

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl

**Induktion von NF- κ B durch Albumin in
immortalisierten humanen proximalen
Tubuluszellen (IHKE-1)**

Inaugural - Dissertation

**zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät**

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Boris Alexander Bauer

aus

Ellwangen

Würzburg, Oktober 2010

Referent: Privat-Dozent Dr. rer. nat. Christoph Sauvant

Koreferent: Professor Dr. med. Eva-Bettina Bröcker

Dekan: Professor Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 08.06.2011

Der Promovend ist Arzt

Sic itur ad astra

1. Einleitung	1
1.1 Die Elimination von Albumin durch die Niere und Funktion des proximalen Tubulus in der Rückresorption	1
1.2 Proteinurie bei Nierenerkrankungen führt zu proinflammatorischen Stimuli	2
1.3 Der Transkriptionsfaktor NF- κ B ist ein wesentlicher Regulator des inflammatorischen Prozesses	3
1.4 Das zentrale proinflammatorische Zytokin TNF- α wird durch NF- κ B reguliert.....	5
1.5 Protein Kinase C und Tyrosin Kinasen sind Regulatoren zytoplasmatischer Signaltransduktionswege in verschiedenen pathologischen Prozessen	6
1.6 Ziel der Studie	7
2. Material und Methoden	9
2.1 Methoden	9
2.1.1 Zellkultur IHKE-1-Zellen	9
2.1.2 Ablauf der Experimente.....	9
2.1.3 Detektion von NF- κ B-, TNF- α - und β -Aktin-spezifischer mRNA in IHKE-1-Zellen	11
2.1.4 RNA-Extraktion	11
2.1.5 Quantitative RNA-Bestimmung.....	12
2.1.6 RT-PCR.....	13
2.1.7 Agarose-Gelelektrophorese	14
2.1.8 NF- κ B spezifische Western-Blot-Analyse	15
2.1.9 Gewinnung des Gesamtproteins aus IHKE-1-Zellen	16
2.1.10 Bestimmung des Proteingehaltes mittels BCA-Test	16
2.1.11 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	17
2.1.12 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran	18
2.1.13 Proteinmarkierung mit Antikörpern.....	18
2.1.14 ECL-Detektion	18
2.1.15 Statistische Analyse	19
2.2. Materialien und Kulturmedien	20
2.2.1 Zellkultur	20
2.2.2 RNA-Extraktion	21
2.2.3 RNA-Messung.....	21
2.2.4 PCR	21
2.2.5 Western Blot	22
3. Ergebnisse	25
3.1 PCR Experimente	25
3.1.1 Abhängigkeit des PCR-Produktes von der Zyklenanzahl der PCR und eingesetzter mRNA-Menge.....	25
3.1.2 NF- κ B mRNA wird in IHKE-1 Zellen durch BSA in Konzentrationen von 50 bzw. 500 mg/l induziert	26

3.1.3 Der Protein-Kinase-C-Inhibitor BIM und der Tyrosin-Kinase-Inhibitor Herbimycin A hemmen unabhängig voneinander die Albumin-induzierte NF- κ B-mRNA Produktion	27
3.1.4 BSA in einer Konzentration von 500mg/l induziert die mRNA-Expression von TNF- α in IHKE-1-Zellen	29
3.2 Western Blot Experimente	30
3.2.1 Die Expression der p50-Untereinheit von NF- κ B wird in IHKE-1 Zellen durch BSA in Konzentrationen von 50 bzw. 500 mg/l induziert	30
3.2.2 Die Induktion der Expression der p50-Untereinheit von NF- κ B in IHKE-1 Zellen durch BSA wird sowohl durch BIM als auch Herbimycin A inhibiert	31
3.2.3 Die Expression der p65-Untereinheit von NF- κ B wird in IHKE-1 Zellen durch BSA in Konzentrationen von 50 bzw. 500 mg/l induziert	34
3.2.4 Die Induktion der Expression der p65-Untereinheit von NF- κ B in IHKE-1 Zellen durch BSA wird sowohl durch BIM als auch Herbimycin A inhibiert	34
4. Diskussion	36
5. Zusammenfassung	43
6. Literaturverzeichnis	45
Danksagung	54
Curriculum vitae	55

1. Einleitung

1.1 Die Elimination von Albumin durch die Niere und Funktion des proximalen Tubulus in der Rückresorption

Albumin ist das im menschlichen Serum mit einer Konzentration von 45 g/l (652×10^{-6} mol/l) quantitativ häufigste Protein und repräsentiert etwa 60% der gesamten Plasmaproteine. Es besitzt ein Molekulargewicht von 69000 Dalton und besteht ultrastrukturell aus neun Schleifen, die durch Disulfidbrücken stabilisiert werden und drei Domänen bilden; die Nettoladungen der einzelnen Teilstücke sind ungleichmäßig über das Molekül verteilt, die Gesamtnettoladung des Proteins beträgt -15. Zu den physiologischen Aufgaben des Albumins gehört unter anderem die Aufrechterhaltung des onkotischen Drucks (Gekle, 1998; Peters, 1985).

Die glomeruläre Filtrationsfraktion des Albumins liegt aufgrund des relativ hohen effektiven Radius des Proteins von 7,5 nm und der negativen Gesamtladung bei nur etwa 0,05-0,1%, entsprechend einer Konzentration von 45 mg/l im glomerulären Ultrafiltrat. Dieser Wert konnte in verschiedenen Mikropunktionsstudien bestätigt werden (Tojo and Endou, 1992). Davon ausgehend, dass die glomeruläre Filtration der gesunden menschlichen Niere täglich etwa 180 Liter beträgt, werden pro Tag etwa 8100 mg Albumin primär filtriert. Hiervon wird der Großteil (etwa 99%) entlang des proximalen Tubulus rückresorbiert und anschließend lysosomal zu einzelnen Aminosäuren oder kleinen Peptiden abgebaut, so dass die Menge des physiologischerweise mit dem Urin ausgeschiedenen Albumins bei etwa 30 mg/Tag liegt (Maunsbach, 1964; Maunsbach, 1966; Tojo and Endou, 1992).

Die Rückresorption des Albumins entlang des proximalen Tubulus erfolgt vorwiegend durch adsorptive Endozytose, einem sättigbaren Prozess, bei dem es im Gegensatz zur unspezifischen flüssig-Phasen-Endozytose zur gezielten Rückresorption des Zielmoleküls kommt, wodurch eine bis zu 20fach höhere Effektivität erreicht wird (Gekle, 1998). Wie für Zellen der Opposum kidney (OK)-Zelllinie gezeigt werden konnte, besteht hierfür im proximalen Tubulus eine spezifisch das Albumin bindende Stelle in der

apikalen Membran der proximalen Tubuluszellen (Schwegler et al., 1991; Gekle, 1998). Darüber hinaus werden weitere an der Endozytose von Albumin beteiligte Proteine diskutiert, wobei ein so genanntes Scavenger-Protein mit einem weiten Spektrum an Liganden aus der Familie der LDL-Rezeptorfamilie eine herausragende Rolle einzunehmen scheint (Cessac-Guillemet et al., 1996; Olson et al., 2008; Christensen et al., 1998). Die Endozytose selbst erfolgt größtenteils durch „clathrin-coated vesicles“ (Brown and Orci, 1986; Rodman et al., 1984) und ist abhängig von einem intakt ausgebildeten Aktin-Zytoskelett (Gekle et al., 1997).

1.2 Proteinurie bei Nierenerkrankungen führt zu proinflammatorischen Stimuli

Der Grad der Proteinurie gilt als prädiktiver Wert bezüglich der Progression chronischer Nierenerkrankungen. Je ausgeprägter die Proteinurie, um so rascher das Fortschreiten der Erkrankung (Remuzzi and Bertani, 1998; Wehrmann et al., 1989). Ein Rückgang der Proteinurie hingegen führt zu einer verlangsamt fortschreitenden Verschlechterung der glomerulären Filtrationsrate (Ruggenenti et al., 1997).

Bei Nierenerkrankungen, die mit einer Proteinurie einhergehen, folgt auf die initiale Schädigung üblicherweise eine progressive Verschlechterung der glomerulären Filtration. Im weiteren Verlauf kommt es, unter anderem durch Erweiterung der Poren der glomerulären Membran zu einer erhöhten glomerulären Filtration von Proteinen (Remuzzi and Bertani, 1998). Dies führt zu einer erhöhten Endozytose der Proteine in die proximalen Tubuluszellen und letzten Endes zu einem nephritogenen Effekt mit Schädigung des Parenchyms, tubulointerstitieller Entzündung, Vernarbung und Niereninsuffizienz (Remuzzi and Bertani, 1998).

Mehrere Studien an Zellmodellen konnten zeigen, dass Albumin in proximalen Tubuluszellen zur Produktion proinflammatorischer Zytokine wie Endothelin-1, RANTES und MCP-1 und deren Exkretion in das basolaterale Kompartiment führt (Zoja et al., 1995; Zoja et al., 1998a).

Darüber hinaus konnte in mehreren Arbeiten die Infiltration von T-Lymphozyten und Monozyten in den tubulointerstitiellen Raum bei verschiedenen chronischen Nierenerkrankungen, die mit Proteinurie einhergehen, gezeigt werden, wie bei den Glomerulopathien, der fokalen Glomerulosklerose und der diabetischen Nephropathie (Mackensen-Haen et al., 1988; Schmitt, 1987; Bohle 1991). Zudem konnte auch die Aktivierung von NF- κ B in proximalen Tubuluszellen nach Proteinüberladung mit Albumin in hoch pathologischen Konzentrationen gezeigt werden (Zoja et al., 1998b).

1.3 Der Transkriptionsfaktor NF- κ B ist ein wesentlicher Regulator des inflammatorischen Prozesses

Nuklear Faktor κ B (NF- κ B) ist ein ubiquitär vorhandener Transkriptionsfaktor aus der Rel-Familie, der sowohl unter physiologischen wie unter pathologischen Bedingungen (z.B. bei chronisch entzündlichen Erkrankungen) die Expression verschiedener Genprodukte, einschließlich verschiedener proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-1 β , Chemokinen, Wachstumsfaktoren, Zelladhäsionsmolekülen, induzierbaren Enzymen wie iNOS und COX-2 sowie einzelner akute-Phase-Proteinen reguliert. Er ist hierdurch an der Initiierung inflammatorischer Vorgänge und dem Entstehen effektiver Immunantworten beteiligt (van den Berg et al., 2001; Wullaert et al., 2006).

Zu den Aktivatoren von NF- κ B zählt ein breites Spektrum von Mediatoren wie Zytokinen, Aktivatoren der Protein Kinase C (Trushin et al., 1999), freien Sauerstoffradikalen, ultravioletter Strahlung und bakteriellen oder viralen Produkten. Eine unverhältnismäßige Aktivierung von NF- κ B bei verschiedenen inflammatorischen Erkrankungen wie der Autoimmunhepatitis, Glomerulonephritis und Atherosklerose wurde beschrieben (Barnes and Karin, 1997).

NF- κ B ist als Dimer aufgebaut, das aus den Untereinheiten RelA/p65 (im weiteren p65 genannt), p50 (abgespalten aus dem Vorläuferprotein p105), p52, c-Rel oder RelB bestehen kann. Kristalline Strukturen konnten für Homodimere gewonnen werden, die aus p50, p52 und p65 bestehen sowie

für p65/p50 Heterodimere. In Säugetieren konnten unter den Rel-Proteinen nur für p65 und c-Rel potente Transkriptions-aktivierende Abschnitte nachgewiesen werden. Für Dimere, die lediglich aus Rel-Proteinen ohne Transkriptions-aktivierende Abschnitte, wie p50, bestehen, wird eine Transkriptions-hemmende Aktivität angenommen. Für die verschiedenen Dimere konnten unterschiedliche physiologische Funktionen nachgewiesen werden, wobei sich lediglich p65 als überlebensnotwendig erwies. Erstmals beschrieben wurde NF- κ B als p65-p50 Dimer; da dieser Komplex zudem in den meisten Zelltypen am weitesten verbreitet ist, wird er von vielen Autoren als der prototypische betrachtet (Baeuerle, 1998; Gomez-Garre et al., 2001; Rogler et al., 1998, Karin et Ben-Neriah, 2000). In unserer Studie wurde die mRNA- und Proteinexpression dieser prototypischen Untereinheiten p50 und p65 untersucht.

NF- κ B liegt im Zytosol als inaktive Form an inhibitorische Proteine (I κ B) gebunden vor. Nach Aktivierung des Transkriptionsfaktors kommt es zu einer raschen Phosphorylierung von I κ B durch das Enzym I κ B-Kinase (IKK), gefolgt von der Polyubiquinisation (Baeuerle, 1998; Wullaert et al., 2006) und der anschließenden Degradierung des Proteins durch Proteasomen (Baeuerle, 1998; Li et al., 1999). Es folgt die Translokation des hierdurch unmaskierten Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Zellkern, wo er sich an seine Zielstrukturen in regulatorischen DNA-Abschnitten anlegt. Hiervon abhängig erfolgt die Transkription der oben aufgeführten Genprodukte.

I κ B wird nach der Degradierung rasch nachsynthetisiert und kann nach Translokation in den Zellkern NF- κ B von der DNA lösen. Der inaktive NF- κ B-I κ B-Komplex wird in das Zytosol rücktransportiert, womit sich der Aktivierungs-/ Inaktivierungszyklus schließt (Baeuerle, 1998) (Fig. 1).

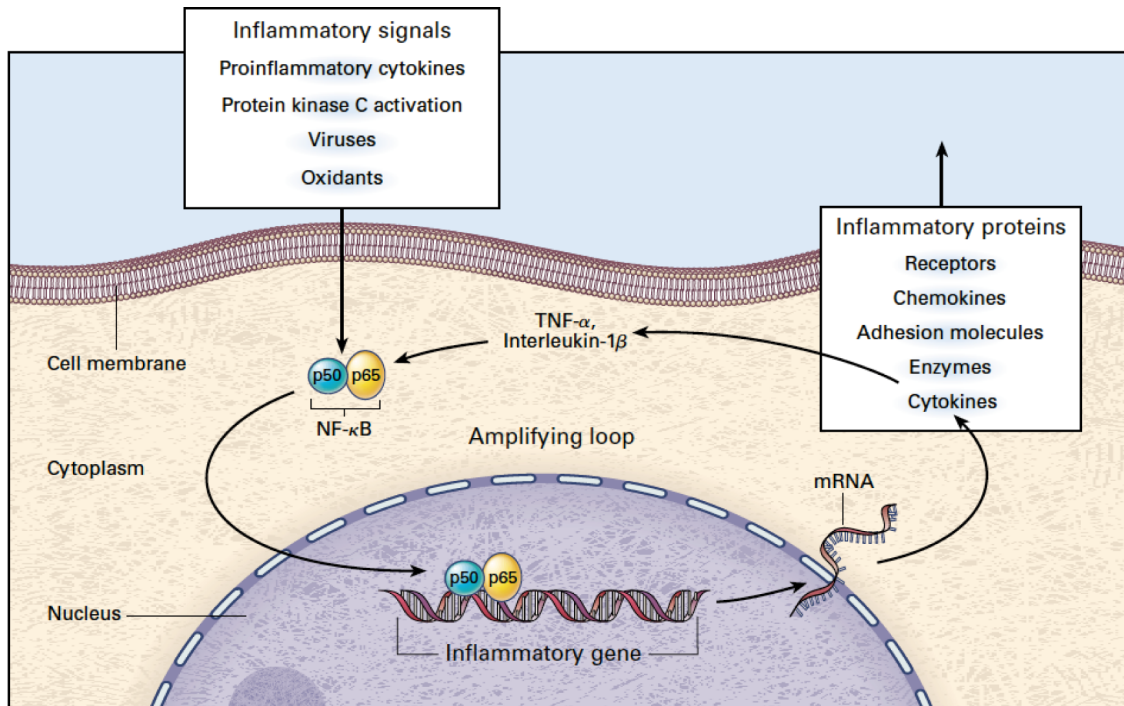


Fig. 1. Schematische Darstellung der inflammatorischen Regulation durch NF- κ B. Aktivierung kann durch eine Vielzahl inflammatorischer Signale geschehen, es folgt die koordinierte Expression der Gene verschiedener Zytokine, Chemokine, Enzyme und Adhäsionsmoleküle. TNF- α führt zu einer positiven Feedback-Schleife (nach Barnes and Karin, 1997)

1.4 Das zentrale proinflammatorische Zytokin TNF- α wird durch NF- κ B reguliert

Ein wesentliches proinflammatorisches Zytokin, dessen Expression durch NF- κ B reguliert wird, ist der Tumornekrosefaktor α (TNF- α). TNF- α fördert seine eigene Transkription durch Aktivierung von NF- κ B. Er ist ein proinflammatorisches Zytokin, das unter anderem mit dem septischen Schock, Ischämie-Reperfusionen-Verletzung und Endorganschäden assoziiert ist (Donnahoo et al., 1999; Meldrum and Donnahoo, 1999). Bei der Infiltration peripherer Granulozyten in glomeruläre Mesangiumzellen und renale Tubuluszellen wurde die renale Produktion von TNF- α beschrieben (Giroir et al., 1992; Kita et al., 1993). In der Niere wird TNF- α auch als Antwort auf oxidativen Stress, Endotoxine, Interleukin oder TNF- α selbst produziert (Meldrum and Donnahoo, 1999; Boswell et al., 1994; Donnahoo et al., 2001;

Kita et al., 1993; Meldrum and Donnan, 1999; von Schnakenburg et al., 2002). Durch TNF- α wird dabei die transepitheliale Permeabilität erhöht, die Apoptose gefördert und tubuläre Nekrose induziert (Donnan et al., 1999; Meldrum and Donnan, 1999; Mullin et al., 1992b; Tveito et al., 1989).

1.5 Protein Kinase C und Tyrosin Kinasen sind Regulatoren zytoplasmatischer Signaltransduktionswege in verschiedenen pathologischen Prozessen

Die Kalzium- und Phospholipid abhängige Serin- / Threoninkinase Protein Kinase C ist ein in mehreren Isoformen vorliegendes zytoplasmatisches Enzym, das an einer hohen Anzahl von Signaltransduktionsprozessen beteiligt ist, wobei es unter anderem eine kritische Rolle bei der Regulierung von Proliferation, Differenzierung und Apoptose verschiedener Gewebe einnimmt (Hoffmann et al., 1997). Die Aktivierung der Protein Kinase C wurde mit Hyperfiltration der Niere, Verdickung der Basalmembran und Glomerulosklerose in Verbindung gebracht (Koya D et al 1998). Bisindolylmaleimid (BIM), ein Abkömmling des nicht spezifischen Protein-Kinase-Inhibitors Staurosporin stellt einen selektiven Inhibitor der Protein Kinase C dar (Wilkinson et al., 1993).

Tyrosin Kinasen sind an einer Vielzahl von pathophysiologischen Prozessen einschließlich verschiedener inflammatorischer Prozesse beteiligt. Unter anderem konnte im Rattenmodell die IL-1 β -vermittelte Aktivierung induzierbarer NO-Synthase in Mesangiumzellen gezeigt werden (Toshifumi 1995). Die Tyrosin Kinase kann spezifisch durch Herbimycin A gehemmt werden (Uehara et al., 1991).

Sowohl für Protein Kinase C als auch für Tyrosin Kinase konnte in Zellen der Opposum-kidney (OK)-Zelllinie ein regulatorischer Effekt auf die späte Phase der Endozytose von Albumin gezeigt werden, wobei sowohl eine Stimulierung der Protein Kinase C wie auch der Tyrosin Kinase zu einer Verminderung der Netto-Aufnahme von Albumin in die Zelle führt (Gekle et al, 1995; Gekle et al, 1997; Gekle, 1998).

1.6 Ziel der Studie

Die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren mit nachfolgender Expression fibrinogener Zytokine und Chemokine und daraus resultierende tubulointerstitielle Schäden im Zusammenhang mit massiver Proteinüberladung und hohen pathophysiologischen Konzentrationen von Albumin im glomerulären Filtrat konnte im Vorfeld unserer Arbeit in mehreren Studien sowohl in vitro wie in vivo gezeigt werden (Gomez-Garre et al., 2001; Mezzano et al., 2001; Morigi et al., 2002). Im Gegensatz zu den dabei untersuchten Konzentrationen liegt die physiologische Konzentration von Albumin im glomerulären Filtrat im Bereich nur einiger mg pro Liter (Drumm et al., 2001; Tojo and Endou, 1992). Die Auswirkungen von Albumin in physiologischen bis niedrig pathophysiologischen Konzentrationen auf proximale Tubuluszellen in Bezug auf potentiell relevante inflammatorische und fibrinogene renale Pathomechanismen sollten in der vorliegenden Studie erstmalig untersucht werden. Dies war deshalb von Interesse, weil Albumin in vivo in frühen Stadien des glomerulären Schadens (mit nur leicht erhöhter Proteinfiltration) zu einer nur leichten Erhöhung der proximal tubulären Albuminkonzentration führt (Remuzzi, G. et Bertani, T., 1998).

Ziel der Studie war es zu untersuchen, i) ob gering erhöhte Albuminkonzentrationen die Expression von NF- κ B induzieren können, ii) ob eine gering erhöhte Albuminkonzentration zu weiteren proinflammatorischen Signalen in proximalen Tubuluszellen führt und iii) in wie weit Protein Kinase C und Tyrosin Kinase diesen pathophysiologischen Prozess regulieren.

Hierfür führten wir zum Nachweis NF- κ B-spezifischer messenger Ribonukleinsäure (mRNA) Untersuchungen mit der Reversen Transkriptase – Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) und zum Nachweis NF- κ B-Proteins Western-Blot-Analysen durch. Zudem wurden TNF- α -spezifische RT-PCR-Untersuchungen durchgeführt. Die Untersuchungen erfolgten nach Exposition der verwendeten Zellen mit Albumin in Konzentrationen von 50 oder 500mg/l BSA, zum Teil in Anwesenheit spezifischer Inhibitoren der Protein Kinase C und Tyrosin Kinase. Diese Konzentrationen wurden repräsentativ für eine nahezu physiologische beziehungsweise pathophysiologische Situation

gewählt, wie sie im oben beschriebenen frühen Stadium des glomerulären Schadens vorkommen (Gekle, 1998, Drumm K et al, 2001).

In der vorliegenden Studie wurde die IHKE-1-Zelllinie als Zellmodell benutzt (Tveito et al., 1989), da diese Zelllinie die endozytische Aufnahme von FITC-markiertem Albumin als eine charakteristische Eigenschaft renaler proximaler Tubuluszellen zeigt (Drumm et al., 2001).

2. Material und Methoden

2.1 Methoden

2.1.1 Zellkultur IHKE-1-Zellen

Die immortalisierten Human Epithelial Kidney-1 Zellen (IHKE-1) wurden freundlicherweise von Dr. Mollerup (Institut für Toxikologie, Oslo, Norwegen) zur Verfügung gestellt. Als Kulturmedium wurde DMEM/Ham F12 mit einem pH-Wert von 7,4 verwendet. Die Zellen wurden im Inkubator in Zellkulturflaschen von Falcon über sechs Tage in einer 37°C, 95 % Luft, 5 % CO₂-Atmosphäre zu einem konfluentem Monolayer kultiviert. Das Wachstum wurde regelmäßig mikroskopisch kontrolliert. Konfluente Monolayer wurden einmal pro Woche durch die Zugabe von EDTA-Lösung zur Bindung von Ca²⁺-Ionen aus dem Extrazellularraum aus den Kulturflaschen gelöst, gefolgt von 10minütiger Trypsinierung (mit Trypsin 0.25 g/l) in Ca²⁺- and Mg²⁺-freier, EDTA-haltiger Ringerlösung und anschließendem vorsichtigen Schütteln. Zugabe von Kulturmedium stoppte die Trypsinwirkung, um die Zellen nach dem Lösen aus der Flasche nicht zu schädigen. Etwa 1/10 der Zellen wurde zur Anlage der nächsten Passage in eine neue Zellkulturflasche überführt, die übrigen Zellen wurden zur Durchführung der Versuche auf Petrischalen ausgesät. Hierfür wurde die Zelllösung mehrmals sorgfältig mit einer Pipette suspendiert, um die einzelnen Zellen weitgehend voneinander zu lösen. Zu den frisch aufgebrauchten Zellen wurde erneut DMEM HAM F12 als Nährmedium zugegeben.

2.1.2 Ablauf der Experimente

Zur Frage, ob Albumin in niedrigen Konzentrationen die Expression von NF- κ B induzieren kann, wurden IHKE-1 Zellen mit bovinem Serumalbumin (BSA)

in einer Konzentration von 50 mg/l (in HEPES pH 7,4 bei Raumtemperatur) bzw. 500 mg/l (in HEPES pH 7,4 bei Raumtemperatur) über 90 Minuten exponiert und die Menge produzierter NF- κ B-mRNA wie unten beschrieben semiquantitativ bestimmt. Zur Durchführung der Versuche wurden die Zellen auf die pro Versuchsanordnung notwendige Anzahl von Petrischalen aufgebracht und in der oben aufgeführten Atmosphäre bis zur Ausbildung eines konfluenten Monolayers über 4-5 Tage inkubiert. Konfluenz ist Voraussetzung für die Versuche, da sich erst durch Ausbildung der Zell-Zell-Kontakte die vollständige Differenzierung der Zellen herausbildet. Vor Durchführung der Experimente wurden die Zellen nach der Ausbildung des Monolayers zunächst über 48 Stunden in Serum-freiem Medium (MEM, siehe unten) gehalten. Hierdurch wurden die Zellen in die gleiche Phase des Zellzyklus synchronisiert.

Vor Durchführung der Albuminexpositionsexperimente zur RT-PCR wurden die Zellen 3x sauer gewaschen (HEPES pH 6,0) und anschließend wie oben beschrieben über 90 Minuten mit BSA exponiert.

Zur Negativkontrolle wurde in jedem Versuchsansatz eine Petrischale mit BSA-freiem HEPES-Ringer (pH 7,4), zur Positivkontrolle eine Petrischale mit Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), einem Superinducer von NF- κ B in einer Konzentration von 2 μ M in HEPES-Ringer (pH 7,4) exponiert.

Um den Einfluss von Protein Kinase C und Tyrosin Kinase auf die Induktion von NF- κ B zu untersuchen wurde ein Teil der Experimente in Anwesenheit des Protein-Kinase-C-Inhibitors BIM in einer Konzentration von 200 nmol/l beziehungsweise des Tyrosin-Kinase-Inhibitors Herbimycin A in einer Konzentration von 1 μ mol/l durchgeführt.

Um weiterhin die Hypothese zu überprüfen, ob Albumin inflammatorische Pathomechanismen in proximalen Tubuluszellen induziert, wurde die TNF- α -spezifische mRNA-Expression als mit der NF- κ B Aktivität assoziiertem biologischem inflammatorischem Parameter analysiert. Nach 90minütiger Inkubation der Zellen mit 50 beziehungsweise 500 mg/l BSA wurde die TNF- α -spezifische mRNA-Expression durch semiquantitative RT-PCR analysiert.

Um die Induktion der Proteinexpression von NF- κ B durch Albumin und den Einflusses der Protein Kinase C und der Tyrosin Kinase auf die Albumin-induzierte NF- κ B Protein-Expression zu überprüfen, wurden IHKE-1-Zellen

über 12 Stunden mit BSA in Konzentrationen von 50 beziehungsweise 500 mg/l exponiert, teils unter Zugabe der spezifischen Inhibitoren BIM in einer Konzentration von 200 nmol/l beziehungsweise Herbigimycin A in einer Konzentration von 1 µmol/l.

2.1.3 Detektion von NF-κB-, TNF-α- und β-Aktin-spezifischer mRNA in IHKE-1-Zellen

Nach 90minütiger Inkubation der IHKE-1-Zellen mit BSA in Konzentrationen von 50 beziehungsweise 500 mg/l +/- 200 nmol/l BIM oder 1µmol/l Herbigimycin A wurde die Menge von NF-κB (p105 = Vorläufer des p50)- und TNF-α-spezifischer mRNA durch semiquantitative RT-PCR bestimmt. Nach Voruntersuchungen zeigte sich nach diesem Inkubationszeitraum eine stabile maximale Expression der TNFα-spezifischen mRNA (Daten nicht gezeigt). Um die Menge an exprimierter spezifischer mRNA auf einen Standard normalisieren zu können, wurde gleichzeitig die Expression des konstitutiv exprimierten Proteins β-Aktin gemessen und als endogener Standard der mRNA-Expression der Zellen verwendet.

2.1.4 RNA-Extraktion

Die vollständige RNA der in den Experimenten verwendeten IHKE-1-Zellen wurde nach der von Chomzinsky und Sacchi beschriebenen Methode der Phenol-Chloroform-Fällung extrahiert (Chomczynski P, Sacchi N, 1987). Die Zellen wurden mit 1ml Trizol pro 10 cm² Zellrasen lysiert und das entstandene Lysat mit der Pipette aufgenommen. Das Trizol-Reagenz ist ein kommerziell erhältliches Reagenz zur RNA-Extraktion und besteht aus Phenol zur Protein- und Nukleinsäurefällung, Guanidiniumisothiocyanat zur Zelllyse und Natriumacetat zur Pufferung im Sauren. Das Lysat wurde 20 Sekunden mit der Vortex-Maschine geschüttelt, um die Nukleoproteinkomplexe zu lösen und anschließend über 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach

erfolgte die Fällung der Proteine und Nukleinsäuren mit Chloroform und anschließende Zentrifugation bei 12000 rpm über 15 Minuten zur Phasentrennung, durch die sich das Homogenisat in eine untere, organische Phenol-Chloroform-Phase, eine häutchenartige Interphase und eine obere, klare, wässrige Phase auftrennen lies. Die untere, organische Phase und die Interphase enthalten Proteine und DNA, die wässrige Phase die Gesamt-RNA. Die wässrige Phase mit der enthaltenden Gesamt-RNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und im Verhältnis 1:1 in Isopropanol aufgenommen. Nach kurzem Schütteln mit der Vortex-Maschine wurde der Ansatz über 60 Minuten bei -20°C ausgefällt und über 15 Minuten bei 4°C und 12000 rpm zentrifugiert, wodurch sich ein gelblich-trübes RNA-Pellet bildete. Dieses wurde mit 1 ml 75 %-igem Ethanol gewaschen, durch eine weitere 20-minütige Zentrifugation bei 4°C und 12000 rpm getrocknet und in ca. 30 ml Aqua bidest. aufgenommen.

2.1.5 Quantitative RNA-Bestimmung

Um bei jeder in der Folge durchgeführten PCR die gleiche Ausgangsmenge an eingesetzter mRNA garantieren zu können, war es notwendig, die Menge der im einzelnen Experiment gewonnenen RNA zu bestimmen. Dazu wurde die optische Dichte einer 1:50 verdünnten Probe in einer Quarzküvette photometrisch bestimmt (Spekol-UV-VIS, Fa. ZEISS). Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm. Eine OD (optische Dichte)-Einheit bei 260 nm entspricht in etwa 30 µg RNA, daraus errechnet sich die RNA-Konzentration folgendermaßen:

$$\text{OD}_{260} \times \text{Verdünnung} \times 30 = [\mu\text{g RNA} / \text{ml}]$$

Setzt man die OD₂₆₀ in Relation zur OD₂₈₀, so lässt ein Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ von 1,8 - 2,0 auf saubere RNA-Isolationsproben schließen (Mülhardt,2009).

2.1.6 RT-PCR

Zur Umwandlung von mRNA in Desoxyribonukleinsäure (DNA) und daran anschließender exponentieller Vermehrung der gewonnenen DNA wurde die Methode der RT-PCR (Reverse Transkriptase – Polymerase Chain Reaktion) eingesetzt. Die RT-PCR wurde mit dem kommerziell erhältlichen Superscript One-Step RT-PCR System von Gibco (Gibco BRL, Deutschland) durchgeführt.

In einem ersten 30minütigen Schritt bei 45°C wird mittels der aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* gewonnenen reversen Transkriptase cDNA komplementär zu der im Ansatz eingebrachten mRNA synthetisiert; diese wird in mehreren darauf folgenden Zyklen exponentiell vermehrt, wobei sich in jedem einzelnen Zyklus die zu Anfang des Zyklus vorhandene DNA nahezu verdoppelt. Nacheinander werden in jedem Zyklus die Schritte Denaturierung, Annealing (Anheften der Oligonukleotid-Primer) und Extension durchlaufen. In der ersten Phase (Denaturierung; 15 Sekunden bei 94°C) trennt sich die gegenläufige Doppelstrang-DNA thermisch induziert in zwei Einzelstränge auf, an die sich im zweiten Schritt (Annealing; 30 Sekunden bei 55°C) zunächst die Primer, kurze Abschnitte von komplementärer DNA, an ihre jeweiligen Zielstrukturen auf der DNA binden. Im letzten Schritt (Extension; 60 Sekunden bei 68°C) werden die Primer durch das Enzym Polymerase mit im Reaktionsansatz vorhandenen einzelnen Nukleotiden verlängert, so dass neue doppelsträngige Teilabschnitte der gewünschten Ziel-DNA synthetisiert werden.

Um ein Eintreten in den Sättigungsbereich (log-Phase) der PCR zu vermeiden, in der die Ergebnisse nicht mehr vergleichbar sind, wurden vor Beginn der Experimente Testreihen mit unterschiedlicher Anzahl von PCR-Zyklen (0, 18, 21, 24, 26 und 28 Zyklen) durchgeführt; eine Zyklenzahl von 24 erwies sich als optimal. Anschließend führten wir auch eine Testreihe mit unterschiedlichen Mengen an initial eingesetzter mRNA (0; 0,5; 1; 1,5; 2mg extrahierter IHKE-1-Zell-mRNA) durch. Die am besten interpretierbaren Werte zeigten sich bei 0,5mg initial eingesetzter mRNA.

Bei allen Experimenten wurde eine Kontroll-PCR ohne cDNA durchgeführt, um Verunreinigungen auszuschließen.

Um die unerwünschte Amplifikation genomischer DNA zu vermeiden wurden Primer verwendet, die in der genomischen DNA durch ein Intron getrennt sind.

Primer-Sequenzen:

NF- κ B:

5': 5'-AGT CAG ATT TCC TCC GAA GC-3'

3': 5'-ATA GCA CTG GCA GCT TCA CA-3'

TNF- α :

5': 5'-GAG TGA CAA GCC TGT AGC CCA TGT TGT AG-3'

3':5'-GCA ATG ATC CCA AAG TAG ACC TGC CCA GA-3'

β -Aktin:

5': 5'-TCC TGT GGC ATC CAC GAA ACT-3'

3': 5'-GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT-3'

2.1.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Produkte der RT-PCR wurden mittels der Agarose-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Um ein 1%-iges Agarosegel zu erhalten, wurden 0,6g Agarosepulver in 60 ml 0,5xTBE-Puffer gelöst. Zur Beschleunigung dieses Prozesses wurde das Gemisch in einem Erlenmeyerkolben etwa eine Minute in einem Mikrowellenofen erhitzt, ohne den Siedepunkt zu erreichen. Anschließend wurde das flüssige Agarosegel in eine Gelkammer gegossen und härtete durch Abkühlen aus. Durch das Einbringen eines Gelkamms in das flüssige Gel wurden Taschen geschaffen, in die nun 10 μ l der aufzutrennenden Proben eingebracht werden konnten. Ein in die erste Geltasche eingebrachter DNA-Längenstandard ließ Rückschlüsse auf die Länge der in die anderen Taschen eingebrachten Proben zu. Die Auftrennung der Proben erfolgte durch Elektrophorese bei 80mv in Tris-

Acetat-EDTA-Puffer als Ladepuffer und führte nach 60 Minuten zu einer ausreichenden Auftrennung der DNA-Fragmente.

Um die DNA zur Auswertung optisch darzustellen wurden dem Ladepuffer der Gelkammer 10 µl Ethidiumbromid beigefügt, welches sich an die DNA anlegt und im UV-Licht orangefarben fluoresziert, wodurch diese im UV-Transluminator als Bande erkenntlich wird.

Zur Dokumentation wurden die Gele im UV-Transluminator mit einer Polaroid Sofortbildkamera fotografiert; anschließend wurden die Gele gesondert im Ethidiumbromidmüll entsorgt.

2.1.8 NF-κB spezifische Western-Blot-Analyse

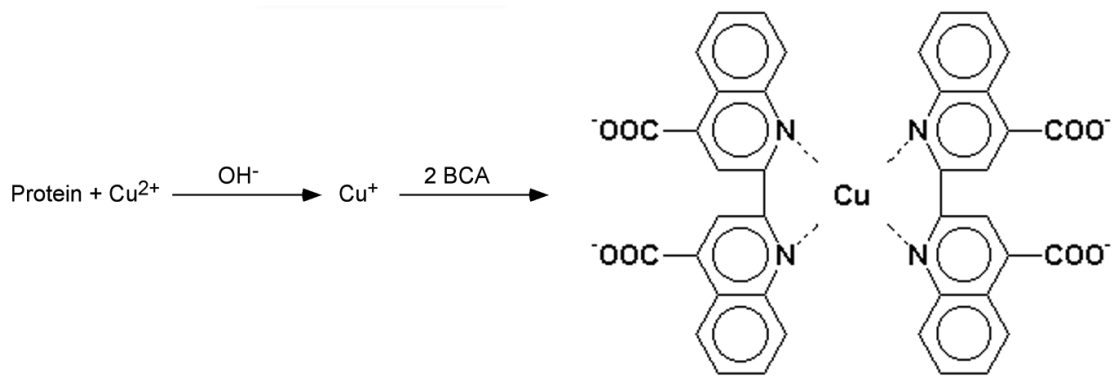
Um die Ergebnisse der Experimente auf Proteinebene zu verifizieren wurde die Western-Blot-Analyse durchgeführt. IHKE-1-Zellen wurden zu voller Konfluenz kultiviert und nach einem 48stündigem Intervall in Serum-freiem Medium (MEM, siehe unten) mit 50 beziehungsweise 500 mg/l BSA +/- 200 nmol BIM oder 1µmol Herbimycin A für bis zu 12 Stunden inkubiert, anschließend lysiert und das gewonnene Gesamtprotein in Laemmli Puffer gelöst. Nach Auftrennung des Proteins in Einzelfractionen durch SDS-Gel-Elektrophorese und Übertragen des Proteins auf Nitrozellulosemembran inkubierten wir mit Erstantikörpern gegen die p50- sowie die p65-Untereinheit von NF-κB, die in einem zweiten Schritt durch Inkubation mit einem an das Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelten Zweitantikörper detektiert werden konnten. Durch Umsetzen des ECL-Reagenzes durch die Meerrettichperoxidase entsteht Emission von Luminiszenz, die einen aufgelegten Röntgenfilm belichtete und so die antigengekoppelten Proteinprobenbanden semiquantitativ sichtbar machte.

2.1.9 Gewinnung des Gesamtproteins aus IHKE-1-Zellen

IHKE-1-Zellen wurden zu voller Konfluenz kultiviert und nach einem 48stündigen Intervall in Serum-freiem Medium (MEM, siehe unten) mit 50 beziehungsweise 500 mg/l BSA +/- 200 nmol BIM oder 1 µmol Herbimycin A über 12 Stunden inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation wurden die Zellen zweimalig auf Eis bei 4° C mit PBS gewaschen, anschließend mit Zellysepuffer unter Verwendung eines Zellscrapers aus den Schalen gelöst und lysiert und anschließend mit 13000 rpm über 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in frische Tubes zur anschließenden Proteinbestimmung überführt, das verbliebene Zellpellet verworfen.

2.1.10 Bestimmung des Proteingehaltes mittels BCA-Test

Zur Normierung der im Western Blot eingesetzten Proteingesamtmenge wurde der Proteingehalt der Proben nach der BCA-Methode bestimmt. Der Nachweis beruht darauf, dass Proteine mit Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex bilden (Biuret-Reaktion). Die Cu^{2+} -Ionen dieses Komplexes werden zu Cu^{+} -Ionen reduziert, die mit Bichinon-Säure (BCA) einen violetten Farbkomplex bilden. Die Absorption dieses Farbkomplexes wird bei 560 nm gemessen. Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurden jeweils 15 µl der Probe in eine Vertiefung einer 96-well-Platte pipettiert und mit 300µl des BCA-Reagenz gemischt. Die Proben wurden über 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert und anschließend bei einer Wellenlänge von 560nm im Victor2-Counter gemessen. Mittels einer Eichkurve mit Testlösungen, die standardisierte Proteinkonzentrationen enthalten, wurde der Proteingehalt der Proben bestimmt.



2.1.11 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proteine wurde die Sodiumdodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)-Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt. Durch das SDS werden die Proteine denaturiert und die Aminosäureladungen durch generelle Negativierung maskiert, wodurch die Auftrennung des Proteingemisches in der Elektrophorese nur in Abhängigkeit von Größe und Masse, jedoch nicht von der elektrischen Ladung erfolgt.

Nach Vermischen der Substanzen des 11%igen Trenngels wurde dieses in die vorbereitete Gelkammer pipettiert; nach Aushärten wurde in gleicher Weise das 3%ige Sammelgel auf das Trenngel gegeben und ein Gelkamm eingebracht, um die zur Einbringung der Proben nötigen Taschen zu schaffen. Nach Aushärtung wurde das Gel in das Elektrophoresegerät (Biorad) eingebaut. Nach Vermischung von 30µg totalem Protein mit Probenpuffer im Verhältniss von 1:4 und Erhitzen auf 95° C über 10 Minuten zur Denaturierung, um Sekundär- und Tertiärstrukturen durch Unterbrechen der Wasserstoffbrücken aufzurechen, wurden die Taschen mit dem Proben / Probenpuffergemisch beladen. Eine separate Tasche wurde mit Biorad prestained SDS-PAGE Standard Low Range Leiter zur Skalierung der Massengröße beladen. Zum Sammeln der Proteine lief das Gel zunächst über 30 Minuten bei 220 V / 10 mA, zur Auftrennung wurde der Stromfluss im Anschluss über 90 Minuten auf 220 V / 20mA erhöht.

2.1.12 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran

Zur Übertragung der Proteinbanden auf Nitrozellulose wurden 6 Whatmann-Papierschichten in Transferpuffer equilibriert und jeweils 3 auf die beiden Grafitflächenelektroden des Blottinggerätes gelegt. Zwischen die Filterpapiere wurde eine Nitrozellulosemembran auf das SDS-Gel so aufgelegt, dass die negativ geladenen Proteine durch die anschließend über 60 Minuten angelegte Spannung bei einem Stromfluss von $2\text{mA}/\text{cm}^2$ aus dem Gel in Richtung der Kathode auf die Nitrozellulosemembran transferiert wurden.

2.1.13 Proteinmarkierung mit Antikörpern

Durch Vorinkubation mit Blockierlösung über 2 Stunden wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran abgesättigt. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran zunächst einmalig mit PBS/Tween 0,05% über 15 Minuten und zweimalig mit PBS/Tween 0,05% über jeweils 5 Minuten gewaschen. Anschließend wurde mit den Erstantikörpern gegen humanes NF- κ B p50 und p65 in Antikörperverdünnungslösung (1:1000) über 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem erneuten Waschvorgang wie oben beschrieben erfolgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper 1:20000 verdünnt über 1,5 Stunden bei Raumtemperatur. Durch erneute Waschung wurden überschüssige Antikörper entfernt.

2.1.14 ECL-Detektion

Die Detektion der Zweitantikörper fand im Fotolabor bei Rotlicht statt. Die Nitrozellulosemembran wurde über 60 Sekunden mit ECL-Reagenz ($70\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$) befeuchtet und anschließend in handelsübliche Frischhaltefolie eingeschlagen. Anschließend wurde die Membran mit leichtem Druck in einer Photoplatte einem Röntgenfilm angelegt. Die mit dem Zweitantikörper konjugierte Meerrettichperoxidase katalysiert die Umsetzung des ECL-Reagenz, wodurch im Bereich der Antikörper-markierten Proteinbanden eine

Luminiszenz entsteht, die den Röntgenfilm an den entsprechenden anliegenden Stellen belichtet. Belichtung fand über 30 Sekunden bis 10 Minuten statt. Nach Entwicklung und Fixierung fanden sich die mit den Antikörpern gegen p50 und p65 markierten Proteinbanden der Nitrozellulosemembran als schwarze Banden auf dem Röntgenfilm abgebildet.

2.1.15 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit der Prophet 5.0 Software durchgeführt.

Die Daten wurden auf Normalverteilung überprüft und die ANOVA Analyse gefolgt vom post-hoc-Vergleich der Mittelwerte durchgeführt.

Zur semiquantitativen Analyse der PCR-Ergebnisse und der Western Blot-Ergebnisse wurden die Rohdaten mit einem optischen Scanner (Canon) eingescannt und zur Normalisierung in Prozentanteile der internen Kontrollwerte für jedes Experiment transformiert. Für die PCR-Ergebnisse wurden die Ergebnisse an β -Aktin als Standard für die totale RNA-Beladung angeglichen.

Die Daten wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung angegeben. P-Werte von $p < 0,05$ wurden als signifikant angesehen.

2.2. Materialien und Kulturmedien

2.2.1 Zellkultur

Zellen: IHKE-1 (Immortalized Human Epithelial Kidney-1) Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Mollerup (Institut für Toxikologie, Oslo, Norwegen) zur Verfügung gestellt.

MEM minimal essential medium mit Earl's Salzen und 24 mmol/l NaHCO₃: GibcoBRL™ Life Technologie™ (Karlsruhe, Deutschland)

Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) HAM F12: MEM ergänzt durch 124 mmol/l HCO₃⁻, 5,37 g/l HEPES, 5 mg/l human apo-transferrin, 5 mg/l (bovines) Insulin, 36 µg/l Hydrokortison, 10 µg/l Maus EGF, 5 µg/l Na-Selenit, 10 % (vol/vol) fetalem Kälberserum von Biochrom (Berlin, Deutschland)

Bovines Serumalbumin (BSA): Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

Morpholinopropansulfonsäure (MOPS): von Serva (Heidelberg, Deutschland)

EDTA-Lösung: 0,54 mM EDTA in PBS, EDTA: Merck (Darmstadt, Deutschland)

Trypsin-Lösung: 0,25% Trypsin in EDTA-Lösung: Serva (Heidelberg, Deutschland)

Bisindolylmaleimid I (BIM): Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

Herbimycin A : Alexis (Grünberg, Deutschland)

Übrige Chemikalien von Merck (Darmstadt, Deutschland)

Zellkulturflaschen, Petrischalen, Falcon-Röhrchen (15 und 45 ml): Falcon
Betcon Dickinson Labware (Franklin Lakes, NJ, USA)

BCA- Proteinbestimmung:

BCA-Reagenz: Die Reaktionslösung wurde vor jeder Proteinbestimmung aus
je 50 Teilen Reagenz A mit einem Teil Reagenz B gemischt.

Reagenz A von der Firma Interchem (Montlucon Cedex, Frankreich)

Reagenz B ist CuSO_4 und wurde in unserem Labor selbst hergestellt.

2.2.2 RNA-Extraktion

Sämtliche fertig gekaufte Lösungen, separat oder im Kit gekauft, waren steril
und RNase frei.

Trizol: Reagenz zur RNA-Extraktion: GibcoBRL™ Life Technologies™
(Karlsruhe, Deutschland)

Chloroform, Ethanol: Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

2.2.3 RNA-Messung

Photometer Spektr-UV-VIS, Fa. ZEISS (Jena, Deutschland)

2.2.4 PCR

Sämtliche fertig gekaufte Lösungen, separat oder im Kit gekauft, waren steril
und RNase frei.

PCR-Reaktionsgefäße: Biozym, Diagnostics GmbH (Hess Oldendorf, Deutschland)

Oligonukleotid Primer: MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland)

Ethidiumbromid Stammlösung: 10 mg/ml Ethidiumbromid in Aqua bidest, steril filtriert und bei 4°C dunkel gelagert.

TAE-Stammlösung (50x): 242 g/l Tris-Base, 57,1 ml/l Eisessig, 100 ml/l 0,5 M EDTA, pH 8,0, autoklaviert

Molekularer Gewichtsmarker: Roche (Grenzach / Whylen, Deutschland)

TBE-Stammlösung (10x): 1 M Tris-Borat, pH 8,3; 20 mM EDTA, autoklaviert

PBS-Stammlösung (10xPBS): 80 g/l NaCl, 2 g/l KCl, 14,42 g/l Na₂HPO₄, 2 g/l KH₂PO₄

SuperScript Taq MixTM, Reaction Mix für PCR: GibcoBRLTM Life TechnologiesTM, (Karlsruhe, Deutschland)

Agarose: Serva (Heidelberg, Deutschland)

Progene Thermocycler: Techne (Cambridge, Großbritannien)

UV-Transilluminator: Biometra GmbH (Göttingen, Deutschland)

2.2.5 Western Blot

Zellysepuffer: 1% Triton 100, 0,5 mM PMSF, 0,5 mM Mercaptoethanol in PBS

Transferpuffer: 25 mmol/l Tris-Base, 150 mmol/l Glyzin, 10 % Methanol

Antikörper-Verdünnungslösung: 0,05% Tween 20, 5% BSA in PBS

Laufpuffer: 3,1g Tris-Base, 1,0g SDS, 14,4g Glycin auf 1 l H₂O

SDS-PAGE-Gel:

Trenngel: 12 % Acrylamid, 0,32 % Bisacrylamid, 375 mM TRIS, 0,5 mM TEMED, 0,1 % SDS, 0,05 % Ammoniumpersulphat (APS), pH 8,8

Sammelgel: 5 % Acrylamid, 0,13 % Bisacrylamid, 125 mM TRIS, 1 mM TEMED, 0,1% SDS, 0,05 % Ammoniumpersulphat (APS), pH 6,8

Acrylamid, Bisacrylamid und Temed von Amresco® (Solon, Ohio, USA)

Natriumdodecylsulfat: Serva (Heidelberg, Deutschland)

Laemmli-Puffer: 60 nmol/l Tris, pH 6,8, 10% Glycerol, 2% SDS, 100 mmol/l DTT und 0,01% Bromphenolblau

Bromphenolblau-Ladepuffer: 50% Glyzerin, 1% Bromphenolblau, 1% Xylencyanol, 1 mM EDTA, sterilfiltriert und bei -20° C gelagert.

SDS-Laufpuffer: 1 g/l SDS, 3,1 g/l TRIS-HCl, 11,4 g/l Glyzin, pH 8,3

Nitrozellulosemembran, Gel-Blot-Papier: Schleicher & Schüll (Dassel, Deutschland)

Blockierlösung: 5% fettfreies Magermilchpulver in 0,1% TWEEN 20 in PBS

Waschpuffer: 0,005% Tween20 in PBS

Western Blot Antikörper: Antikörper gegen NF-κB p50: #H-199, NF-κB p65: #H286: Santa Cruz Biotechnology Inc (Heidelberg, Deutschland)

Anti-Kaninchen-Zweit-Antikörper von Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Dianova (Hamburg, Deutschland)

ECL-Reagenz (Enhanced chemoluminescence), bestehend aus zwei Reagenzien (Lösung 1 und 2): Test-Kit der Firma Amersham Life Sciences (Buckinghamshire, Großbritannien)

Hyperfilm ECL: Amersham Life Sciences (Buckinghamshire, Großbritannien)

Röntgen-Rapid Entwickler und Fixierer: Adefo-Chemie, Nürnberg

Blottinggeräte: FastBlot, Biometra (Göttingen, Deutschland)

3. Ergebnisse

3.1 PCR Experimente

3.1.1 Abhängigkeit des PCR-Produktes von der Zyklanzahl der PCR und eingesetzter mRNA-Menge

Um ein Eintreten in den Sättigungsbereich der PCR zu vermeiden, in der Änderungen der eingesetzten mRNA-Menge nicht mehr zu einer Änderung der Signalstärke in der PCR führen, wurden vor Beginn der Experimente Testreihen mit unterschiedlicher Anzahl von PCR-Zyklen durchgeführt. Dabei erwies sich eine Zyklanzahl von 24 als optimal, weil im linearen Bereich (Fig. 2). In der im Anschluss durchgeführten Testreihe mit unterschiedlichen Mengen an initial eingesetzter mRNA zeigten sich die am besten interpretierbaren Werte bei 0,5mg initial eingesetzter mRNA.

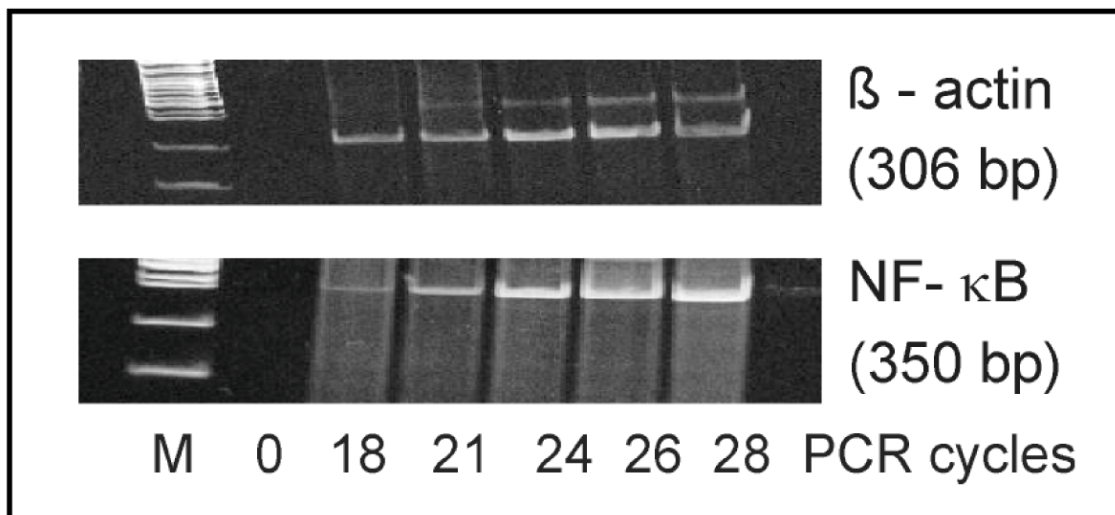


Fig. 2. NF- κ B- und β -Actin spezifische RT-PCR. Die Menge des PCR Produktes wurde in Abhängigkeit von der Anzahl der Zyklen (0, 18, 21, 24, 26, 28 Zyklen) beurteilt (initial eingesetzte mRNA Menge 0,5 μ g)

3.1.2 NF- κ B mRNA wird in IHKE-1 Zellen durch BSA in Konzentrationen von 50 bzw. 500 mg/l induziert

Ziel der Studie war es, die Auswirkungen nahezu physiologischer und niedrig pathophysiologischer Albuminkonzentrationen bezüglich proinflammatorischer Mechanismen anhand der Expression des proinflammatorisch wirksamen Transkriptionsfaktors NF- κ B sowie des durch diesen regulierten proinflammatorischen Zytokins TNF- α zu überprüfen. Um den Effekt gering erhöhter Albuminkonzentrationen auf die Expression von NF- κ B zu beobachten, wurde die Menge NF- κ B-spezifischer mRNA gemessen. Nach 90minütiger Inkubation mit BSA wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen extrahiert und anschließend die PCR mit NF- κ B-spezifischen Primern durchgeführt. Die eingesetzten Primersequenzen wurden so gewählt, dass sie gegen p105, das primär transkribierte Vorläuferprodukt von p50 gerichtet waren.

Die Inkubation mit BSA führte, jeweils im Vergleich zur Kontrolle (=100%), bei einer Konzentration von 50 mg/l zu einem signifikanten Anstieg der NF- κ B-spezifischen mRNA (p105) auf 144% +/-13%, bei einer Konzentration von 500 mg/l zu einem signifikanten Anstieg von NF- κ B (p105) auf 165% +/- 15%. Das zur Positivkontrolle eingesetzte PMA induzierte einen signifikanten Anstieg der NF- κ B-mRNA-Expression (p105) auf 200% +/- 49% (Fig. 3).

Damit konnte auf mRNA-Ebene gezeigt werden, dass die Inkubation mit bovinem Serumalbumin in IHKE-1-Zellen konzentrationsabhängig zur Expression von NF- κ B führt, was einen ersten wichtigen Schritt zur Induktion und Aufrechterhaltung einer proinflammatorischen Immunantwort auf Albumin darstellt.

3.1.3 Der Protein-Kinase-C-Inhibitor BIM und der Tyrosin-Kinase-Inhibitor Herbimycin A hemmen unabhängig voneinander die Albumin-induzierte NF- κ B-mRNA Produktion

Da Protein Kinase C und Tyrosin Kinase an der Regulation einer Vielzahl pathologischer Prozesse beteiligt sind, wurde überprüft, in wie weit die Induktion der NF- κ B-spezifischen mRNA von diesen Signaltransduktoren abhängig ist. Hierzu wurde ein Teil der Experimente in Anwesenheit spezifischer Inhibitoren durchgeführt. Zur Hemmung der Protein Kinase C wurde Bisindolylmaleimid (BIM) eingesetzt, das als Abkömmling des nicht spezifischen Protein-Kinase-Inhibitors Staurosporin einen selektiven Inhibitor der Protein Kinase C darstellt. Herbimycin A wurde als spezifischer Hemmer der Tyrosin Kinase eingesetzt.

Der nach 90minütiger Inkubation mit BSA in einer Konzentration von 50 mg/l beobachtete Anstieg der NF- κ B-Expression auf 144% \pm 13% wurde durch BIM in einer Konzentration von 200 nmol/l signifikant auf 113% \pm 14% und von Herbimycin A in einer Konzentration von 1 μ mol/l auf 67% \pm 7% inhibiert. Der nach 90minütiger Inkubation mit BSA in einer Konzentration von 500 mg/l beobachtete signifikante Anstieg der NF- κ B-Expression auf 165% \pm 15% wurde signifikant durch BIM in einer Konzentration von 200 nmol/l auf 129% \pm 19% und von Herbimycin A in einer Konzentration von 1 μ mol/l auf 96% \pm 12% inhibiert (Fig. 3).

Durch dieses Experiment konnten wir zeigen, dass die Expression von NF- κ B auf genomischer Ebene in Abhängigkeit sowohl von der Protein Kinase C als auch der Tyrosin Kinase erfolgt.

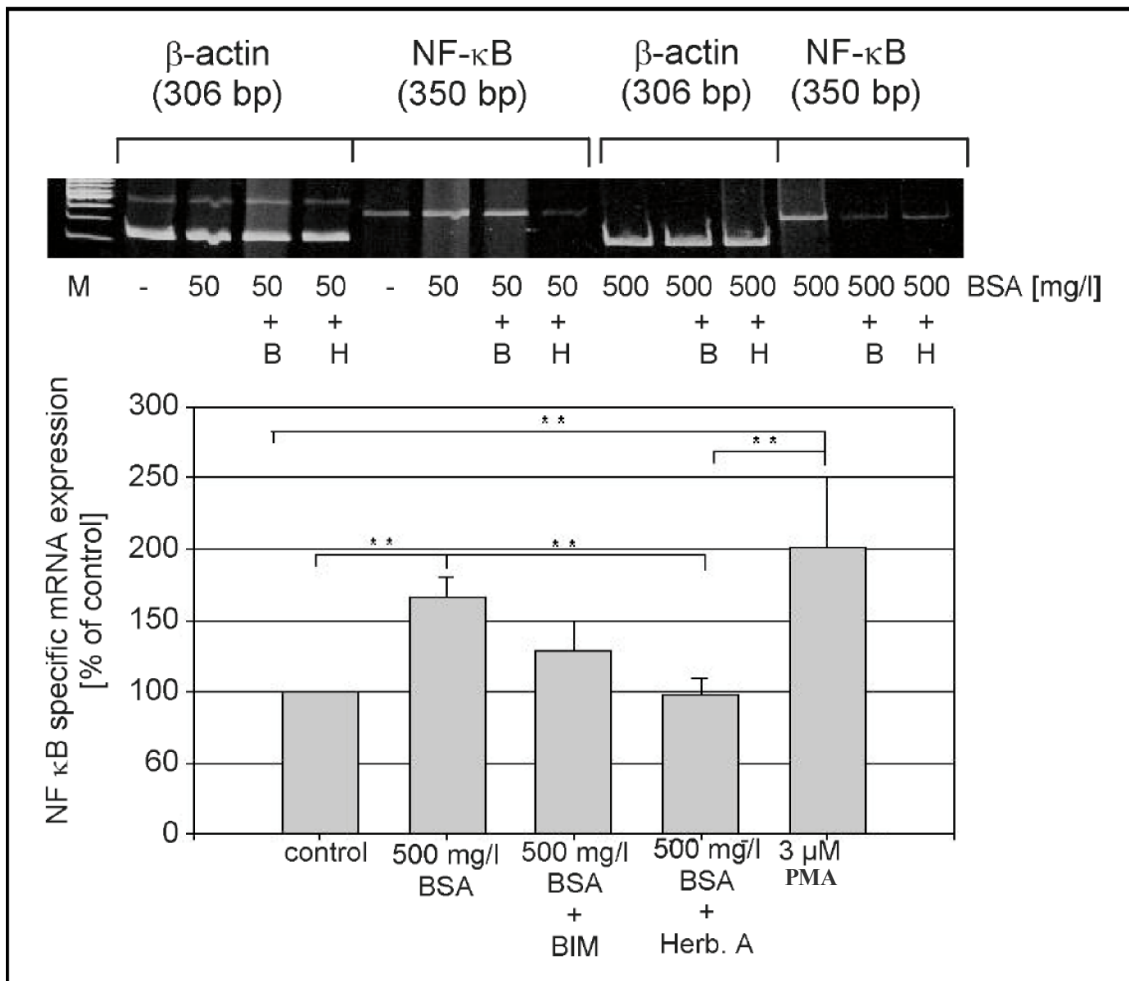


Fig. 3. Repräsentatives Gel (n = 19) von NF-κB- (p105 = p50 Vorläufer) beziehungsweise β-Aktin-spezifischer RT-PCR und semiquantitative Analyse von NF-κB (p105 = p50 Vorläufer)-spezifischer RT-PCR: IHKE-1 Zellen wurden mit BSA in einer Konzentration von 50 beziehungsweise 500 mg/l ± 200 nmol/l BIM oder 1 μmol Herbimycin A über 90 min exponiert (M: Molekulargewichtsmarker; -: Kontrolle).

500 mg/l BSA induzierte einen signifikanten Anstieg (auf 165% ± 15%, p<0,05) von NF-κB (p105), der signifikant durch BIM (auf 129% ± 19%, p<0,5) und Herbimycin A (auf 96% ± 12%, p<0,05) inhibiert wurde.

Die Positivkontrolle mit PMA induzierte einen signifikanten Anstieg der NF-κB-mRNA-Expression (p105) auf 200% ± 49%

3.1.4 BSA in einer Konzentration von 500mg/l induziert die mRNA-Expression von TNF- α in IHKE-1-Zellen

Die Expression proinflammatorischer Zytokine ist wesentliche Voraussetzung zur Induktion und Aufrechterhaltung der inflammatorischen Immunantwort. Das Zytokin TNF- α ist ein zentrales proinflammatorisches Protein, das der Regulation durch NF- κ B unterliegt. Um zu überprüfen, ob durch Inkubation mit bovinem Serumalbumin parallel zur Aufregulierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B auch TNF- α aufreguliert wird, wurde in diesem Experiment die Expression TNF- α -spezifischer mRNA analog zu den oben angeführten Experimenten überprüft.

Inkubation mit 50 mg/l BSA induzierte keinen signifikanten Anstieg der TNF- α -mRNA-Expression (auf 118% \pm 46%) im Vergleich zur Kontrolle (=100%), wohingegen 500 mg/l BSA einen signifikanten Anstieg auf 876% \pm 164% im Vergleich zur Kontrolle bewirkte. Die Positivkontrolle mit 3 μ mol/l PMA führte zu einem signifikanten Anstieg von TNF- α -spezifischer mRNA auf 2670% \pm 906% im Vergleich zur Kontrolle (Fig. 4).

Die hierdurch gezeigte Expression von TNF- α in IHKE-1-Zellen durch Inkubation mit bovinem Serumalbumin ist in Zusammenschau mit der Induktion der Expression von NF- κ B ein weiterer Beleg für die proinflammatorische Wirkung des Albumins in proximalen Tubuluszellen.

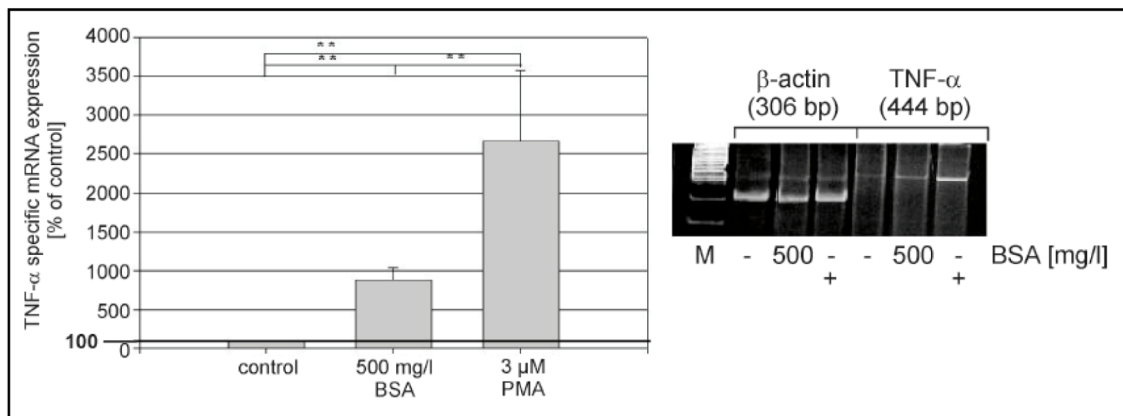


Fig. 4. Repräsentatives Gel (n = 6) von TNF- α - beziehungsweise β -Aktin-spezifischer RT-PCR und semiquantitative Analyse von TNF- α -spezifischer RT-PCR: IHKE-1 Zellen wurden mit BSA (500 mg/l) über 90 min exponiert (M: Molekulargewichtsmarker; -: Kontrolle; + PMA). Inkubation mit 50 mg/l BSA induzierte keinen signifikanten Anstieg der TNF- α -mRNA-Expression (auf 118% +/- 46%) im Vergleich zur Kontrolle (=100%, $p > 0,05$), wohingegen 500 mg/l BSA einen signifikanten Anstieg auf 876% +/- 164% ($p < 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle bewirkte.

3.2 Western Blot Experimente

3.2.1 Die Expression der p50-Untereinheit von NF- κ B wird in IHKE-1 Zellen durch BSA in Konzentrationen von 50 bzw. 500 mg/l induziert.

Um zu überprüfen, ob die Induktion NF- κ B-spezifischer mRNA in der Folge zu einer erhöhten Expression des pathogenetisch zur Regulation proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α bedeutsamen NF- κ B-Proteins führt, wurden Western-Blot-Experimente durchgeführt, in denen semiquantitativ die Menge an intrazellulär vorhandenem NF- κ B gemessen wurde. Die Experimente wurden parallel für die beiden prototypischen Untereinheiten p50 und p65 durchgeführt.

Inkubation der IHKE-1-Zellen mit 50 mg/l BSA über 12 Stunden führte zu einem signifikanten Anstieg der p50-Untereinheit auf 145% +/- 9,5% im Vergleich zur Kontrolle. Albumin in einer Konzentration von 500 mg/l führte zu

einem Anstieg der Expression der p50-Untereinheit auf 207% +/- 15% im Vergleich zur Kontrolle.

Damit konnte gezeigt werden, dass die durch Inkubation mit bovinem Serumalbumin induzierte Expression von NF- κ B sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene nachweisbar ist.

3.2.2 Die Induktion der Expression der p50-Untereinheit von NF- κ B in IHKE-1 Zellen durch BSA wird sowohl durch BIM als auch Herbizimycin A inhibiert.

In Entsprechung zu den Experimenten, in denen der Einfluss von Protein Kinase C und Tyrosin Kinase auf die Expression der NF- κ B mRNA überprüft wurde, wurden Western-Blot-Experimente in Anwesenheit der spezifischen Inhibitoren BIM und Herbizimycin A durchgeführt.

Die Induktion der Expression von p50 durch BSA in einer Konzentration von 50 mg/l auf 145% +/- 9,5% im Vergleich zur Kontrolle wurde durch BIM in einer Konzentration von 200 mmol/l signifikant auf 122% +/- 21% inhibiert.

Die Induktion von p50 durch BSA in einer Konzentration von 500 mg/l auf 207% +/- 15% im Vergleich zur Kontrolle wurde durch BIM in einer Konzentration von 200 mmol/l ebenfalls signifikant auf 151% +/- 33 % inhibiert. BIM alleine führte zu einer leicht erhöhten Expression der p50-Untereinheit auf 129% +/- 22% im Vergleich zur Kontrolle (Fig. 5).

Der durch BSA in einer Dosierung von 50 mg/l verursachte Anstieg der p50-Expression wurde durch Herbizimycin A in einer Konzentration von 1 μ mol/l signifikant auf 91% +/-11% inhibiert. Der Anstieg durch Inkubation mit 500 mg/l BSA wurde ebenfalls signifikant auf 111% +/-20% im Vergleich zu 207% +/- 15% inhibiert. Herbizimycin allein führte zu einer leichten Verminderung der Expression von p50 (80% +/-17%, $p < 0,05$) (Fig. 6).

Damit konnte gezeigt werden, dass die Expression der p50-Untereinheit von NF- κ B analog zur Regulation der NF- κ B-spezifischen mRNA in Abhängigkeit von Protein Kinase C und Thyrosin Kinase erfolgt.

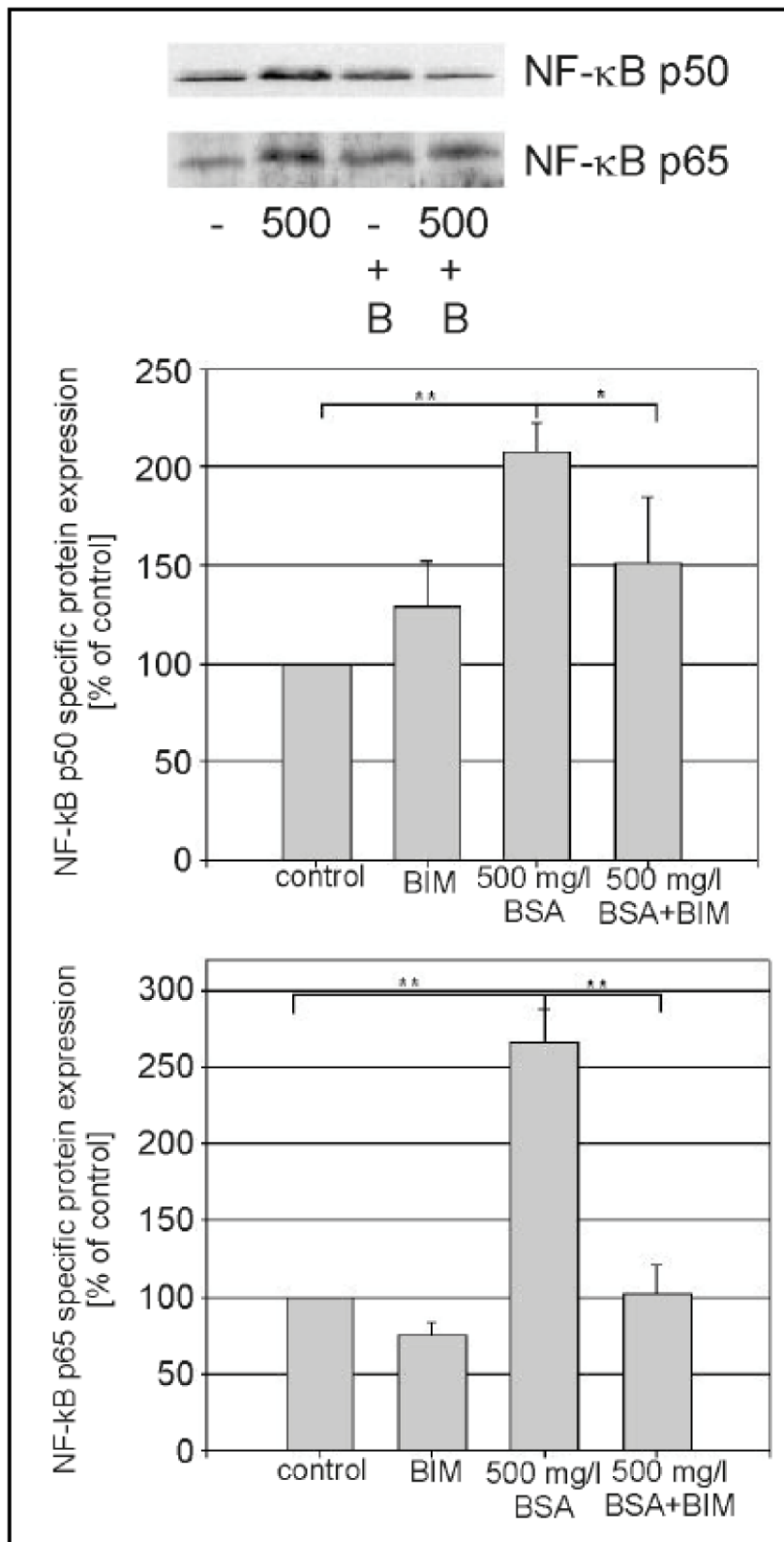


Fig. 5. NF-κB spezifischer Western Blot und NF-κB spezifische Western Blot Analyse: IHKE-1 Zellen wurden mit Albumin (500 mg/l) ± PKC Inhibitor BIM (200 nmol/l) über 12 Stunden exponiert (NF-κB p50 spezifischer Western Blot: Repräsentativer Blot von n = 10; NF-κB p65 spezifischer Western Blot: Repräsentativer Blot von n = 5)

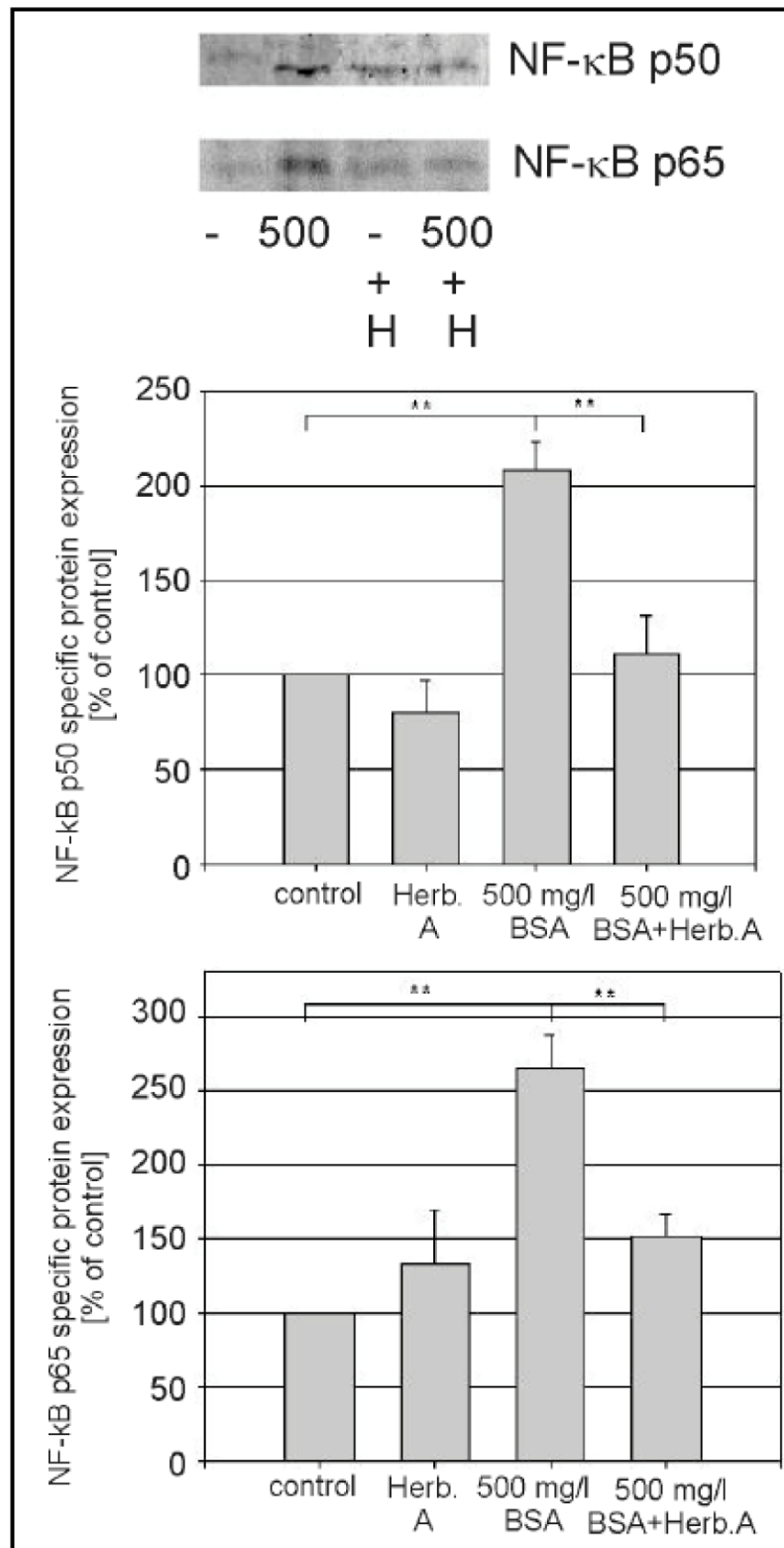


Fig. 6. NF-κB spezifischer Western Blot und NF-κB spezifische Western Blot Analyse: IHKE-1 Zellen wurden mit Albumin (500 mg/l) ± Thyrosin Kinase Inhibitor Herbimycin A (1 μmol/l) über 12 Stunden exponiert (NF-κB p50 spezifischer Western Blot: Repräsentativer Blot von n = 8; NF-κB p65 spezifische Western Blot Analyse: Repräsentativer Blot von n = 6).

3.2.3 Die Expression der p65-Untereinheit von NF- κ B wird in IHKE-1 Zellen durch BSA in Konzentrationen von 50 bzw. 500 mg/l induziert.

Die Expression sowohl der p50- als auch der p65-Untereinheit von NF- κ B sind die Voraussetzung dafür, dass ein pathogenetisch funktionelles Dimer entstehen kann, das den inflammatorischen Prozess induzieren und aufrechterhalten kann. Entsprechend der Experimente zur Expression der p50-Untereinheit von NF- κ B wurde die Expression der p65-Untereinheit nach Inkubation mit bovinem Serumalbumin untersucht.

Inkubation der IHKE-1-Zellen mit 50 mg/l BSA führte zu einem Anstieg der Expression der p65-Untereinheit auf 170% +/- 18% im Vergleich zur Kontrolle; in einer Konzentration von 500 mg/l führte BSA zu einem Anstieg der Expression der p65-Untereinheit auf 265% +/- 21% im Vergleich zur Kontrolle.

In Zusammenschau mit dem Nachweis einer Albumin-induzierten Expression der p50-Untereinheit wurde durch dieses Experiment eine Ursache-Wirkungskette hergestellt, um die proinflammatorische Wirkung von bovinem Serumalbumin auf IHKE-Zellen nachzuweisen, da erst ein Dimer aus den translatierten Genprodukten von p50 und p65 regulatorisch proinflammatorisch wirkt und damit eine pathogenetische Bedeutung im Entzündungsprozess erhält.

3.2.4 Die Induktion der Expression der p65-Untereinheit von NF- κ B in IHKE-1 Zellen durch BSA wird sowohl durch BIM als auch Herbimycin A inhibiert.

Ebenso wie für p50 wurde für p65 durch die Anwesenheit der spezifischen Inhibitoren BIM und Herbimycin in einem Teil der Experimente untersucht, in wie weit die Expression von p65 von Protein Kinase C und Tyrosin Kinase abhängig sind.

Der Anstieg der p65-Untereinheit durch Inkubation mit 50 mg/l BSA auf 170% +/- 18% im Vergleich zur Kontrolle wurde durch BIM in einer

Konzentration von 200 mmol/l signifikant auf 118% +/- 30% inhibiert. Der Anstieg der Expression der p65-Untereinheit auf 265% +/- 21% im Vergleich zur Kontrolle durch Inkubation mit BSA in einer Konzentration von 500 mg/l wurde durch BIM in einer Konzentration von 200 mmol/l signifikant auf 102% +/- 18% inhibiert. BIM alleine führte zu einem signifikanten Abfall der Expression der p65-Untereinheit auf 75% +/- 8% (Fig. 3)

Der durch BSA in einer Dosierung von 50 mg/l verursachte Anstieg der p65-Expression wurde durch Herbimycin A in einer Konzentration von 1 µmol/l nicht signifikant ($p > 0,05$) inhibiert (auf 129% +/- 21%). Bei Inkubation mit 500 mg/l BSA wurde der Anstieg jedoch signifikant auf 151% +/- 14% im Vergleich zu 265% +/- 21% inhibiert. Herbimycin A allein hatte keinen signifikanten Effekt auf die Expression von p65.

Sowohl für die Expression der Untereinheit p65 wie p50 zeigte sich eine Abhängigkeit von Protein Kinase C und Thyrosin Kinase. Die Expression beider Untereinheiten unterliegen also denselben Regulationsmechanismen, wobei einschränkend auffällt, dass eine Hemmung der Protein Kinase C ohne zusätzliche Inkubation mit bovinem Serumalbumin zu einem Anstieg der Expression der p50-Untereinheit führt.

4. Diskussion

In verschiedenen Arbeiten konnten im Rahmen von in vitro- und in-vivo-Studien Hinweise dafür gefunden werden, dass Serumproteine im glomerulären Filtrat in hohen pathophysiologischen Konzentrationen zu tubulointerstitiellen Schäden führen können, in deren Zusammenhang es zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und der Expression von fibrinogenen Zytokinen und Chemokinen kommt (Gomez-Garre et al., 2001; Mezzano et al., 2001; Morigi et al., 2002). Die physiologische Konzentration von Albumin liegt im Bereich nur einiger mg pro Liter (Drumm et al., 2001; Tojo and Endou, 1992), höhere Konzentrationen werden als pathophysiologisch angesehen. In der vorliegenden Arbeit sollte der Effekt von Albumin in physiologischen bis niedrig pathophysiologischen Konzentrationen untersucht werden, wie sie in vivo in frühen Stadien des glomerulären Schadens mit erst leicht erhöhter Proteinfiltration vorkommen. Dies sollte bezüglich potentiell relevanter inflammatorischer und fibrinogener renaler Pathomechanismen geschehen. Dabei sollte untersucht werden, (i) ob gering erhöhte Albuminkonzentrationen die Expression von NF- κ B induzieren können, (ii) ob eine gering erhöhte Albuminkonzentration in proximalen Tubuluszellen zur Expression weiterer proinflammatorischer Signaltransduktoren führt und (iii) in wie weit Protein Kinase C und Thyrosin Kinase an diesem pathophysiologischen Prozess beteiligt sind.

Hierfür wurden von menschlichen proximalen Tubuluszellen abstammende Zellen der IHKE-1-Zelllinie mit Albumin in leicht erhöhten Konzentrationen von 50 mg/l und pathophysiologischen Konzentrationen von 500 mg/l für bis zu 12 Stunden inkubiert und anschließend die mRNA-Expression der p50-Untereinheit von NF- κ B und die Proteinexpression der prototypischen Untereinheiten p50 und p65 untersucht (Baeuerle, 1998a; Gomez-Garre et al., 2001; Rogler et al., 1998).

Als biologischen Marker einer Albumin-induzierten NF- κ B Aktivierung verwendeten wir im Rahmen unserer Studie die Expression des proinflammatorischen Zytokins TNF- α , dessen Induktion anhand der mRNA-Expression überprüft wurde (Awane et al., 1999; Rangan et al., 1999)

Zu (i) konnten wir zeigen, dass bovines Serumalbumin konzentrationsabhängig zu einem Anstieg der Induktion von NF- κ B führt. Dies konnten wir auf RNA-Ebene mittels RT-PCR für die mRNA-Expression von p105 (dem Vorläufer der NF- κ B-Untereinheit p50) zeigen; auf Proteinebene konnte mittels des Westen-Blot-Verfahrens die konzentrationsabhängige Induktion sowohl der p50 wie auch der p65 Untereinheit von NF- κ B gezeigt werden. Dies konnte erstmals für Albumin in nur leicht erhöhten Konzentrationen sowie in niedrig pathophysiologischen Konzentrationen, wie sie in initialen Stadien progressiver Nierenerkrankungen vorkommen, gezeigt werden. Daher war für unsere Fragestellung von besonderem Interesse die Tatsache, dass sich sowohl die Expression der mRNA wie auch der zugehörigen Proteine empfindlich für Albumin im leicht erhöhten (50 mg/l) und im pathophysiologischen (500 mg/l) Konzentrationsbereich zeigen.

Um die Hypothese zu überprüfen, dass Albumin weitere inflammatorische Pathomechanismen in proximalen Tubuluszellen induziert (ii), wurde die TNF- α -spezifische mRNA Expression analysiert, wobei die Exposition mit nur leicht erhöhten Konzentrationen keinen signifikanten Effekt auf die Expression TNF- α -spezifischer mRNA zeigte, wohingegen Albumin in pathophysiologischen Dosen einen signifikanten Anstieg der TNF- α -mRNA-Expression in IHKE-1-Zellen induzierte.

Interessanterweise konnte die Expression der mRNA von TNF- α wie auch der NF- κ B p105 Untereinheit bereits nach 90minütiger Inkubation als ein früher Effekt der Proteinüberladung in pathophysiologischen Dosen nachgewiesen werden. Demgegenüber zeigte sich die Expression TNF- α spezifischer mRNA im Gegensatz zur NF- κ B spezifischer mRNA Expression weniger sensitiv gegenüber Albumin in nur leicht erhöhten Konzentrationen. Dasselbe gilt für den Vergleich der mRNA Expression von TNF- α mit NF- κ B spezifischer Proteinexpression im Bereich nahezu physiologischen Proteinkonzentrationen. Die Expression von TNF- α hängt somit offensichtlich nicht ausschließlich von der Expression von NF- κ B ab. Insgesamt ist jedoch die mRNA Expression von TNF- α in der IHKE-1-Zelllinie durch Albuminexposition in pathophysiologischen Konzentrationen induzierbar.

Mehrere Autoren demonstrieren eine Korrelation zwischen der Expression von TNF- α und der Induktion von Apoptose oder Nekrose im renalen Tubulus während einer Ischämie oder akutem Nierenversagen via c-myc durch BclxL oder p38M (Meldrum et al., 2001; Remuzzi and Bertani, 1998). Andere berichteten über einen TNF- α -induzierten Anstieg renaler transepithelialer Permeabilität (Mullin et al., 1992a). Diese Befunde sind konsistent mit der Hypothese dass die tubuläre Proteinüberladung zu einem Anstieg der inflammatorischen Signaltransduktion führt, wodurch die tubulointerstitielle Schädigung gefördert wird.

Interessanterweise konnte durch Gabe des ACE-Inhibitors Ramipril bei Patienten mit hoher Proteinurie die Verschlechterung der glomerulären Filtrationsrate deutlich verlangsamt werden. Im Rahmen von Nierenerkrankungen, die durch Proteinurie gekennzeichnet sind, kommt es initial zu einem Absinken der glomerulären Filtrationsrate durch Verlust von Nephronen, gefolgt von rasch einsetzender Hypertrophie der verbleibenden Nephronen. Damit einhergehend kommt es zu einer Zunahme des arteriellen Widerstandes und vermehrtem glomerulären Plasmafluss bei erhöhtem intraglomerulärem Kapillardruck, wodurch letztendlich die Filtrationsrate jedes einzelnen Nephrons zunimmt. Obwohl hierdurch der Verlust von Nephronen zum Teil funktionell kompensiert wird, kommt es im weiteren Verlauf zum Fortschreiten des Nierenversagens. Es wird angenommen, dass durch den erhöhten intraglomerulären Druck die Poren der glomerulären Basalmembran erweitert werden und es dadurch zu einer erhöhten Filtration von Protein kommt. ACE-Inhibitoren reduzieren den intraglomerulären Kapillardruck effizienter als andere Hypertensiva und damit die Filtrationsmenge an Protein; der bekannte nephroprotektive Effekt dieser Substanzklasse wird von einigen Autoren diesem Effekt zugeschrieben (Remuzzi and Bertani, 1998).

In vielen Studien konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor NF- κ B an der Regulierung von Chemokinen, Zytokinen (CINC, RANTES, MCP-1, TNF- α , IL1beta, MIP-1alpha, MIP-2, IL-10) und von Adhäsionsmolekülen (VCAM-1, ICAM-1) in proximalen Tubuluszellen beteiligt ist (Mezzano et al., 2001; Oertli et al., 1998; Ohtsuka et al., 1996; Rangan et al., 1999; Wang et al., 1999; Zoja et al., 1998b). Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass eine Proteinüberladung proximaler Tubuluszellen,

wie sie als Folge glomerulärer Schädigung auftritt, einen Anstieg der NF- κ B-Expression und -Aktivierung verursacht. Diesem folgt ein Anstieg der Produktion von Chemokinen, Zytokinen und Adhäsionsmolekülen, was letztlich zu einer tubulointerstitiellen Schädigung führt.

Um zu überprüfen, in wie weit die Enzyme Protein Kinase C und Thyrosin Kinase regulatorisch in die Albumin induzierte Expression von NF- κ B eingreifen, wurde sowohl ein Teil der PCR-Experimente als auch der Western-Blot-Experimente nach Exposition der IHKE-1 Zellen mit Albumin in Kombination mit der für Protein Kinase C und Tyrosin Kinase spezifischen Hemmstoffe BIM und Herbimycin A durchgeführt. Sowohl für den Hemmstoff der Protein Kinase C (BIM), als auch für den Inhibitor der Thyrosin Kinase (Herbimycin A) konnte eine verminderte Induktion der mRNA-Expression des p105-Vorläufers von NF- κ B gezeigt werden. Dies war für Albuminkonzentrationen in nur leicht erhöhten wie auch in eindeutig pathophysiologischen Konzentrationen nachweisbar.

Die Abhängigkeit von Protein Kinase C und Tyrosin Kinase war auch auf Proteinebene nachweisbar, mit der Ausnahme, dass Herbimycin zu einer signifikanten Reduktion der Expression der p65-Untereinheit durch Exposition mit Albumin in eindeutig pathophysiologischen Konzentrationen, jedoch nicht bei leicht erhöhten Konzentrationen führte.

BIM allein induzierte einen signifikanten Abfall der p65 Proteinexpression, wohingegen Herbimycin A allein keinen signifikanten Effekt auf die p65 Proteinexpression in IHKE-1-Zellen hatte. Im Gegensatz dazu verursachte BIM allein einen leichten Anstieg in der NF- κ B p50-Proteinexpression in IHKE-1-Zellen (Fig.6). Dies ist interessant, weil für Dimere, die aus zwei p50 Untereinheiten bestehen, eine Transkriptions-hemmende Wirkung auf nachgeschaltete proinflammatorische Zytokine wie TNF- α angenommen wird (Karin et Ben-Neriah, 2000). Es ist vorstellbar, dass durch eine Hemmung der Protein Kinase C und dadurch verstärkter Bildung der p50- und verminderten Bildung von p65-Untereinheit die Ausbildung Transkriptions-hemmender p50-p50-Dimere gegenüber Transkriptions-fördernder p50-p65 Dimere überwiegt. Die Hemmung der Protein Kinase C mit überwiegender Bildung der p50-p50-Dimere würde damit einer proinflammatorischen Antwort entgegenwirken. Damit wäre Protein Kinase C ganz wesentlich für die Regulierung der

proinflammatorischen Antwort verantwortlich, was sich auch in der starken inhibitorischen Antwort des Protein Kinase C-Inhibitors auf die Expression der p65-Untereinheit widerspiegelt.

Insgesamt konnten wir durch die vorliegende und vorausgegangene Studien unserer Gruppe zeigen, dass Albuminexposition in leicht erhöhten, sowie in pathophysiologischen Konzentrationen einen Protein Kinase C- und Thyrosin Kinase-abhängigen Anstieg sowohl der akuten (wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt) wie der verzögerten NF- κ B-Aktivität nach bis zu 48 Stunden verursachen (Drumm et al., 2001).

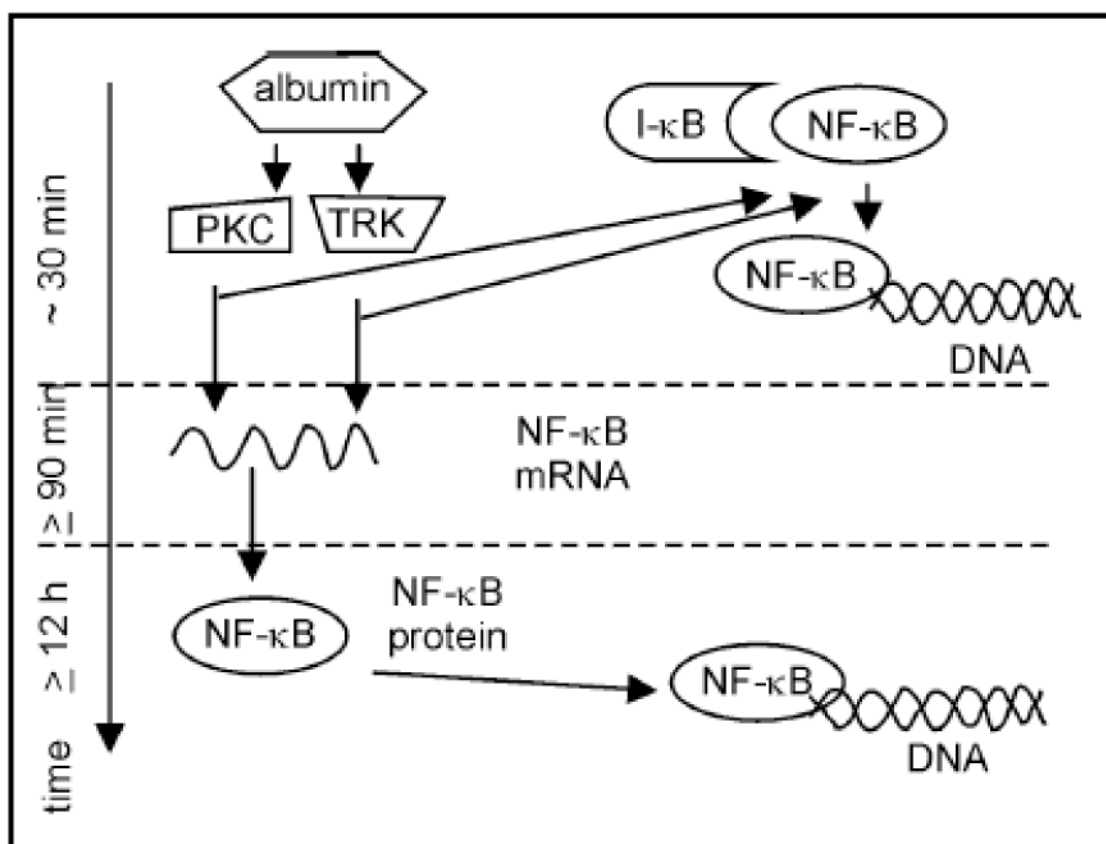


Fig. 7. Schema der akuten beziehungsweise verzögerten Albumin-induzierten NF- κ B spezifischen Aktivität (PKC = Proteinkinase C; TRK = Thyrosinekinase).

Die Arbeiten mehrerer Gruppen legen nahe, dass intrazelluläre Signaltransduktoren wie Protein Kinase C oder Tyrosin Kinase an der renalen Pathophysiologie beteiligt sind. Chan et al berichten über eine Eisen-induzierte transkriptionelle Regulation von iNOS, abhängig von NF- κ B, Protein Kinase A und Thyrosin Kinase in proximalen Tubuluszellen (Chen et

al., 2001). Woods et al beschrieben in einem Rattenmodell, dass die Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte NF- κ B-Aktivierung in Nierenepithelzellen von einer RedOx-insensitiven, Ca²⁺-abhängigem Protein Kinase C vermittelt wird (Woods et al., 1999).

Wenn man die Literatur zu durch Proteinüberladung induzierten renalen Pathomechanismen betrachtet, sind vor allem die Protein Kinase C-abhängigen Signaltransduktionswege interessant. Morigi et al berichten, dass exzessive Proteinlast in humanen proximalen Tubuluszellen Protein Kinase C-abhängig zur Formation reaktiver Sauerstoffspezies führt. Diese wird von den Autoren als verantwortlich ist für eine Protein-induzierte NF- κ B-Aktivierung angesehen (Morigi et al., 2002). Koya et al. Beschreiben einen Rückgang der glomerulären Hyperfiltration, der renalen Hyperfiltration, der Expression renalen TGF- β , Fibronektins und der Typ-IV-Kollagen-Expression durch den spezifischen Protein Kinase C-Inhibitor LY333531 in diabetischen Nagetiermodellen (Koya et al., 2000; Koya et al., 1997). Ebenfalls interessant ist, dass die oben genannten nephroprotektiven Effekte des ACE-Inhibitors Ramipril und auch die des Inhibitors der Aminoguanidininformation AGE ebenfalls den Diabetes-assoziierten Anstieg der renalen Protein Kinase C-Aktivierung hemmen (Osicka et al., 2000).

Auch für die Mitogen aktivierten Protein-Kinasen (MAPK), die eine zentrale Rolle in Nephropathien spielen, konnte eine Abhängigkeit von der Protein Kinase C gezeigt werden (Choi, 2000; Haneda et al., 1997).

Diese Vielzahl von Befunden suggeriert den potentiell möglichen Einsatz von Protein Kinase C- oder Tyrosin Kinase-Inhibitoren als nephroprotektive Substanzen.

In der Zusammenschau liefern die vorliegenden Daten Hinweise für einen möglichen Mechanismus für das Entstehen, Fortbestehen und/oder Fortschreiten der tubulointerstitiellen Schädigung. Albuminexposition induziert in proximalen Tubuluszellen die Expression von NF- κ B sowohl auf mRNA- wie auf Proteinebene. Albumin-induzierte NF- κ B-Aktivierung kann die Transkription von TNF- α und anderen inflammatorischen Mediatoren induzieren. Durch albumininduzierte TNF- α -Expression kann wiederum NF- κ B aktiviert werden (Awane et al., 1999; Rangan et al., 1999). Die Expression

des regulativen Transkriptionsfaktors NF- κ B erfolgt in Abhängigkeit von Thyrosin Kinase und Protein Kinase C. Dies eröffnet möglicherweise in Zukunft die Möglichkeit diese Signaltransduktoren als Zielpunkte neuer nephroprotektiver Strategien zu nutzen.

5. Zusammenfassung

In Zusammenschau der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente konnte gezeigt werden, dass die Inkubation mit bovinem Serumalbumin in IHKE-1-Zellen konzentrationsabhängig zur Expression von NF- κ B führt. Dies war auf genomischer Ebene durch Isolation der Gesamt-mRNA mit nachfolgender für den p65-Vorläufer p105 spezifischer PCR möglich. Auf Proteinebene war dies mittels Durchführung spezifischer Western-Blot-Untersuchungen für die prototypischen Untereinheiten p65 und p50 nachweisbar. Durch den Nachweis einer Albumin-induzierten Expression der p65- wie auch der p50-Untereinheit auf Proteinebene konnte die proinflammatorische Wirkung von bovinem Serumalbumin auf IHKE-Zellen gezeigt werden, da erst ein Dimer aus den translatierten Genprodukten von p50 und p65 regulatorisch proinflammatorisch wirkt und damit eine pathogenetische Bedeutung im Entzündungsprozess erhält.

Die durch bovines Serumalbumin induzierte Expression von NF- κ B war sowohl auf genomischer wie auf Proteinebene durch in Anwesenheit von spezifischen Hemmstoffen sowohl der Protein Kinase C wie auch der Tyrosin Kinase während der Inkubation hemmbar; dadurch konnte gezeigt werden, dass die Induktion der Expression von NF- κ B unabhängig voneinander in Abhängigkeit von der Protein Kinase C als auch der Tyrosin Kinase erfolgt. Einschränkend fiel dabei auf, dass eine Hemmung der Protein Kinase C ohne zusätzliche Inkubation mit bovinem Serumalbumin zu einem Anstieg der Expression der p50-Untereinheit auf Proteinebene führt. Da für Dimere, die aus zwei p50 Untereinheiten bestehen, eine Transkriptions-hemmende Wirkung auf nachgeschaltete proinflammatorische Zytokine wie TNF- α angenommen wird, ist es vorstellbar, dass die Hemmung der Protein Kinase C zu einer verstärkten Bildung des p50-p50-Dimers mit Überwiegen der p50-p50-Dimere gegenüber den Transkription-fördernden p50-p65-Dimeren führt, was einer proinflammatorischen Antwort entgegenwirken würde. Um dies im Detail zu überprüfen sind weitere Untersuchungen notwendig.

Weiterhin konnte in IHKE-1-Zellen erstmals mittels spezifischer PCR auf genomischer Ebene nachgewiesen werden, dass bereits niedrig pathologische Konzentrationen von Albumin, wie sie in frühen Stadien des glomerulären Schadens gefunden werden können, die Expression des durch NF- κ B regulierten, proinflammatorischen Zytokins TNF- α induzieren. In Zusammenschau mit der Induktion der Expression von NF- κ B stellt dies einen weiteren Beleg für die proinflammatorische Wirkung des Albumins in proximalen Tubuluszellen bereits in niedrig pathologischen Konzentrationen dar.

Aufgrund der in dieser Studie analysierten Daten schlagen wir auf Grund der vorliegenden Datenlage vor, dass schon eine gering erhöhte glomeruläre Hyperfiltration und konsekutive tubuläre Proteinüberladung einen Anstieg der NF- κ B Expression induziert und es nachfolgend zur Expression inflammatorischer und fibrotischer Mediatoren durch Protein Kinase C- und Tyrosin Kinase-abhängige Signalwege kommt, was letztlich zu tubulointerstitieller Schädigung führt.

Zusätzlich kann Albumin per se einen Anstieg der TNF- α mRNA Expression induzieren, was einen möglichen pathogenetischen Weg für das Fortbestehen des tubulointerstitiellen Schadens liefert, nicht nur, weil albumininduzierte TNF- α -Expression NF- κ B aktivieren kann, sondern auch, weil umgekehrt Albumin-induzierte NF- κ B Expression die Transkription von TNF- α und anderen inflammatorischen Mediatoren regulieren kann.

NF- κ B, Protein Kinase C und Tyrosin Kinase könnten somit in der Zukunft als therapeutische Ziele von renalen inflammatorischen und fibrotischen Pathomechanismen von speziellem Interesse sein.

6. Literaturverzeichnis

Awane, M., Andres, P.G., Li, D.J., and Reinecker, H.C. (1999). NF-kappa B-inducing kinase is a common mediator of IL-17-, TNF-alpha-, and IL-1 beta-induced chemokine promoter activation in intestinal epithelial cells. *J Immunol* 162, 5337-5344.

Baeuerle, P.A. (1998). Pro-inflammatory signaling: last pieces in the NF-kappaB puzzle? *Curr Biol* 8, R19-22.

Barnes, P.J., and Karin, M. (1997). Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 336, 1066-1071.

Bohle, A., Wehrmann, M., Bogenschutz, O., Batz, C., Muller, C.A., and Muller, G.A. (1991). The pathogenesis of chronic renal failure in diabetic nephropathy. Investigation of 488 cases of diabetic glomerulosclerosis. *Pathol Res Pract* 187, 251-259.

Boswell, R.N., Yard, B.A., Schrama, E., van Es, L.A., Daha, M.R., and van der Woude, F.J. (1994). Interleukin 6 production by human proximal tubular epithelial cells in vitro: analysis of the effects of interleukin-1 alpha (IL-1 alpha) and other cytokines. *Nephrol Dial Transplant* 9, 599-606.

Brown, D., and Orci, L. (1986). The "coat" of kidney intercalated cell tubulovesicles does not contain clathrin. *Am J Physiol* 250, C605-608.

Cessac-Guillemet, A.L., Mounier, F., Borot, C., Bakala, H., Perichon, M., Schaefferbeke, M., and Schaefferbeke, J. (1996). Characterization and distribution of albumin binding protein in normal rat kidney. *Am J Physiol* 271, F101-107.

Chen, L., Wang, Y., Kairaitis, L.K., Zhang, B.H., and Harris, D.C. (2001). Molecular mechanisms by which iron induces nitric oxide synthesis in cultured proximal tubule cells. *Exp Nephrol* 9, 198-204.

Choi, M.E. (2000). Mechanism of transforming growth factor-beta1 signaling. *Kidney Int Suppl* 77, S53-58.

Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159.

Christensen, E.I., Birn, H., Verroust, P., and Moestrup, S.K. (1998). Membrane receptors for endocytosis in the renal proximal tubule. *Int Rev Cytol* 180, 237-284.

Donnahoo, K.K., Meng, X., Ao, L., Ayala, A., Shames, B.D., Cain, M.P., Harken, A.H., and Meldrum, D.R. (2001). Differential cellular immunolocalization of renal tumour necrosis factor-alpha production during ischaemia versus endotoxaemia. *Immunology* 102, 53-58.

Donnahoo, K.K., Shames, B.D., Harken, A.H., and Meldrum, D.R. (1999). Review article: the role of tumor necrosis factor in renal ischemia-reperfusion injury. *J Urol* 162, 196-203.

Drumm, K., Gassner, B., Silbernagl, S., and Gekle, M. (2001a). Albumin in the mg/l-range activates NF-kappaB in renal proximal tubule-derived cell lines via tyrosine kinases and protein kinase C. *Eur J Med Res* 6, 247-258.

Drumm, K., Gassner, B., Silbernagl, S., and Gekle, M. (2001b). Inhibition of Na supersat+/H supersat+ exchange decreases albumin-induced NF-kappaB activation in renal proximal tubular cell lines (OK and LLC-PK1 cells). *Eur J Med Res* 6, 422-432.

Fujitani, Y., Ninomiya, H., Okada, T., Urade, Y., and Masaki, T. (1995). Suppression of endothelin-1-induced mitogenic responses of human aortic smooth muscle cells by interleukin-1 beta. *J Clin Invest* 95, 2474-2482.

Gekle, M. (1998). Renal Proximal Tubular Albumin Reabsorption: Daily Prevention of Albuminuria. *News Physiol Sci* 13, 5-11.

Gekle, M., Mildenerger, S., Freudinger, R., Schwerdt, G., and Silbernagl, S. (1997). Albumin endocytosis in OK cells: dependence on actin and microtubules and regulation by protein kinases. *Am J Physiol* 272, F668-677.

Gekle, M., Mildenerger, S., Freudinger, R., and Silbernagl, S. (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., and Silbernagl, S. (1995). Comparison of the buffer capacity of endocytotic vesicles, lysosomes and cytoplasm in cells derived from the proximal tubule of the kidney (opossum kidney cells). *Pflugers Arch* 429, 452-454.

Giroir, B.P., Johnson, J.H., Brown, T., Allen, G.L., and Beutler, B. (1992). The tissue distribution of tumor necrosis factor biosynthesis during endotoxemia. *J Clin Invest* 90, 693-698.

Gomez-Garre, D., Largo, R., Tejera, N., Fortes, J., Manzarbeitia, F., and Egido, J. (2001). Activation of NF-kappaB in tubular epithelial cells of rats with intense proteinuria: role of angiotensin II and endothelin-1. *Hypertension* 37, 1171-1178.

Haneda, M., Araki, S., Togawa, M., Sugimoto, T., Isono, M., and Kikkawa, R. (1997). Mitogen-activated protein kinase cascade is activated in glomeruli of diabetic rats and glomerular mesangial cells cultured under high glucose conditions. *Diabetes* 46, 847-853.

Hofmann, J. (2004). Protein kinase C isozymes as potential targets for anticancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 4, 125-146.

Karin, M., and Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol* 18, 621-663.

Kita, T., Tanaka, N., and Nagano, T. (1993). The immunocytochemical localization of tumour necrosis factor and leukotriene in the rat kidney after treatment with lipopolysaccharide. *Int J Exp Pathol* 74, 471-479.

Koya, D., Haneda, M., Kikkawa, R., and King, G.L. (1998). d-alpha-tocopherol treatment prevents glomerular dysfunctions in diabetic rats through inhibition of protein kinase C-diacylglycerol pathway. *Biofactors* 7, 69-76.

Koya, D., Haneda, M., Nakagawa, H., Isshiki, K., Sato, H., Maeda, S., Sugimoto, T., Yasuda, H., Kashiwagi, A., Wada, D.K., *et al.* (2000). Amelioration of accelerated diabetic mesangial expansion by treatment with a PKC beta inhibitor in diabetic db/db mice, a rodent model for type 2 diabetes. *FASEB J* 14, 439-447.

Koya, D., Jirousek, M.R., Lin, Y.W., Ishii, H., Kuboki, K., and King, G.L. (1997). Characterization of protein kinase C beta isoform activation on the gene expression of transforming growth factor-beta, extracellular matrix components, and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats. *J Clin Invest* 100, 115-126.

Li, Z.W., Chu, W., Hu, Y., Delhase, M., Deerinck, T., Ellisman, M., Johnson, R., and Karin, M. (1999). The IKKbeta subunit of IkappaB kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis. *J Exp Med* 189, 1839-1845.

Mackensen-Haen, S., Eissele, R., and Bohle, A. (1988). Contribution on the correlation between morphometric parameters gained from the renal cortex and renal function in IgA nephritis. *Lab Invest* 59, 239-244.

Martelli, A.M., Evangelisti, C., Nyakern, M., and Manzoli, F.A. (2006). Nuclear protein kinase C. *Biochim Biophys Acta* 1761, 542-551.

Maunsbach, A.B. (1964). Correlation of Ultrastructure, Autofluorescence and Acid Phosphatase Activity in Granules Isolated from Proximal Tubules of the Kidney of the Rat. *Nature* 202, 1131-1132.

Maunsbach, A.B. (1966). Albumin absorption by renal proximal tubule cells. *Nature* 212, 546-547.

Meldrum, D.R., and Donnahoo, K.K. (1999). Role of TNF in mediating renal insufficiency following cardiac surgery: evidence of a postbypass cardiorenal syndrome. *J Surg Res* 85, 185-199.

Meldrum, K.K., Meldrum, D.R., Hile, K.L., Yerkes, E.B., Ayala, A., Cain, M.P., Rink, R.C., Casale, A.J., and Kaefer, M.A. (2001). p38 MAPK mediates renal tubular cell TNF-alpha production and TNF-alpha-dependent apoptosis during simulated ischemia. *Am J Physiol Cell Physiol* 281, C563-570.

Mezzano, S.A., Barria, M., Droguett, M.A., Burgos, M.E., Ardiles, L.G., Flores, C., and Egido, J. (2001). Tubular NF-kappaB and AP-1 activation in human proteinuric renal disease. *Kidney Int* 60, 1366-1377.

Morigi, M., Macconi, D., Zoja, C., Donadelli, R., Buelli, S., Zanchi, C., Ghilardi, M., and Remuzzi, G. (2002). Protein overload-induced NF-kappaB activation in proximal tubular cells requires H₂O₂ through a PKC-dependent pathway. *J Am Soc Nephrol* 13, 1179-1189.

Mühlhardt, Cornel (2009). *Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics*. Spektrum Verlag S 42.

Mullin, J.M., Kofeldt, L.M., Russo, L.M., Hagee, M.M., and Dantzig, A.H. (1992a). Basolateral 3-O-methylglucose transport by cultured kidney (LLC-PK1) epithelial cells. *Am J Physiol* 262, F480-487.

Mullin, J.M., Laughlin, K.V., Marano, C.W., Russo, L.M., and Soler, A.P. (1992b). Modulation of tumor necrosis factor-induced increase in renal (LLC-PK1) transepithelial permeability. *Am J Physiol* 263, F915-924.

Oertli, B., Beck-Schimmer, B., Fan, X., and Wuthrich, R.P. (1998). Mechanisms of hyaluronan-induced up-regulation of ICAM-1 and VCAM-1 expression by murine kidney tubular epithelial cells: hyaluronan triggers cell adhesion molecule expression through a mechanism involving activation of nuclear factor-kappa B and activating protein-1. *J Immunol* 161, 3431-3437.

Ohtsuka, T., Kubota, A., Hirano, T., Watanabe, K., Yoshida, H., Tsurufuji, M., Iizuka, Y., Konishi, K., and Tsurufuji, S. (1996). Glucocorticoid-mediated gene suppression of rat cytokine-induced neutrophil chemoattractant CINC/gro, a member of the interleukin-8 family, through impairment of NF-kappa B activation. *J Biol Chem* 271, 1651-1659.

Olson, G.E., Winfrey, V.P., Hill, K.E., and Burk, R.F. (2008). Megalin mediates selenoprotein P uptake by kidney proximal tubule epithelial cells. *J Biol Chem* 283, 6854-6860.

Osicka, T.M., Yu, Y., Panagiotopoulos, S., Clavant, S.P., Kiriazis, Z., Pike, R.N., Pratt, L.M., Russo, L.M., Kemp, B.E., Comper, W.D., and Jerums, G. (2000). Prevention of albuminuria by aminoguanidine or ramipril in streptozotocin-induced diabetic rats is associated with the normalization of glomerular protein kinase C. *Diabetes* 49, 87-93.

Peters, T., Jr. (1985). Serum albumin. *Adv Protein Chem* 37, 161-245.

Rangan, G.K., Wang, Y., Tay, Y.C., and Harris, D.C. (1999). Inhibition of NFkappaB activation with antioxidants is correlated with reduced cytokine transcription in PTC. *Am J Physiol* 277, F779-789.

Remuzzi, G., and Bertani, T. (1998). Pathophysiology of progressive nephropathies. *N Engl J Med* 339, 1448-1456.

Rodman, J.S., Kerjaschki, D., Merisko, E., and Farquhar, M.G. (1984). Presence of an extensive clathrin coat on the apical plasmalemma of the rat kidney proximal tubule cell. *J Cell Biol* 98, 1630-1636.

Roger, T., Out, T., Mukaida, N., Matsushima, K., Jansen, H., and Lutter, R. (1998). Enhanced AP-1 and NF-kappaB activities and stability of interleukin 8 (IL-8) transcripts are implicated in IL-8 mRNA superinduction in lung epithelial H292 cells. *Biochem J* 330 (Pt 1), 429-435.

Ruggenti, P., Perna, A., Mosconi, L., Matalone, M., Pisoni, R., Gaspari, F., and Remuzzi, G. (1997). Proteinuria predicts end-stage renal failure in non-diabetic chronic nephropathies. The "Gruppo Italiano di Studi Epidemiologici in Nefrologia" (GISEN). *Kidney Int Suppl* 63, S54-57.

Schmitt, H., Cavalcanti de Oliveira, V., and Bohle, A. (1987). Tubulo-interstitial alterations in type I membranoproliferative glomerulonephritis. An investigation of 259 cases. *Pathol Res Pract* 182, 6-10.

Schwegler, J.S., Heppelmann, B., Mildenerger, S., and Silbernagl, S. (1991). Receptor-mediated endocytosis of albumin in cultured opossum kidney cells: a model for proximal tubular protein reabsorption. *Pflugers Arch* 418, 383-392.

Tojo, A., and Endou, H. (1992). Intrarenal handling of proteins in rats using fractional micropuncture technique. *Am J Physiol* 263, F601-606.

Trushin, S.A., Pennington, K.N., Algeciras-Schimnich, A., and Paya, C.V. (1999). Protein kinase C and calcineurin synergize to activate I κ B kinase and NF- κ B in T lymphocytes. *J Biol Chem* 274, 22923-22931.

Tveito, G., Hansteen, I.L., Dalen, H., and Haugen, A. (1989). immortalization of normal human kidney epithelial cells by nickel(II). *Cancer Res* 49, 1829-1835.

Uehara, Y., and Fukazawa, H. (1991). Use and selectivity of herbimycin A as inhibitor of protein-tyrosine kinases. *Methods Enzymol* 201, 370-379.

van den Berg, R., Haenen, G.R., van den Berg, H., and Bast, A. (2001). Transcription factor NF- κ B as a potential biomarker for oxidative stress. *Br J Nutr* 86 *Suppl* 1, S121-127.

von Schnakenburg, C., Strehlau, J., Ehrich, J.H., and Melk, A. (2002). Quantitative gene expression of TGF- β 1, IL-10, TNF- α and Fas Ligand in renal cortex and medulla. *Nephrol Dial Transplant* 17, 573-579.

Wang, Y., Rangan, G.K., Tay, Y.C., and Harris, D.C. (1999). Induction of monocyte chemoattractant protein-1 by albumin is mediated by nuclear factor κ B in proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol* 10, 1204-1213.

Wehrmann, M., Bohle, A., Bogenschutz, O., Eissele, R., Freisleder, A., Ohlschlegel, C., Schumm, G., Batz, C., and Gartner, H.V. (1989). Long-term prognosis of chronic idiopathic membranous glomerulonephritis. An analysis of 334 cases with particular regard to tubulo-interstitial changes. *Clin Nephrol* 31, 67-76.

Wilkinson, S.E., Parker, P.J., and Nixon, J.S. (1993). Isoenzyme specificity of bisindolylmaleimides, selective inhibitors of protein kinase C. *Biochem J* 294 (Pt 2), 335-337.

Woods, J.S., Ellis, M.E., Dieguez-Acuna, F.J., and Corral, J. (1999). Activation of NF-kappaB in normal rat kidney epithelial (NRK52E) cells is mediated via a redox-insensitive, calcium-dependent pathway. *Toxicol Appl Pharmacol* 154, 219-227.

Wullaert, A., Heyninck, K., Janssens, S., and Beyaert, R. (2006). Ubiquitin: tool and target for intracellular NF-kappaB inhibitors. *Trends Immunol* 27, 533-540.

Zoja, C., Corna, D., Benedetti, G., Morigi, M., Donadelli, R., Guglielmotti, A., Pinza, M., Bertani, T., and Remuzzi, G. (1998a). Bindarit retards renal disease and prolongs survival in murine lupus autoimmune disease. *Kidney Int* 53, 726-734.

Zoja, C., Donadelli, R., Colleoni, S., Figliuzzi, M., Bonazzola, S., Morigi, M., and Remuzzi, G. (1998b). Protein overload stimulates RANTES production by proximal tubular cells depending on NF-kappa B activation. *Kidney Int* 53, 1608-1615.

Zoja, C., Morigi, M., Figliuzzi, M., Bruzzi, I., Oldroyd, S., Benigni, A., Ronco, P., and Remuzzi, G. (1995). Proximal tubular cell synthesis and secretion of endothelin-1 on challenge with albumin and other proteins. *Am J Kidney Dis* 26, 934-941.

Danksagung

Dank an

meine Eltern, dafür, dass die mich immer unterstützt und nie unter Druck gesetzt haben

meine Verlobte Yu-Hwa, dafür, dass sie es getan hat

Curriculum vitae

Boris Bauer
Spitalgasse 15
97070 Würzburg

Geboren: 23. Januar 1976 in Bad Mergentheim

Eltern: Otto Bauer
Heidemarie Bauer, geborene Gropp

Schulische Ausbildung: 1982-1986 Buchenberggrundschule Ellwangen
1986-1995 Peutinger Gymnasium Ellwangen

Wehrdienst: 1995-1996 5. Trsp. Btl. 10 Ellwangen

Universitäre Ausbildung: 1996-2003 Studium der Humanmedizin an der
Bayerischen Julius- Maximilians-Universität
Würzburg
2002 Zweites Staatsexamen
2003 Drittes Staatsexamen und Teilapprobation
2004 Vollapprobation als Arzt

Facharztausbildung: Februar 2004 – Mai 2010 Klinik und Poliklinik für
Dermatologie, Venerologie und Allergologie der
Universität Würzburg

Datum der Facharztprüfung: 11.Mai 2010

Arbeitstätigkeit: Februar 2004 – Mai 2010: Arzt in Ausbildung an der
Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie
und Allergologie der Universität Würzburg
Seit Mai 2010: Facharzt an der Klinik und Poliklinik
für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der
Universität Würzburg