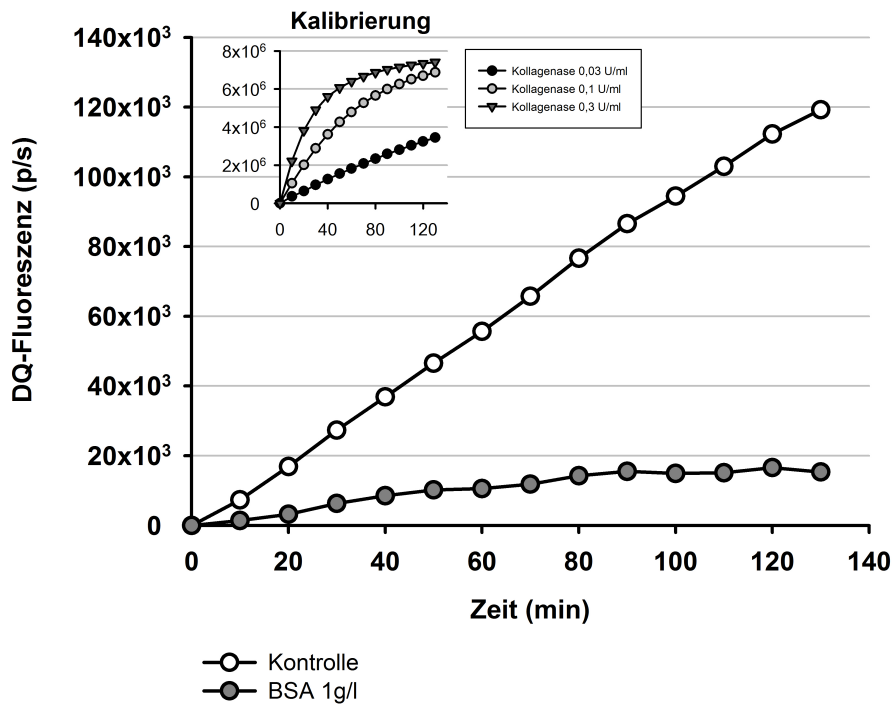


Abbildung 3.9 — Originalverlauf eines Gelatinaseassays aus dem Überstand der für 48 Stunden mit MEM⁻ und BSA (1g/l) inkubierten OK-Zellen. Dargestellt als DQ-Fluoreszenzmessung in Photonen pro Sekunde (p/s) über die Zeit in Minuten (min).

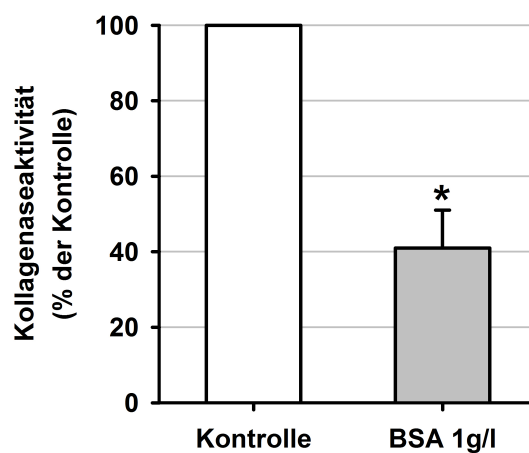


Abbildung 3.10 — Kollagenaseaktivität im Medium der OK-Zellen nach 48 stündiger Inkubation mit BSA (1 g/l). Dargestellt als Prozent der Kontrolle, wobei Kontrolle (Inkubation mit MEM⁻) gleich 100 % gesetzt wurde. n=12 (3 unterschiedliche Passagen). * P<0,05 versus Kontrolle.

3.3 Signaltransduktion der Albumin-induzierten Kollagensekretion

3.3.1 Pharmakologische Hemmung der Albumin-induzierten Kollagensekretion

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein vermehrtes Angebot von Albumin zu einer gestörten Kollagenhomöostase der proximalen Tubuluszellen des Opossums führt. Als nächstes sollte die Frage untersucht werden, über welche Signaltransduktionswege die beobachteten Effekte vermittelt werden. In der Literatur kommt der Proteinkinase A und C sowie den MAP-Kinasen eine zentrale Rolle im Rahmen inflammatorischer und fibrotischer Umbauvorgänge zu. Mittels zur Verfügung stehender pharmakologischer Inhibitoren wurde der Beitrag der einzelnen Signaltransduktionswege an der Albumin-induzierten Kollagensekretion anhand eines Kollagen-ELISA untersucht. H89 wurde als Inhibitor der Proteinkinase A, U0126 als spezifischer Inhibitor des MAP-Kinase Weges ERK 1/2, BIM als Inhibitor der Proteinkinase C und PDTC für die Hemmung der NF- κ B Aktivierung gewählt.

Inhibierung der Proteinkinase C mittels BIM, der NF- κ B Aktivierung mittels PDTC und der Proteinkinase A mittels H89 reduzierte die Albumin-induzierte Kollagensekretion (BSA 100 mg/l) von Typ I, III und IV signifikant (Abb. 3.11). Eine Inkubation mit den einzelnen Inhibitoren selbst zeigte keinen Effekt im Vergleich zur Kontrolle (hier nicht dargestellt). Hemmung der ERK1/2-Aktivierung mittels U0126 führte überraschenderweise zu einer überproportionalen Zunahme der Typ I Kollagen Sekretion.

3.3.2 Pharmakologische Hemmung der Wirkung von Albumin auf die Kollagenaseaktivität

Bereits zuvor konnte eine Reduktion der Gelatinaseaktivität durch eine Exposition der Zellen gegenüber Albumin nachgewiesen werden. Jetzt sollte durch pharmako-

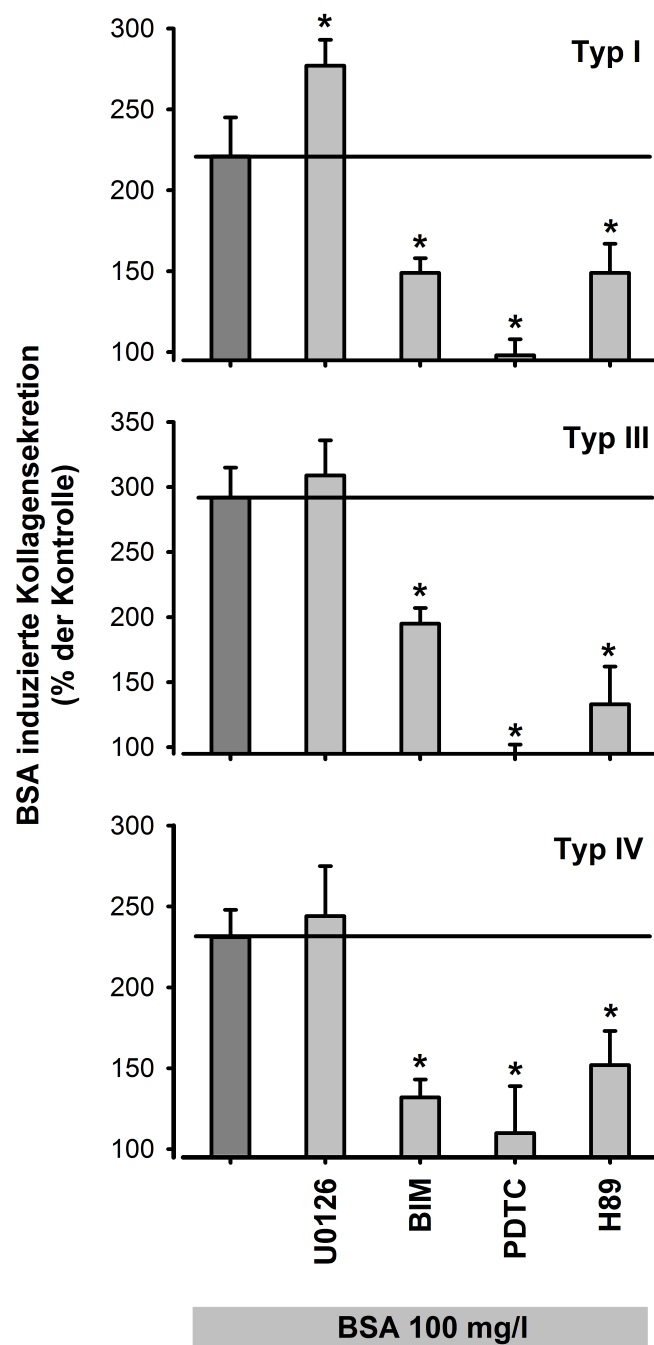


Abbildung 3.11 — BSA-induzierte Kollagen Typ I, III, IV Sekretion in Anwesenheit von verschiedenen pharmakologischen Inhibitoren: ERK1/2 Aktivierungshemmer U 0126 (10 μ mol/l), PKC Hemmer BIM (100 nmol/l), NF- κ B Aktivierungshemmer PDTC (100 μ mol/l), PKA-Hemmer H 89 (5 μ mol/l). Dargestellt als Prozent der Kontrolle, wobei Kontrolle (Inkubation mit MEM⁻) gleich 100 % gesetzt wurde. n=6-9 (2-3 unterschiedliche Passagen). * P<0,05 versus alleinige BSA-Inkubation.

logische Aktivierung und Hemmung eine mögliche Beteiligung der Proteinkinase C an dem durch Albumin vermittelten Effekt untersucht werden.

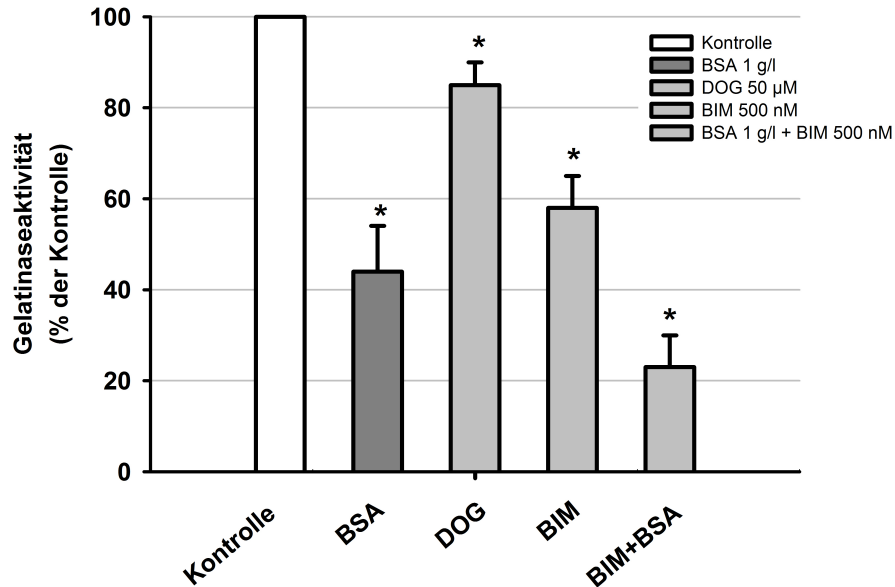


Abbildung 3.12 — Gelatinaseaktivität aus dem Medium der OK-Zellen nach 48 stündiger Inkubation mit BSA (1 g/l), PKC-Aktivator DOG (50 μ M), PKC-Hemmer BIM (500 nM), BSA (1 g/l) + BIM (500 nM). Dargestellt als % der Kontrolle, wobei Kontrolle (Inkubation mit MEM⁻) gleich 100 % gesetzt wurde. n=4 (1 Passage). * P<0,05 versus Kontrolle.

Abb. 3.12 zeigt, dass eine Inkubation mit BIM alleine bereits einen signifikanten Eigeneffekt mit Reduktion der Gelatinaseaktivität aufwies. Die Hemmung der Proteinkinase C mittels BIM konnte den BSA-vermittelten Effekt der reduzierten Gelatinaseaktivität nicht vermindern. Somit ist die Hypothese, dass Albumin die Gelatinaseaktivität durch Aktivierung von Proteinkinase C vermindert, falsifiziert. Eine Aktivierung der Proteinkinase C mittels 1,2-Dioctanoyl-glycerol (DOG) 50 μ M führte zu keiner Zunahme der Gelatinaseaktivität.

3.3.3 Albumin-induzierte Aktivierung von Signaltransduktionswegen

Die für eine veränderte Extrazellulärmatrix verantwortlichen „profibrotischen“ Gene (z. B. Gene für Kollagen, TIMP, TGF- β) werden u. a. durch die im Folgenden kurz charakterisierten Transkriptionsfaktoren induziert.

3.3.3.1 NF- κ B

Der Transkriptionsfaktor nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B-Cells (NF- κ B) kommt praktisch ubiquitär in allen Zellen vor. Er induziert durch Bindung an ein entsprechendes Responsives Element die Transkription entsprechender Zielgene. Der NF- κ B setzt sich aus zwei von insgesamt 7 existierenden Untereinheiten zusammen und liegt in den meisten Fällen inaktiv an das inhibitorische κ -B Protein (I- κ B) gebunden im Zytosol vor. Phosphorylierung von I- κ B führt zur Dissoziation des I- κ B/NF- κ B-Komplexes und Verlagerung von NF- κ B in den Zellkern. Dort bindet es an spezifische DNA-Sequenzen in den Promotorregionen der Zielgene und führt auf diese Weise zur gesteigerten Transkription derselben. Die Aktivierung von NF- κ B erfolgt über Wachstumsfaktoren, Zytokine, bakterielle und virale Antigene sowie chemische und physikalische Noxen. Charakteristisch für den NF- κ B Weg ist die schnelle – innerhalb weniger Minuten stattfindende – Aktivierung, die darauf zurückzuführen ist, dass NF- κ B bereits funktionsfähig im Zytoplasma vorliegt und nur noch von seinem inhibitorischen Protein gelöst werden muss (LÖFFLER and PETRIDES, 1997).

Eine Exposition der OK-Zellen gegenüber BSA führte zu einem signifikanten Anstieg der NF- κ B-SEAP Aktivität (Abb. 3.13). Ein ähnlicher Effekt konnte für FAF-BSA nachgewiesen werden. Eine Inkubation mit dem Polysaccharid Dextran zeigte keinen Effekt. Diese Daten belegen, dass Albumin den NF- κ B-Signalweg stimuliert. Durch direkte Hemmung der NF- κ B Aktivierung mittels dem Antioxidanz Pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) in einer Konzentration von 100 μ mol/l wurde die Albumin induzierte NF- κ B-Aktivierung signifikant reduziert. PDTC alleine zeigte keinen Effekt. Um die der NF- κ B Aktivierung vorgeschalteten Signalwege zu

untersuchen, erfolgte die pharmakologische Hemmung der Proteinkinase A und C. Als Ergebnis zeigte sich, dass pharmakologische Hemmung der Proteinkinase C mittels BIM in einer Konzentration von 100 nmol/l zu einer signifikanten Reduktion der BSA-induzierten NF- κ B Aktivierung führte, wobei BIM alleine keinen Eigeneffekt hatte. Hemmung der Proteinkinase A mit H89 in einer Dosierung von 5 μ mol/l beeinträchtigte die Albumin-induzierte NF- κ B-Aktivierung nicht.

3.3.3.2 Activator-Protein 1 (AP-1)

Wurde anstelle des NF- κ B Responsiven Elements Aktivator Protein 1 (AP-1) eingesetzt, zeigte sich eine signifikante Aktivierung der SEAP nach Albumininkubation (Abb. 3.14). Auch hier führte BIM zu einem signifikanten Rückgang der Albumin-induzierten AP-1 Aktivierung, mit H89 zeigte sich kein Effekt.

Im Verlauf wurde der SEAP Reporter Genassay noch unter Verwendung von SRE und CRE als Responsives Element durchgeführt. Die Aktivierung von SRE erfolgt über ERK1/2 Aktivierung, die von CRE über die Proteinkinase A. Wie in Abb. 3.15 gezeigt, konnte sowohl für SRE als auch für CRE eine Albumin-induzierte Aktivierung nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse lassen folgende Schlussfolgerung zu: Albuminexposition führt zu einer Aktivierung des NF- κ B, AP-1, SRE und CRE Signaltransduktionsweges. Dabei scheint die Proteinkinase C der NF- κ B- und AP-1-Aktivierung vorausgeschaltet zu sein, da Hemmung der PKC mittels BIM die Albumin-induzierte NF- κ B und AP-1 Aktivierung signifikant reduzieren konnte.

3.3.3.3 Reactive Oxygen Species als Second Messenger

Neben den geläufigen Signaltransduktionswegen sind in den letzten Jahren vermehrt die Reactive Oxygen Species (ROS) als Second Messenger in den Mittelpunkt der Untersuchungen gerückt. ROS entstehen nicht nur als toxisches Nebenprodukt im oxidativen Stoffwechsel, sondern fungieren in vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen als Intermediärprodukt oder Botenstoffe in den einzelnen Signaltransduktionskaskaden (DRÖGE, 2002). ROS können intra- oder extrazellulär entstehen, wobei verschiedene Enzymsysteme an der Entstehung der ROS beteiligt

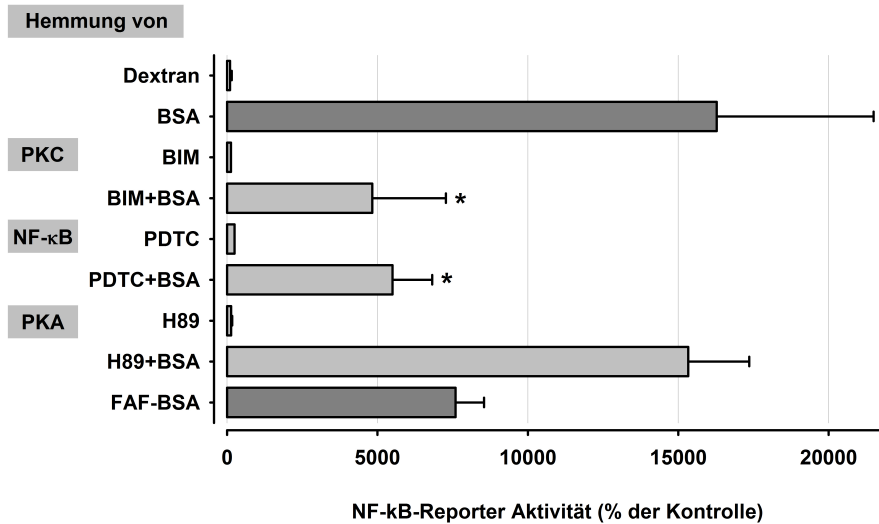


Abbildung 3.13 — NF- κ B Reporter Aktivität der OK-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit verschiedenen Experimentalmedien: Dextran (0,1 g/l), BSA (0,1 g/l), BIM (100 nmol/l), PDTC (100 μ mol/l), H89 (5 μ mol/l), FAF-BSA (0,1 g/l). Dargestellt als Prozent der Kontrolle, wobei Kontrolle (Inkubation mit MEM⁻) gleich 100 % gesetzt wurde. n=9 (3 unterschiedliche Passagen). * P<0,05 versus BSA alleine.

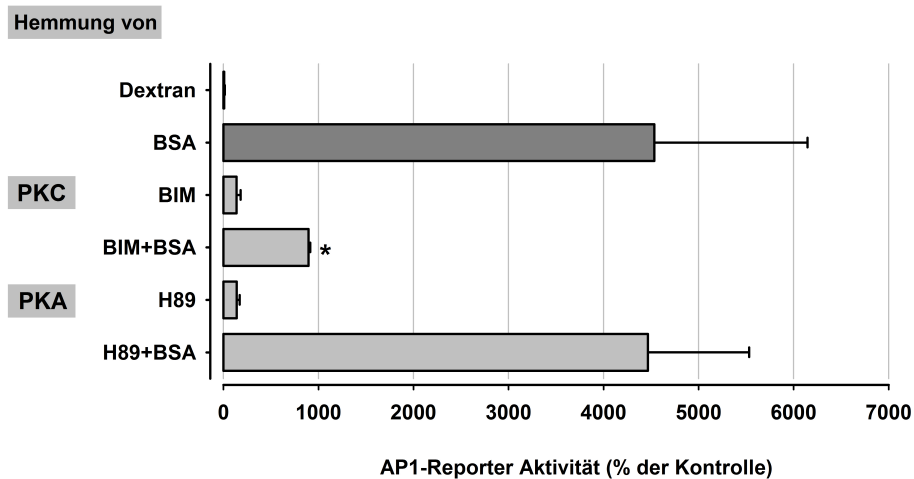


Abbildung 3.14 — AP-1 Reporter Aktivität der OK-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit verschiedenen Experimentalmedien: Dextran (0,1 g/l), BSA (0,1 g/l), BIM (100 nmol/l), H89 (5 μ mol/l). Dargestellt als Prozent der Kontrolle, wobei Kontrolle (Inkubation mit MEM⁻) gleich 100 % gesetzt wurde. n=6 (2 unterschiedliche Passagen). * P<0,05 versus BSA alleine.

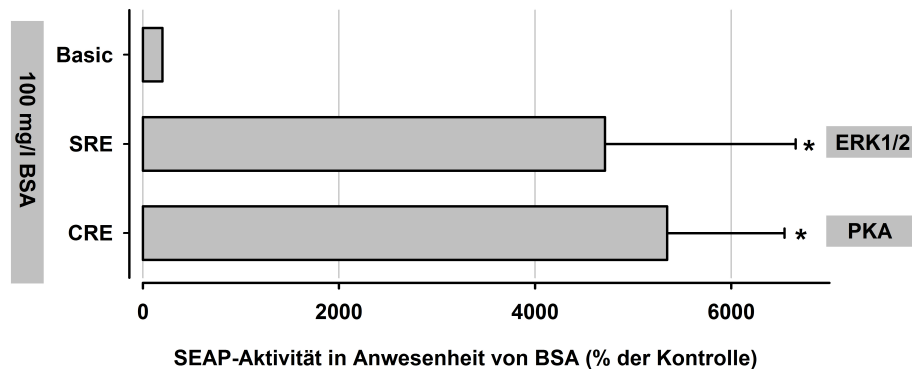


Abbildung 3.15 — Darstellung der SEAP Aktivität für SRE und CRE als Responsives Element nach 24-stündiger Inkubation der OK-Zellen mit BSA (0,1 g/l). Basic: Reporter Plasmid ohne Verwendung eines enhancer elements. Dargestellt als Prozent der Kontrolle, wobei Kontrolle (Inkubation mit MEM⁻) gleich 100 % gesetzt wurde. n=6 (2 unterschiedliche Passagen). * P<0,05 versus Kontrolle.

sind: Enzyme der mitochondrialen Atmungskette, Xanthinoxidasen, NO-Synthase, P450 Monooxygenase und NADPH Oxidase. Die Konzentration in der Zelle wird durch Bildung und Abbau der ROS bestimmt, wobei die Homöostase eine entscheidende Rolle für den physiologischen Ablauf in der Zelle spielt (DRÖGE, 2002). Immer wieder wird die bedeutende Rolle der ROS beim akuten und chronischen Nierenversagen hervorgehoben. So konnte z. B. de la Cruz *et al.* zeigen, dass Wasserstoffperoxid (H₂O₂) die extrazelluläre Matrix-Synthese in kultivierten, humanen mesangialen Zellen erhöht (IGLESIAS-DE LA CRUZ *et al.*, 2001). Im nächsten Versuchsschritt sollte anhand des DCF-DA Assays (2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetate) untersucht werden, ob eine Inkubation der OK-Zellen mit bovinem Serumalbumin zu einer vermehrten H₂O₂-Produktion führt. In Abb. 3.16 ist ein Original-DCF-DA Verlauf als Fluoreszenz über die Zeit aufgetragen. Albumin führte im Vergleich zur Kontrolle zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der intrazellulären H₂O₂ Produktion. Abb. 3.17 zeigt eine Zusammenfassung mehrerer DCF-DA Einzelversuche. Auch bei der Inkubation mit FAF-BSA kam es zu einem Trend der dosisabhängigen Abnahme der H₂O₂ Produktion (siehe Abb. 3.17). Dextran zeigte keinen signifikanten Effekt. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die

Albumin-induzierte Kollagensekretion nicht auf eine vermehrte H_2O_2 Produktion zurückzuführen ist.

3.4 Zentrale Rolle der Albuminendozytose bei der Albumin-induzierten Kollagensekretion

Bisher konnte nachgewiesen werden, dass die Albuminexposition über unterschiedliche Signaltransduktionswege zu einer veränderten Kollagenhomöostase der proximalen Tubuluszellen des Opossums führt. Als nächstes sollte untersucht werden, ob für die beobachteten Effekte die Aufnahme von Albumin in die Zelle notwendig ist.

3.4.1 Albumin-induzierte Kollagensekretion bei Zellen unterschiedlicher endozytotischer Aktivität

Zunächst wurden Zellen unterschiedlicher endozytotischer Aktivität mit Albumin inkubiert und anschließend mittels Kollagen-ELISA die Albumin-induzierte Kollagensekretion bestimmt. Die einzelnen Zelllinien wurden ausführlich in Material und Methoden charakterisiert. Neben den OK-Wildtyp Zellen exprimieren auch die LLC-PK₁-Zellen die Endozytoserezeptoren Cubilin und Megalin. Beide Zelltypen weisen - wie Mikropunktionsstudien gezeigt haben - Endozytoseaktivitäten ähnlich den in vivo Bedingungen auf. NHE3-defiziente Zellen besitzen - wie bei Gekle et al. ausführlich beschrieben - eine im Vergleich zu OK-Wildtyp Zellen dramatisch reduzierte Endozytoseleistung (GEKLE *et al.*, 2002). IHKE1- und MDCK-Zellen exprimieren Cubilin und Megalin nicht.

In Abb. 3.18 wurde die Albumin-induzierte Kollagensekretion von Zelllinien mit hoher endozytotischer Aktivität (OK-Zellen, LLC-PK Zellen) versus Zelllinien mit niedriger endozytotischer Aktivität (NHE3-defiziente OK-Zellen, MDCK Zellen, IHKE1 Zellen) verglichen. Eine 48-stündige Albuminexposition mit 100 mg/l führte bei OK- und LLC-PK₁-Zellen zu einer signifikanten Zunahme der Kollagensekretion von Typ I, III und IV. Bei den Zelllinien mit niedriger endozytotischen Aktivität - NHE3-defiziente OK-Zellen, MDCK- und IHKE1- Zellen - wurde nach Albuminin-

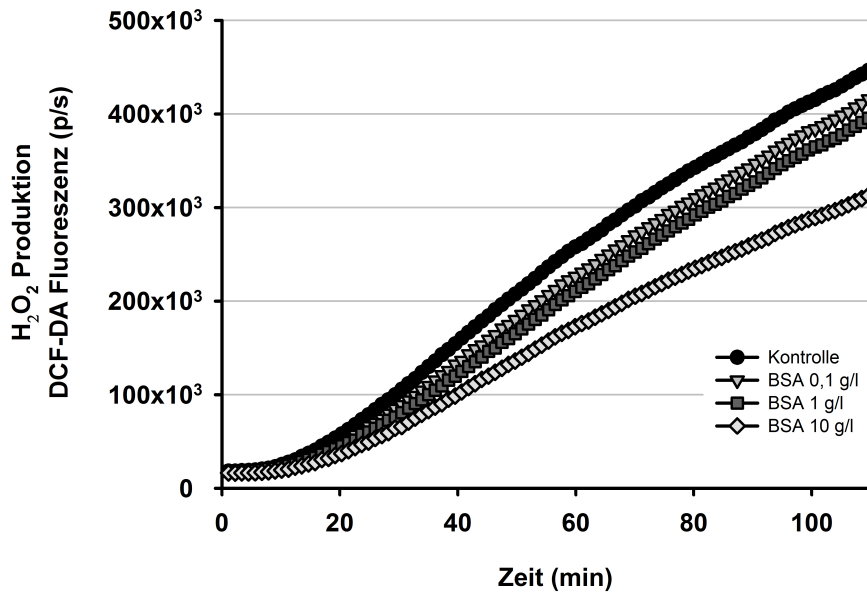


Abbildung 3.16 — Originalverlauf eines DCF-DA Fluoreszenzassays aus dem Überstand der für 48 Stunden mit MEM⁻ und unterschiedlichen BSA-Konzentrationen inkubierten OK-Zellen. Dargestellt als DCF-DA Fluoreszenzmessung in Photonen pro Sekunde (p/s) über die Zeit in Minuten (min).

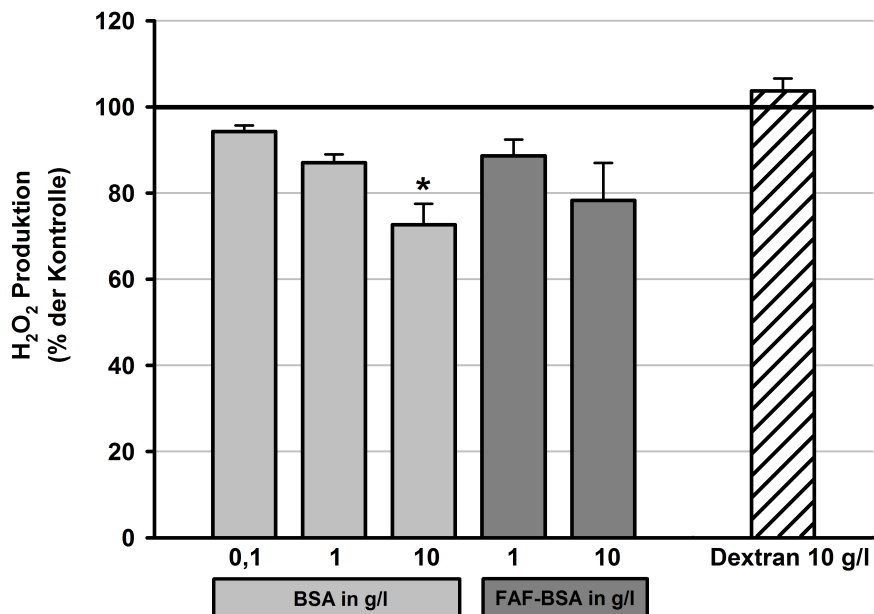


Abbildung 3.17 — Zusammenfassung mehrerer DCF-DA Assays. H₂O₂ Produktion nach Inkubation mit unterschiedlichen BSA- und FAF-BSA-Konzentrationen sowie Dextran. Dargestellt als Prozent der Kontrolle, wobei Kontrolle (Inkubation mit MEM⁻) gleich 100 % gesetzt wurde. n=4-20 (1 bis 5 unterschiedliche Passagen). * P<0,05 versus Kontrolle.

kubation sogar eine signifikante Reduktion der Sekretion von Kollagentyp I, III und IV unter den Kontrollwert beobachtet.

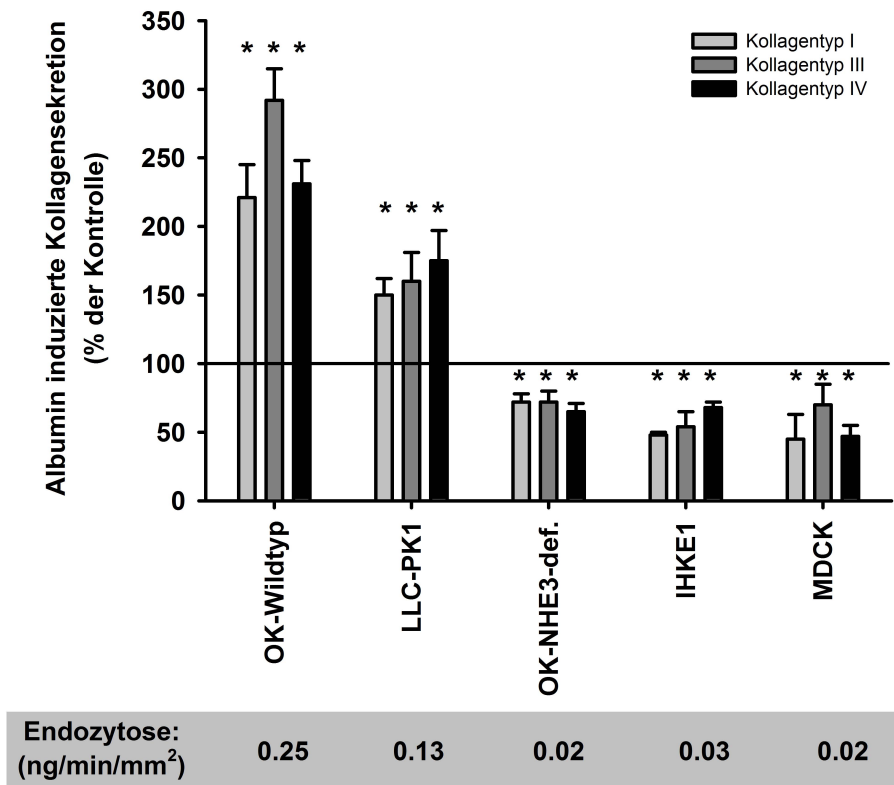


Abbildung 3.18 — Kollagensekretion unterschiedlicher Zelllinien mit unterschiedlicher endozytotischer Aktivität nach 48-stündiger Inkubation mit BSA (0,1 g/l). Dargestellt als Prozent der Kontrolle, wobei Kontrolle (Inkubation mit MEM⁻) gleich 100 % gesetzt wurde. Endozytoserate des proximalen Tubulus liegt bei ungefähr 0,45 ng Albumin/min/mm². n=6-15 (2-5 unterschiedliche Passagen). * P<0,05 versus Kontrolle.

3.4.2 Pharmakologische Hemmung der Albuminendozytose

Pharmakologisch kann die Albuminendozytose mittels 5-N-ethyl-N-isopropyl-amiloride (EIPA), einem selektiven Hemmer des NHE3, inhibiert werden; wobei eine EIPA Konzentration von 30 μ mol/l zu einer Verringerung der Albuminendozytose um 70 % führt (GEKLE *et al.*, 1999).

Im Kollagenase-sensitiven Prolininkorporationsassay kam es durch Hemmung des NHE3 mittels EIPA zu einer signifikanten Reduktion der BSA-induzierten Kollagensekretion (Abb. 3.19).

Zur zusätzlichen Bestätigung unserer Ergebnisse wurde noch ein Kollagen-ELISA durchgeführt. Der Kollagen ELISA (Abb. 3.20) bestätigte, dass eine Hemmung der Albuminendozytose mittels EIPA in einer Konzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$ eine signifikante Reduktion der Albumin-induzierten Kollagensekretion bewirkt.

Daraus kann gefolgert werden, dass Albumin von der proximalen Tubuluszelle aufgenommen werden muss, um die beobachtete profibrotische Wirkung zu vermitteln.

3.4.3 Abhängigkeit der Albumin-induzierten Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege von der Albuminendozytose

Als Nächstes wurde untersucht, ob für die Aktivierung bestimmter Signaltransduktionswege (in diesem Fall NF- κ B) ebenfalls die Aufnahme von Albumin in die proximale Tubuluszelle entscheidend ist. Bei den OK-Wildtypzellen zeigte sich nach Albumininkubation - wie bereits oben dargestellt - eine deutliche Aktivierung des NF- κ B Signalweges im Vergleich zu den NHE3-defizienten OK-Zellen und den IHKE1 Zellen, beides Zelllinien mit niedriger endozytotischer Aktivität (Abb. 3.21).

Eine pharmakologische Hemmung der Albuminaufnahme mittels EIPA (Abb. 3.22) konnte - wie erwartet - die Albumin-induzierte NF- κ B Aktivierung reduzieren. EIPA alleine zeigte keinen Effekt.

Somit ist die Albuminaufnahme in die proximale Tubuluszelle nicht nur für die Albumin-induzierte Kollagensekretion, sondern auch für die Albumin-induzierte Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege (hier nur NF- κ B SEAP aufgeführt) essentiell.

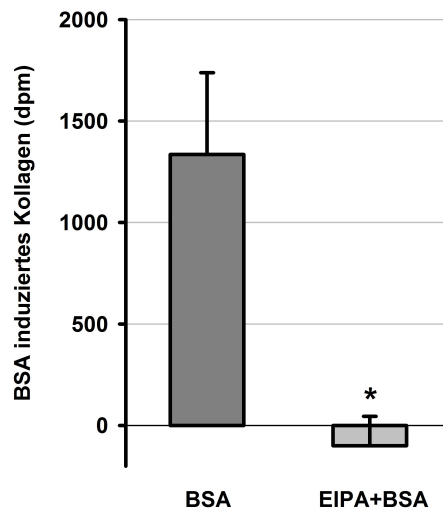


Abbildung 3.19 — BSA-induziertes Kollagen (1 g/l) nach pharmakologischer Hemmung der Albuminendozytose mittels dem NHE3 Inhibitor EIPA (30 μ mol/l). Dargestellt als desintegrations per minute (dpm). Inkubationsdauer 48 h. n=6 (2 unterschiedliche Passagen). * P<0,05 versus BSA-Inkubation alleine.

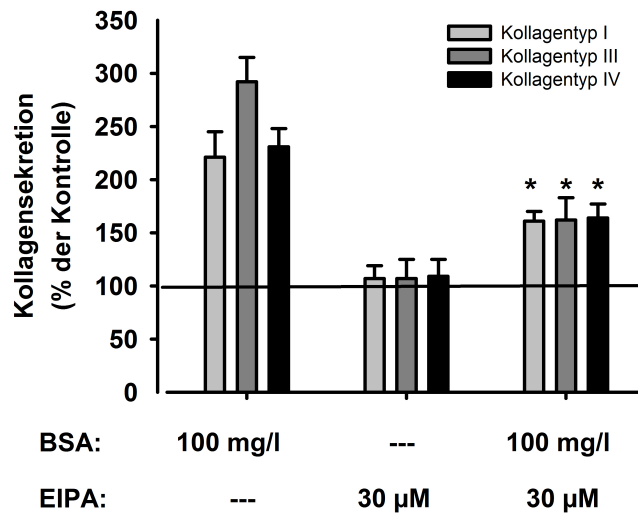


Abbildung 3.20 — BSA-induzierte Kollagensekretion nach pharmakologischer Hemmung der Albuminendozytose mittels dem NHE3 Inhibitor EIPA. Dargestellt als Prozent der Kontrolle, wobei Kontrolle (Inkubation mit MEM⁻) gleich 100 % gesetzt wurde. Inkubationsdauer 48 h. n=6 (2 unterschiedliche Passagen). * P < 0,05 versus BSA alleine.

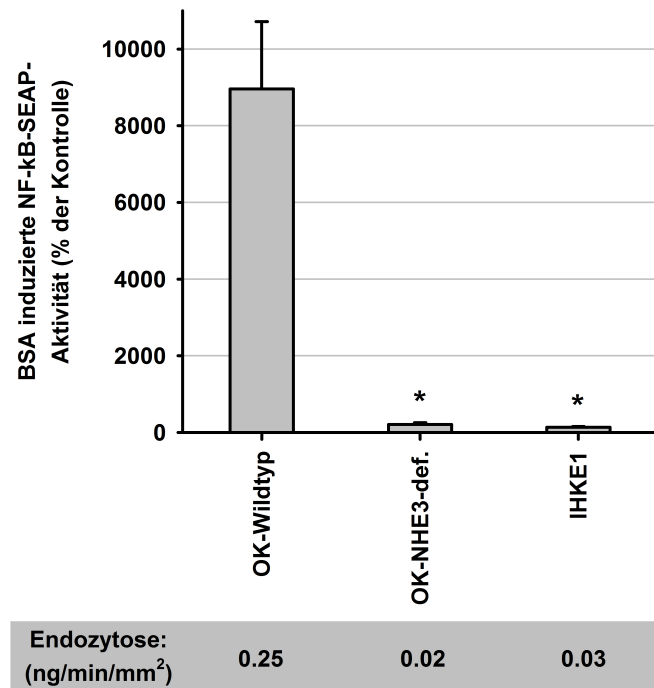


Abbildung 3.21 — NF- κ B Aktivierung bei unterschiedlichen Zelllinien mit unterschiedlicher endozytotischer Aktivität nach 48-stündiger Inkubation mit BSA (0,1 g/l). Dargestellt als Prozent der Kontrolle, wobei Kontrolle (Inkubation mit MEM⁻) gleich 100 % gesetzt wurde. Inkubationsdauer 48 h. n=6-15 (2-5 unterschiedliche Passagen). * P<0,05 versus BSA-Inkubation bei OK-Wildtyp-Zellen.

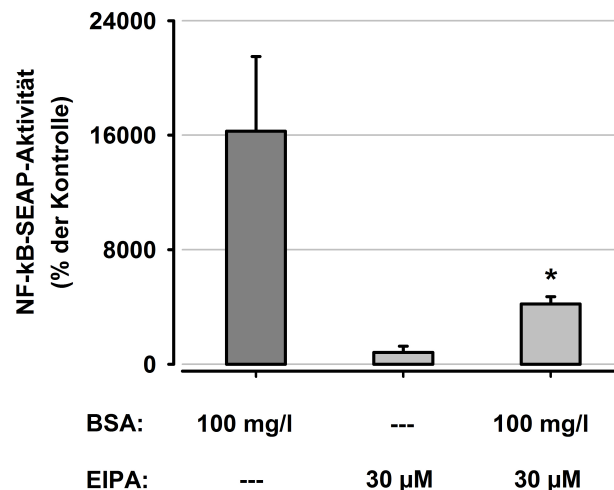


Abbildung 3.22 — BSA-induzierte NF- κ B Aktivierung in Anwesenheit von EIPA. Dargestellt als Prozent der Kontrolle, wobei Kontrolle (Inkubation mit MEM⁻) gleich 100 % gesetzt wurde. Inkubationsdauer 48 h. n=6 (2 unterschiedliche Passagen). * P<0,05 versus BSA alleine.

4 Diskussion

Die Proteinurie ist in den letzten Jahren vermehrt in den Mittelpunkt klinischer und experimenteller Untersuchungen gerückt. Zum Zeitpunkt ihrer Diagnose liegt bereits in den meisten Fällen eine Nierenschädigung vor. Ein Fortbestehen der Proteinurie führt anschließend zu einer raschen Progredienz der Niereninsuffizienz mit dem Endstadium der Dialysepflichtigkeit (GANSEVOORT *et al.*, 1997; DE ZEEUW *et al.*, 2004b; CHIURCHIU *et al.*, 2005). Weiterhin ist das Vorhandensein einer Proteinurie ein unabhängiger Risikofaktor für die kardiovaskuläre Mortalität (RITZ *et al.*, 2002; HEERSPINK *et al.*, 2006). Das wichtigste Ziel bei chronischen Nierenerkrankungen ist - neben der Behandlung der Grunderkrankung - eine Reduktion der Proteinurie (ZANDI-NEJAD *et al.*, 2004), da dadurch die Nierenfunktion länger aufrecht erhalten werden kann (REMUZZI *et al.*, 2006) und die kardiovaskuläre Mortalität gesenkt wird (BAINES and BRUNSKILL, 2008). Eine zentrale Rolle in dieser Eventkaskade, welche über inflammatorische und fibrotische Umbauveränderungen zur terminalen Niereninsuffizienz führt, kommt dabei der Interaktion Protein - proximale Tubuluszelle, dem Ort der Proteinrückresorption, zu (BIRN and CHRISTENSEN, 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde systematisch der Einfluss eines vermehrten Albuminangebots auf die Kollagenhomöostase kultivierter proximaler Tubuluszellen untersucht. Dabei spielten vor allem die in der Literatur beschriebenen pathophysiologisch relevanten Kollagentypen eine Rolle (ALEXAKIS *et al.*, 2006). Weiterhin wurden mögliche beteiligte Signaltransduktionswege aufgezeigt sowie die zentrale Rolle der Albuminaufnahme in die proximale Tubuluszelle im Rahmen dieses Geschehens belegt.

4.1 Zellkulturmodell

Der Großteil der Untersuchungen wurde an den proximalen Tubuluszellen des amerikanischen Opossums durchgeführt. Diese gut charakterisierte Zelllinie besitzt – wie auch die LLC-PK₁-Zellen (NIELSEN *et al.*, 1998) - die für die Rezeptor-vermittelte Endozytose von Albumin notwendigen Werkzeuge Megalin, Cubilin (ZHAI *et al.*, 2000) sowie den Natrium-Protonen-Austauscher 3. Sie weist - wie Mikropunktionsstudien gezeigt haben - eine Endozytoserate ähnlich den in vivo Bedingungen auf (GEKLE *et al.*, 1998) und ist somit ein geeignetes Zellkultursystem, um die oben adressierten Fragen zu untersuchen (GEKLE *et al.*, 1997; DIXON and BRUNSKILL, 1999a; GEKLE *et al.*, 1999; ZHAI *et al.*, 2000; GEKLE *et al.*, 2002). Für Vergleichsstudien wurden ebenso gut charakterisierte Zelllinien mit einer geringeren Endozytoserate (NHE-3-defiziente OK-Zellen, IHKE1-Zellen, MCDK-Zellen) herangezogen (WOHLFARTH *et al.*, 2003; GEKLE *et al.*, 2004).

4.2 TGF- β_1 als profibrotischer Stimulus

OK-Zellen reagieren auf TGF- β_1 , einen typischen profibrotischen Stimulus (EDDY and GIACHELLI, 1995; EICKELBERG *et al.*, 1999; WOLF, 1999; CHIN *et al.*, 2001; YU *et al.*, 2003), adäquat im Sinne einer vermehrten Kollagensekretion. Nachdem die Zellen auf Filtern angesät worden waren, konnte eine zusätzliche Unterscheidung in apikale und basolaterale TGF- β_1 -induzierte Kollagensekretion erfolgen. In beiden Kompartimenten kam es unter zeitgleicher apikaler und basolateraler TGF- β_1 Exposition zu einer signifikanten Zunahme der Kollagensekretion. In einer späteren Arbeit wurde von Gekle *et al.* darüber hinaus gezeigt, dass eine alleinige apikale Inkubation mit TGF- β_1 zu keiner signifikanten Kollagensekretionszunahme führt, wohingegen die alleinige basolaterale Exposition einen ähnlichen Effekt wie die zeitgleiche apikale und basolaterale Inkubation mit TGF- β_1 zur Folge hat (GEKLE *et al.*, 2003). Die gewonnenen Daten stimmen mit der in der Literatur beschriebenen basolateralen Expression (WANG *et al.*, 2000) des TGF- β Rezeptors in proximalen Tubuluszellen

von Ratten und mit der basolateralen Wirkung von TGF- β in kultivierten proximalen Tubuluszellen überein (TIAN and PHILLIPS, 2002).

4.3 Albumin-induzierte Störung der Kollagenhomöostase

Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine Albuminexposition in Konzentrationen bis 1000 mg/l - wie man sie unter pathophysiologisch erhöhter Proteinfiltration erwartet - zu einer vermehrten Kollagensekretion der OK-Zellen führt. Durch die Bestimmung der Kollagenfraktion (Anteil des gesamtsezernierten Kollagens am gesamtsezernierten Protein) wird belegt, dass die Albumin-induzierte Kollagensekretion nicht nur auf eine nach Albuminexposition insgesamt gesteigerte Proteinsekretion zurückzuführen ist. Im nächsten Schritt konnte nachgewiesen werden, dass Albuminexposition zu einer vermehrten Sekretion und Synthese von Kollagen Typ I, III und IV führt. Die von uns gewonnenen Daten stimmen gut mit der Übersicht von ALEXAKIS *et al.*, 2006 über die Verteilung der für die Niere relevanten Kollagentypen unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen überein. Während Kollagen Typ IV vor allem im Frühstadium einer diabetischen Nephropathie zur Basalmembranverdickung (IHM *et al.*, 1992; PARK *et al.*, 1997) führt, tragen die fibrillären Kollagene Typ I und III im Spätstadium einer chronischen Nierenerkrankung zur tubulointerstitiellen Fibrose bei (MAKINO *et al.*, 1994; SOYLEMEZOGLU *et al.*, 1997; GILBERT *et al.*, 1998; STRUTZ F., 1999; ROSSERT *et al.*, 2000; MASON and WAHAB, 2003).

Da Albumin als Transportprotein für u. a. freie Fettsäuren fungiert und diese immer wieder in Zusammenhang mit der Entstehung einer Nierenfibrose gebracht werden, wurde in dieser Arbeit durch Verwendung von FAF-BSA der mögliche Beitrag der freien Fettsäuren an der Albumin-induzierten Kollagensekretion untersucht. Eine Inkubation der OK-Zellen mit FAF-BSA zeigt kein signifikant unterschiedliches Ergebnis zu der Inkubation der Zellen mit BSA. Eine mögliche indirekte Beteiligung freier Fettsäuren über eine Metabolisierung in der proximalen Tubuluszelle und daraus resultierender Makrophageninfiltration ins Interstitium mit entsprechen-

den fibrotischen Umbauvorgängen ist jedoch nicht auszuschließen (THOMAS and SCHREINER, 1993).

Weiterhin können sogenannte Amadori glucose adducts bei der Entstehung der tubulointerstitiellen Fibrose eine zentrale Rolle spielen (COHEN and ZIYADEH, 1994; COHEN *et al.*, 1995; VLASSARA, 1996; COHEN *et al.*, 1997; GILBERT and COOPER, 1999; COHEN *et al.*, 1999; CHEN *et al.*, 2000; COHEN *et al.*, 2002). Amadori glucose adducts entstehen durch eine nicht-enzymatische Glykolisierung von Proteinen (u. a. Albumin) im Rahmen einer diabetischen Stoffwechsellage. Amadori glucose adducts veränderte Proteine besitzen andere biologische Eigenschaften als ihre nicht glycierten Counterparts. Sie führen laut Literatur zu einer erhöhten Genexpression von Kollagen Typ IV und Fibronectin (COHEN *et al.*, 1997), sie induzieren die Expression und Bioaktivität von TGF- β_1 und TGF- β Typ II Rezeptoren (ZIYADEH *et al.*, 1998), die Aktivierung der Proteinkinase C (CHEN *et al.*, 2000) und der NF- κ B Aktivierung in mesangialen Zellen sowie die Entstehung freier Radikale (ZHANG *et al.*, 2006). Um den Stellenwert glykolisierter Endprodukte bei der Entstehung der Protein-induzierten Nierenfibrose beurteilen zu können, müssen weitere Untersuchung z. B. mit glycated Albumin als ein Vertreter der Amadori glucose adducts erfolgen.

Neben der vermehrten Kollagensynthese und -sekretion, ist auch ein verminderter Abbau des sezernierten Kollagens für die durch Albumin gestörte Kollagenhomöostase der OK-Zellen verantwortlich. Ein ähnlicher Mechanismus wurde von ORPHANIDES *et al.*, 1997; NORMAN *et al.*, 2000 für den Effekt von Hypoxie bei proximalen Tubuluszellen und von MCLENNAN *et al.*, 2000 für den Effekt von Glukose bei mesangialen Zellen nachgewiesen. Albuminexposition führt – wie unsere Daten zeigen – zu einem signifikanten Rückgang der Kollagenaseaktivität. In der Zymographie konnten wir zwei unterschiedliche Banden identifizieren. Diese stimmen gut mit den in der Literatur angegebenen Grössenangaben für MMP-2 (sog. Gelatinase A) bei ca. 72 kD und MMP-9 (sog. Gelatinase B) bei ca. 95 kD überein. Während denaturiertes Kollagen von beiden Matrix-Metalloproteinasen gespalten wird, ist nur MMP-2 in der Lage, Typ I, II und III Kollagen abzubauen (VISSE and NAGASE, 2003). Es ist bisher nicht geklärt, ob der verminderten Proteinasenaktivität eine verminderte Ex-

pression von Matrix-Metalloproteinasen oder eine vermehrte Expression von TIMPs zu Grunde liegt. Hierfür müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Es ist davon auszugehen, dass es sich um ein multifaktorielles Geschehen handelt. So konnten SHANKLAND *et al.*, 1996 und MCLENNAN *et al.*, 2002 nachweisen, dass Streptozotocin-induzierter Diabetes mellitus bei Ratten zu einer verminderten Expression von MMP-9 mRNA und -aktivität sowie zu einer vermehrten Expression von TIMP-1 mRNA führt.

4.4 Albumin-induzierte Signaltransduktionswege

Die vorliegenden Daten belegen, dass eine Inkubation mit Albumin zur Aktivierung von NF- κ B, AP-1, PKC und PKA führt. Die Beteiligung des NF- κ B- und AP-1-Signalweges im Rahmen fibrotischer Umbauprozesse stimmen gut mit Daten aus der Literatur überein (MEZZANO *et al.*, 2001; DRUMM *et al.*, 2002; ZOJA *et al.*, 2004; ROSSERT *et al.*, 2000; MASON and WAHAB, 2003). Während eine pharmakologische Hemmung der Proteinkinase C durch BIM die Albumin-induzierte Aktivierung des NF- κ B und des AP-1 Signalweges verhindert, zeigt eine Hemmung der Proteinkinase A durch H89 in beiden Fällen keinen Effekt. Die Aktivierung der Proteinkinase C ist somit der NF- κ B- und AP-1-Aktivierung vorgeschaltet. Auch DRUMM *et al.*, 2002 haben eine Albumin-induzierte NF- κ B Aktivierung über die Proteinkinase C bei OK-Zellen nachgewiesen. Durch pharmakologische Hemmung der PKC durch BIM und der NF- κ B Aktivierung durch PDTC konnten wir zeigen, dass diese beiden durch Albuminexposition aktivierten Signaltransduktionswege direkt an der Albumin-induzierten Kollagensekretion beteiligt sind. In Anwesenheit des Proteinkinase A Hemmers H89 kommt es ebenfalls zu einem signifikanten Rückgang der Albumin-induzierten Kollagensekretion. Leicht *et al.* beschreibt in seiner Arbeit eine Proteinkinase A abhängige Phosphorylierung des CREB Transkriptionsfaktors mit konsekutiver Erhöhung von messenger RNA für Kollagen Typ I und III sowie für MMP-2 in kardialen Fibroblasten (LEICHT *et al.*, 2001). Auch wir können mittels SEAP eine Aktivierung des cAMP Responsiven Elements nach Albuminexposition nachweisen. Möglicherweise bewirkt die Albuminexposition in den OK-Zellen ne-

ben einer Aktivierung der PKC auch eine Aktivierung der PKA mit anschließender CREB Phosphorylierung und vermehrter Kollagensekretion. Weiterhin wurde die Aktivierung des MAPK Weges untersucht. Es ist bekannt, dass Albumin konzentrationsabhängig die Phosphorylierung von ERK1/2 bei OK-Zellen induziert (DIXON and BRUNSKILL, 2000). Eine Hemmung der ERK1/2 Phosphorylierung durch U0126 führt in unseren Versuchen zu keiner Abschwächung, sondern überraschenderweise sogar zu einer Zunahme der Albumin-induzierten Kollagensekretion (zumindest von Kollagen Typ I), wobei der Mechanismus noch ungeklärt ist.

Neben den oben genannten Signaltransduktionswegen wird in der Literatur immer wieder auf die Rolle der ROS in der Vermittlung tubulointerstitieller Nierenschädigung hingewiesen (KLAHR, 1997; LEE *et al.*, 2003). In unseren Versuchen zeigt sich nach Albuminexposition überraschenderweise ein Konzentrations-abhängiger Rückgang der Wasserstoffperoxidproduktion (als ein Beispiel für ROS). Eine ähnliche Situation beschreiben WOLF *et al.*, 2001. Hier kommt es bei kultivierten proximalen Tubuluszellen der Maus unter antioxidativer Therapie zu einer Zunahme der TGF- β_1 - und Proteinproduktion. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von MORIGI *et al.*, 2002. Er zeigt in seiner Arbeit, dass eine Exposition humaner proximaler Tubuluszellen gegenüber Albumin/Immunglobulin zu einer gesteigerten ROS-Produktion und gesteigerten NF- κ B Aktivierung führt. Dabei sollen die ROS als second messenger zwischen der Proteinkinase C- und der NF- κ B-Aktivierung fungieren. Auch dies kann im Rahmen unserer Ergebnisse nicht verifiziert werden. Eine Hemmung der Proteinkinase C mittels BIM hat keinen Effekt auf die ROS-Produktion. Eine schlüssige Zusammenführung dieser diskrepanten Daten ist zur Zeit nicht möglich. Morigi *et al.* beginnt seine Messungen bereits nach einer 5 minütigen Albumininkubation, so dass die unterschiedlichen Angaben in der Literatur auf die Instabilität der ROS zurückgeführt werden könnten. Weiterhin ist in verschiedenen Literaturstellen eine Aktivierung der MMPs und eine Inaktivierung der TIMPs durch ROS als second messenger beschrieben (VISSE and NAGASE, 2003). Dies könnte bedeuten, dass eine Abnahme der ROS-Produktion zu einer reduzierten MMP-Aktivität führt. Somit ist wahrscheinlich das jeweils spezifische Verhältnis von Änderungen der Kollagenbildung zum Kollagenabbau entscheidend für den Nettoeffekt von ROS.

In Zusammenschau machen diese Ergebnisse deutlich, dass durch eine erhöhte proximal-tubuläre Proteinlast verschiedene Signaltransduktionswege simultan aktiviert werden können. Erst dadurch kommt es zur Schädigung der Kollagenhomöostase im proximalen Tubulus. Im Verlauf müssen noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um die Quervernetzung der einzelnen Signaltransduktionswege genauer zu beleuchten.

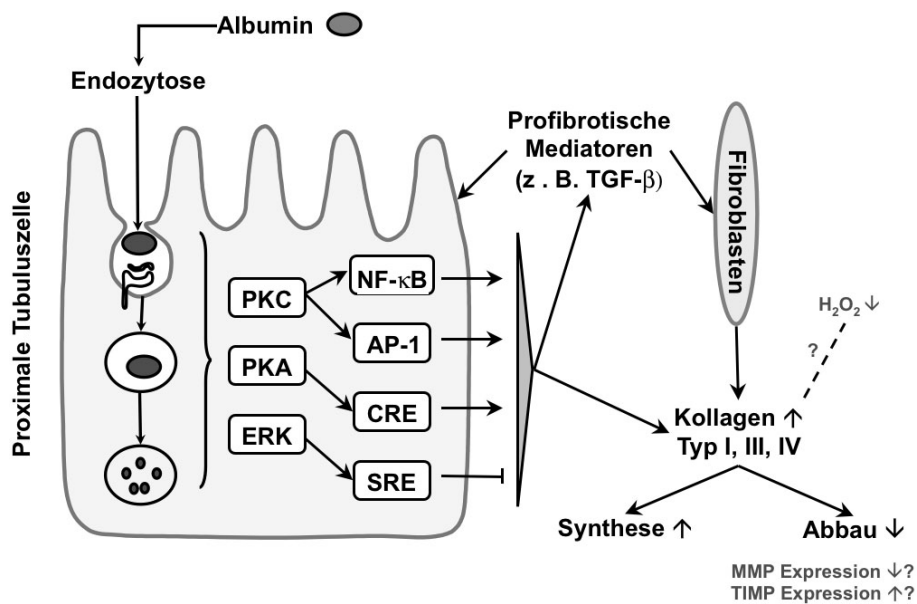


Abbildung 4.1 — Modell der Albumin-induzierten Nierenfibrose basierend auf den hier vorgestellten Daten.

Weiterhin kann bei all den gewonnenen Ergebnissen natürlich nicht ausgeschlossen werden, dass die von uns beobachteten Effekte nicht auf direktem Wege, sondern über eine autokrine Aktivierungsschleife durch z. B. Sekretion von TGF- β_1 zu Stande kommen (Abb. 4.1). ORTEGA-VELAZQUEZ *et al.*, 2004 beschreiben z.B. eine vermehrte Expression extrazellulärer Matrix-Gene und vermehrte TGF- β_1 Sekretion durch Kollagen Typ I in kultivierten humanen Mesangiumzellen mit einem daraus resultierendem positiven Feedback. Es ist bekannt, dass TGF- β_1 selbst den NF- κ B und AP-1 Signaltransduktionsweg stimuliert (GOVINDEN and BHOOLA, 2003), die Aktivität von MMPs reduziert und die Aktivität von TIMPs erhöht (BARICOS *et al.*, 1999; CHOI, 2000; LEE *et al.*, 2003; HAN *et al.*, 2006).

4.5 Notwendigkeit der Albuminendozytose

Zuletzt zeigen unsere Daten, dass die alleinige Anwesenheit von Albumin im Inkubationsmedium bzw. im Lumen des proximalen Tubulus nicht ausreicht, um die Signaltransduktionswege und die Kollagensekretion zu stimulieren. Dafür muss eine effektive Rezeptor-vermittelte Endozytose von Albumin vorliegen. Eine effektive Endozytose ist durch das Vorhandensein von Cubilin, Megalin und NHE3 gewährleistet. Wenn die OK-Zellen mit dem Polysaccharid Dextran anstelle von Albumin inkubiert werden, kommt es zu keiner Aktivierung der Signaltransduktionswege bzw. der Kollagensekretion oder -degradation, so dass ein Effekt durch Änderungen des kolloidosmotischen Drucks ausgeschlossen werden kann. Dagegen führt eine Inkubation mit Immunglobulin (im Ergebnisteil nicht aufgeführt), welches u. a. ein Substrat des Rezeptors Cubilin ist (BATUMAN *et al.*, 1998), zu einer signifikanten Zunahme von Kollagen Typ I, III und IV (WOHLFARTH *et al.*, 2003). Auch WANG *et al.*, 1997 betonen die Notwendigkeit der Albuminendozytose in proximalen Tubuluszellen für den Effekt Protein-induzierter MCP-1-Synthese.

Vergleicht man Zelllinien mit unterschiedlicher endozytotischer Aktivität, dann zeigt sich, dass die Albumin-induzierte Kollagensekretion abhängig von der Endozytoserate der einzelnen Zelllinien ist. Bei Zellen mit hoher – Cubilin/Megalin vermittelter - Endozytoserate zeigt sich eine signifikante Zunahme der Kollagensekretion nach Inkubation mit Albumin. Eine pharmakologische Hemmung der Albuminaufnahme in die Zelle mittels EIPA kann die Albumin-induzierte Kollagensekretion signifikant reduzieren. Ebenso verhält es sich bei der Aktivierung der Signaltransduktionswege (hier NF- κ B Aktivierung). Bei Zellen mit niedriger endozytotischer Aktivität (in unserem Fall OK-NHE3 defiziente-, IHKE1- und MDCK-Zellen) kommt es nach Albuminexposition sogar zu einer signifikanten Abnahme der Kollagensekretion im Vergleich zur Kontrolle; d. h. eine Erhöhung der Albuminkonzentration extrazellulär inhibiert die Kollagensekretion auf unbekannte Weise. Möglicherweise agiert Albumin in hohen extrazellulären Konzentrationen als Radikalfänger und schützt auf diese Weise die proximale Tubuluszelle. So argumentieren IGLESIAS *et al.*, 1999 in ihrer Arbeit. Diese Theorie könnte auch den biphasischen Verlauf der Albumin-

induzierten Kollagensekretion erklären. Unsere Daten zeigen, dass ein Inkubation mit einer hohen Albuminkonzentration (über 1000 mg/l) keinen Effekt mehr auf die Kollagensekretion hat bzw. diese sogar reduziert. Diese Beobachtung könnte eventuell auch von klinischer Relevanz sein. Die in der Literatur beschriebene minimal change glomerulonephritis geht mit einer ausgeprägten Proteinurie, i. S. eines nephrotischen Syndroms einher, ist jedoch nur selten mit einer schlechten Prognose bezüglich einer dauerhaften Nierenfunktionsstörung verbunden.

Eine wichtige Schlussfolgerung dieser Ergebnisse ist, dass es für weitere Studien unabdingbar ist, mit Albumin-Konzentrationen im pathophysiologisch relevanten Bereich und proximalen Tubuluszellen, welche den entsprechenden Endozytoseapparat besitzen, zu arbeiten, um die Proteinurie-induzierte tubulointerstitielle Schädigung in funktionell sinnvoller Weise zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

Auf dem Weg von der gesunden zur kranken Niere kommt dem Auftreten bzw. Nachweis einer Proteinurie als Marker einer bereits bestehenden Nierenschädigung eine zentrale Rolle zu. Eine fortbestehende Proteinurie führt zur raschen Progredienz der Niereninsuffizienz bis hin zur Dialysepflichtigkeit, wohingegen eine adäquate Therapie ein Fortschreiten der Erkrankung verhindern bzw. hinauszögern kann. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, systematisch den Einfluss eines vermehrten Albuminangebots auf die Kollagenhomöostase kultivierter proximaler Tubuluszellen zu untersuchen, dabei involvierte Signaltransduktionswege aufzuzeigen und die zentrale Rolle der Albuminendozytose im Rahmen dieses Geschehens zu beurteilen. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen:

1. Albuminurie stört die Kollagenhomöostase der proximalen Tubuluszelle und führt zu einer vermehrten Kollagensynthese (Kollagen Typ I, III und IV) und einer verminderten Kollagen Degradation.
2. Albuminurie aktiviert folgende Signalwege: PKC, PKA, NF- κ B, AP-1, CRE. Die Proteinkinase C scheint der NF- κ B und AP-1 Aktivierung vorgeschaltet zu sein. Eine pharmakologische Hemmung der entsprechenden Signaltransduktionswege führt zu einer Reduktion der Albumin-induzierten Kollagensekretion. Somit kann die unmittelbare Beteiligung der aufgeführten, durch Albuminexposition aktivierten Signaltransduktionswege an der gestörten Kollagenhomöostase bewiesen werden.
3. Albumin muss in die proximale Tubuluszelle via Rezeptor-vermittelter Endozytose aufgenommen werden, um die entsprechenden Signaltransduktionswege zu stimulieren und um zu einer vermehrten Kollagensekretion zu führen.

In dieser Arbeit konnte die zentrale Stellung der Albuminurie als pars pro toto für die Proteinurie als Motor der Nierenfibrose herausgearbeitet werden. Der zentrale Punkt wird und muss weiterhin sein – wenn möglich -, schon im Voraus durch adäquate Behandlung der Grunderkrankung (z. B. arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus) das Auftreten einer Proteinurie zu vermeiden. Sollte eine Proteinurie aufgetreten sein, kann das Wissen über die Notwendigkeit der Albuminaufnahme in die proximale Tubuluszelle und die weiteren Signaltransduktionswege möglicherweise die Grundlage für entsprechende Behandlungsansätze bieten, um den Patienten vor dem Verlust seiner Nierenfunktion zu bewahren.

Literaturverzeichnis

- ABBATE, M., D. BACHINSKY, G. ZHENG, I. STAMENKOVIC, M. McLAUGHLIN, *et al.*, 1993 Location of gp330/alpha 2-m receptor-associated protein (alpha 2-mrap) and its binding sites in kidney: distribution of endogenous alpha 2-mrap is modified by tissue processing. *Eur J Cell Biol* **61**: 139–149.
- ABBATE, M., and G. REMUZZI, 1999 Proteinuria as a mediator of tubulointerstitial injury. *Kidney Blood Press Res* **22**: 37–46.
- AGELLI, M., and S. M. WAHL, 1988 Collagen production by fibroblasts. *Methods Enzymol* **163**: 642–656.
- AKHTER, S., O. KOVBASNJUK, X. LI, M. CAVET, J. NOEL, *et al.*, 2002 Na(+)/h(+) exchanger 3 is in large complexes in the center of the apical surface of proximal tubule-derived ok cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **283**: C927–C940.
- ALEXAKIS, C., P. MAXWELL, and G. BOU-GHARIOS, 2006 Organ-specific collagen expression: implications for renal disease. *Nephron Exp Nephrol* **102**: e71–e75.
- ARICI, M., J. BROWN, M. WILLIAMS, K. P. G. HARRIS, J. WALLS, *et al.*, 2002 Fatty acids carried on albumin modulate proximal tubular cell fibronectin production: a role for protein kinase c. *Nephrol Dial Transplant* **17**: 1751–1757.
- BACHINSKY, D. R., G. ZHENG, J. L. NILES, M. McLAUGHLIN, M. ABBATE, *et al.*, 1993 Detection of two forms of gp330. their role in heymann nephritis. *Am J Pathol* **143**: 598–611.
- BAINES, R. J., and N. J. BRUNSKILL, 2008 The molecular interactions between filtered proteins and proximal tubular cells in proteinuria. *Nephron Exp Nephrol* **110**: e67–e71.
- BAKALA, H., M. PERICHON, I. SUDEY, and J. SCHAEVERBEKE, 1990 Binding of 125i-labelled albumin by isolated rat renal brush-border membrane vesicles. evidence for uptake and internalization process. *Int J Biochem* **22**: 1189–1194.
- BARICOS, W. H., S. L. CORTEZ, M. DEBOISBLANC, and S. XIN, 1999 Transforming growth factor-beta is a potent inhibitor of extracellular matrix degradation by cultured human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* **10**: 790–795.
- BATUMAN, V., P. J. VERROUST, G. L. NAVAR, J. H. KAYSEN, F. O. GODA, *et al.*, 1998 Myeloma light chains are ligands for cubilin (gp280). *Am J Physiol* **275**: F246–F254.
- BIRN, H., and E. I. CHRISTENSEN, 2006 Renal albumin absorption in physiology and pathology. *Kidney Int* **69**: 440–449.

- BIRN, H., P. J. VERROUST, E. NEXO, H. HAGER, C. JACOBSEN, *et al.*, 1997 Characterization of an epithelial approximately 460-kda protein that facilitates endocytosis of intrinsic factor-vitamin b12 and binds receptor-associated protein. *J Biol Chem* **272**: 26497–26504.
- BRUNSKILL, N. J., S. NAHORSKI, and J. WALLS, 1997 Characteristics of albumin binding to opossum kidney cells and identification of potential receptors. *Pflugers Arch* **433**: 497–504.
- BRUNSKILL, N. J., J. STUART, A. B. TOBIN, J. WALLS, and S. NAHORSKI, 1998 Receptor-mediated endocytosis of albumin by kidney proximal tubule cells is regulated by phosphatidylinositide 3-kinase. *J Clin Invest* **101**: 2140–2150.
- BURTON, C., and K. P. HARRIS, 1996 The role of proteinuria in the progression of chronic renal failure. *Am J Kidney Dis* **27**: 765–775.
- CAMERON, J. S., 1990 Proteinuria and progression in human glomerular diseases. *Am J Nephrol* **10 Suppl 1**: 81–87.
- CARONE, F. A., D. R. PETERSON, S. OPARIL, and T. N. PULLMAN, 1979 Renal tubular transport and catabolism of proteins and peptides. *Kidney Int* **16**: 271–278.
- CHATELET, F., E. BRIANTI, P. RONCO, J. ROLAND, and P. VERROUST, 1986 Ultrastructural localization by monoclonal antibodies of brush border antigens expressed by glomeruli. ii. extrarenal distribution. *Am J Pathol* **122**: 512–519.
- CHEN, S., M. P. COHEN, and F. N. ZIYADEH, 2000 Amadori-glycated albumin in diabetic nephropathy: pathophysiologic connections. *Kidney Int Suppl* **77**: S40–S44.
- CHIN, B. Y., A. MOHSENIN, S. X. LI, A. M. CHOI, and M. E. CHOI, 2001 Stimulation of pro-alpha(1)(i) collagen by tgf-beta(1) in mesangial cells: role of the p38 mapk pathway. *Am J Physiol Renal Physiol* **280**: F495–F504.
- CHIURCHIU, C., G. REMUZZI, and P. RUGGENENTI, 2005 Angiotensin-converting enzyme inhibition and renal protection in nondiabetic patients: the data of the meta-analyses. *J Am Soc Nephrol* **16 Suppl 1**: S58–S63.
- CHOI, M. E., 2000 Mechanism of transforming growth factor-beta1 signaling. *Kidney Int Suppl* **77**: S53–S58.
- CHRISTENSEN, E. I., and H. BIRN, 2001 Megalin and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* **280**: F562–F573.
- CHRISTENSEN, E. I., H. BIRN, B. RIPPE, and A. B. MAUNSBACH, 2007 Controversies in nephrology: renal albumin handling, facts, and artifacts! *Kidney Int* **72**: 1192–4.
- CHRISTENSEN, E. I., J. O. MOSKAUG, H. VORUM, C. JACOBSEN, T. E. GUNDERSEN, *et al.*, 1999 Evidence for an essential role of megalin in transepithelial transport of retinol. *J Am Soc Nephrol* **10**: 685–695.
- CHRISTENSEN, E. I., and T. E. WILLNOW, 1999 Essential role of megalin in renal

- proximal tubule for vitamin homeostasis. *J Am Soc Nephrol* **10**: 2224–2236.
- CHRISTENSEN E. I., B. H., 2002 Megalin and cubilin: multifunctional endocytic receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 256–266.
- COHEN, M. P., E. HUD, V. Y. WU, and F. N. ZIYADEH, 1995 Albumin modified by amadori glucose adducts activates mesangial cell type iv collagen gene transcription. *Mol Cell Biochem* **151**: 61–67.
- COHEN, M. P., V. Y. WU, and J. A. COHEN, 1997 Glycated albumin stimulates fibronectin and collagen iv production by glomerular endothelial cells under normoglycemic conditions. *Biochem Biophys Res Commun* **239**: 91–94.
- COHEN, M. P., and F. N. ZIYADEH, 1994 Amadori glucose adducts modulate mesangial cell growth and collagen gene expression. *Kidney Int* **45**: 475–484.
- COHEN, M. P., F. N. ZIYADEH, S. W. HONG, C. W. SHEARMAN, E. HUD, *et al.*, 2002 Inhibiting albumin glycation in vivo ameliorates glomerular overexpression of tgf-beta1. *Kidney Int* **61**: 2025–2032.
- COHEN, M. P., F. N. ZIYADEH, G. T. LAUTENSLAGER, J. A. COHEN, and C. W. SHEARMAN, 1999 Glycated albumin stimulation of pkc-beta activity is linked to increased collagen iv in mesangial cells. *Am J Physiol* **276**: F684–F690.
- COMPER, W. D., and E. F. GLASGOW, 1995 Charge selectivity in kidney ultrafiltration. *Kidney Int* **47**: 1242–1251.
- COTRAN, R., V. KUMAR, and T. COLLINS, editors, 1999 *Robbins: Pathologic Basis of Disease (6th edition)*. W. B. Saunders Company.
- COURJAULT, F., B. GERIN, D. LEROY, J. CHEVALIER, and H. TOUTAIN, 1991 Morphological and biochemical characterization of the opossum kidney cell line and primary cultures of rabbit proximal tubule cells in serum-free defined medium. *Cell Biol Int Rep* **15**: 1225–1234.
- CUI, S., P. J. VERROUST, S. K. MOESTRUP, and E. I. CHRISTENSEN, 1996 Megalin/gp330 mediates uptake of albumin in renal proximal tubule. *Am J Physiol* **271**: F900–F907.
- DE ZEEUW, D., G. REMUZZI, H.-H. PARVING, W. F. KEANE, Z. ZHANG, *et al.*, 2004a Albuminuria, a therapeutic target for cardiovascular protection in type 2 diabetic patients with nephropathy. *Circulation* **110**: 921–927.
- DE ZEEUW, D., G. REMUZZI, H.-H. PARVING, W. F. KEANE, Z. ZHANG, *et al.*, 2004b Proteinuria, a target for renoprotection in patients with type 2 diabetic nephropathy: lessons from renaal. *Kidney Int* **65**: 2309–2320.
- DIXON, R., and N. J. BRUNSKILL, 1999a Activation of mitogenic pathways by albumin in kidney proximal tubule epithelial cells: implications for the pathophysiology of proteinuric states. *J Am Soc Nephrol* **10**: 1487–1497.
- DIXON, R., and N. J. BRUNSKILL, 2000 Albumin stimulates p44/p42 extracellular-signal-regulated mitogen-activated protein kinase in opossum kidney proximal tubular cells. *Clin Sci (Lond)* **98**: 295–301.

- DIXON, R. J., and N. J. BRUNSKILL, 1999b Lysophosphatidic acid-induced proliferation in opossum kidney proximal tubular cells: role of pi 3-kinase and erk. *Kidney Int* **56**: 2064–2075.
- DRÖGE, W., 2002 Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* **82**: 47–95.
- DRUMM, K., B. BAUER, R. FREUDINGER, and M. GEKLE, 2002 Albumin induces nf-kappab expression in human proximal tubule-derived cells (ihke-1). *Cell Physiol Biochem* **12**: 187–196.
- D'SOUZA, S., A. GARCIA-CABADO, F. YU, K. TETER, G. LUKACS, *et al.*, 1998 The epithelial sodium-hydrogen antiporter na⁺/h⁺ exchanger 3 accumulates and is functional in recycling endosomes. *J Biol Chem* **273**: 2035–43.
- EDDY, A. A., and C. M. GIACHELLI, 1995 Renal expression of genes that promote interstitial inflammation and fibrosis in rats with protein-overload proteinuria. *Kidney Int* **47**: 1546–1557.
- EICKELBERG, O., E. KÖHLER, F. REICHENBERGER, S. BERTSCHIN, T. WOODTLI, *et al.*, 1999 Extracellular matrix deposition by primary human lung fibroblasts in response to tgf-beta1 and tgf-beta3. *Am J Physiol* **276**: L814–24.
- ESPOSITO, C., A. FORNONI, F. CORNACCHIA, N. BELLOTTI, G. FASOLI, *et al.*, 2000 Cyclosporine induces different responses in human epithelial, endothelial and fibroblast cell cultures. *Kidney Int* **58**: 123–130.
- FREI, U., and H. J. SCHOBERT-HALSTENBERG, 2006/2007 Nierenersatztherapie in deutschland: Bericht über dialysebehandlung und nierentransplantation in deutschland 2006/2007. *QuiSi Niere* .
- FYFE, J. C., U. GIGER, C. A. HALL, P. F. JEZYK, S. A. KLUMPP, *et al.*, 1991a Inherited selective intestinal cobalamin malabsorption and cobalamin deficiency in dogs. *Pediatr Res* **29**: 24–31.
- FYFE, J. C., K. S. RAMANUJAM, K. RAMASWAMY, D. F. PATTERSON, and B. SEETHARAM, 1991b Defective brush-border expression of intrinsic factor-cobalamin receptor in canine inherited intestinal cobalamin malabsorption. *J Biol Chem* **266**: 4489–4494.
- GANSEVOORT, R. T., G. J. NAVIS, F. H. WAPSTRA, P. E. DE JONG, and D. DE ZEEUW, 1997 Proteinuria and progression of renal disease: therapeutic implications. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **6**: 133–140.
- GEKLE, M., 1998 Renal proximal tubular albumin reabsorption: Daily prevention of albuminuria. *News Physiol Sci* **13**: 5–11.
- GEKLE, M., 2007 Renal albumin handling: a look at the dark side of the filter. *Kidney Int* **71**: 479–81.
- GEKLE, M., K. DRUMM, S. MILDENBERGER, R. FREUDINGER, B. GASSNER, *et al.*, 1999 Inhibition of na⁺-h⁺ exchange impairs receptor-mediated albumin endocytosis in renal proximal tubule-derived epithelial cells from opossum. *J Physiol* **520 Pt 3**: 709–721.

- GEKLE, M., R. FREUDINGER, and S. MILDENBERGER, 2001 Inhibition of na⁺-h⁺ exchanger-3 interferes with apical receptor-mediated endocytosis via vesicle fusion. *J Physiol* **531**: 619–629.
- GEKLE, M., P. KNAUS, R. NIELSEN, S. MILDENBERGER, R. FREUDINGER, *et al.*, 2003 Transforming growth factor-beta1 reduces megalin- and cubilin-mediated endocytosis of albumin in proximal-tubule-derived opossum kidney cells. *J Physiol* **552**: 471–481.
- GEKLE, M., S. MILDENBERGER, R. FREUDINGER, G. SCHWERDT, and S. SILBERNAGL, 1997 Albumin endocytosis in ok cells: dependence on actin and microtubules and regulation by protein kinases. *Am J Physiol* **272**: F668–F677.
- GEKLE, M., S. MILDENBERGER, R. FREUDINGER, and S. SILBERNAGL, 1995a Endosomal alkalization reduces j_{max} and k_m of albumin receptor-mediated endocytosis in ok cells. *Am J Physiol* **268**: F899–F906.
- GEKLE, M., S. MILDENBERGER, R. FREUDINGER, and S. SILBERNAGL, 1995b Kinetics of receptor-mediated endocytosis of albumin in cells derived from the proximal tubule of the kidney (opossum kidney cells): influence of ca²⁺ and camp. *Pflugers Arch* **430**: 374–380.
- GEKLE, M., S. MILDENBERGER, R. FREUDINGER, and S. SILBERNAGL, 1996 Functional characterization of albumin binding to the apical membrane of ok cells. *Am J Physiol* **271**: F286–F291.
- GEKLE, M., S. MILDENBERGER, R. FREUDINGER, and S. SILBERNAGL, 1998 Long-term protein exposure reduces albumin binding and uptake in proximal tubule-derived opossum kidney cells. *J Am Soc Nephrol* **9**: 960–968.
- GEKLE, M., O. K. SERRANO, K. DRUMM, S. MILDENBERGER, R. FREUDINGER, *et al.*, 2002 Nhe3 serves as a molecular tool for camp-mediated regulation of receptor-mediated endocytosis. *Am J Physiol Renal Physiol* **283**: F549–F558.
- GEKLE, M., K. VÖLKER, S. MILDENBERGER, R. FREUDINGER, G. E. SHULL, *et al.*, 2004 Nhe3 na⁺/h⁺ exchanger supports proximal tubular protein reabsorption in vivo. *Am J Physiol Renal Physiol* **287**: F469–73.
- GEKLE, M., S. WÜNSCH, H. OBERLEITHNER, and S. SILBERNAGL, 1994 Characterization of two mdck-cell subtypes as a model system to study principal cell and intercalated cell properties. *Pflugers Arch* **428**: 157–62.
- GELSE, K., E. PÖSCHL, and T. AIGNER, 2003 Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev* **55**: 1531–46.
- GILBERT, R. E., and M. E. COOPER, 1999 The tubulointerstitium in progressive diabetic kidney disease: more than an aftermath of glomerular injury? *Kidney Int* **56**: 1627–1637.
- GILBERT, R. E., A. COX, L. L. WU, T. J. ALLEN, U. L. HULTHEN, *et al.*, 1998 Expression of transforming growth factor-beta1 and type iv collagen in the renal tubulointerstitium in experimental diabetes: effects of ace inhibition. *Diabetes* **47**: 414–422.

- GOVINDEN, R., and K. D. BHOOLA, 2003 Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta. *Pharmacol Ther* **98**: 257–265.
- GROSS, J., and C. M. LAPIERE, 1962 Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* **48**: 1014–1022.
- GRUENBERG, J., and F. R. MAXFIELD, 1995 Membrane transport in the endocytic pathway. *Curr Opin Cell Biol* **7**: 552–563.
- HALLIWELL, B., and M. WHITEMAN, 2004 Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* **142**: 231–255.
- HAMILTON, J. A., S. ERA, S. P. BHAMIDIPATI, and R. G. REED, 1991 Locations of the three primary binding sites for long-chain fatty acids on bovine serum albumin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 2051–4.
- HAN, S. Y., Y. H. JEE, K. H. HAN, Y. S. KANG, H. K. KIM, *et al.*, 2006 An imbalance between matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 contributes to the development of early diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* **21**: 2406–2416.
- HASSLACHER, C., 2007 Protection of renal function in diabetics. *Internist (Berl)* **48**: 686, 688–90, 692 passim.
- HASSLACHER, C., P. KEMPE, and E. RITZ, 2007 Praxisleitlinie diabetische nephropathie. *Diabetologie 2 (Suppl 2)* : 159–162.
- HEERSPINK, H. J. L., J. W. BRINKMAN, S. J. L. BAKKER, R. T. GANSEVOORT, and D. DE ZEEUW, 2006 Update on microalbuminuria as a biomarker in renal and cardiovascular disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **15**: 631–636.
- HEMPEL, S. L., G. R. BUETTNER, Y. Q. O'MALLEY, D. A. WESSELS, and D. M. FLAHERTY, 1999 Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med* **27**: 146–159.
- HILPERT, J., A. NYKJAER, C. JACOBSEN, G. WALLUKAT, R. NIELSEN, *et al.*, 1999 Megalin antagonizes activation of the parathyroid hormone receptor. *J Biol Chem* **274**: 5620–5625.
- IGLESIAS, J., V. E. ABERNETHY, Z. WANG, W. LIEBERTHAL, J. S. KOH, *et al.*, 1999 Albumin is a major serum survival factor for renal tubular cells and macrophages through scavenging of ros. *Am J Physiol* **277**: F711–F722.
- IGLESIAS-DE LA CRUZ, M. C., P. RUIZ-TORRES, J. ALCAMÍ, L. DÍEZ-MARQUÉS, R. ORTEGA-VELÁZQUEZ, *et al.*, 2001 Hydrogen peroxide increases extracellular matrix mrna through tgf-beta in human mesangial cells. *Kidney Int* **59**: 87–95.
- IHM, C. G., G. S. LEE, C. C. NAST, A. ARTISHEVSKY, R. GUILLERMO, *et al.*, 1992 Early increased renal procollagen alpha 1(iv) mrna levels in streptozotocin induced diabetes. *Kidney Int* **41**: 768–777.

- JERUMS, G., S. PANAGIOTOPOULOS, C. TSALAMANDRIS, T. J. ALLEN, R. E. GILBERT, *et al.*, 1997 Why is proteinuria such an important risk factor for progression in clinical trials? *Kidney Int Suppl* **63**: S87–S92.
- KAPUS, A., S. GRINSTEIN, S. WASAN, R. KANDASAMY, and J. ORLOWSKI, 1994 Functional characterization of three isoforms of the na⁺/h⁺ exchanger stably expressed in chinese hamster ovary cells. atp dependence, osmotic sensitivity, and role in cell proliferation. *J Biol Chem* **269**: 23544–23552.
- KERJASCHKI, D., and M. G. FARQUHAR, 1982 The pathogenic antigen of heyman nephritis is a membrane glycoprotein of the renal proximal tubule brush border. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**: 5557–5561.
- KERJASCHKI, D., and M. G. FARQUHAR, 1983 Immunocytochemical localization of the heyman nephritis antigen (gp330) in glomerular epithelial cells of normal lewis rats. *J Exp Med* **157**: 667–686.
- KLAHR, S., 1997 Oxygen radicals and renal diseases. *Miner Electrolyte Metab* **23**: 140–143.
- KLAHR, S., G. SCHREINER, and I. ICHIKAWA, 1988 The progression of renal disease. *N Engl J Med* **318**: 1657–1666.
- KLINKE, R., and S. SILBERNAGL, editors, 2001 *Lehrbuch der Physiologie*. Thieme Stuttgart.
- KORENBERG, J. R., K. M. ARGRAVES, X. N. CHEN, H. TRAN, D. K. STRICKLAND, *et al.*, 1994 Chromosomal localization of human genes for the ldl receptor family member glycoprotein 330 (lrp2) and its associated protein rap (lrpap1). *Genomics* **22**: 88–93.
- KOZYRAKI, R., J. FYFE, M. KRISTIANSEN, C. GERDES, C. JACOBSEN, *et al.*, 1999 The intrinsic factor-vitamin b12 receptor, cubilin, is a high-affinity apolipoprotein a-i receptor facilitating endocytosis of high-density lipoprotein. *Nat Med* **5**: 656–661.
- KOZYRAKI, R., M. KRISTIANSEN, A. SILAHTAROGLU, C. HANSEN, C. JACOBSEN, *et al.*, 1998 The human intrinsic factor-vitamin b12 receptor, cubilin: molecular characterization and chromosomal mapping of the gene to 10p within the autosomal recessive megaloblastic anemia (mga1) region. *Blood* **91**: 3593–3600.
- LEE, H. B., M.-R. YU, Y. YANG, Z. JIANG, and H. HA, 2003 Reactive oxygen species-regulated signaling pathways in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* **14**: S241–S245.
- LEICHT, M., W. BRIEST, A. HÖLZL, and H. G. ZIMMER, 2001 Serum depletion induces cell loss of rat cardiac fibroblasts and increased expression of extracellular matrix proteins in surviving cells. *Cardiovasc Res* **52**: 429–37.
- LÖFFLER, G., and P. E. PETRIDES, editors, 1997 *Biochemie und Pathobiochemie (5th Edition)*. Springer.
- MAACK, T., C. H. PARK, and M. J. F. CAMARGO, 1992 *The Kidney: Physiology and Pathophysiology, D. W. Seldin and G. Giebisch (Ed.)*, chapter Renal

- filtration, transport and metabolism of proteins. New York: Raven, 3005–3038.
- MAKINO, H., K. SHIKATA, J. WIESLANDER, J. WADA, N. KASHIHARA, *et al.*, 1994 Localization of fibril/microfibril and basement membrane collagens in diabetic glomerulosclerosis in type 2 diabetes. *Diabet Med* **11**: 304–311.
- MASON, R. M., and N. A. WAHAB, 2003 Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* **14**: 1358–1373.
- MCLENNAN, S. V., E. FISHER, S. Y. MARTELL, A. K. DEATH, P. F. WILLIAMS, *et al.*, 2000 Effects of glucose on matrix metalloproteinase and plasmin activities in mesangial cells: possible role in diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl* **77**: S81–S87.
- MCLENNAN, S. V., D. J. KELLY, A. J. COX, Z. CAO, J. G. LYONS, *et al.*, 2002 Decreased matrix degradation in diabetic nephropathy: effects of ace inhibition on the expression and activities of matrix metalloproteinases. *Diabetologia* **45**: 268–275.
- MELLMAN, I., R. FUCHS, and A. HELENIUS, 1986 Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu Rev Biochem* **55**: 663–700.
- MEZZANO, S. A., M. BARRÍA, M. A. DROGUETT, M. E. BURGOS, L. G. ARDILES, *et al.*, 2001 Tubular nf-kappab and ap-1 activation in human proteinuric renal disease. *Kidney Int* **60**: 1366–77.
- MOESTRUP, S. K., R. KOZYRAKI, M. KRISTIANSEN, J. H. KAYSEN, H. H. RASMUSSEN, *et al.*, 1998 The intrinsic factor-vitamin b12 receptor and target of teratogenic antibodies is a megalin-binding peripheral membrane protein with homology to developmental proteins. *J Biol Chem* **273**: 5235–5242.
- MOGENSEN, C. E., 1987 Microalbuminuria as a predictor of clinical diabetic nephropathy. *Kidney Int* **31**: 673–689.
- MORIGI, M., D. MACCONI, C. ZOJA, R. DONADELLI, S. BUELLI, *et al.*, 2002 Protein overload-induced nf-kappab activation in proximal tubular cells requires h(2)o(2) through a pkc-dependent pathway. *J Am Soc Nephrol* **13**: 1179–1189.
- MUKHERJEE, S., R. N. GHOSH, and F. R. MAXFIELD, 1997 Endocytosis. *Physiol Rev* **77**: 759–803.
- NIELSEN, R., H. BIRN, S. K. MOESTRUP, M. NIELSEN, P. VERROUST, *et al.*, 1998 Characterization of a kidney proximal tubule cell line, llc-pk1, expressing endocytotic active megalin. *J Am Soc Nephrol* **9**: 1767–1776.
- NOEL, B., 1996 Differential localization of na⁺/h⁺ exchanger isoforms (nhe1 and nhe3) in polarized epithelial cell lines. *J Cell Sci* **109** (Pt 5): 929–939.
- NORMAN, J. T., I. M. CLARK, and P. L. GARCIA, 2000 Hypoxia promotes fibrogenesis in human renal fibroblasts. *Kidney Int* **58**: 2351–2366.
- NYKJAER, A., D. DRAGUN, D. WALTHER, H. VORUM, C. JACOBSEN, *et al.*, 1999 An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(oh) vitamin d3. *Cell* **96**: 507–515.

- ORPHANIDES, C., L. G. FINE, and J. T. NORMAN, 1997 Hypoxia stimulates proximal tubular cell matrix production via a *tgf-beta1*-independent mechanism. *Kidney Int* **52**: 637–647.
- ORTEGA-VELAZQUEZ, R., M. GONZALEZ-RUBIO, M. P. RUIZ-TORRES, M. L. DIEZ-MARQUES, M. C. IGLESIAS, *et al.*, 2004 Collagen i upregulates extracellular matrix gene expression and secretion of *tgf-beta 1* by cultured human mesangial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **286**: C1335–43.
- PARK, I. S., H. KIYOMOTO, S. L. ABBOUD, and H. E. ABBOUD, 1997 Expression of transforming growth factor-beta and type iv collagen in early streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes* **46**: 473–480.
- PETERS, T., 1985 Serum albumin. *Adv Protein Chem* **37**: 161–245.
- POUYSSÉGUR, J., C. SARDET, A. FRANCHI, G. L'ALLEMAIN, and S. PARIS, 1984 A specific mutation abolishing *na⁺/h⁺* antiport activity in hamster fibroblasts precludes growth at neutral and acidic ph. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 4833–7.
- REMUZZI, G., 1995 Abnormal protein traffic through the glomerular barrier induces proximal tubular cell dysfunction and causes renal injury. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **4**: 339–342.
- REMUZZI, G., A. BENIGNI, and A. REMUZZI, 2006 Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. *J Clin Invest* **116**: 288–296.
- REMUZZI, G., P. RUGGENENTI, and A. BENIGNI, 1997 Understanding the nature of renal disease progression. *Kidney Int* **51**: 2–15.
- RITZ, E., R. DIKOW, and L. M. RUILOPE, 2002 Renal dysfunction as a cardiovascular risk factor. *Curr Hypertens Rep* **4**: 365–368.
- ROSSERT, J., C. TERRAZ, and S. DUPONT, 2000 Regulation of type i collagen genes expression. *Nephrol Dial Transplant* **15 Suppl 6**: 66–68.
- RUGGENENTI, P., A. PERNA, L. MOSCONI, R. PISONI, and G. REMUZZI, 1998 Urinary protein excretion rate is the best independent predictor of esrf in non-diabetic proteinuric chronic nephropathies. "gruppo italiano di studi epidemiologici in nefrologia"(gisen). *Kidney Int* **53**: 1209–1216.
- RUSSO, L. M., R. M. SANDOVAL, M. MCKEE, T. M. OSICKA, A. B. COLLINS, *et al.*, 2007 The normal kidney filters nephrotic levels of albumin retrieved by proximal tubule cells: retrieval is disrupted in nephrotic states. *Kidney Int* **71**: 504–513.
- SAHALI, D., N. MULLIEZ, F. CHATELET, R. DUPUIS, P. RONCO, *et al.*, 1988 Characterization of a 280-kd protein restricted to the coated pits of the renal brush border and the epithelial cells of the yolk sac. teratogenic effect of the specific monoclonal antibodies. *J Exp Med* **167**: 213–218.
- SAITO, A., S. PIETROMONACO, A. K. LOO, and M. G. FARQUHAR, 1994 Complete cloning and sequencing of rat *gp330/megalin*, a distinctive member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 9725–

9729.

- SCHWEGLER, J. S., B. HEPPELMANN, S. MILDENBERGER, and S. SILBERNAGL, 1991 Receptor-mediated endocytosis of albumin in cultured opossum kidney cells: a model for proximal tubular protein reabsorption. *Pflugers Arch* **418**: 383–392.
- SEETHARAM, B., E. I. CHRISTENSEN, S. K. MOESTRUP, T. G. HAMMOND, and P. J. VERROUST, 1997 Identification of rat yolk sac target protein of teratogenic antibodies, gp280, as intrinsic factor-cobalamin receptor. *J Clin Invest* **99**: 2317–2322.
- SHANKLAND, S. J., H. LY, K. THAI, and J. W. SCHOLEY, 1996 Glomerular expression of tissue inhibitor of metalloproteinase (timp-1) in normal and diabetic rats. *J Am Soc Nephrol* **7**: 97–104.
- SHUGRUE, C. A., N. OBERMÜLLER, S. BACHMANN, C. W. SLAYMAN, and R. F. REILLY, 1999 Molecular cloning of nhe3 from llc-pk1 cells and localization in pig kidney. *J Am Soc Nephrol* **10**: 1649–57.
- SOYLEMEZOGLU, O., G. WILD, A. J. DALLEY, S. MACNEIL, A. MILFORD-WARD, *et al.*, 1997 Urinary and serum type iii collagen: markers of renal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant* **12**: 1883–1889.
- STERNLICHT, M. D., and Z. WERB, 2001 How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**: 463–516.
- STRUTZ F., M. G. A., 1999 Interstitial pathomechanisms underlying progressive tubulointerstitial damage. *Kidney Blood Press Res* **22**: 71–80.
- THOMAS, M. E., K. P. G. HARRIS, J. WALLS, P. N. FURNESS, and N. J. BRUNSKILL, 2002 Fatty acids exacerbate tubulointerstitial injury in protein-overload proteinuria. *Am J Physiol Renal Physiol* **283**: F640–F647.
- THOMAS, M. E., and G. F. SCHREINER, 1993 Contribution of proteinuria to progressive renal injury: consequences of tubular uptake of fatty acid bearing albumin. *Am J Nephrol* **13**: 385–398.
- TIAN, Y. C., and A. O. PHILLIPS, 2002 Interaction between the transforming growth factor-beta type ii receptor/smad pathway and beta-catenin during transforming growth factor-beta1-mediated adherens junction disassembly. *Am J Pathol* **160**: 1619–1628.
- TOJO, A., and H. ENDOU, 1992 Intrarenal handling of proteins in rats using fractional micropuncture technique. *Am J Physiol* **263**: F601–F606.
- TOJO, A., M. L. ONOZATO, H. HA, H. KURIHARA, T. SAKAI, *et al.*, 2001 Reduced albumin reabsorption in the proximal tubule of early-stage diabetic rats. *Histochem Cell Biol* **116**: 269–276.
- VERROUST, P. J., and R. KOZYRAKI, 2001 The roles of cubilin and megalin, two multiligand receptors, in proximal tubule function: possible implication in the progression of renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **10**: 33–38.

- VISSE, R., and H. NAGASE, 2003 Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* **92**: 827–839.
- VLASSARA, H., 1996 Protein glycation in the kidney: role in diabetes and aging. *Kidney Int* **49**: 1795–1804.
- WANG, S. N., J. LAPAGE, and R. HIRSCHBERG, 2000 Role of glomerular ultrafiltration of growth factors in progressive interstitial fibrosis in diabetic nephropathy. *Kidney Int* **57**: 1002–1014.
- WANG, Y., J. CHEN, L. CHEN, Y. C. TAY, G. K. RANGAN, *et al.*, 1997 Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in proximal tubule cells by urinary protein. *J Am Soc Nephrol* **8**: 1537–1545.
- WILLNOW, T. E., J. HILPERT, S. A. ARMSTRONG, A. ROHLMANN, R. E. HAMMER, *et al.*, 1996 Defective forebrain development in mice lacking gp330/megalin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 8460–8464.
- WOHLFARTH, V., K. DRUMM, S. MILDENBERGER, R. FREUDINGER, and M. GEKLE, 2003 Protein uptake disturbs collagen homeostasis in proximal tubule-derived cells. *Kidney Int Suppl* : S103–S109.
- WOLF, G., 1999 Vasoactive factors and tubulointerstitial injury. *Kidney Blood Press Res* **22**: 62–70.
- WOLF, G., T. HANNKEN, R. SCHROEDER, G. ZAHNER, F. N. ZIYADEH, *et al.*, 2001 Antioxidant treatment induces transcription and expression of transforming growth factor beta in cultured renal proximal tubular cells. *FEBS Lett* **488**: 154–159.
- YARD, B. A., E. CHORIANOPOULOS, D. HERR, and F. J. VAN DER WOUDE, 2001 Regulation of endothelin-1 and transforming growth factor-beta1 production in cultured proximal tubular cells by albumin and heparan sulphate glycosaminoglycans. *Nephrol Dial Transplant* **16**: 1769–1775.
- YU, L., W. A. BORDER, Y. HUANG, and N. A. NOBLE, 2003 Tgf-beta isoforms in renal fibrogenesis. *Kidney Int* **64**: 844–856.
- ZANDI-NEJAD, K., A. A. EDDY, R. J. GLASSOCK, and B. M. BRENNER, 2004 Why is proteinuria an ominous biomarker of progressive kidney disease? *Kidney Int Suppl* : S76–S89.
- ZHAI, X. Y., R. NIELSEN, H. BIRN, K. DRUMM, S. MILDENBERGER, *et al.*, 2000 Cubilin- and megalin-mediated uptake of albumin in cultured proximal tubule cells of opossum kidney. *Kidney Int* **58**: 1523–1533.
- ZHANG, M., A. L. KHO, N. ANILKUMAR, R. CHIBBER, P. J. PAGANO, *et al.*, 2006 Glycated proteins stimulate reactive oxygen species production in cardiac myocytes: involvement of nox2 (gp91phox)-containing nadph oxidase. *Circulation* **113**: 1235–1243.
- ZIYADEH, F. N., D. C. HAN, J. A. COHEN, J. GUO, and M. P. COHEN, 1998 Glycated albumin stimulates fibronectin gene expression in glomerular mesangial cells: involvement of the transforming growth factor-beta system. *Kidney Int*

53: 631–638.

ZIYADEH, F. N., E. R. SNIPES, M. WATANABE, R. J. ALVAREZ, S. GOLDFARB, *et al.*, 1990 High glucose induces cell hypertrophy and stimulates collagen gene transcription in proximal tubule. *Am J Physiol* **259**: F704–F714.

ZOJA, C., A. BENIGNI, and G. REMUZZI, 2004 Cellular responses to protein overload: key event in renal disease progression. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **13**: 31–37.

ZOJA, C., R. DONADELLI, S. COLLEONI, M. FIGLIUZZI, S. BONAZZOLA, *et al.*, 1998 Protein overload stimulates rantes production by proximal tubular cells depending on nf-kappa b activation. *Kidney Int* **53**: 1608–1615.

Danksagung

Ich danke meinem großartigen Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Michael Gekle, dass seine Begeisterung für die Physiologie – insbesondere natürlich die Nierenphysiologie – in seinem Physiologieseminar ansteckend war und ich meine Dissertation bei ihm (im wahrsten Sinne des Wortes) schreiben durfte. Lieber Michael, danke für die Rundumbetreuung meiner Arbeit, Deine immer verfügbare Hilfe und Unterstützung, die anregenden Diskussionen, Deine Ratschläge – auch die fürs Leben -, Deine Geduld (die ich zum Teil auf eine harte Probe gestellt habe), und für Deine fortwährende Begeisterung und Deinen Einsatz im Labor und in der Lehre. Das Abgeben dieser Arbeit ist durchaus mit ein bisschen Wehmut verbunden.

Als nächstes möchte ich mich ganz herzlich bei Sigrid Mildenberger bedanken. Sie hat mich in die Praktiken des Laboralltags eingeführt und stand mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite. Liebe Sigrid, vielen Dank für Deine sofortige Reaktion auf Hilfe(an)rufe, für Dein „Doktorarbeits“-zimmer und die Vorhersage meines Jahresplanes 2010.

Danke an Herrn Prof. Dr. Silbernagl für die Möglichkeit, in seinem Institut wissenschaftlich tätig sein zu dürfen.

Danke an alle Labormitarbeiter. Durch Eure freundliche Aufnahme, Eure Unterstützung, den regelmäßigen Austausch bei einer Tasse Kaffee und Euren Humor hat das „Arbeiten“ sehr viel Spaß gemacht und zum Gelingen beigetragen. Danke besonders an Gerald, der sich selbst den 8. Posterdruck noch aufmerksam angeschaut hat. Danke auch an Christoph, Karina, Ruth, Katharina, Hildegard und Birgit.

Ein ganz dickes Dankeschön geht an Tobi, der jetzt – wer hätte das gedacht - im „richtigen“ Gebäude sitzt. Danke für Deine unermüdliche, selbstlose Hilfe bei der

Entstehung dieser Arbeit und Deiner Fähigkeit, meinen Panikattacken mit einem Augenzwinkern zu begegnen.

Zuletzt danke ich mich meiner Familie: meiner 5 cm größeren Schwester für ihren fortwährenden (Telefon)-Beistand und meinen Eltern, dass sie mir meine Ausbildung und so vieles mehr in meinem Leben ermöglicht haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Verena Maria Wohlfarth
Geburtstag 27.11.1977
Geburtsort Nördlingen

Schulbildung

1984 - 1988 Grundschule Riesbürg-Pflaumloch/Utzmemmingen
1988 - 1997 Theodor-Heuss Gymnasium, Nördlingen, Erlangung der allgemeinen Hochschulreife

Hochschulbildung

11/1997 - 05/2004 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
01.10.2004 Approbation

Berufstätigkeit

seit 09/2004 Assistenzärztin in der Inneren Abteilung/Kardiologie, Klinikum Traunstein

Kongressteilnahmen

09/2001 Nephrologen Kongress (Posterpräsentation), Münster
12/2001 Promomed Kongress (Vortrag), Universität Würzburg
09/2002 Internationaler Nephrologen Kongress (Vortrag), Würzburg
11/2002 European Student's Conference, Charité, Berlin (Posterpräsentation)

Veröffentlichungen

Wohlfarth, V., Drumm, K., Mildenerger, S., Freudinger, R., Gekle, M. (2003). Protein uptake disturbs collagen homeostasis in proximal tubule-derived cells. *Kidney Int Vol 63 (Suppl 84): 103-109.*

Gekle, M., Knaus, P., Nielsen, R., Mildenerger, S., Freudinger, R., Wohlfarth, V., Sauvants, C., Christensen, E. I. (2003). Transforming growth factor- β_1 reduces megalin- and cubilin-mediated endocytosis of albumin in proximal-tubule-derived opossum kidney cells. *J Physiol, 552: 471-481.*

Traunstein, den 20. Februar 2010