

Aus dem Institut für Klinische Chemie
(ehemaliger Direktor Prof. Dr. med. Dr. h.c. Michael Oellerich)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Veränderung der Nierenfunktion, des Proteoms und des
Phosphorylierungsstatus der Proteine bei Alport-Mäusen unter
Mycophenolat-Mofetil

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Klaus-Dieter Luchs
aus
Stuttgart

Göttingen 2016

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden teilweise veröffentlicht in:

Petrova DT, Schultze FC, Brandhorst G, **Luchs K-D**, Lenz C, Urlaub H, Rubel D, Gross O, Walson PD, Oellerich M (2014): Effects of mycophenolate mofetil on kidney function and phosphorylation status of renal proteins in Alport COL4A3-deficient mice. *Proteome Sci* 12, 56 8 (Full Text paper)

Petrova DT, **Luchs K-D**, Schultze FC, Alwahsh SM, Rubel D, Gross O, Oellerich M, Brandhorst G (2012): Nierenfunktion und histopathologische Unterschiede in Alportmäusen hervorgerufen durch Mycophenolatmofetil. P007, DGKL 2012, 9. Jahrestagung, 26.-29. September 2012, Congress Center Rosengarten, Mannheim. *Clin Chem Lab Med*; 50(9):A227-A228 (Abstract)

Dekan:

Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Oellerich

II. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Oliver Groß

III. Berichterstatter:

Prof. Dr. hum. biol. Margarete Schön

Tag der mündlichen Prüfung:

am 30.11.2016 um 11:00 Uhr

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1. Einleitung.....	1
1.1 Entstehungsverlauf einer chronischen Niereninsuffizienz.....	3
1.2 Alport-Mäuse als Modell einer chronisch progredienten Niereninsuffizienz.....	5
1.3 Wirkungsweise und Einsatzmöglichkeiten von MMF.....	6
1.4 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit.....	10
2. Material und Methoden.....	11
2.1 Materialien.....	11
2.1.1 Chemikalien.....	11
2.1.2 Puffer und Lösungen.....	13
2.1.3 Oligonukleotid-Primer.....	16
2.1.4 Gebrauchswaren.....	16
2.1.5 Geräte.....	17
2.2 Tiermodell und Studiendesign.....	19
2.2.1 Tiermodell.....	19
2.2.2 Genotypisierung der Versuchstiere und Studiendesign.....	19
2.3 Methoden.....	22
2.3.1 Histologische Färbung mit Hämatoxylin und Eosin.....	22
2.3.2. Bestimmung der Serum- und Urinparameter.....	23
2.3.2.1 Klinische Chemie.....	23
2.3.2.2 Serumelektrophorese.....	23
2.3.2.3 Urinteststreifen.....	24
2.3.2.4 Urinsediment.....	24
2.3.3 Bestimmung MPA- und MPAG-Spiegel.....	24
2.3.4 Darstellung und Identifizierung von Proteinen aus Nierengewebe.....	25
2.3.4.1 Proteinextraktion.....	25
2.3.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung.....	26
2.3.4.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese (2 DE).....	26
2.3.4.4 Phosphoprotein- und Silberfärbung der 2 DE-Gele.....	29
2.3.4.5 Auswertung Proteinspots und Proteinidentifikation.....	30
2.3.5 Statistik und bioinformatische Auswertung.....	31

3.	Ergebnisse	33
3.1	Tiermodell	33
3.1.1	Gewichtsverlauf COL4A3-defiziente Versuchstiere	33
3.2	Histologische Bewertung der tubulointerstitiellen Fibrosierung	35
3.2.1	Ergebnisse der lichtmikroskopischen Untersuchung.....	35
3.3	Untersuchung von Blut und Urin der Versuchstiere	37
3.3.1	Klinische Chemie	37
3.3.1.1	Klinisch-chemische Parameter im Serum	37
3.3.1.2	Fraktionen der Serumprotein-Elektrophorese	40
3.3.1.3	Urinparameter.....	43
3.3.1.3.1	Urinteststreifen	43
3.3.1.3.2	Urinsediment	44
3.3.2	MPA- und MPAG-Spiegel im Serum.....	45
3.4	Phosphoproteom- und Proteomanalyse	47
3.4.1	Veränderungen des Phosphorylierungsstatus	48
3.4.2	Veränderungen der Proteinmenge	53
4.	Diskussion.....	56
4.1	Alport-Mäuse als Modell der chronischen Niereninsuffizienz	57
4.2	Therapeutischer Effekt von MMF in Bezug auf die Nierenhistologie und -funktion..	57
4.3	Therapeutischer Effekt von MMF auf den Phosphorylierungsstatus und das renale Proteom	60
4.3.1	Veränderungen des Phosphorylierungsstatus	61
4.3.2	Veränderungen des Proteoms.....	66
4.4	MMF als therapeutische Option bei chronischer Niereninsuffizienz	68
5.	Zusammenfassung.....	72
6.	Anhang.....	74
6.1	Publikationsliste	74
7.	Literaturverzeichnis	75

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Isoelektrische Fokussierung IPG-Streifen	27
Tabelle 2	Zusammensetzung 12,5%iges Polyacrylamidgel	28
Tabelle 3	Arbeitsschritte Phosphoproteinfärbung	29
Tabelle 4	Arbeitsschritte Silberfärbung	30
Tabelle 5	Übersicht Körpergewicht 14. Behandlungstag (Ende 7. Lebenswoche)	34
Tabelle 6	Banff-Score-Bewertung H.E.-gefärbter Nierenschnittpräparate	35
Tabelle 7	Übersicht Serumparameter	39
Tabelle 8	Übersicht Proteinfractionen Serumelektrophorese	42
Tabelle 9	Übersicht Urinparameter (Urinteststreifen)	43
Tabelle 10	Übersicht Urinsedimentuntersuchung	44
Tabelle 11	Übersicht Wirkstoffspiegel MPA, MPAG	46
Tabelle 12	Übersicht signifikant veränderte Phosphospots mit Proteinzuzuordnung	52
Tabelle 13	Übersicht signifikant veränderte Silberspots mit Proteinzuzuordnung	55

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Versuchstiergruppen.....	20
Abbildung 2	Behandlungsverlauf der Versuchstiere	21
Abbildung 3	Gewichtsverlauf COL4A3-defiziente Mäuse in der Behandlungsphase.....	34
Abbildung 4	Körpergewicht Versuchstiergruppen am 14. Behandlungstag.....	34
Abbildung 5	Banff-Score-Bewertung der Versuchstiergruppen.....	36
Abbildung 6	Serumparameter Harnstoff	37
Abbildung 7	Serumparameter Kreatinin.....	38
Abbildung 8	Serumparameter Gesamtprotein.....	38
Abbildung 9	Fraktionen Protein Serum-Elektrophorese.....	40
Abbildung 10	Serumelektrophorese repräsentative Fraktionsverteilung	41
Abbildung 11	Bilder Untersuchung Urinsediment	45
Abbildung 12	MPA- & MPAG-Spiegel in der MMF-Versuchstiergruppe	45
Abbildung 13	Exemplarische Proteinspotzuordnung Phospho- und Silber-gefärbtes Gel ..	48
Abbildung 14	Phosphospot-Fluoreszenz-Intensitäten der repräsentativen Versuchstiere ..	49
Abbildung 15	Proteine mit signifikanter Veränderung des Phosphorylierungsstatus.....	50
Abbildung 16	Proteine mit signifikanter Gesamtmengenveränderung.....	53
Abbildung 17	Silberspot-Intensitäten der repräsentativen Versuchstiere	54

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
AcMPAG	Mycophenolsäure-Acylglucuronid
APS	Ammoniumpersulfat
best.	bestimmt(e/er)
Bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine serum albumin)
bspw.	beispielsweise
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
COL4A3	Kollagen 4A3
d	Tag(e)
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	epitheliale mesenchymale Transition
EtOH	Ethanol
g	Gramm, Erdbeschleunigung
GF	Gesichtsfeld(er)
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
gem.	gemäß
h	Stunde(n)
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
IMPDH	Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase
kDa	Kilodalton
KOF	Körperoberfläche
min	Minute(n)

MMF	Mycophenolat-Mofetil
MPA	Mycophenolsäure
MPAG	glukuronidierte Mycophenolsäure
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MW	molekulares Gewicht
n	Nano- (10^{-9})
NFW	nukleasefreies Wasser
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	pondus Hydrogenii
pI	isoelektrischer Punkt
PLC	Placebo
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
p-Wert	Überschreitungswahrscheinlichkeit, Signifikanzwert
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SPSS	Statistical Product and Service Solutions
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	Tetramethylethylenediamine
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Einheit der Enzymaktivität (Unit)
UMG	Universitätsmedizin Göttingen
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	vergleich(e)
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
ZTE	Zentrale Tierexperimentelle Einrichtung
z.B.	zum Beispiel
z.Zt.	zur Zeit
~	geschätzt

±

berechnet

1. Einleitung

Aufgrund der weltweit steigenden Prävalenz und Inzidenz der dialysepflichtigen chronischen Niereninsuffizienz wird diese zu einem immer größer werdenden Problem für das öffentliche Gesundheitssystem. Durch die Behandlung der ca. 70.000 dialysepflichtigen Patienten entstehen allein in Deutschland jedes Jahr Kosten in Höhe von ca. 3 Milliarden Euro. Demzufolge kostet die medizinische Versorgung eines dialysepflichtigen Patienten jährlich ungefähr 40.000 Euro. Unabhängig von den ökonomischen Aspekten entstehen für die betroffenen Patienten vor allem aber auch tiefgreifende persönliche Einschränkungen, da sie von einer Nierenersatztherapie abhängig und den damit verbundenen körperlichen sowie psychischen Leiden unterworfen sind. Eine Nierentransplantation stellt als *ultima ratio* in den meisten Fällen die einzige Alternative zu einer lebenslangen Dialyse dar. Aufgrund der in Deutschland aktuell bestehenden Organspenderproblematik ist die Anzahl potentieller Spender allerdings stark limitiert (Hübner 2014; Deutsche Gesellschaft für Nephrologie 2015).

Die Definition der chronisch progredienten Niereninsuffizienz wurde 2002 von der *National Kidney Foundation* eingeführt. Demzufolge muss die Einschränkung der Nierenfunktion mindestens 3 Monate bestehen und mit einer glomerulären Filtrationsrate von < 60 ml/min pro $1,73$ m² Körperoberfläche (KOF) vergesellschaftet oder bei einer höheren glomerulären Filtrationsrate durch bioptisch gesicherte pathologische Veränderungen im Nierengewebe hervorgerufen sein (Lamb et al. 2013). Gemäß diesen internationalen Richtlinien wird die chronisch progrediente Niereninsuffizienz in 5 Stadien eingeteilt (National Kidney Foundation 2002). In dieser Klassifikation wird das Endstadium der chronisch progredienten Niereninsuffizienz-, die terminale Niereninsuffizienz, mit einer glomerulären Filtrationsrate von < 15 ml/min pro $1,73$ m² Körperoberfläche bzw. der Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie als Stadium 5 eingestuft (Levey et al. 2003). Die Indikation für ein Nierenersatzverfahren ist bei konservativ nicht mehr beherrschbaren Entgleisungen des Säure-Basen- oder Elektrolythaushalts, Intoxikation, Überwässerung oder Urämie gegeben (Arastéh 2009).

An erster Stelle der ursächlich zur terminalen Niereninsuffizienz führenden Krankheiten steht mit ca. 35% die diabetische Nephropathie (Whaley-Connell et al. 2009), gefolgt von den hypertensiven Nephropathien mit ca. 25% (Bakris et al. 2009) und den chronischen Glomerulonephritiden mit ca. 10% der Fälle. Die wohl häufigsten hereditären Ursachen für eine chronisch progrediente Niereninsuffizienz sind die Zystennierenerkrankung und das

Alport-Syndrom (McCarthy und McMullen 1997; Kashtan 2004). Die verschiedenen Formen chronischer Nierenerkrankungen sind das Ergebnis unterschiedlichster primärer Schädigungen (glomerulärer, tubulointerstitieller oder vasaler Ursprung), die letztlich alle zu einer relativ einheitlichen Veränderung, der renalen Fibrose, führen (López-Hernández und López-Novoa 2012). Somit kann die renale Fibrose als gemeinsame Endstrecke der chronischen Nierenerkrankungen betrachtet werden (Boor et al. 2007; Wynn 2007). Die renale Fibrose führt zur Niereninsuffizienz und ist durch eine tubulointerstitielle Fibrose wesentlicher Faktor hinsichtlich des irreversiblen Verlusts der Nierenfunktion (Nangaku 2004) sowie Glomerulosklerose und Veränderungen in der Gefäßarchitektur gekennzeichnet (Boor et al. 2007).

Durch die Abnahme der Nierenfunktion kommt es zu Störungen im Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalt sowie aufgrund der Volumenretention zu Ödemen. Da die harnpflichtigen Substanzen durch die Nieren nicht mehr ausgeschieden werden können, kommt es im weiteren Verlauf zur Akkumulation toxischer Substanzen, die eine Urämiesymptomatik mit Übelkeit und Vigilanzstörungen sowie toxische Organschäden verursachen können. Aufgrund der inkretorischen Nierenfunktionsstörungen entsteht ein Mangel an Erythropoetin, der zu einer renalen Anämie führt, einer durch die Abnahme der Aktivierung von Vitamin D₃ induzierten renalen Osteopathie sowie einer renoparenchymatöse Hypertonie (aktiviertes Renin-Angiotensin-System). Zudem kommt es im Verlauf zu einer verminderten Synthese sowie Sekretion von Renin und Prostaglandinen (Arastéh 2009).

Die Therapiemöglichkeiten der chronisch progredienten Niereninsuffizienz orientieren sich in der Regel an der Behandlung der ursächlichen Grunderkrankung. Generell sollten nephrotoxische Substanzen und Lebensmittel mit hohem Protein-, Phosphat- oder Salzanteil gemieden werden. Bei bereits bestehender Proteinurie (> 1g/d) sollte versucht werden, den Blutdruck auf Werte von etwa 120/80 mmHg zu senken, da zusätzlich ein sehr hohes kardiovaskuläres Risiko besteht. Zur Senkung des Blutdrucks sind aufgrund ihrer nephroprotektiven Wirkung zunächst ACE-Hemmer und Angiotensin-Rezeptor-Antagonisten aufgrund ihrer nephroprotektiven Wirkung zu präferieren (Arastéh 2009).

Bei Fortschreiten der Niereninsuffizienz und im Stadium der terminalen Niereninsuffizienz (GFR < 15 ml/min pro 1,73 m² KOF) gibt es nur noch in sehr begrenztem Umfang alternative Therapieoptionen. Eine urämische Intoxikation kann nur durch die Nierenersatzverfahren Hämodialyse oder Peritonealdialyse oder durch die einzige kurative, aber aufgrund begrenzter Spenderkapazitäten limitierten Therapiemöglichkeit einer Nierentransplantation vermieden werden. Die meisten Patienten mit einer chronisch progredienten Niereninsuffizienz versterben jedoch vor Eintreten der terminalen Niereninsuffizienz an

kardiovaskulären Erkrankungen, bspw. einem Myokardinfarkt. Das Risiko für ein kardiovaskuläres Ereignis ist für Patienten im Stadium der terminalen Niereninsuffizienz 17-fach höher als bei einem nierengesunden Patienten (DuBose 2007).

Da die fibrotischen Umbauprozesse im Nierengewebe in der Regel nicht reversibel sind (Hodgkins und Schnaper 2012), sollte nach therapeutischen Ansätzen gesucht werden, die das Fortschreiten sowie die Entstehung der Fibrose bei chronisch progredienter Niereninsuffizienz verhindern, aufhalten oder zumindest verlangsamen können. In einer früheren Arbeit wurde bereits nachgewiesen, dass die Behandlung mit MMF zu einer verminderten tubulointerstitiellen Fibrose und verbesserten Organfunktion mit niedrigeren Nierenretentionsparametern führt (Brehmer 2011). Demzufolge ist die Behandlung mit dem als Immunsuppressivum etablierten MMF ein weiter bestehender und zu verfolgender Ansatz im Rahmen der antifibrotischen Therapie.

1.1 Entstehungsverlauf einer chronischen Niereninsuffizienz

Das morphologische Korrelat einer chronisch progredienten Niereninsuffizienz sind die zugrunde liegende tubulointerstitielle Fibrose und Glomerulosklerose (Boor et al. 2010). Da 90% des Nierenvolumens aus dem tubulointerstitiellen Nierenparenchym bestehen (Strutz und Neilson 2003), führen fibrotische Umbauprozesse in diesem Bereich zu einem deutlich stärkeren Verlust der Nierenfunktion als Veränderungen im Bereich des Glomerulums (Strutz und Müller 2006). Grundsätzlich ist unter einer Fibrose eine überschießende Synthese der kollagenen Bindegewebsfasern in Geweben und Organen zu verstehen (Wynn 2008). Die Fibrosierung wird zum einen durch die Akkumulation und zum anderen durch den verminderten Abbau (beispielsweise durch Matrixmetalloproteinasen) von interstitiellen Matrixbestandteilen im Interstitium verursacht. Die Fibrosierung wird dabei vorrangig durch Fibroblasten oder Myofibroblasten verursacht. Die Hauptbestandteile der gebildeten interstitiellen Matrix sind Kollagen, Fibronectin, Laminin, Proteoglykane, Polysaccharide und Glykoproteine (Eddy 1996). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass Fibroblasten in fibrotisch veränderten Nieren deutlich mehr Kollagen produzieren als in gesundem Nierengewebe (Rodemann und Müller 1991). Dieser Umstand stellt eine Erklärung für den progressiven Krankheitsverlauf bei chronischer Niereninsuffizienz dar.

Bei Fibroblasten handelt es sich gemäß der Definition von Kalluri und Zeisberg um Zellen, die weder Blutgefäßen, noch Entzündungszellen oder Epithelien zugeordnet werden können und den Hauptbestandteil des interstitiellen Gewebes sowie Bindegewebes darstellen (Kalluri und Zeisberg 2006). Die Aktivierung der für die Fibrosierung des Nierenparenchyms

verantwortlichen Myofibroblasten setzt eine Entzündungsreaktion im Gewebe und der damit verbundenen Migration von Entzündungszellen, vorrangig Lymphozyten und Makrophagen, voraus (Zeisberg et al. 2001). Die Myofibroblastenaktivierung wird heute als das Ursprungsereignis der Nierenfibrose angesehen. Infolgedessen werden Fibroblasten stimulierende Proteine freigesetzt. Dabei handelt es sich vorrangig um profibrotisch wirkende Proteine wie bspw. TGF- β 1 (*transforming growth factor- β 1*), das von TGF- β 1-stimulierten Fibroblasten sezernierte Protein CTGF (*connective tissue factor*), PDGF (*platelet derived growth factor*) und FGF (*fibroblast growth factor*) (Gupta et al. 2000; Eddy 2014). Weitere Aktivierungsmechanismen der Fibrosierung sind der direkte Zellkontakt mit Entzündungszellen, Hypoxie oder Hyperglykämie (Qi et al. 2006; Bechtel und Zeisberg 2009).

Aktuell gibt es für die Herkunft der aktivierten Fibroblasten/Myofibroblasten mehrere Erklärungsansätze. Zum einen wird vermutet, dass die Fibroblasten lokaler Herkunft sind und dem Interstitium entstammen. Die Myofibroblasten stellen demnach die aktivierte Form der Fibroblasten dar (Faulkner et al. 2005). Zum anderen könnte ein Teil der Myofibroblastenpopulation auch aus Perizyten oder glatten Muskelzellen entstanden sein (Duffield und Humphreys 2011). Ein weiterer Erklärungsansatz besagt, dass die Myofibroblasten im Rahmen der epithelial-mesenchymalen Transition aus Epithelzellen entstehen (siehe auch Kap. 1.3), die sich zu Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften verwandeln (Fragiadaki und Mason 2011). Zudem muss auch das Knochenmark als Entstehungsort von Fibroblasten in Betracht gezogen werden, da sowohl Fibroblasten gesunder wie auch von chronisch progredienter Niereninsuffizienz betroffener Nieren aus dem Knochenmark stammen (Wada et al. 2011). Eine aktuelle Studie aus dem Jahr 2013 verbindet diese Erkenntnisse und kommt zu dem Ergebnis, dass die aktivierten Fibroblasten/Myofibroblasten nicht generell einem bestimmten Ursprungsort zugeordnet werden können. Die an einer Nierenfibrose beteiligten Myofibroblasten bestehen zu 50% aus proliferierenden residenten Fibroblasten, kommen zu 35% aus dem Knochenmark, unterlagen zu 10% einer endothelial-mesenchymalen Transition und zu 5% einer epithelial-mesenchymalen Transition (EMT). Allerdings konnte kein Einfluss von Perizyten auf die Entstehung der Myofibroblasten oder Nierenfibrose nachgewiesen werden (LeBleu et al. 2013).

1.2 Alport-Mäuse als Modell einer chronisch progredienten Niereninsuffizienz

Das Versuchstiermodell der Kollagen-4A3-defizienten Mäuse (= Alport-Mäuse) ist bereits in der Vergangenheit erfolgreich als Modell für neue therapeutische Behandlungsoptionen angewendet worden. Homozygote Kollagen-4A3-defiziente Mäuse entwickeln eine chronische Niereninsuffizienz, die analog zur humanen Alport-Nephritis verläuft. Das Alport-Syndrom ist eine hereditäre und progrediente Erkrankung, die zu einer Nephropathie führt und sich mit einer Hämaturie und Proteinurie manifestiert. Desweiteren kommt es im Krankheitsverlauf zu einer Innenohrschwerhörigkeit, Augenveränderungen und Veränderungen der glomerulären Basalmembran, die zu einem terminalen Nierenversagen führen (Alport 1927; Gross und Weber 2005).

Das Alport-Syndrom folgt in 85% der Fälle, mit einer geschätzten Prävalenz von 1 : 5000, einem X-chromosomalen und in 15% der Fälle, mit einer geschätzten Prävalenz von 1 : 50000, einem autosomal rezessiven Erbgang. Beim Alport-Syndrom sind 80% der betroffenen Patienten männlichen Geschlechts (Gross und Weber 2005). Eine Mutation in den Genen, die für die Alphaketten $\alpha 3$, $\alpha 4$ und $\alpha 5$ des Kollagens Typ IV ($\alpha 3$ - $\alpha 5$ (IV)-Ketten) kodieren ist ursächlich für die Entstehung des Alport-Syndroms. Beim autosomalen Erbgang sind die Alphaketten $\alpha 3$ und $\alpha 4$ von einer Mutation betroffen, beim X-chromosomalen Erbgang die Alphakette $\alpha 5$ (Heidet und Gubler 2009). Die $\alpha 3$ - $\alpha 5$ (IV)-Ketten sind im Bereich der glomerulären Basalmembran sowie der Basalmembran von Cochlea und Retina die bestimmende Kollageneinheit. Durch den fehlerhaften Aufbau des Kollagen Typ IV, das aus einer Triple-Helix dreier Alphaketten besteht (Khoshnoodi et al. 2008), kommt es im Verlauf zu einer Lamellierung und Aufsplitterung der glomerulären Basalmembran, die zu einer glomerulären Sklerose, Podozytenhypertrophie und einer verdickten glomerulären Basalmembran führen (Hudson et al. 2003). Die Kollagen-4A3-defizienten Mäuse des Tiermodells entwickeln das Vollbild des Alport-Syndroms, da durch den fehlerhaften Einbau der $\alpha 3$ - $\alpha 5$ (IV)-Ketten und der damit einhergehenden abnormen Zusammensetzung der glomerulären Basalmembran eine interstitielle Fibrose entsteht, die letztlich zu einer terminalen Niereninsuffizienz führt (Gross und Weber 2005).

Bei den Kollagen-4A3-defizienten Mäusen kann man, analog zum Krankheitsverlauf der chronisch progredienten Niereninsuffizienz des Menschen, die renale Fibrose als gemeinsame Endstrecke beobachten. Damit stellt das Alport-Maus-Tiermodell ein wertvolles Werkzeug zur Beurteilung des Nutzens zielgerichteter antifibrotischer Therapien dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Alport-Mäuse genutzt, um die bei der Behandlung mit dem als

Immunsuppressivum etablierten MMF einhergehenden Veränderungen der Nierenfunktion, des Proteoms und Phosphoproteoms analysieren zu können.

1.3 Wirkungsweise und Einsatzmöglichkeiten von MMF

Nach oraler Applikation wird MMF rasch und nahezu vollständig absorbiert. In der Darmschleimhaut findet die vollständige präsystemische Metabolisierung statt. MMF wird hier in seinen pharmakologisch aktiven Metaboliten, die Mycophenolsäure (MPA) umgewandelt. MPA wird einerseits durch das Leberenzym Glucuronyltransferase in das pharmakologisch inaktive phenolische Mycophenolsäure-Glucuronid (MPAG) umgewandelt, andererseits entstehen als weitere MPA-Abbauprodukte 7-OH-Glukosid und Mycophenolsäure-Acylglucuronid (AcMPAG) (Shipkova et al. 1999). *In vitro* konnte für AcMPAG eine schwache, aber mit MPA vergleichbare Wirkung nachgewiesen werden (Gensburger et al. 2009). Wahrscheinlich hat es aber *in vivo* keine pharmakologische Wirkung und verursacht infolgedessen auch keine gastrointestinalen Nebenwirkungen (Gensburger et al. 2009; Raggi et al. 2010). MPAG wird zu 93% mit dem Urin und zu 7% mit den Fäzes eliminiert. Der enterohepatische Kreislauf führt durch eine intestinale und bakterielle Deglukuronidierung des MPAG etwa 6-12 Stunden nach der MMF-Applikation zu einem sekundären Anstieg der MPA-Plasmakonzentration. Die Konzentrationskurve (AUC) von MPA wird zu 40% durch das im enterohepatischen Kreislauf deglukuronidierte MPAG bestimmt (Fachinformation 2014). MPA und MPAG sind im Serum größtenteils an Albumin gebunden. Hohe MPAG-Konzentrationen führen dazu, dass MPA aus der Plasmaalbuminbindung verdrängt wird. Infolgedessen liegen bei hohen MPAG-Konzentrationen auch höhere Konzentrationen des ungebundenen pharmakologisch aktiven MPA vor und können damit zu einer Wirkungsverstärkung führen (Nowak und Shaw 1995).

MMF entfaltet seine Wirkung über dessen aktiven Metaboliten Mycophenolsäure (MPA). Durch eine nichtkompetitive reversible Hemmung der Inosinmonophosphat-Dehydrogenase (IMPDH), dem Schlüsselenzym in der De-novo-Synthese von Purinbasen, werden die RNA- und DNA-Synthese gehemmt und es kommt zu einer Proliferationshemmung vorwiegend in T- und B-Lymphozyten, die bspw. bei immunologischen Reaktionen wie der Transplantatabstoßung eine wesentliche Rolle spielen (Heemann et al. 1996). Die Hemmung der IMPDH führt dabei zu einer intrazellulären Verminderung von Guanodin-Phosphaten bei Überwiegen von Adenosin-Phosphaten (Villarreal et al. 2009; Karow und Lang-Roth 2014). Die Reduktion der vorhandenen Guanodin-Phosphate führt zu einer Unterdrückung der Glykosylierung und Expression von Adhäsionsmolekülen sowie Zelloberflächenantigenen

(Allison et al. 1993), einer Verringerung von Tetrahydrobiopterin, einem Kofaktor der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (Allison und Eugui 2000), und Stabilisierung von Aktinfilamenten in humanen Mesangiumzellen (Dubus et al. 2003). Diese MMF-induzierten Veränderungen bewirken letztendlich eine verminderte Rekrutierung von Lymphozyten und Monozyten zu Entzündungsloci, eine verringerte Stickstoffmonoxidproduktion und damit einhergehend geringere Gewebeschäden sowie eine Reduktion der Aktivierung von Mesangiumzellen mit positiven Effekten auf Glomerulosklerose und Allograft-Nephropathie (Schädigung der Transplantatnieren). Weiterhin führt der MMF-abhängige Schwund von Zytokin-produzierenden Zellen zu einer geringeren Entzündungsreaktion (Lui et al. 1998). Darüber hinaus kann MPA die Apoptose aktivierter T-Lymphozyten induzieren (Cohn et al. 1999).

Die in den aktivierten Lymphozyten vorkommende IMPDH Isoform Typ II wird von MPA etwa 5 Mal stärker als die IMPDH Isoform Typ I gehemmt. Aktivierte Lymphozyten und neoplastische Zellen exprimieren vorrangig die IMPDH-Isoform Typ II während die Isoform Typ I in allen anderen Zellen dominiert (Allison und Eugui 2000). Die IMPDH Typ II ist in Lymphozyten das Schlüsselenzym zur De-novo-Purin-Synthese, welche die zur DNA- und RNA-Produktion notwendigen Nukleotide aus verschiedenen Vorstufen neu bildet. Als Folge kommt es zu einer selektiven Hemmung der DNA-Synthese in den Lymphozyten, da diese den Wiederverwertungsstoffwechsel (*salvage-pathway*) von Purinbasen nicht nutzen können. Beim Salvage-pathway handelt es sich um eine Art Recycling, mittels erneuter Metabolisierung der beim DNA-/RNA-Abbau anfallenden Purinbasen (Allison et al. 1975). Desweiteren hemmt MPA die Expression von Interleukin-6 (IL-6), einem multifunktionalem Zytokin und entzündungsfördernden Botenstoff, der für die Steuerung von Immunantworten und Abwehrmechanismen verantwortlich ist. Bei entzündlichen Erkrankungen werden normalerweise erhöhte Interleukin IL-6-Konzentrationen nachgewiesen (Baer et al. 2004).

Die im Rahmen der systemischen MMF-Applikation zu erwartenden Nebenwirkungen sind überschaubar, da der Wirkstoff in therapeutischer Dosierung normalerweise sehr gut vertragen wird. Als unerwünschte Arzneimittelwirkung können Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts (Diarrhöen, Erbrechen, Bauchschmerzen und Übelkeit), Veränderungen des Blutbilds (Anämien, Thrombozytopenien und Leukopenien) sowie opportunistische Infektionen (Herpes simplex, Zoster, Cytomegalievirus) auftreten (Fachinformation 2014). Die häufigsten MMF-abhängigen unerwünschten Arzneimittelwirkungen betreffen den oberen Gastrointestinaltrakt. Durch die Entwicklung von Mycophenolat-Natrium, einer magensaftresistenten MMF-Form mit verzögerter MPA-Freisetzung im Dünndarm, wurde versucht die Verträglichkeit zu verbessern (Filler und Buffo 2007). Mycophenolat-Natrium senkt zwar die Häufigkeit gastrointestinaler Nebenwirkungen,

aber die hämatologischen Nebenwirkungen treten unverändert auf. Aktuell gibt es daher keine pharmakologische Empfehlung für den Einsatz von Mycophenolat-Natrium (Zhang et al. 2014).

Mycophenolat-Mofetil (MMF) ist ein Immunsuppressivum, das aktuell zur Prophylaxe der akuten Abstoßungsreaktion nach Transplantation solider Organe, vorrangig bei Herz-, Leber- oder Nierentransplantationen, und hämatopoetischen Stammzellen eingesetzt wird (Shipkova et al. 2005). Zur Prophylaxe akuter Abstoßungsreaktionen wird MMF zweimal täglich oral mit einer Dosierung zwischen 1,0 g und 1,5 g appliziert (Villarroel et al. 2009).

Aber auch bei der Behandlung von Autoimmunkrankheiten, wie dem systemischem Lupus erythematodes (SLE) (Merville et al. 2004; Ginzler et al. 2005), Psoriasis (Epinette et al. 1987), chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Smith und Cooper 2014) sowie der chronischen Transplantat-Nephropathie (Merville et al. 2004) wird MMF mittlerweile erfolgreich eingesetzt.

Im Übrigen wird MMF auch zur Behandlung von Arteriosklerose und in letzter Zeit auch bei Hepatitis eingesetzt. Arteriosklerose ist eine chronische Entzündungsform, die aufgrund einer Endothelzellen- Fehlfunktion, Fibrosierungsprozessen, oxidativem Stress und entzündlicher Zellaktivierung zur Plaqueeentwicklung und Destabilisierung führt. T-Lymphozyten spielen bei der Entstehung von Arteriosklerose ebenfalls eine Schlüsselrolle. Dies legt die Vermutung nahe, dass die proliferationshemmenden Eigenschaften von MMF den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen können (Olejarz et al. 2014).

Im Rahmen einer Infektion mit dem Hepatitis C Virus (HCV) kommt es in den meisten Fällen zu einer Chronifizierung. Bei einem Drittel dieser Patienten entwickelt sich daraus eine Leberfibrose und –zirrhose, die auf einer vermehrten Kollagenbildung durch hepatische ITO-Zellen beruht (Arastéh 2009). Da MPA zudem ein potenter Induktor der zellulären Apoptose ist, konnte die ITO-Zellaktivierung sowie die daraus entstehende Leberfibrose abgeschwächt werden (Dong et al. 2015).

In einer kürzlich durchgeführten Studie wurde MMF ein hemmender Effekt auf die EMT zugeschrieben. Dieser Effekt zeigte sich bei verschiedenen Immunsuppressiva, wobei die hemmende Wirkung bei MMF im Vergleich zu Cyclosporin A, Azathioprin und Methylprednisolon am stärksten ausgeprägt war. Daraus konnte die Hypothese abgeleitet werden, dass MMF zu weniger Fibrose und einem besseren Langzeitüberleben von Transplantaten führt (Copeland et al. 2007). Bei der EMT handelt es sich um einen Zelltransformationsprozess. Sie entsteht im Rahmen der Regeneration des Epithels nach Verletzungen und beschreibt die Umwandlung von proliferierenden Epithelzellen in matrixbildende Fibro- und/oder Myofibroblasten. Diese Zellmigration steht in der Regel im

Zusammenhang mit einer Organschädigung und der daraus resultierenden Fibrosierung (Fragiadaki und Mason 2011). Die EMT wird aber auch durch den transformierenden Wachstumsfaktor (TGF- β) hervorgerufen und/oder unterstützt. Sowohl TNF- α als auch Interleukin-1 stimulieren TGF- β (Willis und Borok 2007). EMT spielt beim Fortschreiten der Nierenfibrose ebenfalls eine wichtige Rolle, da die zunehmende Zahl an Myofibroblasten zu einer Tubulusatrophie führt. Nach neueren Erkenntnissen handelt es sich hierbei aber um einen reversiblen Prozess. Analog zu anderen Organen wird auch die Fibrose in den Epithelzellen der Nierentubuli durch TGF- β induziert. Mittlerweile konnte das *bone morphogenic protein-7* (BMP-7) als Antagonist des TGF- β identifiziert werden. Der dargestellte Antagonismus führt zu einer Reparatur/Regeneration der verletzten Nierenepithelzellen (Zeisberg und Kalluri 2004). MPA kann dabei die Reparatur der verletzten Epithelzellen unterstützen, da es die EMT-induzierenden Botenstoffe TNF- α und Interleukin-1 hemmt (Eugui 2002). Letztendlich verhindert MPA nicht nur die Organabstoßung bei Patienten nach Nierentransplantation, sondern verlangsamt auch die Progression einer Nierenfibrose (Weimer et al. 2003; Kaminska et al. 2005).

1.4 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung eines potentiellen antifibrotischen und/oder nephroprotektiven Effektes der Behandlung von COL4A3-defizienten Mäusen (COL4A3^{-/-}) mit Mycophenolat-Mofetil (MMF) im Hinblick auf die Nierenfunktion, die quantitative Veränderung von Nierenproteinen und deren Phosphorylierungsstatus.

Diese Untersuchungen wurden *in vivo* an einem nicht-hypertensiven Tiermodell für die autosomal-rezessive Form des Alport-Syndroms an Versuchstieren (männliche homozygote Mäuse) durchgeführt.

In der vorliegenden Studie wurden insbesondere die Auswirkungen der MMF-Behandlung

- auf die tubulointerstitielle Veränderungen der Nieren
- auf die Nierenfunktion (Nierenretentionsparameter im Serum) und Veränderungen der Serumelektrophoresefraktionen
- auf den Phosphorylierungsstatus der Nierenproteine
- auf die quantitative Expression der Proteine des Nierengewebes

untersucht.

Im Rahmen der Proteom-Untersuchung sollte aufgeklärt werden, ob die Behandlung mit MMF einen wesentlichen Einfluss auf die Expression bzw. Modifikation bestimmter Kandidatenproteine hat und ob die Synthese bestimmter Proteine verändert wird, die im Zusammenhang mit Signalwegen für bestimmte Wachstumsfaktoren stehen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

Die folgenden Chemikalien, Puffer, Lösungen, Primerpaare, Gebrauchswaren und Geräte wurden in dieser Studie verwendet:

2.1.1 Chemikalien

Acetonitril (ACN)	J.T. Baker, Deventer, Holland
Acrylamid/Bisacrylamid (30%)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Agarose	Life Technologies, Paisley, Schottland
Ameisensäure (Formic acid)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ammoniumbicarbonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ampholyte	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Ampuwa	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad Laboratories, München
Benzylalkohol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
BioRad Protein Assay	Bio-Rad Laboratories, München
Borsäure	MERCK KGaA, Darmstadt
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
BPB	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
BSA	New England Biolabs Inc., Ipswich, USA
Butanol	MERCK KGaA, Darmstadt
Calciumchlorid	MERCK KGaA, Darmstadt
Carboxymethylcellulose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Cell proliferation ELISA	Roche Diagnostics, Penzberg
CHAPS	AppliChem GmbH, Darmstadt
Chloroform	MERCK KGaA, Darmstadt
ddH ₂ O	UMG, Göttingen

DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DNeasy® Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden
DTT	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
dNTP Mix 10 mM	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Dulbecco´s PBS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Essigsäure 100%	MERCK KGaA, Darmstadt
Ethanol	GeReSo mbH, Einbeck
Ethidiumbromid	MERCK KGaA, Darmstadt
Formaldehyd Load Dye	Applied Biosystems/Ambion, Austin, Texas, USA
Formalin	J.T. Baker, Deventer, Holland
Glycerin	MERCK KGaA, Darmstadt
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Guanosin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Isopropanol	MERCK KGaA, Darmstadt
Iodoacetamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumchlorid	MERCK KGaA, Darmstadt
Kaliumhexacyanoferrat (III)	MERCK KGaA, Darmstadt
Magnesiumchlorid	MERCK KGaA, Darmstadt
Mayers Hämlaunlösung	MERCK KGaA, Darmstadt
Methanol	J.T. Baker, Deventer, Holland
Mineralöl	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Mycophenolat-Mofetil	Roche, Palo Alto, CA, USA
Natriumacetat	MERCK KGaA, Darmstadt
Natriumcarbonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumchlorid	MERCK KGaA, Darmstadt
Natriumcitrat	MERCK KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid	MERCK KGaA, Darmstadt
Natriumthiosulfat	MERCK KGaA, Darmstadt

Nuclease-Free Water (NFW)	Ambion, Austin, TX, USA
Paraplast	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
PBS	GIBCO, Paisley, Großbritannien
PCR Buffer 10x	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Phosphatase Inhibitor	Sigma, Saint Louis, USA
Platinum® Taq DNA Polymerase	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
PMSF	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Precision Plus Protein Standards	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Proteinase Inhibitor	Sigma, Saint Louis, USA
Pro-Q® Diamond Phosphoprotein	Invitrogen, Ltd., Paisley, Großbritannien
Roti® Histokitt	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Salzsäure	MERCK KGaA, Darmstadt
Silbernitrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
SDS	SERVA Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg
TEMED	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Thiourea	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
TFA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tris	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
TRIzol® Reagenz	Invitrogen Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Trypsin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tween 80	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Urea	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

2.1.2 Puffer und Lösungen

Sofern keine anderen Angaben gemacht werden, wurden die verwendeten Puffer und Lösungen entweder mit deionisiertem Wasser (ddH₂O) oder mit Ampuwa (steriles pyrogenfreies Wasser) hergestellt.

Agaroselösung	1,5% (w/v) Agarose TBE-Puffer	1x
---------------	----------------------------------	----

10x TBE-Puffer	890 mmol/l Tris 890 mmol/l Borsäure 10 mmol/l Na ₂ EDTA pH 8,0
Carboxymethylcelluloselösung	0,861 ml Benzylalkohol 0,376 ml Tween 80 0,9 g NaCl 0,5 g Carboxymethylcellulose add 100 ml dH ₂ O pH 3,5
Mastermix für das Genotyping	0,5 µl Primer COL4A3-for 0,5 µl Primer COL4A3-rev 0,5 µl Primer COL4A3-neomutant 0,5 µl dNTP Mix 0,2 µl Platinum® Taq DNA Polymerase 2,5 µl PCR Buffer 10x 10,3 µl dH ₂ O
<u>Proteinaufbereitung</u>	
Äquilibrationspuffer 1	6 mol/l Urea 30% (v/v) Glycerin 2% (w/v) SDS 0,15 mol/l Tris (pH 8,8) 0,25% (w/v) BPB 15 mmol/l DTT
Äquilibrationspuffer 2	6 mol/l Urea 30 % (v/v) Glycerin 2% (w/v) SDS 0,15 mol/l Tris (pH 8,8) 0,25% (w/v) BPB 40 g/l Iodoacetamid
Lysepuffer	7 mol/l Urea 2 mol/l Thiourea 4% (w/v) CHAPS 1% (w/v) DTT 2% (v/v) Ampholyte 10 mmol/l PMSF 1% (v/v) Phosphatase Inhibitor 1% (v/v) Proteinase Inhibitor
BPB-Lösung	0,25% (w/v) BPB 1,5 mol/l Tris (pH 8,8)
PBS-Puffer pH 7,4	137 mmol/l Natriumchlorid 2,7 mmol/l Kaliumchlorid 10 mmol/l Dinatriumhydrogenphosphat 1,76 mmol/l Kaliumdihydrogenphosphat

Rehydrationspuffer
7 mol/l Urea
2 mol/l Thiourea
4% (w/v) CHAPS
0,2% (w/v) DTT
1% (v/v) Ampholyte

Elektrophorese

Elektrophoresepuffer (5x)
0,025 mol/l Tris (pH 8,3)
0,192 mol/l Glycin
0,5% (w/v) SDS

Phosphoproteinfärbung

Entfärber
20% (v/v) ACN
5% (v/v) Natriumacetat (50 mmol/l, pH 4)

Fixierungslösung
50% (v/v) Methanol
10% (v/v) Essigsäure

Silberfärbung

Fixierungslösung
50% (v/v) Methanol
10% (v/v) Essigsäure

Lagerungspuffer
5% (v/v) Essigsäure

Entwicklungslösung
6% (w/v) Natriumcarbonat
0,0185% (v/v) Formaldehyd
16 µmol/l Natriumthiosulfat

Silberfärbungslösung
12 mmol/l Silbernitrat
0,026% (v/v) Formaldehyd

Sensitizer
0,8 mmol/l Natriumthiosulfat

Waschpuffer 1
50% (v/v) Ethanol

Waschpuffer 2:
30% (v/v) Ethanol

In-Gel-Verdau

Entfärbe-Lösung
25 µl Kaliumhexacyanoferrat(III) (30 mmol/l)
25 µl Natriumthiosulfat (100 mmol/l)

Trypsin-Verdau-Puffer
25 µl Ammoniumbicarbonat (1 mol/l)
25 µl Trypsin (10 ng/µl)
950 µl ddH₂O

Verdaupuffer ohne Trypsin
5 µl CaCl₂ (1 mol/l)
25 µl Ammoniumbicarbonat (1 mol/l)
970 µl ddH₂O

2.1.3 Oligonukleotid-Primer

Oligonukleotid-Primer für das Genotyping von Invitrogen, Carlsbad, CA USA:

COL4A3-for	5'- CCA GGC TTA AAG GGA AAT CC- 3'; 58,4 °C; 926 Bp
COL4A3-rev	5'- CCT GCT AAT ATA GGG TTC GAG A – 3'; 60,1 °C; 926 Bp
COL4A3neo-muta	5'- ATT CGC CAA TGA CAA GAC G – 3'; 55,0 °C; > 926 Bp

2.1.4 Gebrauchswaren

Cobas 8000 Probengefäß	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Combitips plus	Eppendorf AG, Hamburg
Deckgläser	Menzel GmbH & Co., Braunschweig
Einstreu	J. Rettenmaier & Söhne GmbH & Co., Rosenberg
Einmalhandschuhe	Hartmann, Hildesheim
Einmalskalpell „Feather Disposable“	Feather Safety Razor Co., LTD., Osaka, Japan
Eppendorf-Cups	Eppendorf AG, Hamburg
Falcon-Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Filterpapier	Whatman Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Gelgießplatten	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Kämme	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Knopfkanüle (Durchmesser: 0,67 mm, Länge: 28,0 mm)	Acufirm GmbH, Dreieich
Küvetten	Hellma, Müllheim
Kanülen verschiedener Größen	B. Braun AG, Melsungen
Mikro-Schraubröhre 2 ml PP	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Objektträger	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Parafilm „M“	Parafilm, Chicago, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettierhilfe pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co., Eberstadt
Eppendorf Multipette plus	Eppendorf AG, Hamburg

ReadyStrip™ IPG Strip	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Reagiergefäß 0,5 ml PP	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reaktionsgefäße Tubes 0,2 & 0,6 ml	Biozym, Hessisch Oldendorf
Serologische Pipette 10 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Spritze Omnifix® U-40 Insulin/ 40 I.U.	B. Braun AG, Melsungen
11-Felder Urinteststreifen	URIFLET S; ARKRAY Factory Inc., Shiga, Japan

2.1.5 Geräte

Canon LiDE 210 Scanner	Canon Deutschland GmbH, Krefeld
CapLC-System	Waters, Milford, MA, USA
Cobas® 8000 modular analyzer	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Densitometer Hyrys 2	Sebia GmbH, Fulda
Einbettautomat Duplex Professor	Shandon Southern Products LTD, Runcorn, Großbritannien
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen GmbH, Isernhagen
Färbeautomat Stainix	DiaPath s.r.l., Martinego, Italien
FLA 5100	Fujifilm Europa GmbH, Düsseldorf
Fluor-S™ Multi-Imager	Bio-Rad, München
Folienschweißgerät Vacupack	Krupps GmbH, Offenbach am Main
Gel Dryer, Model 583	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Glo Runner Mikroplate Luminator	Bioscience Technology, Winooski, USA
Hamilton Pipette	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Kühlzentrifuge	Hettich, Tuttlingen
Magnetrührer	IKA Werke GmbH & Co., Staufen
Massenspektrometer Quattro Premier XE-Micromass-System	Waters Corporation, Milford Massachusetts, USA
Microtome Microm HM325	Thermo Scientific, Walldorf
Mikroskop Diavert	Leitz GmbH, Wetzlar

Mikroskop Zeiss Standard 14 mit Objektiv 5165602 und Ocular K-pl-W 12,5x/18	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Heraeus Multifuge 1 S-R	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Zentrifuge Type 3530	Abbott Laboratories GmbH, Hannover
Zentrifuge Mikro 200	Hettich, Tuttlingen
Netzteil Power Pac 1000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
pH-Meter	Wissenschaftlich-technische Werkstätten GmbH, Weilheim
Personal Cyclor	Biometra, Göttingen
Protean IEF Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Micromass Q-TOF Ultima	MS Vision GmbH, Goch
Reinstwasser-SystemSeralpur pro 90 CN	SERAL Erich Alhäuser GmbH, Ransbach Baumbach
Schüttelmaschine	Schütt, Göttingen & Bühler, Tübingen
Serumelektrophorese Hyrys 2	Sebia GmbH, Fulda
SpeedVac SVC100	UniEquip GmbH, München
Ultraschall-Desintegrator Sonifer	Branson Ultraschall GmbH, Dientzenbach
Urinanalysegerät Aution Max	Arkray Inc., Shiga, Japan
Vakuumentrifuge Univapo 150 H	UniEquip GmbH, Martinsried/München
Vortex Genie 2	Scientific Industries, USA und Schütt, Göttingen
Waagen	Sartorius, Göttingen
Wasserbad GFL Typ 1003	Krannich GmbH & Co., Göttingen

2.2 Tiermodell und Studiendesign

2.2.1 Tiermodell

Im Rahmen dieser Arbeit wurden als Modell für die progrediente renale Fibrose, in Analogie zum humanen und autosomal rezessiv vererbten Alport-Syndrom (Cosgrove et al. 1996), COL4A3-defiziente Mäuse (Jackson Laboratory, Bar Harbour, ME, USA) für das Tierversuchsvorhaben genutzt. Diese Mäuse wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. O. Gross, Innere Medizin, Abteilung Nephrologie und Rheumatologie, Universitätsmedizin Göttingen (UMG) zur Verfügung gestellt. Die Genehmigung des Tierversuchsvorhabens erfolgte durch das Niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) Oldenburg (Aktenzeichen Tierversuchsantrag: 33.9-42502-04-11/0379). Die Versuchstiere waren in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen untergebracht und wurden dort behandelt. Die Tierpflege erfolgte gemäß den Vorschriften zur Labortierhaltung der Tierschutzkommission der Universitätsmedizin Göttingen und unter Berücksichtigung der gesetzlichen Regelungen des Niedersächsischen Landesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. Es befanden sich dabei bis zu 3 Tiere in einem Käfig, Standardkäfig der Größe III- 40 x 25 x 15 cm, mit keimarmen Einstreu. Die Raumtemperatur betrug 21 °C und die Tiere waren einer 12-stündigen Dunkelphase von 18:00 bis 06:00 Uhr ausgesetzt. Leitungswasser in Tränkeflaschen und pelletiertes Halterungsfutter stand den Mäusen dabei immer zur Verfügung.

2.2.2 Genotypisierung der Versuchstiere und Studiendesign

Die Genotypisierung der Versuchstiere wurde in der vierten oder fünften Lebenswoche freundlicherweise durch die Kollegen der Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. O. Gross, Inneren Medizin, Abteilung Nephrologie und Rheumatologie, UMG durchgeführt (Gross et al. 2003). Als Material für die Biopsie wurde ein ca. 5 mm langes Schwanzstück des jeweiligen Versuchstiers genutzt. Die Gewebeprobe wurde nach Zugabe des ATL-Puffers (180 µl) sowie der Proteinase K (20 µl) aus dem DNeasy® Blood & Tissue Kit über 5 h bei 56 °C unter konstantem Schütteln verdaut. Danach wurde die PCR mit den COL4A3-Primern für das Genotyping der Fa. Invitrogen durchgeführt. Pro Tube wurden dafür 10 µl der verdauten Proteine und 15 µl des Mastermixes für das Genotyping pipettiert.

Ablauf der PCR:

- | | | |
|------------------------|------------------------------|-----------------------|
| 1.) 95 °C für 4 min, | 2.) 64 °C für 1 min, | |
| 3.) 72 °C für 2,5 min, | 4.) 95 °C für 1 Minute, | 5.) 62 °C für 1 min; |
| | 3.)-5.) 3 Mal wiederholen; | |
| 6.) 72 °C für 2,5 min, | 7.) 95 °C für 1 min, | 8.) 60 °C für 1 min; |
| | 6.)-8.) 3 Mal wiederholen; | |
| 9.) 72 °C für 2,5 min, | 10.) 95 °C für 1 min, | 11.) 58 °C für 1 min; |
| | 9.)-11.) 41 Mal wiederholen; | |
| 12.) 72 °C für 4 min, | 13.) 72 °C für 1 min | |

Danach wurden 10 µl des PCR-Produkts und 1 µl Loading Dye zusammen auf ein 1,5%iges Agarose-Gel übertragen und bei 70 Volt aufgetrennt. Anschließend wurden die DNA-Banden mithilfe des Fluor-STM Multi-Imager sichtbar gemacht und fotografiert. Bei den Wildtyp-Mäusen zeigte sich auf Höhe von 926 Bp eine einzelne Bande, bei den homozygot COL4A3-defizienten Mäusen eine einzelne Bande oberhalb der Höhe von 926 Bp und bei den heterozygot COL4A3-defizienten Mäusen war sowohl die Bande der Wildtyp- wie auch der homozygot COL4A3-defizienten-Mäuse sichtbar.

Die Tierversuchsdurchführung erfolgte in einer Versuchsreihe von 27 männlichen und homozygot COL4A3-defizienten sowie 3 Mäusen des Wildtyps (129/SvJ) als Kontrollgruppe. Die 5 Wochen alten COL4A3-defizienten Mäuse wurden, wenn sie mindestens 16 g wogen, durch Randomisierung entweder der MMF- (100 mg/kg/d MMF) oder der PLC-Versuchsgruppe (0 mg/kg/d MMF) zugeordnet.



Abbildung 1 Versuchstiergruppen

Im Rahmen der Studie gab es 3 Versuchstiergruppen. Zum einen COL4A3-defiziente Mäuse, die mit MMF und zum anderen COL4A3-defiziente Mäuse, die mit PLC behandelt wurden sowie WT-Mäuse ohne Behandlung als Kontrollgruppe.

Die Verabreichung des Medikaments bzw. des Placebos erfolgte *per os* über eine Magenknopfsonde (Durchmesser: 0,67 mm, Länge: 28,0 mm). Als Trägersubstanz bzw. Placebo wurde Carboxymethyl-Cellulose verwendet. Die Behandlung der Versuchstiere wurde in der 6. Woche postnatal begonnen und 14 Tage lang durchgeführt. Vor der Wirkstoffapplikation wurden die Tiere täglich gewogen, um eine gewichtsadaptierte Dosierung zu gewährleisten, den Allgemeinzustand der Mäuse regelmäßig zu beurteilen und eine kurzfristige Intervention zu ermöglichen. Gemäß den Vorgaben der Tierschutzkommission führte bei 7 Versuchstieren ein inadäquater Gewichtsverlust (> 20%

des Körpergewichts), zunehmende Apathie, eine deutlich reduzierte Trinkmenge oder Nahrungsaufnahme zu einem Versuchsabbruch. Die Tiere erhielten täglich je nach Versuchsgruppe entweder 0 oder 100 mg/kg/d MMF in Carboxymethyl-Cellulose. Die 3 Wildtyp-Mäuse erhielten als Kontrollgruppe auch 0 mg/kg/d MMF in Carboxymethyl-Cellulose. Zu Beginn der 8. Lebenswoche, das heißt 24 Stunden nach der letzten Wirkstoffapplikation, wurden die Versuchstiere (inkl. der 3 Wildtyp-Mäuse) getötet (zervikale Dislokation) und im Anschluss Blut, Urin sowie die Nieren entnommen. Das bei der Präparation der Versuchstiere durch kardiale Punktion gewonnene Vollblut wurde umgehend in ein E-Tube überführt und in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Im Anschluss wurden im Labor die Vollblutproben aufgetaut, nach Zentrifugation bei 8400 g mit 0,9%iger NaCl-Lösung verdünnt (1:5 oder 1:10 v/v) und bei -20 °C, bis zur Messung der klinisch-chemischen Parameter sowie der Wirkstoffspiegel, aufbewahrt. Der bei der Präparation der Mäuse gewonnene Urin wurde ebenfalls in ein E-Tube überführt, in flüssigem Stickstoff kryokonserviert und bis zur Bestimmung der Urinparameter, bei -80 °C gelagert. Eine halbe Niere (Teilung in äquidistanter Schichtung) wurde zur histologischen Untersuchung genutzt. Diese halbe Niere wurde dafür umgehend für 8 h in Formalin und danach in 70%igem Ethanol bei 4 °C gelagert. Die verbliebenen eineinhalb Nieren wurden umgehend in flüssigem Stickstoff und danach bei -80 °C gelagert.

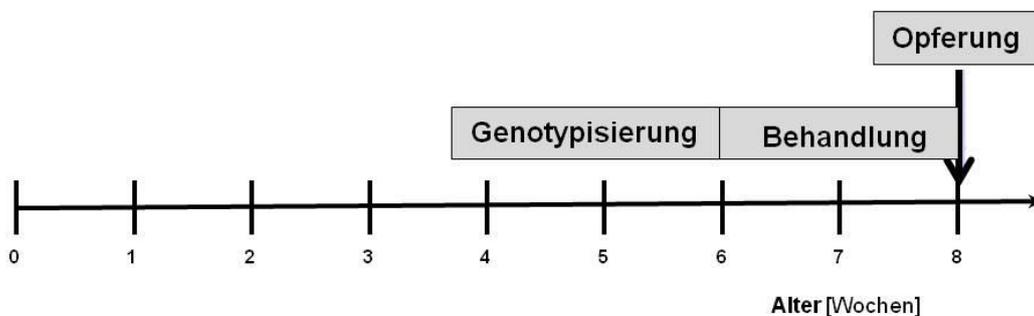


Abbildung 2 **Behandlungsverlauf der Versuchstiere**

Die COL4A3-defizienten Versuchstiere wurden in der 4.-6. Lebenswoche genotypisiert und im Anschluss einer 14-tägigen Behandlung mit MMF oder PLC unterzogen. Zu Beginn der 8. Lebenswoche wurden die Versuchstiere getötet (zervikale Dislokation) und im Anschluss Blut, Urin und Nieren entnommen.

2.3 Methoden

Die folgenden Methoden wurden in der Studie verwendet:

2.3.1 Histologische Färbung mit Hämatoxylin und Eosin

Die histologische Färbung der Nierenschnittpräparate mit Hämatoxylin und Eosin wurde freundlicherweise durch die Kollegen der Arbeitsgruppe Dr. med. F. Schultze, Zentrum Innere Medizin, Abteilung Gastroenterologie und Endokrinologie, UMG durchgeführt. Damit die Niereneinbettung in Paraffin erfolgen konnte, mussten die Nieren zur Entwässerung eine aufsteigende Ethanolreihe (70% - 100% EtOH) und ein Xylolbad in einem automatischen Einbettautomaten über Nacht durchlaufen. Am Ende des Verfahrens befanden sich die Nieren in einem 56 °C warmen Paraplast und konnten in Paraffin eingebettet werden. Aus den so entstandenen Paraffinblöcken wurden mithilfe eines Mikrotoms 5 µm dicke Schnittpräparate gefertigt und diese auf einem Objektträger fixiert. Anschließend wurden die Objektträger zuerst für 30 min auf einer Heizplatte und dann über Nacht bei 37 °C im Brutschrank getrocknet. Die Färbung der Präparate erfolgte am Stainix-Färbeautomaten. Dafür mussten die auf Objektträger befindlichen Nierenschnittpräparate zuerst in einem 10 minütigem Xylolbad manuell entparaffiniert werden.

HE-Färbung

Die Eosinfärbelösung wurde direkt vor der Färbung mit einigen Tropfen 100%iger Essigsäure versehen.

Ablauf der Färbemethode:

01	Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe:	100% EtOH	(2 min)
		80% EtOH	(2 min)
02	Spülung mit dH ₂ O		(2 min)
03	Anfärbung mit Mayers Hämalaunlösung		(4 min)
04	Spülung mit dH ₂ O		(1 min)
05	Bläuen- Behandlung des Präparats mit fließendem Leitungswasser		(15 min)
06	Anfärbung mit Eosin		(7 min)
07	Spülung mit dH ₂ O		(2 min)
08	Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe:	80% EtOH	(1 min)

	100% EtOH	(1 min)
	100% EtOH	(2 min)
09 Xylol		(3 min)

Durch die Behandlung des gefärbten Präparates mit fließendem Leitungswasser erhöht sich der pH-Wert. Infolgedessen kommt es zu einem Farbumschlag der durch Hämatoxylin zuerst rötlich-braun gefärbten Zellkerne in die typisch blau-violette Färbung.

Für jede Versuchstieriere wurden 5 Schnitte angefertigt und die daraus entstandenen Präparate der Hämatoxylin-Eosin-Färbung unterzogen. Um die Präparate zu konservieren, wurden sie mit Deckgläsern und Roti®Histokitt als Klebstoff eingedeckt.

Auswertung der Gewebeschnitte

Für jedes Versuchstier wurden 3 mit Hämatoxylin-Eosin gefärbte Präparate hergestellt, welche unter Zuhilfenahme eines semiquantitativen Bewertungssystems beurteilt worden sind. Das Bewertungssystem basiert auf der Banff-Klassifikation für die chronische Nierentransplantpathologie (Racusen et al. 1999). Die Auswertung der Gewebeschnitte erfolgte durch 2 unterschiedliche Untersucher und war dabei jeweils verblindet (Petrova et al. 2011). Die Kriterien zur Bewertung der chronischen Allograft-Nephropathie sind die interstitielle Fibrose und Tubulusatrophie. Diese histologischen Veränderungen wurden in eine Bewertungsskala von 0 bis 3 eingeteilt. Dabei steht 0 für keine Veränderungen, 1 für Veränderungen bei weniger als 25% der Fläche, 2 für Veränderungen zwischen 25% und 50% der Fläche und 3 für Veränderungen bei mehr als 50% der Fläche.

2.3.2. Bestimmung der Serum- und Urinparameter

2.3.2.1 Klinische Chemie

Die Serumkonzentrationen der klinisch-chemischen Parameter Kreatinin (enzymatisch), Harnstoff-N und Gesamtprotein wurden in einer 1:5 (0,9%iger NaCl-Lösung) verdünnten Probe gemäß den Herstellerangaben am Cobas® 8000 modular analyzer bestimmt (Brandhorst et al. 2010).

2.3.2.2 Serumelektrophorese

Die Serumelektrophorese wurde mit einer 1:10 (0,9%iger NaCl-Lösung) verdünnten Probe am Hyrys 2 Densitometer (Dünnschichtchromatografie) der Fa. Sebia gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Hierbei erfolgte die Trennung sowie Charakterisierung der 5 Proteinfractionen, Albumin, Alpha1-Globulin, Alpha2-Globulin, Beta-Globulin und Gamma-

Globulin. Proteine besitzen aufgrund des unterschiedlichen Gehaltes an sauren und basischen Aminosäuren eine bestimmte, vom pH-Wert der Lösung abhängige Gesamtladung. Dadurch war eine elektrophoretische Auftrennung der Proteinfractionen möglich (Hallbach 2011). Die Normwerte der einzelnen Proteinfractionen stellen sich wie folgt dar: Albumin 58-70%, Alpha1-Globulin 2-5% (Hauptbestandteile: α 1-Antitrypsin, α -1Lipoprotein); Alpha2-Globulin 5-10% (Hauptbestandteile: Coeruloplasmin, Haptoglobin, Alpha-2-Makroglobulin); Beta-Globulin 8-14% (Hauptbestandteile: Transferrin, β -Lipoprotein, Plasminogen); Gamma-Globulin 10-20% (Hauptbestandteile: Antikörper, z.B. IgG) (Kaneko 1980).

2.3.2.3 Urinteststreifen

Mithilfe des 11 Reagenzzonen umfassenden Urinteststreifens URIFILET S der Fa. Arkray wurden die Veränderungen der Urinzusammensetzung der Versuchstiere bewertet. 3-10 μ l der Urinprobe wurden auf jeweils eine Reagenzzone pipettiert und dabei folgende Urinparameter/-bestandteile bestimmt: Glukose, Protein, Bilirubin, Urobilinogen, pH-Wert, Hämoglobin, Keton, Nitrit, Leukozyten und das spezifische Gewicht (Dichte). Ein Urinteststreifen ist ein, auch außerhalb des Labors durchführbares, semiquantitatives und qualitatives Testverfahren. Zur Bewertung der 11 Reagenzzonen nutzten wir den Aution Max, ein vollautomatisches Urinanalysegerät der Fa. Arkray.

2.3.2.4 Urinsediment

Die lichtmikroskopische Beurteilung der Urinsedimente führten wir an Urinproben à 100 μ l am Kontrastphasen-Mikroskop der Fa. Zeiss (Mikroskop Zeiss Standard 14 mit Objektiv 5165602 und Ocular K-pl-W 12,5x/18) bei 400-facher Vergrößerung und nach Zentrifugation (3000 g, 2 min) mit der Zentrifuge Typ 3530 der Fa. Abbott Laboratories durch.

2.3.3 Bestimmung MPA- und MPAG-Spiegel

Die Bestimmung der MPA- und MPAG-Spiegel erfolgte analog einer validierten massenspektrometrischen Methode (Streit et al. 2004; Brandhorst et al. 2006) am Tandem-Massenspektrometer (LC-MS/MS: Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Koppelung) der Fa. Waters Cooperation. Die Serumprobe war dabei im Verhältnis 1:5 mit 0,9 %iger NaCl-Lösung verdünnt.

2.3.4 Darstellung und Identifizierung von Proteinen aus Nierengewebe

2.3.4.1 Proteinextraktion

Um die Proteine extrahieren zu können, musste zuerst die Gesamt-RNA aus dem Nierengewebe der Versuchstiere isoliert werden. Dies wurde mit der Methode nach Chomczynski und Sacchi (Chomczynski und Sacchi 1987) unter Zuhilfenahme des TRIzol®-Reagenz modifiziert durchgeführt. Das TRIzol®-Reagenz ist eine monophasische Lösung, die aus Phenol und Guanidinisothiocyanat besteht. Dabei wurden zuerst 50-100 mg Organgewebe in 1 ml TRIzol®-Reagenz mit einem Dispergiergerät homogenisiert und in 200 µl Chloroform auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zentrifugation (12000 g, 4 °C, 15 min) der Probe. Nach der Zentrifugation bestand die Flüssigkeit aus 3 Phasen: die obere wässrige und RNA enthaltende, farblose Phase, die trübe und weißlich gefärbte, DNA enthaltende Interphase sowie die untere, rot gefärbte, Protein enthaltende organische Phase (Phenolphase). Die anschließende Präzipitationszeit der RNA mit 500 µl Isopropanol betrug 30 min. Danach wurde die Flüssigkeit erneut zentrifugiert und das entstandene Pellet einmalig mit 70%igem Ethanol gewaschen, nochmals zentrifugiert (12000 g, 4 °C, 5 min), an der Luft getrocknet, in dH₂O aufgelöst und bei -80 °C gelagert.

Als nächstes wurden die beiden verbliebenen Phasen voneinander getrennt. Dabei war es notwendig, dass die DNA zuerst durch eine Ethanol-fällung mit 300 µl Ethanol sowie einer 3 minütigen Inkubation bei RT präzipitiert wurde. Nach der Inkubation wurden die Proben erneut zentrifugiert (2000 g, 4 °C, 5 min). Danach befanden sich im Reagiergefäß 2 verschiedene Phasen: die untere Phase enthielt die DNA, die obere Phase die Proteine. Die obere Phase (Überstand) wurde in ein anderes Reagiergefäß überführt und zur Proteinextraktion bei -80 °C eingefroren. Im Anschluss wurde das Pellet (untere Phase) zweimal dem nachfolgend beschriebenen Waschvorgang, bestehend aus einer Waschung mit 1 ml Natriumcitratethanollösung (0,1 M Natriumcitrat in 10% Ethanol bei pH 8,5), einer 30 minütigen Inkubation bei RT, einer Zentrifugation der Probe (2000 g, 4 °C, 5 min) und der Verwerfung des dabei entstandene Überstands, unterzogen. Danach wurde den Proben 1,5 ml 75%iges Ethanol zugefügt, bei RT für weitere 20 min inkubiert, abzentrifugiert (2000 g, 4 °C, 5 min) und der Überstand verworfen. Letztendlich wurde das Pellet nochmals für 10 min luftgetrocknet und mit 8 mM NaOH resuspendiert. Nach erneutem Zentrifugieren (12000 g, 4 °C, 10 min) wurde der DNA enthaltende Überstand in ein zusätzliches Reagiergefäß überführt und nach Zugabe von 1 mM EDTA (0,5 ml/60 mg) bei -20 °C eingefroren.

Die extrahierten Proteine wurden zuerst mit 1,5 ml Isopropanol für 10 min präzipitiert und danach zentrifugiert (12000 g, 4 °C, 10 min). Im Anschluss wurde das Proteinpellet dreimal dem nachfolgend beschriebenen Waschvorgang, bestehend aus einer Waschung mit 2 ml

0,3 M Guanidine Hydrochlorid in 95%igem Ethanol, einer 20 minütigen Inkubation bei RT und Zentrifugation (7500 g, 4 °C, 5 min) unterzogen. Abschließend wurde ein Waschvorgang mit 2 ml 100%igem Ethanol, eine 20-minütige Inkubation bei RT, eine Zentrifugation (7500 g, 4 °C, 5 min) sowie einer 10 minütigen Vakuumtrocknung durchgeführt. Danach wurden die Proteine mit einem Lysepuffer aufgelöst, falls erforderlich mit Ultraschall behandelt und nochmals zentrifugiert (10000 g, 4 °C, 10 min). Durch diese Vorgehensweise wurde gewährleistet, dass sämtliche unlösliche Bestandteile sedimentierten. Abschließend wurde der Überstand in ein neues Röhrchen transferiert und bei -80 °C eingefroren.

2.3.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Konzentrationsbestimmung der unter 2.3.4.3 gewonnenen Proteine nutzten wir die Methode von Bradford (Bradford 1976) unter Verwendung des BioRad Protein Assays. Der quantitative Nachweis der Proteine erfolgte mithilfe des im BioRad Protein Assay enthaltenen Farbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau, da dieser durch die Bindung an Proteine dazu führt, dass sich das Absorptionsmaximum von 465 nm (ungebundenes Coomassie-Brilliant-Blau) zu 595 nm (Proteinfarbstoffkomplex) verschiebt (Compton und Jones 1985). Die Zunahme der Absorption bei 595 nm kann photometrisch bestimmt werden und korreliert mit der Proteinkonzentration der zu untersuchenden Lösung. Um die im Photometer gemessenen Absorption einer Proteinkonzentration zuordnen zu können, wurde zunächst mit einem Standardprotein, hier BSA, eine Eichgerade erstellt. Danach wurden die Absorptionen definierter BSA-Konzentrationen photometrisch bestimmt und gegen die jeweils eingesetzte Proteinkonzentration in einem Diagramm aufgetragen. Nun konnten aufgrund der gemessenen Absorptionen unbekannter Proteinlösungen die jeweiligen Proteinkonzentrationen berechnet werden, solange die Absorptionen der unbekannt Proteinlösung im linearen Bereich der Eichgerade lagen.

2.3.4.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese (2 DE)

Bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese handelt es sich um ein spezielles gelelektrophoretisches Verfahren, durch das eine zeitgleiche Trennung tausender Proteine einer Proteinmischung möglich ist. Dieses Verfahren wurde 1975 von O'Farrell entwickelt, um durch eine Kombination der isoelektrischen Fokussierung (1. Dimension- Auftrennung der Proteine nach Nettoladung) mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2. Dimension- Auftrennung nach Molekulargewicht) ein hohes Auflösungsvermögen zu

erreichen (O'Farrell 1975). Die angewendete 2DE wurde gemäß des Protokolls von Görg et al. durchgeführt (Görg et al. 2000).

Im ersten Schritt wurde mit der isoelektrischen Fokussierung der Proteine begonnen. Dabei bewegen sich die einzelnen Proteine im elektrischen Feld entsprechend ihrer Eigenladung entweder in Richtung Kathode (Minuspol) oder Anode (Pluspol). Es wurden jeweils 125 µg des Proteinlysats der jeweiligen Probe mit Rehydrationspuffer und BPB-Lösung (1 µl/ml) auf ein Gesamtvolumen von 350 µl gebracht. Danach wurde der 17 cm lange immobilisierte pH-Gradienten-Streifen (IPG-Streifen), nicht linearer pH-Bereich von 3-10, mit der Proteinlösung beladen, nach 1 h mit jeweils 2 ml Mineralöl beschichtet und für 16 h passiv rehydriert. Die isoelektrische Fokussierung der beladenen IPG-Streifen erfolgte mit dem Protean IEF Cellgerät der Fa. Biorad gemäß folgender Bedingungen:

Arbeitsschritt	Spannung (Volt)	Zeit
01	500	1 h
02	1000	1 h
03	5000	1,5 h
04	8000	32000 Vh (ca. 4 h)

Tabelle 1 Isoelektrische Fokussierung IPG-Streifen

Ablauf der Arbeitsschritte zur isoelektrischen Fokussierung von Proteinen mithilfe eines immobilisierten pH-Gradienten-Streifen (IPG-Streifen).

Nach Beendigung der isoelektrischen Fokussierung wurden die IPG-Streifen zunächst für 20 min in 10 ml des Äquilibrationspuffers 1 und dann für 20 min in 10 ml des Äquilibrationspuffers 2 bei RT inkubiert. Das im Äquilibrationspuffer 1 enthaltene DTT bewirkte eine Reduktion der Disulfidbrücken und ermöglichte damit eine „Entfaltung“ der Proteine. Iodoacetamid war im Äquilibrationspuffer 2 enthalten, führte zu einer irreversiblen Alkylierung der freien Sulfhydrylgruppen der Cysteinreste und fixierte dadurch die Proteine für die nachfolgende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).

Im zweiten Schritt wurden die bereits anhand ihres isoelektrischen Punkts horizontal aufgetrennten Proteine durch eine SDS-Page vertikal anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Diese elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem SDS-Trenngel mit einem Puffersystem nach Laemmli (Laemmli 1970). Dazu wurde jeweils ein IPG-Streifen auf ein im XL-System der Fa. BioRad hergestelltes 12,5%iges Polyacrylamidgel gelegt (Herstellung Polyacrylamidgel siehe Tabelle).

Reagenz	je 12,5%igem Polyacrylamidgel
ddH ₂ O	12,30 ml
1,5 M Tris/HCl (pH: 8,8)	9,60 ml
Acrylamid (30%)	16,05 ml
SDS (10%)	0,55 ml
APS (10%)	0,193 ml
TEMED	0,013 ml

Tabelle 2 **Zusammensetzung 12,5%iges Polyacrylamidgel**

Reagenzien zur Herstellung eines 12,5%igen Polyacrylamidgels für die Zweidimensionale-Gelelektrophorese.

Bevor die SDS-PAGE gestartet werden konnte, wurden 5 µl des Molekulargewichtsmarkers *Precision Plus Protein All Blue* auf ein ca. 3 x 10 mm großes Filterpapier aufgetragen und auf der linken Seite des Polyacrylamidgels neben den IPG-Streifen aufgelegt. Die Gelelektrophorese erfolgte über 18 h, einer Spannung von 100 V und bei einer Temperatur von 4 °C. Dabei erfolgte eine Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Das bedeutet, dass die Polyacrylamidmatrix als molekulares Sieb verwendet wird, das die Proteine ausschließlich nach Ihrer Molekülgröße vertikal trennt. Bei diesem Verfahren werden die Proteine denaturiert, das SDS lagert sich an die Peptidketten an und führt zu einer gleichmäßig negativen Ladung der Proteine. SDS zerstört zudem die nichtkovalenten Bindungen, unterbindet die Wechselwirkungen und führt zu einer Linearisierung der Proteine. Als Ergebnis erhält man eine zweidimensionale punktförmige Verteilung des Proteingemischs, horizontal nach dem isoelektrischen Punkt und vertikal nach der relativen Molekülmasse.

2.3.4.4 Phosphoprotein- und Silberfärbung der 2 DE-Gele

Aufgrund der post-translationalen Proteinmodifikation durch Veränderung des Phosphorylierungsstatus kommt es häufig zu einer Ladungsänderung und damit einhergehend zu Veränderungen der Proteineigenschaften (bspw. der Proteinfaltung oder enzymatischen Aktivität). Zudem werden Zellprozesse wie die Differenzierung oder der Abbau von Proteinen und Signalwegen durch die Phosphorylierung von Proteinen gesteuert (Hunter 2000). Die Phosphoproteinfärbung untersucht den Phosphorylierungsstatus der getrennten Proteine, um Veränderungen bei der Regulation von Proteinen und deren Funktionen zu erkennen. Bei der anschließend durchgeführten Silberfärbung wurden die Proteine der 2 DE-Gele schwarz gefärbt und sichtbar gemacht. Dadurch waren wir in der Lage 2 DE-Gele hinsichtlich der Quantität eines Proteins untereinander zu vergleichen. Nach Abschluss der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine (siehe 2.3.4.5) wurde das 12,5%ige Polyacrylamidgel in eine Färbekammer gelegt und 2 Mal für 30 min mit 250 ml Fixierungslösung behandelt. Im Anschluss wurde das Gel vor der Phosphoproteinfärbung 3 Mal mit ddH₂O gewaschen und dann mit der *Ready Solution Pro-Q® Diamond Phosphoprotein Gel Stain*-Lösung gemäß den Herstellerangaben gefärbt.

Ablauf Phosphoproteinfärbung	
Arbeitsschritt (alle bei Dunkelheit und RT)	Zeit
01 Inkubation zur Phosphoproteinfärbung	1 h
02 Inkubation im Entfärber	90 min
03 Waschung der 2DE-Polyacrylamidgele mit ddH ₂ O	-
04 Scannen der 2-DE Gele am Fluoreszenzscanner FLA5100 mit 523 nm Wellenlänge	-

Tabelle 3 Arbeitsschritte Phosphoproteinfärbung

Zeitlicher Ablauf der einzelnen Arbeitsschritte zur Phosphoproteinfärbung der 2 DE-Gele.

Nachdem die Darstellung der Proteine mittels Phosphoproteinfärbung abgeschlossen und die Expression der Proteine mittels des Fluoreszenzscanners digitalisiert war, wurden die Polyacrylamidgele in der Färbekammer für 1 h mit der Silber-Fix/Stop-Lösung inkubiert. Danach wurde die Silberfärbung der Gele gemäß der Methode von Blum et al. (Blum et al. 1987) durchgeführt:

Ablauf Silberfärbung	
Arbeitsschritt	Zeit
01 Waschung 2-DE Gele mit Waschpuffer 1	20 min
02 Waschung 2-DE Gele mit Waschpuffer 2	20 min
03 Sensitizer	60 sec
04 Entfernung Sensitizer mit 3 Waschungen	je 20 sec
05 Silberfärbung	20 min
06 Entfernung Silberfärbung mit 3 Waschungen	je 20 sec
07 Entwicklerlösung	3-8 min
08 Fixierungslösung (Entwicklungsstop)	-
09 Scannen der 2-DE Gele am Canon LiDE 210 Scanner	-
10 Waschung mit <i>Gel Dryer</i>	-
11 Trocknen der 2-DE Gele bei 80 °C	1,5 h

Tabelle 4 Arbeitsschritte Silberfärbung

Zeitlicher Ablauf der einzelnen Arbeitsschritte zur Silberfärbung der 2 DE-Gele.

2.3.4.5 Auswertung Proteinspots und Proteinidentifikation

Die Auswertung der Proteinspots erfolgte durch eine densitometrische Quantifikation der Proteinspot-Intensität, normalisiert zur Gesamtintensität aller Proteinspots eines Polyacrylamidgels (Prozentsatz Proteinspot-Intensität im Verhältnis zur Gesamtproteinspot-Intensität). Um die Fluoreszenz-Intensitäten der unterschiedlichen Versuchstiergruppen gegenüberstellen zu können, wurden aus jeder Versuchstiergruppe (MMF, PLC, WT) 3 repräsentative 2 DE-Polyacrylamidgele ausgewählt und densitometrisch quantifiziert. Diese Auswertung erfolgte gemäß den Herstellerangaben (Luhn et al. 2003) und wurde mit der Software Delta2D der Fa. Decodon berechnet. Ein in die Delta2D-Software integriertes statistisches Werkzeug wurde genutzt, um die unterschiedlichen Intensitäten der Proteinphosphorylierungen und Proteinmengen der Versuchstiergruppen abzuschätzen. Ein Unterschied in der Intensität der Proteinspots hinsichtlich ihrer Phosphorylierung oder Proteinmenge von mindestens 50% wurde dabei als Zielvorgabe für die Proteinspotauswahl genutzt. Eine signifikante Veränderung der Proteinspot-Intensität zwischen Wildtyp- (WT) und Placebo- (PLC) COL4A3^{-/-} Mäusen bei nicht signifikanter Veränderung zwischen WT- und Mycophenolat-Mofetil- (MMF) COL4A3^{-/-} Mäusen diente als Auswahlkriterium für eine massenspektrometrische Identifizierung der veränderten Proteinspots. Die MALDI-TOF Massenspektrometrie wurde zur Proteinidentifikation genutzt. Hierbei werden die Analytionen

im Hochvakuum aufgrund ihrer unterschiedlichen Flugzeiten unterschieden. Die ausgewählten Proteine in den 2-DE Gelen wurden davor nach dem modifizierten Protokoll von Shevchenko (Shevchenko et al. 1996) entfärbt und verdaut. Dafür wurden die ausgewählten Proteinspots aus den 2-DE Gelen ausgeschnitten und mit 50 µl frisch präparierter Entfärbungslösung behandelt. Danach wurden die Gelstücke zweimal mit ddH₂O gewaschen und für 15 min mit 40 µl 50%igen Acetonitril inkubiert. Bis zum Erreichen einer weißlich-klebrigen Konsistenz wurden die Gelstücke mit jeweils 40 µl ACN behandelt. Im Anschluss wurden sie für 5 min mit 50 µl einer 100 mM Ammoniumbikarbonat-Lösung äquilibriert und dann 50 µl ACN hinzugegeben (Verhältnis 1:1). Nach 15 min wurde die Lösung entfernt und die Proben für 15 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Beim anschließenden In-Gel-Verdau wurden die getrockneten Gelstücke zuerst für 45 min mit 10 µl Trypsin-Verdau-Puffer auf Eis und danach mit 40 µl Verdau-Puffer ohne Trypsin bei 37 °C über Nacht inkubiert. Der am darauffolgenden Tag in ein neues Eppendorf-Cup gegebene Überstand wurde mit einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

Um die noch in den Polyacrylamid-Gelstücken befindlichen Peptide zu extrahieren, wurden diese mit jeweils 50 µl einer 0,1%igen TFA-Lösung bedeckt und im Anschluss für 30 min in ein Ultraschall-Wasserbad gestellt. Danach wurden die gewonnenen Überstände in ein Eppendorf-Cup überführt und ebenfalls mit der Vakuumzentrifuge getrocknet. Dieser Arbeitsschritt wurde noch 3 Mal wiederholt. Zuerst mit einer aus 3/10 ACN und 7/10 0,1%igen TFA bestehenden Lösung, dann mit einer aus 3/5 ACN und 2/5 0,1%igen TFA bestehenden Lösung und zuletzt mit einer 100%igen ACN-Lösung. Danach wurden die gewonnenen und entnommenen Überstände gepoolt und getrocknet. Die Proben wurden dann in 0,1%iger Ameisensäure gelöst und dann 1 µl der gelösten Probe zur chromatographischen Separation auf ein CapLC-System aufgetragen. Danach wurden die Peptidsequenzen nach einer Elektrospray-Ionisation mit einem TripleToF 5600+ QqToF Massenspektrometer analysiert. Die erhaltenen Daten wurden mit der Software Analyst TF1.6 verarbeitet und dann mit der Mascot-Suchmaschine mit der Proteindatenbank UniProt/SwissProt abgeglichen.

2.3.5 Statistik und bioinformatische Auswertung

Mittelwerte, Standardabweichungen und Zufallsverteilungen wurden mit dem Computerprogramm Microsoft Excel, Version 2007 (Microsoft Corporation, Washington, USA) berechnet. Nicht normalverteilte, unverbundene Stichproben wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test verglichen. Ein p-Wert < 0,05 wurde als signifikant gewertet. Zur statistischen Auswertung wurde die Software SPSS Version 15.0 verwendet (SPSS Inc.,

Chicago, USA). Die densitometrische Auswertung der 2DE-Polyacrylamidgele nach Phosphoprotein- und Silberfärbung wurde mit der Software Delta2D (Version 4.2; Decodon GmbH, Greifswald) durchgeführt. Die durch Prof. Dr. Henning Urlaub und Herrn Dr. Christof Lenz massenspektrometrisch ermittelten Daten wurden mit der Software Analyst TF1.6 (AB SCIEX, Foster City/CA, USA) prozessiert. Der Proteindatenbankabgleich der prozessierten Daten erfolgte mit der Mascot-Suchmaschine, Version 2.4.1 (Matrix Science, London, UK).

3. Ergebnisse

3.1 Tiermodell

Insgesamt wurden 27 homozygot COL4A3-defiziente, männliche Versuchstiere durch Randomisierung entweder der MMF- (Applikation 100 mg/kg/d MMF) oder der PLC-Versuchstiergruppe (Applikation 0 mg/kg/d MMF in Placebo-Lösung) zugeordnet und in der 6. und 7. Lebenswoche behandelt. Als Kontrollgruppe wurden Wildtyp (Mäuse-Stamm 129/SvJ) Mäuse verwendet, die ebenfalls in der 6. und 7. Lebenswoche mit einer Placebo-Lösung behandelt wurden.

3.1.1 Gewichtsverlauf COL4A3-defiziente Versuchstiere

Ab dem ersten Behandlungstag der tierexperimentellen Untersuchung wurden der Allgemeinzustand und das Körpergewicht der Mäuse täglich kontrolliert. Während der zweiwöchigen Behandlungsphase mit MMF traten keine schwerwiegenden Nebenwirkungen auf. Es konnte bei den Versuchstieren keine Diarrhöe, Erbrechen oder Sepsis, die auf eine durch MMF verursachte Intoxikation zurückgeführt werden konnte, beobachtet werden. Die Versuchstiere wurden von der Studie ausgeschlossen, wenn ihr Gesamtgewicht um mehr als 20% abgenommen oder unter 16 g lag (n = 7). Am Ende der 14-tägigen Behandlungsphase der COL4A3-defizienten Mäuse, hatten die mit MMF behandelten Versuchstiere im Durchschnitt weniger Körpergewicht (10%) als die mit PLC behandelten Versuchstiere (14%) im Vergleich zum Körpergewicht bei Behandlungsbeginn verloren. Am letzten Behandlungstag lag das durchschnittliche Körpergewicht der MMF-Versuchstiergruppe bei 19+/-3 g, der PLC-Versuchstiergruppe bei 18+/-1 g und der Wildtyp-Versuchstierkontrollgruppe bei 26+/-1 g.

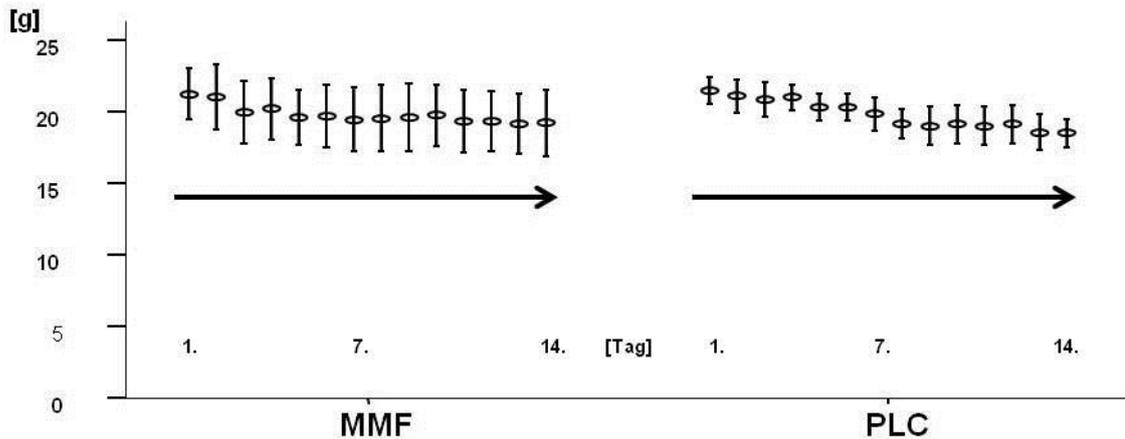


Abbildung 3 Gewichtsverlauf COL4A3-defiziente Mäuse in der Behandlungsphase

Das Körpergewicht der COL4A3-defizienten Mäuse, dargestellt als Mittelwert der jeweiligen Versuchstiergruppe mit Standardabweichung, hatte während der 14-tägigen Behandlungsphase um durchschnittlich 10% bei der MMF- und um 14% bei der PLC-Versuchstiergruppe abgenommen.

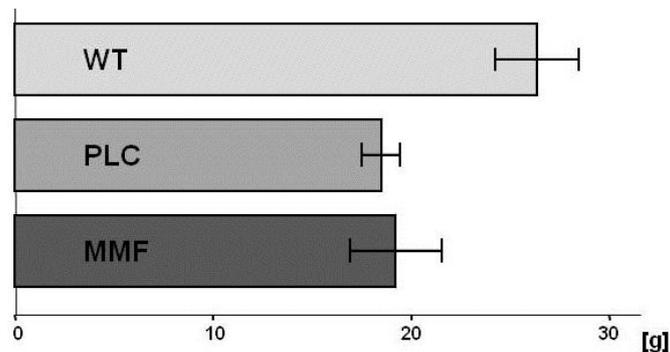


Abbildung 4 Körpergewicht Versuchstiergruppen am 14. Behandlungstag

Übersicht des durchschnittlichen Körpergewichts am letzten Behandlungstag (Ende 7. Lebenswoche). Dabei lag das durchschnittliche Körpergewicht der WT- bei 26+/-1g, der PLC- bei 18+/-1g und der MMF-Versuchstiergruppe bei 19+/-3g.

Gruppe	Anzahl (n)	Einheit	Mittelwert	Standardabweichung		p-Wert
WT	3	g	26,367	0,850	WT vs. PLC	0,011
PLC	10	g	18,480	1,333	PLC vs. MMF	0,821
MMF	10	g	19,210	3,232	WT vs. MMF	0,018

Tabelle 5 Übersicht Körpergewicht 14. Behandlungstag (Ende 7. Lebenswoche)

Tabellarische Darstellung des durchschnittlichen Körpergewichts der verschiedenen Versuchstiergruppen (MMF, PLC, WT) am Ende der 7. Lebenswoche. Wenn der ermittelte p-Wert (Überschreitungswahrscheinlichkeit oder Signifikanzwert) beim Vergleich von 2 Versuchstiergruppen < 0,05 ist, besteht zwischen den Gruppen ein signifikanter Unterschied.

3.2 Histologische Bewertung der tubulointerstitiellen Fibrosierung

3.2.1 Ergebnisse der lichtmikroskopischen Untersuchung

Für die lichtmikroskopische Untersuchung der Nierenschnittpräparate wurde die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung) durchgeführt. Bei der H.E.-Färbung handelt es sich um ein histologisches Färbeverfahren, das es ermöglicht verschiedene Strukturen eines feingeweblichen Schnittes anzufärben. Um seine färbenden Eigenschaften zu entwickeln muss der Farbstoff Hämatoxylin zu Hämatein oxidiert werden, dann färbt er alle sauren/basophilen Strukturen, insbesondere Zellkerne mit der darin enthaltenen DNA sowie das raue endoplasmatische Retikulum, blau an. Der zweite Bestandteil der Färbung, der Farbstoff Eosin färbt alle basischen/eosinophilen Strukturen rot an. Somit werden Zellplasmaproteine, Mitochondrien, das glatte endoplasmatische Retikulum, Kollagen- und Keratinbestandteile rot angefärbt.

Die H.E.-gefärbten Nierenschnittpräparate wurden voneinander unabhängig und verblindet, gemäß den Banff Kriterien (Racusen et al. 1999) am Lichtmikroskop Zeiss Standard 14 (Objektiv 5165602 und Ocular K-pl-W 12,5x/18) bei einer berechneten 400-fachen Vergrößerung (40 fache Objektiv- und 10 fache Okularvergrößerung), nach 14-tägiger Behandlungsdauer von 2 unterschiedlichen Untersuchern bewertet. Dabei wurden die tubulointerstitiellen Veränderungen von 3653 Gesichtsfeldern ausgewertet. Die tubulointerstitielle Fibrosierung wird gemäß den Banff-Kriterien in 4 unterschiedliche Grade eingeteilt (Racusen et al. 1999):

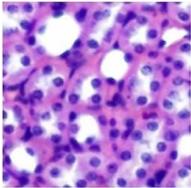
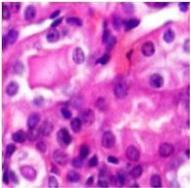
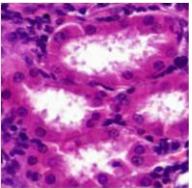
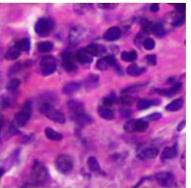
Banff-Score	0	1	2	3
Tubulointerstitielle Fibrosierung	0%	< 25%	25-50%	> 50%
Mikroskopische Darstellung				

Tabelle 6 Banff-Score-Bewertung H.E.-gefärbter Nierenschnittpräparate

In den exemplarisch dargestellten Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Nierenschnittpräparaten nimmt die tubulointerstitielle Fibrosierung von links (Banff-Score 0) nach rechts (Banff-Score 3) zu.

Es wurden 1629 Gesichtsfelder der PLC-Gruppe, 1532 der MMF-Gruppe und 492 der WT-Gruppe ausgewertet. Das Ausmaß der tubulointerstitiellen Fibrose der mit MMF behandelten

COL4A3-defizienten Mäuse (Banff-Score 0: 12,1%; 1: 33,1%; 2: 36,7%; 3: 18,1%; [Σ 1532 GF]) war im Vergleich zu den mit PLC behandelten Versuchstieren (Banff-Score 0: 11,2%; 1: 33,2%; 2: 35,4%; 3: 20,3% [Σ 1629 GF]) nur geringfügig niedriger ausgeprägt. Im Vergleich zur WT-Versuchstiergruppe (Banff-Score 0: 63,7%; 1: 36,3%; 2: 0,0%; 3: 0,0%; [Σ 492 GF]) war die tubulointerstitielle Fibrose sowohl bei den mit MMF wie auch mit PLC behandelten Mäusen deutlich erhöht. Es scheint, dass die MMF-Behandlung die Glomerulosklerose nicht beeinflusst (Petrova et al. 2014).

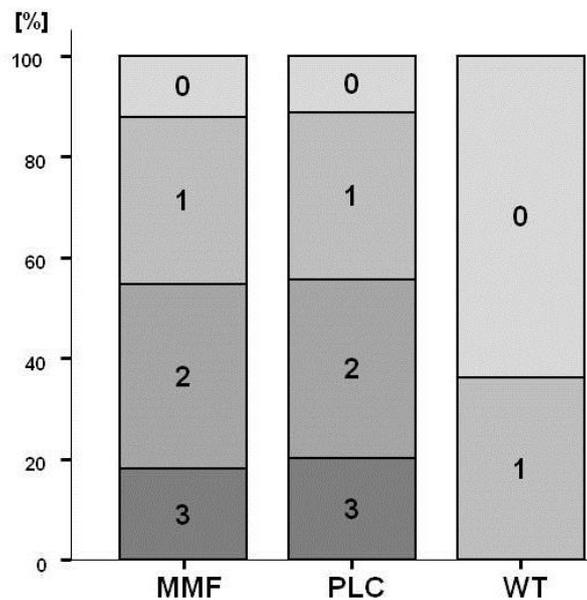


Abbildung 5 Banff-Score-Bewertung der Versuchstiergruppen

Bewertung des Ausmaßes der tubulointerstitiellen Fibrose gemäß Banff-Kriterien: MMF-Versuchstiergruppe: 0: 12,1%; 1: 33,1%; 2: 36,7%; 3: 18,1%; [1532 ausgewertete Gesichtsfelder], PLC-Versuchstiergruppe: 0: 11,2%; 1: 33,2%; 2: 35,4%; 3: 20,3% [1629 ausgewertete Gesichtsfelder], WT-Versuchstiergruppe: 0: 63,7%; 1: 36,3%; 2: 0,0%; 3: 0,0%; [492 ausgewertete Gesichtsfelder]

3.3 Untersuchung von Blut und Urin der Versuchstiere

3.3.1 Klinische Chemie

3.3.1.1 Klinisch-chemische Parameter im Serum

Die bei der Präparation der Versuchstiere gewonnenen Seren wurden zur Bestimmung der Parameter Harnstoff-N, Kreatinin und Gesamtprotein verwendet. Analog der Protokolle zur Bestimmung klinisch-chemischer Parameter aus menschlichem Serum am *Cobas® 8000 modular analyzer*, konnten diese Parameter auch aus den Mäuseseren bestimmt werden.

Dabei waren die gemessenen Harnstoffkonzentrationen bei beiden COL4A3-defizienten-Versuchstiergruppen im Vergleich zu den WT-Mäusen signifikant erhöht (MMF: 74,75±19,67; PLC: 147,00±143,61; WT: 22,47±3,97 [mg/dl]). Ebenso konnten wir feststellen, dass auch die Harnstoffkonzentrationen der MMF- im Vergleich zu den PLC-Mäusen signifikant erniedrigt waren.

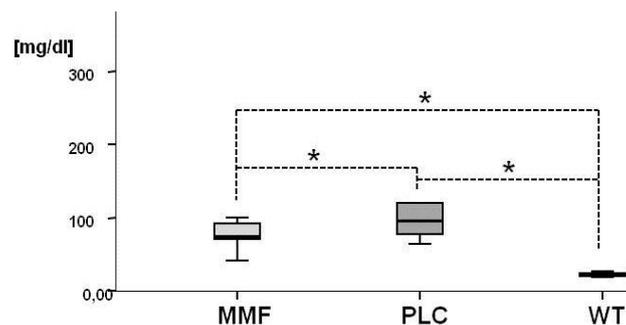


Abbildung 6 Serumparameter Harnstoff

Die graphische Gegenüberstellung der gemessenen Harnstoffwerte zeigt im Vergleich MMF vs. PLC, MMF vs. WT und PLC vs. WT (MMF [n = 10], PLC [n = 10], WT [n = 3]) im Mann-Whitney-U-Test einen signifikanten Unterschied (* = P < 0,05). Die gestrichelte Linie kennzeichnet i.Z.m. dem Zeichen [*] signifikante Unterschiede zwischen den Versuchstiergruppen. Wenn der ermittelte p-Wert (Überschreitungswahrscheinlichkeit oder Signifikanzwert) beim Vergleich von 2 Versuchstiergruppen < 0,05 ist, besteht zwischen den Gruppen ein signifikanter Unterschied. Für die ermittelten Harnstoffwerte liegt keine Normalverteilung vor. Daher müssen die einzelnen Versuchstiergruppen anhand des Medians und der 25% und 75% Perzentile (unteres und oberes Ende der Boxplots) verglichen werden, siehe Tab. 7.

Die gemessenen Kreatininkonzentrationen waren in beiden COL4A3-defizienten-Versuchstiergruppen im Vergleich zu den WT-Mäusen signifikant erhöht (MMF: 1,13±0,59; PLC: 1,44±0,61; WT: 0,16±0,03 [mg/dl]). Desweiteren waren auch die Kreatininkonzentrationen der PLC- im Vergleich zu den MMF-Mäusen erhöht. Allerdings ließ sich hierbei kein statistisch relevanter Unterschied zwischen den beiden Versuchstiergruppen feststellen.

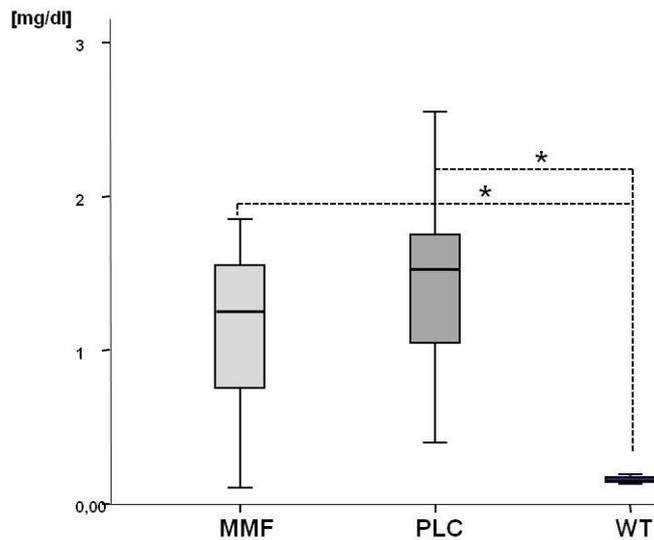


Abbildung 7 Serumparameter Kreatinin

Die graphische Gegenüberstellung der gemessenen Kreatininwerte zeigt im Vergleich MMF vs. WT und PLC vs. WT (MMF [n = 10], PLC [n = 10], WT [n = 3]) im Mann-Whitney-U-Test einen signifikanten Unterschied ([*] = $P < 0,05$). Die gestrichelte Linie kennzeichnet i.Z.m. dem Zeichen [*] signifikante Unterschiede zwischen den 3 Versuchstiergruppen. Wenn der ermittelte p-Wert (Überschreitungswahrscheinlichkeit oder Signifikanzwert) beim Vergleich von 2 Versuchstiergruppen $< 0,05$ ist, besteht zwischen den Gruppen ein signifikanter Unterschied. Für die ermittelten Kreatininwerte liegt keine Normalverteilung vor. Daher müssen die einzelnen Versuchstiergruppen anhand des Medians und der 25% und 75% Perzentile (unteres und oberes Ende der Boxplots) verglichen werden, siehe Tab. 7.

Bei der Bestimmung des Gesamtproteins zeigten sich zwischen den 3 Versuchstiergruppen (MMF: $5,61 \pm 0,77$; PLC: $5,64 \pm 0,78$; WT: $5,30 \pm 0,47$ [mg/dl]) keine signifikanten Unterschiede.

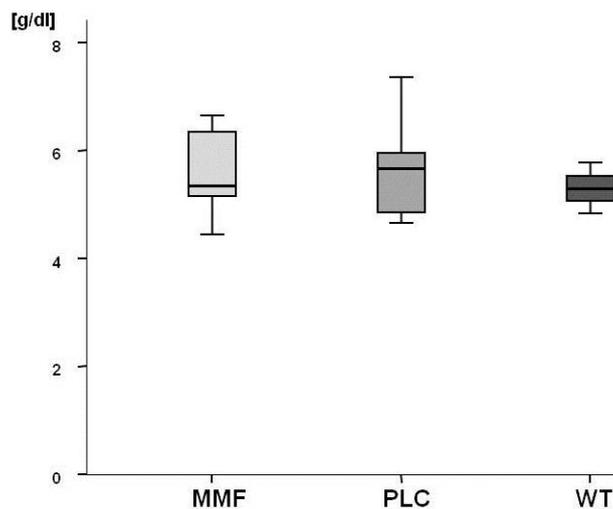


Abbildung 8 Serumparameter Gesamtprotein

Die graphische Gegenüberstellung der gemessenen Gesamtproteinwerte zeigt im Vergleich zwischen den 3 Versuchstiergruppen (MMF [n = 10], PLC [n = 10], WT [n = 3]) im Mann-Whitney-U-Test keine signifikanten Unterschiede. Die gestrichelte Linie kennzeichnet i.Z.m. dem Zeichen [*] signifikante Unterschiede zwischen den 3 Versuchstiergruppen. Wenn der ermittelte p-Wert (Überschreitungswahrscheinlichkeit oder Signifikanzwert) beim Vergleich von 2 Versuchstiergruppen $< 0,05$ ist, besteht zwischen den Gruppen ein signifikanter Unterschied.

Serumparameter	Gruppe	Anzahl (n)	Einheit	Median	25% Perzentile	75% Perzentile		P-Wert
Harnstoff	WT	3	mg/dl	21,600	19,000	-	WT vs. PLC	P=0.011
	PLC	10	mg/dl	96,250	77,750	140,380	PLC vs. MMF	P=0.037
	MMF	10	mg/dl	75,500	64,500	93,250	WT vs. MMF	P=0.011
Kreatinin	WT	3	mg/dl	0,150	0,130	-	WT vs. PLC	P=0.011
	PLC	10	mg/dl	1,525	1,013	1,788	PLC vs. MMF	P=0.364
	MMF	10	mg/dl	1,250	0,638	1,613	WT vs. MMF	P=0.043
Serumparameter	Gruppe	Anzahl (n)	Einheit	Mittelwert	Standardabweichung			P-Wert
Gesamtprotein	WT	3	g/dl	5.300	0.465		WT vs. PLC	P=0.397
	PLC	10	g/dl	5.640	0.776		PLC vs. MMF	P=0.940
	MMF	10	g/dl	5.605	0.773		WT vs. MMF	P=0.612

Tabelle 7 Übersicht Serumparameter

Tabellarische Darstellung der ermittelten Serumparameter der verschiedenen Versuchstiergruppen (MMF, PLC, WT). Wenn der ermittelte p-Wert (Überschreitungswahrscheinlichkeit oder Signifikanzwert) beim Vergleich von 2 Versuchstiergruppen < 0,05 ist, besteht zwischen den Gruppen ein signifikanter Unterschied.

3.3.1.2 Fraktionen der Serumprotein-Elektrophorese

Die Serumprotein-Elektrophorese zeigte bei den COL4A3-defizienten Mäusen im Vergleich zur WT-Versuchstiergruppe sowohl in der Albumin- (MMF: 2,10 \pm 0,53; PLC: 1,72 \pm 0,44; WT: 3,02 \pm 0,26 [g/dl]) als auch in der Alpha-1-Fraktion (MMF: 0,15 \pm 0,07; PLC: 0,11 \pm 0,05; WT: 0,37 \pm 0,04 [g/dl]) einen signifikanten Abfall, in der Alpha-2-Fraktion jedoch einen signifikanten Anstieg (MMF: 1,95 \pm 1,23; PLC: 0,93 \pm 0,30; WT: 0,48 \pm 0,04 [g/dl]).

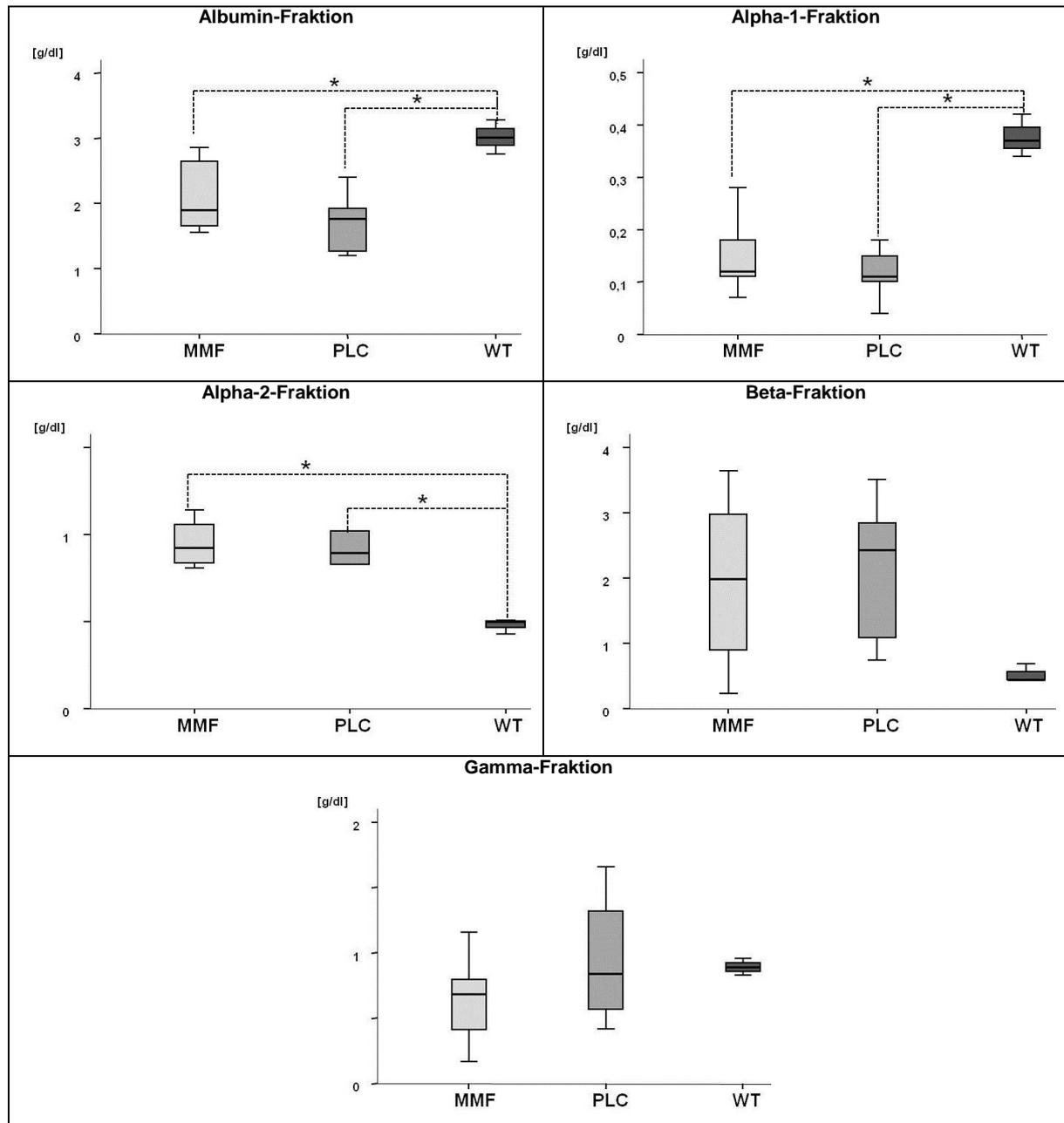


Abbildung 9 Fraktionen Protein Serum-Elektrophorese

Die Albumin- und Alpha-1-Fraktion ist bei beiden COL4A3-defizienten-Gruppen [jeweils n = 10] im Vergleich zur WT-Gruppe im Mann-Whitney-U-Test signifikant erniedrigt (* = P < 0,05). Bei der MMF- und PLC-Versuchstiergruppe ist die Alpha-2-Fraktion im Vergleich zu den WT-Mäusen im Mann-Whitney-U-Test signifikant erhöht (* = P < 0,05). Im Vergleich zu den WT-Mäusen

ist die Beta-Fraktion bei der MMF- und PLC-Versuchstiergruppe erhöht und die Gamma-Fraktion erniedrigt ($P > 0,05$). Wenn der ermittelte p-Wert (Überschreitungswahrscheinlichkeit oder Signifikanzwert) beim Vergleich von 2 Versuchstiergruppen $< 0,05$ ist, besteht zwischen den Gruppen ein signifikanter Unterschied.

In der Beta- (MMF: $1,95 \pm 1,23$; PLC: $2,18 \pm 1,06$; WT: $0,53 \pm 0,13$ [g/dl]) und Gamma-Fraktion (MMF: $0,64 \pm 0,33$; PLC: $0,94 \pm 0,49$; WT: $0,89 \pm 0,07$ [g/dl]) der Serumprotein-Elektrophorese zeigten sich zwischen den 3 Versuchstiergruppen keine signifikanten Unterschiede. Aufgrund des begrenzten Probenumfangs konnte die Serumprotein-Elektrophorese nur bei 17 Mäusen durchgeführt werden (MMF: $n=8$; PLC: $n=6$; WT: $n=3$).

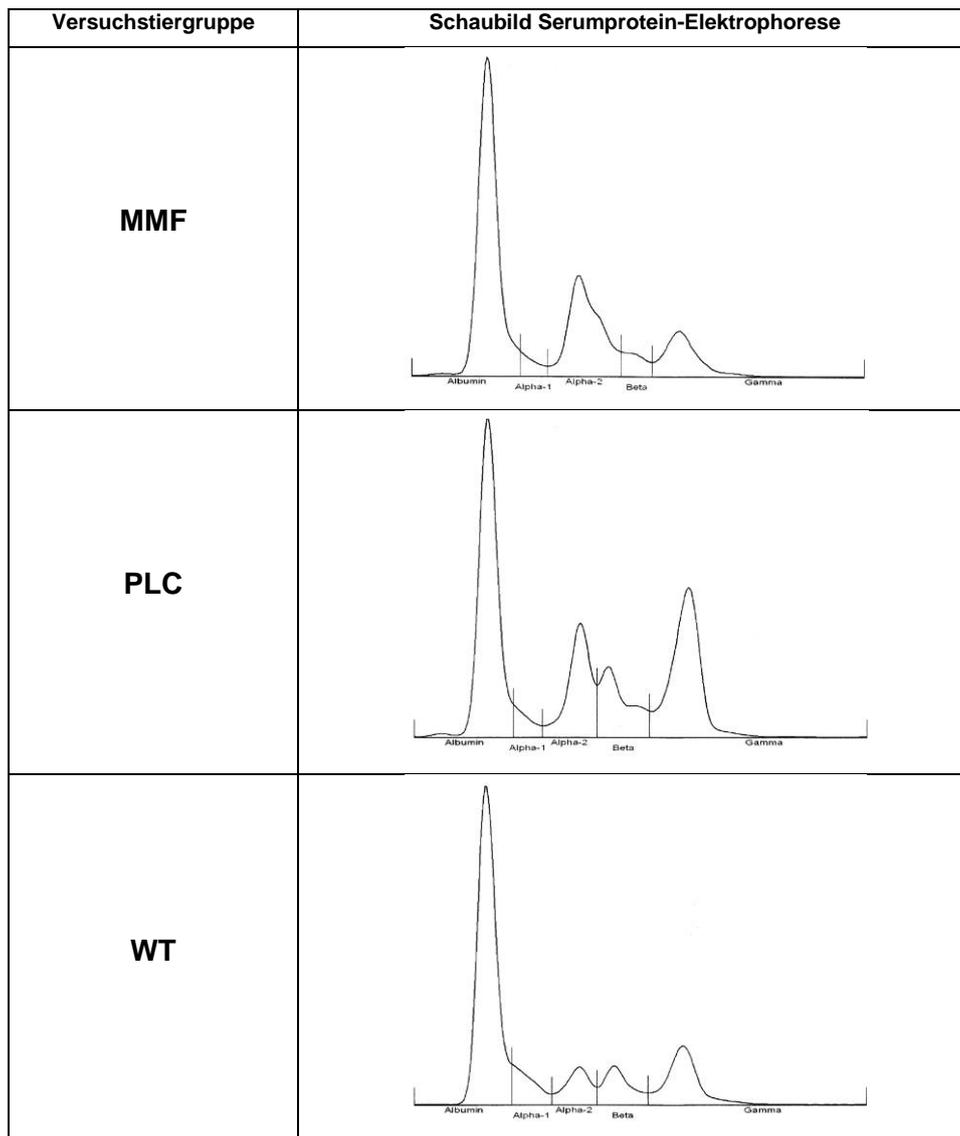


Abbildung 10 Serumelektrophorese repräsentative Fraktionsverteilung

Exemplarisch-graphische Darstellung der veränderten Serumprotein-Elektrophorese-Fractionen bei COL4A3-defizienten Mäusen der MMF- und PLC-Versuchstiergruppe. Im Vergleich dazu die physiologische Normalverteilung der Serumprotein-Elektrophorese-Fractionen bei einer gesunden Maus der WT-Versuchstiergruppe.

Bereits in der graphisch-exemplarischen Darstellung der Serumprotein-Elektrophoresen wird deutlich, dass die Proteinfractionen der COL4A3-defizienten Versuchstiere sich im Vergleich zur physiologischen Proteinfractionsverteilung der WT-Maus erheblich unterscheiden.

Elektrophorese-Fraktion	Gruppe	Anzahl (n)	Einheit	Mittelwert	Standardabweichung		p-Wert
Albumin	WT	3	g/dl	3,019	0,259	WT vs. PLC	0,020
	PLC	6	g/dl	1,723	0,445	PLC vs. MMF	0,366
	MMF	8	g/dl	2,103	0,533	WT vs. MMF	0,041
Alpha-1	WT	3	g/dl	0,374	0,039	WT vs. PLC	0,020
	PLC	6	g/dl	0,114	0,048	PLC vs. MMF	0,398
	MMF	8	g/dl	0,146	0,068	WT vs. MMF	0,013
Alpha-2	WT	3	g/dl	0,480	0,044	WT vs. PLC	0,028
	PLC	6	g/dl	0,932	0,304	PLC vs. MMF	0,846
	MMF	8	g/dl	0,945	0,284	WT vs. MMF	0,041
Beta	WT	3	g/dl	0,532	0,134	WT vs. PLC	0,020
	PLC	6	g/dl	2,176	1,057	PLC vs. MMF	0,796
	MMF	8	g/dl	1,953	1,232	WT vs. MMF	0,102
Gamma	WT	3	g/dl	0,895	0,068	WT vs. PLC	1,000
	PLC	6	g/dl	0,938	0,487	PLC vs. MMF	0,518
	MMF	8	g/dl	0,641	0,329	WT vs. MMF	0,124

Tabelle 8 Übersicht Proteinfractionen Serumelektrophorese

Tabellarische Darstellung der 5 Serumelektrophorese-Proteinfractionen der verschiedenen Versuchstiergruppen (MMF, PLC, WT). Wenn der ermittelte p-Wert (Überschreitungswahrscheinlichkeit oder Signifikanzwert) beim Vergleich von 2 Versuchstiergruppen $< 0,05$ ist, besteht zwischen den Gruppen ein signifikanter Unterschied.

3.3.1.3 Urinparameter

3.3.1.3.1 Urinteststreifen

Den Versuchstieren wurde zu ihrem Todeszeitpunkt Urin entnommen, um die unter Kap. 2.3.2.3 beschriebenen Urinparameter mittels Urinteststreifen semiquantitativ zu bestimmen. Eine statistische Prüfung war aufgrund der begrenzten Probenanzahl (MMF: [n = 6-8]; PLC: [n = 3-5]; WT: [n = 1]) und Urinmenge nur eingeschränkt möglich. Es konnte allerdings festgestellt werden, dass das durchschnittliche Gesamtprotein bei den COL4A3-defizienten Versuchstieren im Vergleich zur WT-Maus deutlich erhöht war (MMF [n=8]: 162; PLC [n=4]: 100; WT [n=1]: < 15 [mg/dl]).

Urinparameter	Gruppe	Anzahl (n)	Einheit	Mittelwert	Standardabweichung
Glukose	WT	1	mg/dl	<50	
	PLC	3	mg/dl	<50	
	MMF	7	mg/dl	<50	
	MMF	7	mg/dl	100	
Gesamtprotein	WT	1	mg/dl	<15	0
	PLC	4	mg/dl	100	0
	MMF	8	mg/dl	162	92
Bilirubin	WT	1	mg/dl	0	0
	PLC	4	mg/dl	0	0
	MMF	7	mg/dl	0	0
Urobilinogen	WT	1	mg/dl	0	0
	PLC	4	mg/dl	0	0
	MMF	6	mg/dl	0	0
pH-Wert	WT	1		5,50	0
	PLC	4		5,75	0,29
	MMF	8		5,63	0,23
Dichte	WT	1		1,030	0
	PLC	5		1,025	0,011
	MMF	8		1,030	0
Hämoglobin	WT	1	mg/dl	0	0
	PLC	5	mg/dl	1	0
	MMF	8	mg/dl	1,25	0,46
Keton	WT	1	mg/dl	0	0
	PLC	4	mg/dl	0	0
	MMF	6	mg/dl	0	0
Nitrit (qualitativ)	WT	1		negativ	
	PLC	4		negativ	
	MMF	7		negativ	
Leukozyten-Esterase	WT	1	Zellen/µl	0	0
	PLC	5	Zellen/µl	250	0
	MMF	7	Zellen/µl	250	0

Tabelle 9 Übersicht Urinparameter (Urinteststreifen)

Tabellarische Darstellung der mithilfe von Urinteststreifen ermittelten Urinparameter der verschiedenen Versuchstiergruppen (MMF, PLC, WT).

Im Gegensatz zu den COL4A3-defizienten Versuchstieren waren weder Hämoglobin (MMF [n=8]: 1,25; PLC [n=5]: 1,0; WT [n=0]: 0 [mg/dl]) noch Leukozyten (Nachweis über

Leukozyten-Esterase- MMF [n=7]: 250; PLC [n=5]: 250; WT [n=1]: 0 [Zellen/ μ l]) im Urin der WT-Maus nachweisbar. Die restlichen, mittels Urinteststreifen bestimmten Urinparameter (Glukose, Bilirubin, Urobilinogen, Keton, pH-Wert und Dichte), zeigten zwischen den 3 Versuchstiergruppen keine signifikanten Unterschiede.

3.3.1.3.2 Urinsediment

Bei der mikroskopischen Untersuchung des Urinsediments zeigten sich zwischen den verschiedenen Versuchstiergruppen analog zu den Ergebnissen der Urinteststreifen-Untersuchung ebenfalls Unterschiede. Erythrozyten konnten nur im Urinsediment der MMF- und PLC-Versuchstiere festgestellt werden. Zudem waren im Urinsediment der COL4A3-defizienten-Mäusen weniger amorphe Phosphate und Bakterien als bei den WT-Mäusen. Desweiteren waren bei der mikroskopischen Untersuchung des Urins sowohl bei den PLC- wie auch WT-Versuchstieren Hefen und hyaline Zylinder nachweisbar. Leukozyten konnten im Urinsediment der MMF- und WT-Mäuse nachgewiesen werden.

Urinsedimentparameter	Gruppe	Probenanzahl (n)	Einheit	Messwert
Bakterien (qualitativ)	WT	1	-	positiv (+++)
	PLC	1	-	positiv
	MMF	1	-	positiv
Hefen (qualitativ), siehe Abb. 11 [01]	WT	1	-	positiv (+)
	PLC	1	-	positiv
	MMF	1	-	negativ
Hyaline Zylinder (qualitativ), siehe Abb. 11 [02]	WT	1	-	positiv (+)
	PLC	1	-	positiv
	MMF	1	-	negativ
Erythrozyten, siehe Abb. 11 [03]	WT	1	Zellen/Gesichtsfeld	negativ
	PLC	1	Zellen/Gesichtsfeld	10-20
	MMF	1	Zellen/Gesichtsfeld	5-9
Leukozyten	WT	1	Zellen/Gesichtsfeld	1-4
	PLC	1	Zellen/Gesichtsfeld	negativ
	MMF	1	Zellen/Gesichtsfeld	1-4
Amorphe Phosphate (qualitativ), siehe Abb. 11 [04]	WT	1	-	positiv (+)
	PLC	1	-	positiv
	MMF	1	-	positiv

Tabelle 10 Übersicht Urinsedimentuntersuchung

Tabellarische Darstellung der mikroskopischen Urinsedimentuntersuchungsergebnisse bei 400-facher Vergrößerung am Phasen-Kontrast Mikroskop.

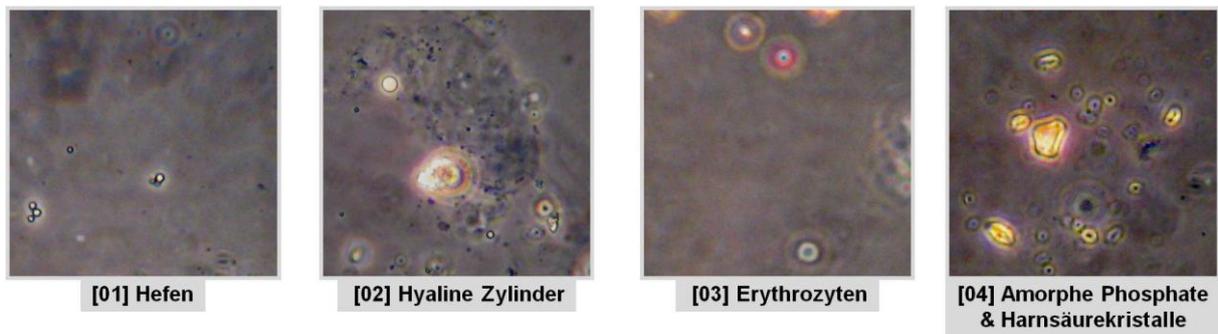


Abbildung 11 Bilder Untersuchung Urnsediment

Exemplarische Darstellung einzelner Befunde der mikroskopischen Urnsedimentuntersuchung bei 400-facher Vergrößerung am Phasen-Kontrast Mikroskop.

3.3.2 MPA- und MPAG-Spiegel im Serum

Im Rahmen der Präparation der Versuchstiere wurde das gewonnene Blut auch zur Bestimmung der MPA- und MPAG-Konzentrationen im Serum verwendet. Die ermittelten Wirkstoffspiegel sind als Talspiegel anzusehen, da die Tötung der Mäuse ohne erneute MMF-Applikation erfolgte und die letzte Applikation mindestens 24 h zurücklag. Bei der MMF-Versuchstiergruppe lagen die erwarteten MPA-Spiegel zwischen 1,7 und 41,1 mg/l (Mittelwert \pm -Standardabweichung = 21 \pm 14 [mg/l]) und die MPAG-Konzentrationen zwischen 0 und 25,6 mg/l (Mittelwert \pm -Standardabweichung = 12 \pm 10 [mg/l]). Die MPA- und MPAG-Konzentrationen der PLC- und WT-Mäuse lagen bei den 1:5 verdünnten Proben unter der analytischen Bestimmungsgrenze (MPAG: < 0,5 mg/l und MPA: < 5 mg/l).

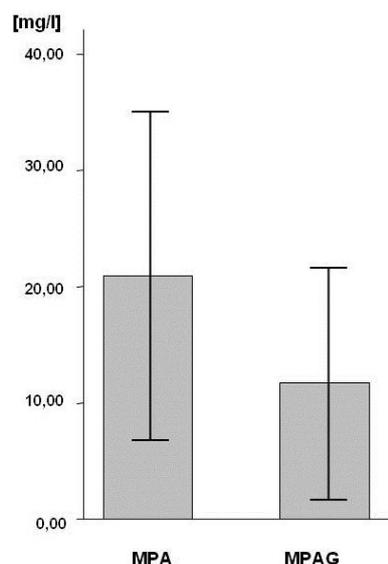


Abbildung 12 MPA- & MPAG-Spiegel in der MMF-Versuchstiergruppe

Grafische Darstellung der Mycophenolsäure- und glukuronidierten Mycophenolsäure-Talspiegel der MMF-Versuchstiergruppe 24 Stunden nach der letzten MMF-Applikation.

	Gruppe	Anzahl (n)	Einheit	Mittelwert	Standardabweichung
MPA	WT	3	mg/l	<0,1	0
	PLC	10	mg/l	<0,5	0
	MMF	10	mg/l	20,930	14,111
MPAG	WT	3	mg/l	<1	0
	PLC	10	mg/l	<5	0
	MMF	10	mg/l	11,710	9,960

Tabelle 11 Übersicht Wirkstoffspiegel MPA, MPAG

Tabellarische Darstellung der mittels LC-MS/MS (Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung) ermittelten Mycophenolsäure- und glukuronidierten Mycophenolsäure-Talspiegel.

3.4 Phosphoproteom- und Proteomanalyse

Um MMF bedingte Proteinveränderungen im Gewebe der Versuchstier-Nieren erkennen, vergleichen und analysieren zu können, wurden die gewonnenen Proteine mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese (siehe Kap. 2.3.4.3) und in einem Polyacrylamid-Gel (siehe Kap. 2.3.4.5) anhand ihres Molekulargewichts und isoelektrischen Punkts aufgetrennt.

Zur Untersuchung des Phosphorylierungsstatus der aufgetrennten Proteine wurden die Polyacrylamid-Gele einer Phosphoproteinfärbung und zur Untersuchung des Proteoms einer Silberfärbung (siehe Kap. 2.3.4.6) unterzogen. Ziel dabei war es, die Proteine des Nierengewebes zu identifizieren, quantifizieren und charakterisieren (Lottspeich und Engels 2006). Bei der Untersuchung des Phosphoproteoms wurden die Funktionsveränderungen von Proteinen, charakterisiert durch unterschiedliche Phosphorylierungen, analysiert. Die Untersuchung des Proteoms mittels Silberfärbung diente dem Nachweis quantitativer Proteinveränderungen. Im nächsten Schritt wurden die Intensitäten der Silber- und Phosphogefärbten Proteinspots, als Verhältnis der Einzelspotintensität zur Gesamtpotintensität eines Gels, mithilfe der Software Delta2D bestimmt. Ein Proteinspot-Intensitätsunterschied von mindestens 50% zwischen den Versuchstiergruppen war dabei das Kriterium für die Proteinspotauswahl. Eine weiterführende massenspektrometrische Analyse der ausgewählten Proteinspots (siehe Kap. 2.3.4.7) wurde nur durchgeführt, wenn eine signifikante Veränderung der Proteinspot-Intensität zwischen Wildtyp- (WT) und Placebo- (PLC) COL4A3^{-/-} Versuchstiergruppe, bei nicht signifikanter Veränderung zwischen WT- und Mycophenolat-Mofetil- (MMF) COL4A3^{-/-} Versuchstiergruppe vorlag. Der nicht signifikante Unterschied zwischen der WT- und MMF-Versuchstiergruppe bei gleichzeitig bestehendem signifikanten Unterschied zwischen der WT- und PLC-Versuchstiergruppe impliziert, dass die COL4A3-Defizienz-bedingten Proteinveränderungen durch die MMF-Behandlung rückgängig gemacht werden konnten.

Proteinspots blau (bei signifikanter Veränderung gemäß Vorgaben Kap. 3.4 rote Darstellung) dargestellt. Die digitalen Bilder der 2 DE-Polyacrylamidgele wurden mit der Software Delta2D überlagert.

Da die Phospho-gefärbten Proteinspots (= Phosphospots) in den 2 DE-Gelen nur durch einen Fluoreszenz-Scanner sichtbar gemacht werden konnten, wurden die digitalisierten Bilder der Phospho-gefärbten Gele mit den Bildern der Silber-gefärbten Gele überlagert. Diese Vorgehensweise ermöglichte uns, den Phospho-gefärbten Proteinspots die entsprechenden Proteinspots auf dem Silber-gefärbten 2 DE-Gel zuzuweisen. Danach konnten die korrespondierenden Proteinspots im Silber-gefärbten 2 DE-Gel ausgeschnitten, verdaut und massenspektrometrisch (siehe Kap. 2.3.4.7) untersucht werden.

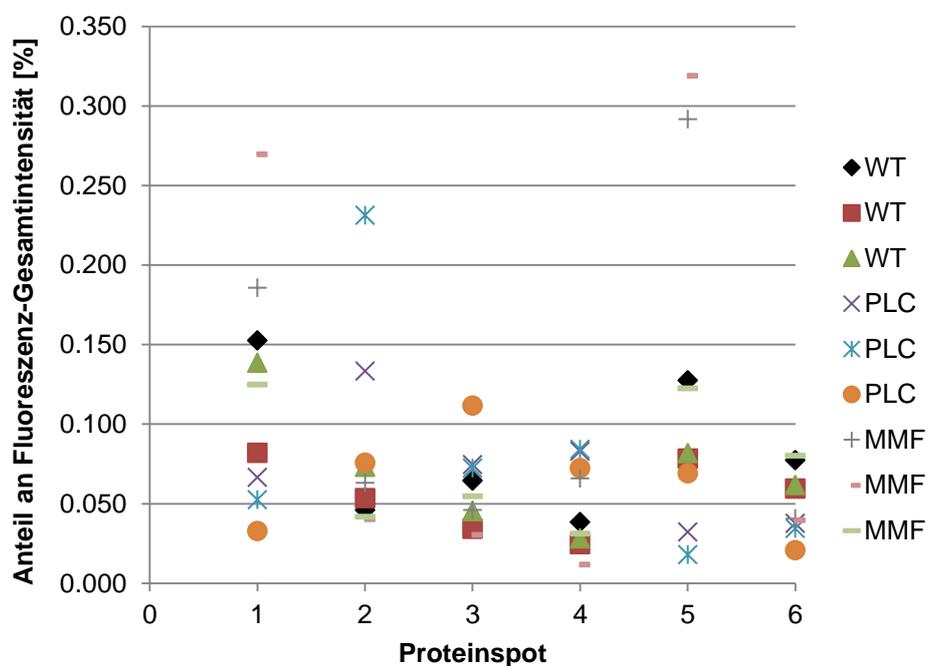


Abbildung 14 Phosphospot-Fluoreszenz-Intensitäten der repräsentativen Versuchstiere

Zur Gegenüberstellung und Messung der Fluoreszenz-Intensitäten wurden aus den 3 verschiedenen Versuchstiergruppen (MMF, PLC, WT) jeweils 3 repräsentative Versuchstiere ausgewählt. Mithilfe der Software Delta 2D wurden die Intensitäten an den digitalen Bildern der 2 DE-Polyacrylamidgele bestimmt. Im Schaubild sind die 6 Fluoreszenz-Intensitäten (identifizierte Proteinspots) der 3 repräsentativen Versuchstiere jeder Versuchstiergruppe (3x3) dargestellt.

Die dabei erhaltenen Daten der identifizierten 6 Proteinspots wurden zuerst mit der Software Analyst TF1.6 verarbeitet und dann unter Verwendung der Mascot-Suchmaschine mit der Proteindatenbank UniProt/SwissProt abgeglichen.

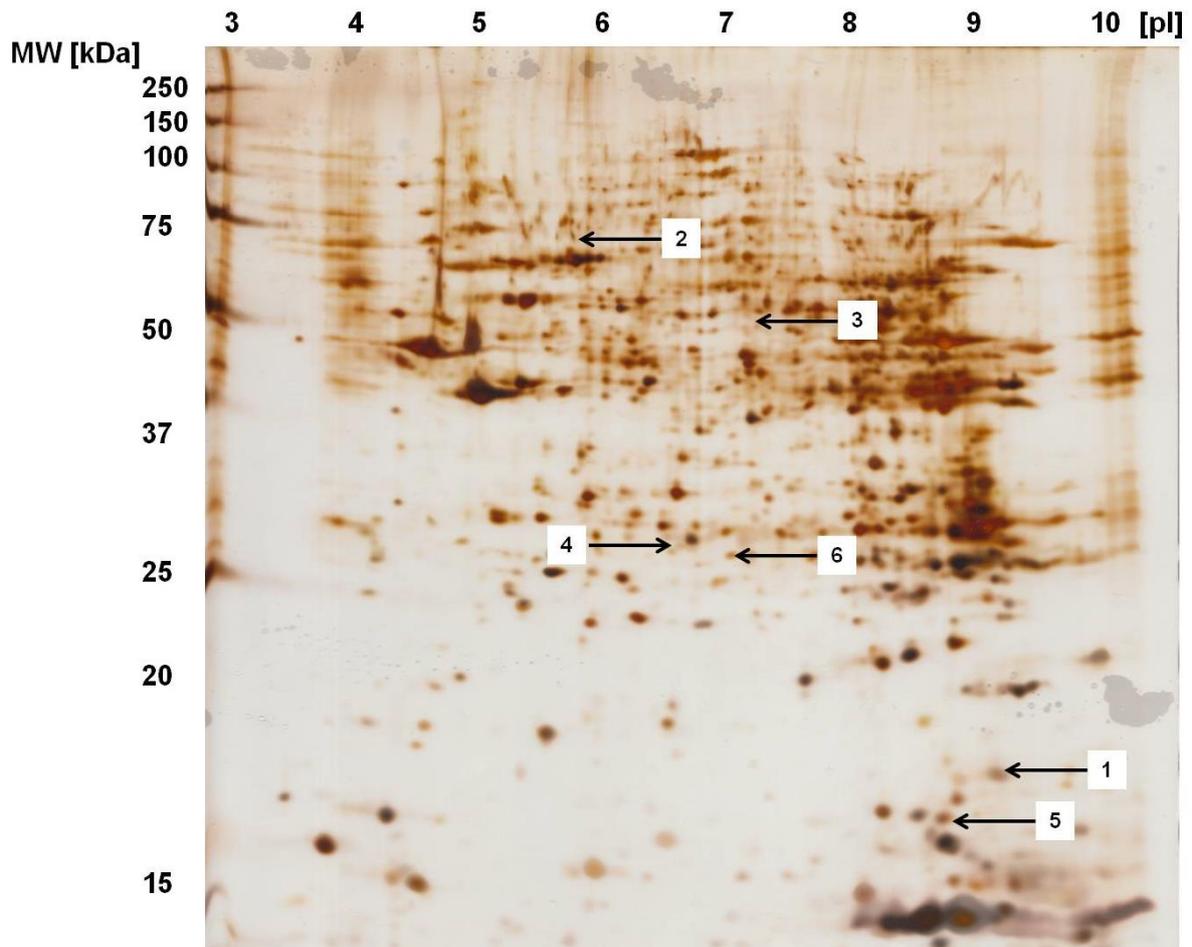


Abbildung 15 Proteine mit signifikanter Veränderung des Phosphorylierungsstatus

Signifikant veränderte Proteinspots [Pfeilnummer 1-6] im Phospho-gefärbten Polyacrylamidgel. Bedingungen: WT vs. PLC $p < 0,05$, WT vs. MMF $p > 0,05$ und MMF vs. PLC $p < 0,05$.

Beim Abgleich der gefundenen Peptidsequenzen mit der Proteindatenbank UniProt/SwissProt sowie des errechneten molekularen Gewichts (MW) und isoelektrischen Punkts (pI) mit den Positionen der Proteinspots auf den 2 DE-Gelen, konnten den 6 identifizierten Proteinspots die korrespondierenden Proteine zugeordnet werden. Identifizierte Proteine wurden nur in die Analyse einbezogen, wenn mindestens 3 übereinstimmende Peptidsequenzen (= Aminosäuresequenz, d.h. Abfolge (Sequenz) der Aminosäuren in einem Protein) nachgewiesen werden konnten. Auch nach Beseitigung etwaiger Laborverunreinigungen, wie bspw. menschliches Keratin, beinhalteten die nachgewiesenen Proteinspots mehr als nur ein Protein. Dies führten wir auf mögliche Überlagerung mit benachbarten Proteinspots zurück. Die mithilfe der Phospho-Färbung identifizierten Proteine sind in der folgenden Tabelle mit dem in der Mascot-Datenbank ermittelten Proteinnamen, der UniProt-Datenbank Identifikationsnummer, den geschätzten und berechneten Molekulargewichten, den geschätzten und berechneten isoelektrischen Punkten sowie ihrer Funktion aufgeführt.

Phospho- spot Nr.	Im Proteinspot identifiziertes Phosphoprotein (Proteinname Mascot- Datenbank)	Protein- name UniProt- Daten- bank	MW [kDa]		pI		Intensität Vgl. zu WT		Funktion
			~	±	~	±	MMF	PLC	
Phospho- spot 1	Aktin-bindendes Protein 2/3 Komplex Untereinheit 3 (ARPC3_MOUSE)	Q9JM76	17		9,0		(+) (-)		Regulation der Aktin Polymerisation und zusammen mit einem aktivierenden Zellbildungsfördernden Faktor (NPF) Vermittlung der Bildung verzweigter Aktin-Netzwerke
				21		8,78			Komplexe Funktionen beim Elektronentransfer von NADH in der Atmungskette. Ubiquinon vermutlich unmittelbare Elektronen- Empfänger für Enzym
Haupt- protein	NADH Dehydrogenase [Ubiquinon] 1 Alpha Unterkomplex Untereinheit 8 (NDUA8_MOUSE)	Q9DCJ5		20		8,76			
Phospho- spot 2			75		5,5		(-) (+)		
	Plastin-3 (PLST_MOUSE)	Q99K51		71		5,42			Aktin-bündelndes Protein
	Hitzeschockprotein verwandtes 71 kDa Protein (HSP7C_MOUSE)	P63017		71		5,37			Repressor bei der Transkriptionsaktivierung
	Adseverin (ADSV_MOUSE)	Q60604		80		5,64			Ca-abhängiges Aktin-Filament durchtrennendes Protein mit vermutlich regulatorischer Funktion bei Exozytose- Organisation des Mikrofilament-Netzwerks unterhalb Plasmamembran
Haupt- protein	Serum-Albumin (ALBU_MOUSE)	P07724		69		5,75		Regulation des kolloidal- osmotischen Drucks im Blut	
Phospho- spot 3	ATP Synthase Untereinheit Alpha, mitochondrial (ATPA_MOUSE)	Q03265	45		7,5		(-) (+)		
				60		9,22			Mitochondrienmembran ATP- Synthase: Umwandlung von ADP in ATP
	Katalase (CATA_MOUSE)	P24270		60		7,72			Schützt Zellen vor toxischer Wasserstoffperoxidwirkung, Förderung des Zellwachstums

Hauptprotein	Glutamat-Dehydrogenase 1, mitochondrial (DHE3_MOUSE)	P26443		61		8,05			Umwandlung L-Glutamat in Alpha-Keto-Glutarat, dabei Schlüsselrolle im Zitrat-Zyklus. Beteiligung an Lern- und Gedächtnisprozessen durch Erhöhung Glutamatumsatz
Phosphospot 4				27		6,5	(-)	(+)	
	Serin/Arginin-reicher Spleißfaktor 1 (SRSF1_MOUSE)	Q6PDM2		28		10,37			Verhinderung Exon-Skipping, Gewährleistung der Genauigkeit beim Spleißen, Regulation von Spleißalternativen
	26S Proteasom der nicht-ATPase regulierende Untereinheit 9 (PSMD9_MOUSE)	Q9CR00		25		6,00			Chaperon bei der Herstellung des 26S Proteasoms
Hauptprotein	Östradiol 17-Beta-Dehydrogenase 8 (DHB8_MOUSE)	P50171		27		6,10		Beteiligung Biosynthese von Fettsäuren in den Mitochondrien	
Phosphospot 5				15		8,5	(+)	(-)	
	Destrin OS (DEST_MOUSE)	Q9R0P5		19		8,14			Depolymerisation von Aktin, Trennung von Aktin-Filamenten (F-Aktin), Bindung an Aktin-Monomere (G-Aktin), pH-unabhängig
	40S ribosomales Protein S14 (RS14_MOUSE)	P62264		16		10,07			Proteinbestandteil 40S Ribosom
Hauptprotein	Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase A (PPIA_MOUSE)	P17742		18		7,73		Beschleunigung der Proteinfaltung	
Phosphospot 6	Serin/Arginin-reicher Spleißfaktor 1 (SRSF1_MOUSE)	Q6PDM2		26		7,0	(+)	(-)	
				28		10,37			siehe Proteinspot 4
Hauptprotein	Omega-Amidase NIT2 (NIT2_MOUSE)	Q9JHW2		31		6,44			Entfernung potentiell toxischer Zwischenprodukte
Legende: pI = isoelektrischer Punkt; MW = Molekulargewicht; (+) = erhöht; (-) = erniedrigt, ± = berechnet, ~ = geschätzt									

Tabelle 12 Übersicht signifikant veränderte Phosphospots mit Proteinzuzuordnung

Die Proteininformationen wurden am 02.05.2015 von den Internetseiten <http://www.proteinatlas.org>, <http://www.matrixscience.com> und <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> abgerufen.

3.4.2 Veränderungen der Proteinmenge

Die Proteomanalyse hat das Ziel Veränderungen der Proteinmenge einzelner Proteinspots zu detektieren. In den Silber-gefärbten 2 DE-Polyacrylamidgelen konnten aus ca. 500 vorhandenen Proteinspots (siehe Kap. 3.4.1) insgesamt 22 Proteinspots mit veränderter Intensität anhand der oben beschriebenen Kriterien durch die Software Delta2D identifiziert werden. Die Voraussetzungen für eine weiterführende massenspektrometrische Analyse waren, aufgrund der festgelegten Signifikanz-Unterschiede zwischen den Versuchstiergruppen, (signifikante Veränderung zwischen WT- und PLC- bei nicht signifikanter Veränderung zwischen WT- und MMF-Mäusen), nur bei 4 der 22 Proteinspots gegeben.

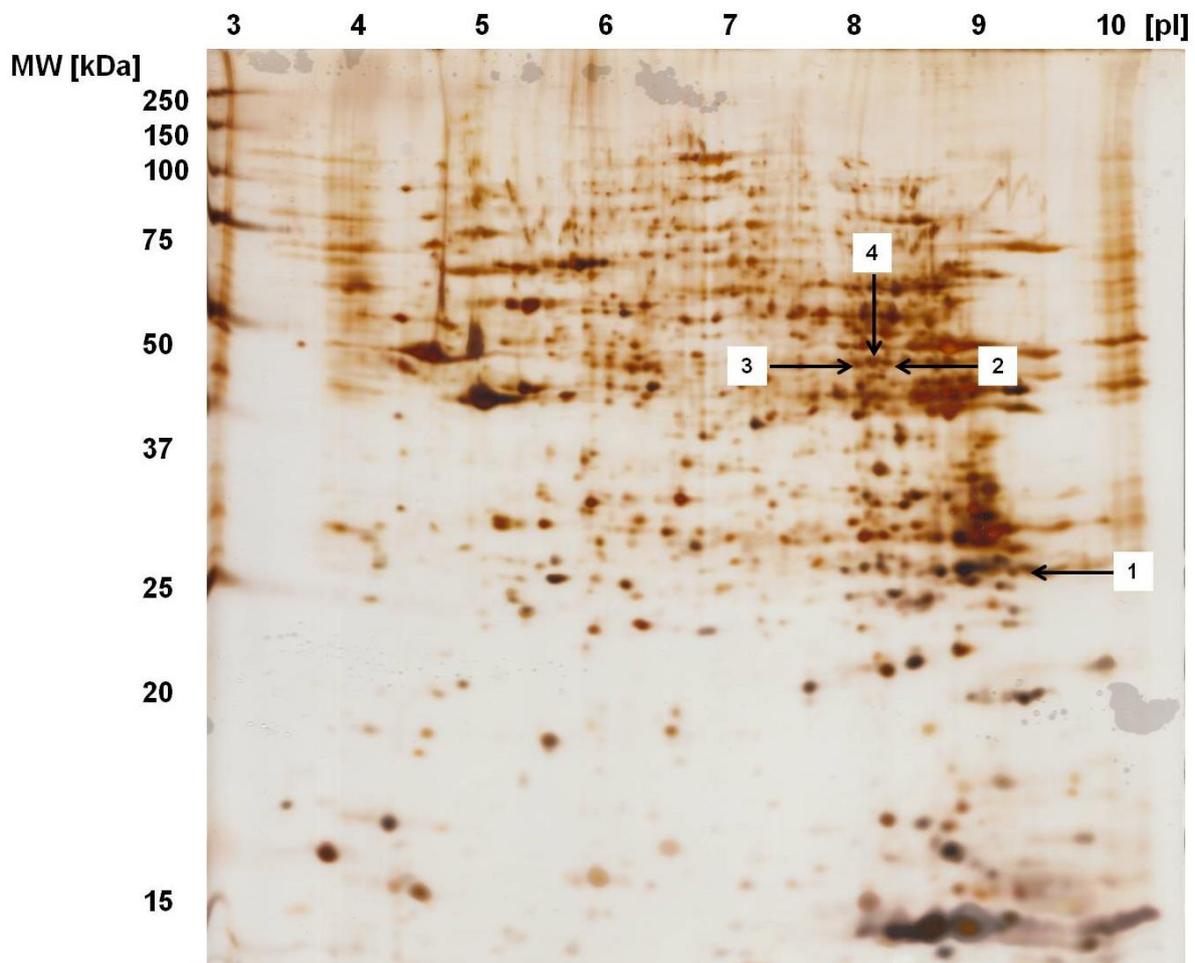


Abbildung 16 Proteine mit signifikanter Gesamt mengenveränderung

Signifikant veränderte Proteinspots [Pfeilnummer 1-4] im Silber-gefärbten Polyacrylamidgel. Bedingungen: WT vs. PLC $p < 0,05$, WT vs. MMF $p > 0,05$ und MMF vs. PLC $p > 0,05$.

Im Anschluss wurden die 4 ermittelten Proteinspots (= Silberspots) aus dem Silber-gefärbten 2 DE-Gel ausgeschnitten, verdaut und massenspektrometrisch untersucht. Die gewonnenen

Daten wurden wiederum mit der Software Analyst TF1.6 verarbeitet und danach unter Verwendung der Mascot-Suchmaschine mit der Proteindatenbank UniProt/SwissProt abgeglichen.

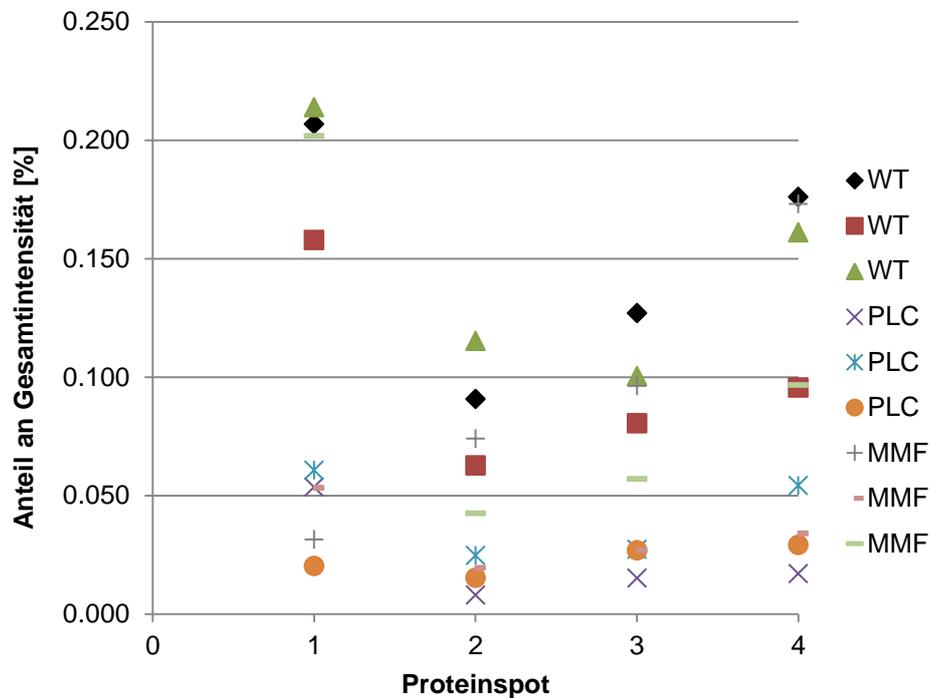


Abbildung 17 Silberspot-Intensitäten der repräsentativen Versuchstiere

Zur Gegenüberstellung und Messung der Fluoreszenz-Intensitäten wurden aus den 3 verschiedenen Versuchstiergruppen (MMF, PLC, WT) jeweils 3 repräsentative Versuchstiere ausgewählt. Mithilfe der Software Delta 2D wurden die Intensitäten an den digitalen Bildern der 2 DE-Polyacrylamidgelen bestimmt. Im Schaubild sind die 4 Fluoreszenz-Intensitäten (identifizierte Proteinspots) der 3 repräsentativen Versuchstiere jeder Versuchstiergruppe (3x3) dargestellt.

Identifizierte Proteine wurden nur in die Analyse einbezogen, wenn mindestens 3 übereinstimmende Peptidsequenzen nachgewiesen wurden. Beim Abgleich der gefundenen Peptidsequenzen mit der Proteindatenbank UniProt/SwissProt sowie des errechneten molekularen Gewichts (MW) und isoelektrischen Punkts (pI) mit den Positionen der Proteinspots auf den 2 DE-Gelen konnten den 4 identifizierten Proteinspots die korrespondierenden Proteine zugeordnet werden. Einem Proteinspot konnten, auch nach Beseitigung etwaiger Laborverunreinigungen, 3 Proteine zugeordnet werden. Die mithilfe der Silber-Färbung identifizierten Proteine sind in Tabelle 13 mit den in der Mascot-Datenbank ermittelten Proteinennamen, der UniProt-Datenbank Identifikationsnummer, den geschätzten und berechneten Molekulargewichten, den geschätzten und berechneten isoelektrischen Punkten sowie ihrer Funktion aufgeführt.

Silber-spot-Nr.	Im Proteinspot identifiziertes Protein (Proteinname Mascot-Datenbank)	Proteinname UniProt-Datenbank	MW [kDa]		pI		Intensität vs. WT		Funktion
			~	±	~	±	MMF	PLC	
Silber-spot 1	Dehydrogenase/Reduktase SDR (DHRS4_MOUSE)	Q99LB2	26		9		(-)	(-/-/-)	Oxidoreduktase bei Abbauprozessen: Alkohol, Keton, Netzhaut
				29,8		9,45			
	Protein NipSnap homolog (NIPS1_MOUSE)	O55125		33,3		9,48			
Hauptprotein	GTP:AMP Phosphotransferase AK3, mitochondrial (KAD3_MOUSE)	Q9WTP7		25,4		8,87			Aufrechterhaltung Homöostase zellulärer Nukleotide im Mitochondrium
Silber-spot 2	Peroxisomale Acyl-coenzyme A Oxidase (ACOX1_MOUSE)	Q9R0H0	40		8		(-)	(-/-/-)	Fettstoffwechsel: katalysierendes Enzym in den Peroxisomen zum Fettsäurenabbau (Beta-Oxidation)
				74,6		8,64			
Silber-spot 3	Acyl-CoA Dehydrogenase (ACD10_MOUSE)	Q8K370	42		8		(-)	(-/-/-)	Katalyse Anfangsschritt Abbau von Fettsäuren (Beta-Oxidation) im Mitochondrium
				11,9		8,49			
Silber-spot 4	Peroxisomale Acyl-coenzyme A Oxidase (ACOX1_MOUSE)	Q9R0H0	40		8		(-)	(-/-/-)	Fettstoffwechsel: katalysierendes Enzym in den Peroxisomen zum Fettsäurenabbau (Beta-Oxidation)
				74,6		8,64			
Legende: pI = isoelektrischer Punkt; MW = Molekulargewicht; (-) = leicht erniedrigt; (-/-) = erniedrigt; (-/-/-) = stark erniedrigt, ± = berechnet, ~ = geschätzt									

Tabelle 13 Übersicht signifikant veränderte Silberspots mit Proteinzuzuordnung

Die Proteininformationen wurden am 02.05.2015 von den Internetseiten <http://www.proteinatlas.org>, <http://www.matrixscience.com> und <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> abgerufen.

Die Hälfte der identifizierten und Phospho- oder Silber-gefärbten Proteinspots wurden zur Überprüfung der ermittelten Ergebnisse und Reproduzierbarkeit erneut aus unterschiedlichen 2 DE-Gelen ausgeschnitten, verdaut, massenspektrometrisch analysiert und mit den Proteindatenbanken abgeglichen. Bei der erneuten Durchführung der Untersuchungen/Analysemethoden wurden die jeweils zugeordneten Proteine der Proteinspots bestätigt.

4. Diskussion

Bei der Alport-Glomerulonephritis handelt es sich um eine erbliche Erkrankung die im Rahmen einer chronisch progredienten Niereninsuffizienz zu einer Nierenfibrose führt. Hierbei kommt es aufgrund pathologisch veränderter Basalmembranstrukturen in den Nieren, Augen und Ohren betroffener Patienten zu histopathologischen und funktionellen Veränderungen. Ursächlich dafür ist ein Genmutation-assoziiierter fehlerhafter Aufbau des Kollagen Typ IV (Cosgrove et al. 1996). Im Rahmen dieser Arbeit wurden in Analogie zum humanen Alport-Syndrom, COL4A3-defiziente Mäuse als Tiermodell für ein progredientes Nierenversagen verwendet (Alport 1927). Unbehandelte COL4A3-defiziente Mäuse sterben in der Regel nach 66 bis 71 Tagen an terminalem Nierenversagen (Gross et al. 2003; Koepke et al. 2007; Brandhorst et al. 2010; Ryu et al. 2012). Im Vergleich dazu liegt die Lebenserwartung einer gesunden WT-Maus bei 565 Tagen (Gross et al. 2003). Vorausgegangene Studien zeigten bei COL4A3-defizienten Mäusen unter der Behandlung mit nephroprotektiv oder antifibrotisch wirkenden Medikamenten eine verlängerte Lebenszeit. Durch die Behandlung mit Paricalcitol konnte die Lebenserwartung bspw. um 13%, mit Ramipril um mehr als 50 oder 100% sowie mit der Kombination Ramipril und Paricalcitol um mehr als 68% verlängert werden (Gross et al. 2003; Rubel et al. 2014). Eine weitere Studie zeigte, dass die Nierenfunktion COL4A3-defizienter Mäuse durch die Behandlung mit MMF verbessert werden konnte. Allerdings hatte die Behandlung in dieser Studie keinen Einfluss auf die Lebenserwartung der Versuchstiere (Brandhorst et al. 2010).

Die bisherigen Studienergebnisse führten zu der Hypothese, dass MMF möglicherweise die Entstehung einer tubulointerstitielle Fibrose hemmt, aber keinen Einfluss auf den Verlauf der Glomerulosklerose hat. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Auswirkungen der MMF-Behandlung auf die Nierenfunktion sowie den Phosphorylierungsstatus und die quantitative Expression der Nierenproteine anhand COL4A3-defizienter Mäuse als Modell für eine progrediente Nierenfibrose *in vivo* untersucht. Durch die Veränderung des Proteinphosphorylierungsstatus werden in erster Linie intrazelluläre Signalkaskaden reguliert. Dadurch kann bspw. ein Protein aktiviert oder inaktiviert werden und die Koordination von zellulären Antworten auf ein spezifisches Signal erfolgen (Lottspeich und Engels 2006). Es wurde daher versucht jene funktionellen Zusammenhänge aufzuklären, die an der Entstehung und dem Fortschreiten einer chronisch progredienten Niereninsuffizienz beteiligt sind. Beim Proteom handelt es sich um die Gesamtheit aller Proteine in einem Lebewesen, Gewebe, Zelle oder Zellkompartiment. Es wird durch Genom, Stoffwechsellage, Temperatur, Interaktionen, Stress, zellspezifische Expression und Pharmaka beeinflusst (Lottspeich und Engels 2006). Um die MMF assoziierten Veränderungen des Proteoms

identifizieren zu können, wurde im 14-tägigen Behandlungszeitraum einer COL4A3-defizienten Versuchstiergruppe MMF und der anderen Versuchstiergruppe eine Placebo-Lösung appliziert

4.1 Alport-Mäuse als Modell der chronischen Niereninsuffizienz

Als Tiermodell für eine chronisch-progrediente Niereninsuffizienz eignen sich Alport-Mäuse in besonderem Maße, da sie im Vergleich zu anderen Tiermodellen des Alport-Syndroms, wie bspw. dem *samoyed dog* Hundemodell (Heikkilä et al. 2000), mit einer durchschnittlichen Lebenserwartung von ca. 70 Tagen, den Vorteil einer kurzen Lebenszeit sowie hohen Generationszahl bieten. Um das Versterben der Versuchstiere aufgrund ihrer kurzen Lebenserwartung vor Studienende zu verhindern, wurde der Opferungstag auf den 50. Lebenstag festgelegt. Desweiteren sind der einheitliche Phänotyp, die Möglichkeit der zeitnahen Genotypbestimmung und eine hohe Nachkommenzahl weitere Vorteile (Gross et al. 2003). Um die tubulointerstitielle Nierenfibrose an einem Modell *in vivo* untersuchen zu können, hätte auch das Tiermodell der unilateralen Urterobstruktion, bspw. an Sprague-Dawley-Ratten, zur Verfügung gestanden. Dieses Modell bringt aber den großen Nachteil, initial eine aufwendige Operation zur unilateraten Ligatur des Ureters durchführen zu müssen (Truong et al. 2001). Durch den Eingriff besteht immer ein Risiko von intraoperativen Komplikationen und postoperativen Wund- oder Systeminfektionen. Im Rahmen des COL4A3-defizienten Mausmodells sind diese vorgeschalteten operativen Interventionen nicht erforderlich. Somit stellen die Alport-Mäuse, als nicht-hypertensives und nicht-inflammatorisches Versuchstiermodell, für uns die geeignetste Grundlage zur *in vivo* Untersuchung von Behandlungsmöglichkeiten chronisch progredienter Nierenerkrankungen (Gross et al. 2004) dar.

4.2 Therapeutischer Effekt von MMF in Bezug auf die Nierenhistologie und -funktion

Im Rahmen der histologischen Untersuchung wurden 3653 Gesichtsfelder der H.E.-gefärbten Nierenschnittpräparate gemäß der Banff-Klassifikation ausgewertet (Racusen et al. 1999). Dabei war zumindest morphologisch das Ausmaß der tubulointerstitiellen Fibrose in der MMF-Versuchstiergruppe im Vergleich zu den PLC-Versuchstieren (siehe Kap. 3.2.1) nur geringfügig niedriger ausgeprägt. Eine durch die MMF-Behandlung induzierte Hemmung

der Glomerulosklerose konnte durch die histologische Untersuchung nicht nachgewiesen werden. Daher ist davon auszugehen, dass es zwischen der MMF- und PLC-Versuchstiergruppe hinsichtlich der Glomerulosklerose am Ende der 7. Lebenswoche keine wesentlichen Unterschiede gab. Dass die tubulointerstitiellen Fibrosierung nur geringfügig gehemmt werden konnte, führten wir darauf zurück, dass die Behandlungsdauer von 14 Tagen (6. und 7. Lebenswoche der Versuchstiere) vermutlich zu kurz und der Behandlungsbeginn auf einen zu späten Zeitpunkt terminiert worden war. Wahrscheinlich kann durch die MMF-Behandlung nur der Beginn der tubulointerstitiellen Fibrosierung verzögert oder verlangsamt, aber nicht der Progress einer bereits bestehenden und fortgeschrittenen Fibrosierung aufgehalten werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte bei insgesamt 23 Versuchstieren (MMF: n = 10, PLC: n = 10, WT: n = 3) Blut für diagnostische Zwecke gewonnen werden. Die Serumproben der Versuchstiere wurden zur Bestimmung von Gesamtprotein, Kreatinin und Harnstoff-N verwendet. Analog zu den Ergebnissen einer vorhergehenden Arbeit (Brehmer 2011) waren die Harnstoff-N-Konzentrationen in der MMF-Versuchstiergruppe im Vergleich zu den PLC-Tieren signifikant erniedrigt. Durch die zweiwöchige Behandlung mit MMF konnte der Zentralwert (= Median) der Harnstoff-N-Konzentration im Vergleich zu den mit PLC behandelten COL4A3-defizienten Mäusen um nahezu 25% reduziert werden. Die 25% Perzentile konnte durch die MMF-Behandlung dabei um annähernd 20% und 75% Perzentile um nahezu 35% gesenkt werden. Da alle Versuchstiere in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) mit dem gleichen Futter versorgt wurden, können die differierenden Harnstoff-N-Konzentrationen nicht auf eine unterschiedliche Proteinzufuhr mit der Nahrung zurückgeführt werden. Der Proteinmetabolismus stellt die wichtigste Einflussgröße der Harnstoffkonzentration dar und wird deswegen bspw. zur Überwachung des Proteinstoffwechsels im Rahmen einer Intensivtherapie bestimmt. Vielmehr ist von einer renalen Ursache auszugehen. Die Harnstoff-N-Konzentration steigt bei einer Einschränkung der glomerulären Filtrationsrate, wie sie auch im Rahmen eines Alport-Syndroms auftritt, üblicherweise um mehr als 50% an (Hallbach 2011). Darüber hinaus steigt die Harnstoff-N-Konzentration beim akuten Nierenversagen früher als die Kreatininkonzentration an. Die signifikant verringerte Harnstoff-N-Konzentration der MMF-Versuchstiergruppe legt damit einen positiven Einfluss auf die Nierenfunktion der COL4A3-defizienten Versuchstiere nahe.

Die gemessenen Kreatininkonzentrationen waren in beiden COL4A3-defizienten-Versuchstiergruppen im Vergleich zu den WT-Mäusen signifikant erhöht. Dies war zu erwarten und kann ebenfalls als Folge der COL4A3-Defizienz bedingten eingeschränkten Nierenfunktion der Versuchstiere betrachtet werden. Die Kreatininkonzentrationen sind im

Gegensatz zu den Harnstoffkonzentrationen ernährungsunabhängig. Allerdings korreliert die Konzentration mit der jeweils vorhandenen Muskelmasse, da Kreatinin als Ausscheidungsprodukt beim Abbau der muskelspezifischen Energiespeichersubstanz Kreatinphosphat entsteht. Desweiteren wird die Kreatininkonzentration im Blut auch von Geschlecht und Alter der Versuchstiere beeinflusst. Allerdings kann es auch im Rahmen von Muskeltraumen, Verbrennungen sowie Muskeldystrophien zu einer Erhöhung kommen (Hallbach 2011). Durch die MMF-Behandlung konnte der Zentralwert (= Median) der Kreatinin-Konzentration im Vergleich zu den mit PLC behandelten COL4A3-defizienten Mäusen um nahezu 20% , die 25% Perzentile um annähernd 40% und 75 % Perzentile um 10% gesenkt werden. Die ermittelten Kreatininkonzentrationen waren in der PLC-Versuchstiergruppe im Vergleich zu den MMF-Mäusen (nicht signifikant) erhöht. Dies unterstreicht, analog zu den gemessenen Harnstoff-N-Konzentrationen, den positiven Einfluss der MMF-Behandlung auf die Nierenfunktion der Versuchstiere.

Bei der Bestimmung des Gesamtproteins zeigten sich zwischen den 3 Versuchstiergruppen keine signifikanten Unterschiede. Nur bei sehr großen Veränderungen der Albumin- und Immunglobulinkonzentrationen, die die Hauptbestandteile der Gesamtproteinkonzentration im Blutplasma darstellen, kommt es auch zu einer Veränderung des Gesamtproteins. Bei den WT-Mäusen ist das Albumin im Vergleich zu den MMF- und PLC-Mäusen deutlich höher und die Alpha-2-Fraktion sowie Beta-Fraktionen niedriger. Vermutlich werden bei den COL4A3-defizienten Versuchstieren zur Aufrechterhaltung des onkotischen Drucks, analog zur gesteigerten Synthese der Alpha-2-Globuline beim humanen nephrotischen Syndrom, als Ausgleich zum erniedrigten Albumin die Proteine der Alpha-2-Fraktion und der Beta-Fraktionen hochreguliert. Die Veränderungen der Proteinzusammensetzungen im Blutplasma werden mithilfe der Serumprotein-Elektrophorese in diesem Kapitel nochmals weiterführend und eingehend betrachtet. Die Gesamtproteinkonzentration ist ein Katabolienmarker und belegt, dass die signifikanten Harnstoffveränderungen nicht durch Katabolismus hervorgerufen werden. Er dient dem Nachweis einer Dysproteinämie, Störungen des Wasserhaushalts sowie der Verlaufskontrolle zahlreicher Erkrankungen (Hallbach 2011).

Die mittels Urinteststreifen und Urinsedimentuntersuchung gewonnenen Ergebnisse stellten sich konsistent zu den übrigen Ergebnissen dar. Bei der Bestimmung der Urinparameter mittels Teststreifen war das ermittelte durchschnittliche Gesamtprotein bei den COL4A3-defizienten Mäuse deutlich erhöht. Im Urin der WT-Mäuse konnte im Gegensatz zu den COL4A3-defizienten Versuchstieren kein Hämoglobin oder Leukozyten, als Zeichen einer chronisch progredienten Niereninsuffizienz und der damit einhergehenden Schädigungen der

Glomeruli sowie Entzündungen der ableitenden Harnwege, nachgewiesen werden. In Analogie dazu, konnten bei der lichtmikroskopischen Untersuchung des Urinsediments Erythrozyten nur bei den COL4A3-defizienten Mäusen nachgewiesen werden. Aufgrund der geringen Probenanzahl sind die Ergebnisse der Urinuntersuchung aber leider nur begrenzt repräsentativ.

Bei der Serumprotein-Elektrophorese zeigten sich in der Albumin-, Alpha-1- und Alpha-2-Fraktion bei den COL4A3-defizienten Versuchstieren und im Vergleich zu den WT-Mäusen signifikante Unterschiede. Die Albuminfraktion war bei den COL4A3-defizienten Mäusen aufgrund der hereditären progressiven Nephropathie und bedingt durch den renalen Proteinverlust erwartungsgemäß erniedrigt. Albumin nimmt mit normalerweise 30-50% den größten Anteil der Proteine im Blut ein, spielt eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung des kolloid-osmotischen Drucks und dient als Transporterprotein für diverse Moleküle. Da auch viele Medikamente, unter anderem MPA und MPAG, an Albumin binden, kann es aufgrund einer Hypalbuminämie dazu kommen, dass die freien pharmakologisch wirksamen Anteile eines Medikaments erhöht sind (siehe Kap. 1.3). Die bei den COL4A3-defizienten Versuchstieren ebenfalls erniedrigte Alpha-1-Fraktion und die erhöhte Alpha-2-Fraktion sind die Folge der krankheitsbedingten Proteinurie. Aufgrund des renalen Proteinverlusts nehmen die niedermolekulare Albumin- (69 kDa) und Alpha-1-Fraktion (44-200 kDa) ab. Infolgedessen kann die Alpha-2-Fraktion bis zu 65% des Gesamtproteinanteils annehmen. Da die Globuline der Alpha-2-Fraktion größtenteils hochmolekular (54-1000 kDa) sind, werden sie selbst bei schweren glomerulären Schäden nicht vermehrt filtriert. Aufgrund des Albuminverlusts kommt es, um den kolloid-osmotischen Druck aufrechtzuerhalten, zu einer kompensatorischen Syntheserhöhung von Makroglobulinen der Alpha-2-Fraktion (Kaneko 1980; Hallbach 2011). Im Rahmen der bestehenden Entzündung werden sowohl Globuline der Alpha-1- wie auch der Alpha-2-Fraktion vermehrt produziert. Aufgrund des glomerulären Schadens gehen die vorrangig niedermolekularen Globuline der Alpha-1-Fraktion aber verloren.

4.3 Therapeutischer Effekt von MMF auf den Phosphorylierungsstatus und das renale Proteom

Die mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese erzeugten Polyacrylamidgele stellen die Grundlage zur Beurteilung von Veränderungen des Phosphoproteoms und Proteoms dar. Je gründlicher die Proteine voneinander getrennt wurden, umso einfacher konnten die Veränderungen analysiert werden. Die Proteintrennungsgenauigkeit der erzeugten 2DE-Gele

wurde aber durch multiple Faktoren beeinflusst. Gemäß den Literaturangaben kann bei der 2DE-Gelelektrophorese unter Umständen eine Standardabweichung bis zu 70% auftreten (Schröder et al. 2008). Die technische Reproduzierbarkeit dieser Proteintrennungsmethode hängt einerseits von der Probengewinnung, -lagerung und -aufarbeitung ab (Boguski und McIntosh 2003; Choe und Lee 2003). Andererseits hatte die Erfahrung hinsichtlich Handhabung und Durchführung der Labormethode ebenfalls auch einen gewissen Einfluss. Zudem beinhaltet die 2DE-Gelelektrophorese eine methodische Ungenauigkeit, da sich die Proteine im stark basisch oder sauren wie auch im hochmolekularen Bereich (Extrembereiche des Gels) nur unbefriedigend fokussieren lassen (Schröder et al. 2008). Eine weitere Limitation dieser Methode betrifft die Fähigkeit alle Proteomelemente zu erkennen und richtig darzustellen. Proteine, wie bspw. Albumin, sind in einer deutlich größeren Menge vorhanden als andere Proteine. Dies führt dazu, dass Proteine mit einer kleineren Gesamtmenge und damit geringerer Signalintensität oft von Proteinen wie bspw. Albumin überdeckt werden und demzufolge entweder nicht identifiziert oder einem Proteinspot mehrere Proteine zugeordnet werden können (Gygi et al. 2000).

Das Genom kann als eine Art statische Sammlung von Genen aufgefasst werden. Im Vergleich dazu handelt es sich beim Proteom um keine feste Entität, sondern vielmehr um eine dynamische Sammlung von Proteinen, die sich sogar von Zelle zu Zelle unterscheiden können. Demzufolge existiert eine Vielzahl an Proteomen, die für eine bestimmte Zellart oder ein Krankheitsbild charakteristisch sind. Zudem sind die Proteine auch aufgrund posttranslationaler Modifikationen (z.B. Acetylierung, Phosphorylierung) einem ständigen Wandel und Veränderungen unterworfen. Es ist daher oft schwierig abzugrenzen, ob ein erkenn- und messbarer Intensitätsunterschied eines Proteins durch ein divergierendes „pathologisches“ Proteom verursacht wird oder nur auf „physiologischen“ Differenzierungen und posttranslationalen Modifikationen beruht (Huber 2003).

4.3.1 Veränderungen des Phosphorylierungsstatus

Bei der Untersuchung des Phosphoproteoms konnten aufgrund der erforderlichen Signifikanz-Unterschiede zwischen den Versuchstiergruppen 6 unterschiedlich phosphorylierte Proteine identifiziert werden (siehe Kap. 3.4.1). Als mögliche posttranslationale Peptidmodifikationen wurde die Phosphorylierung mit Serin, Threonin und Tyrosin bei der Peptidsuche in der UniProt/SwissProt-Datenbank miteinbezogen. Identifizierte Proteine wurden nur Bestandteil der Analyse, wenn mindestens 3 übereinstimmende Peptidsequenzen nachgewiesen werden konnten. Es konnte allerdings

kein phosphoryliertes Peptid mit ausreichender Sicherheit identifiziert werden. Aufgrund der geringen Proteinmengen wurden die Proben vor der massenspektrometrischen Untersuchung keiner Phosphopeptid-Anreicherungsprozedur unterzogen.

Dem Phosphoproteinspot 1 (~MW: 17 kDa, ~pI: 9) konnten 2 korrespondierende Proteine zugeordnet werden. Die Intensität des Proteinspots war bei der PLC-Versuchstiergruppe signifikant erniedrigt. Durch die Behandlung mit MMF wurde die Phosphorylierung bei der MMF-Versuchstiergruppe auf das Niveau der WT-Mäuse angehoben. Als Hauptprotein konnte allen 3 Versuchstiergruppen die NADH-Dehydrogenase [Ubiquinon] 1 Alpha Unterkomplex Untereinheit 8 (NDUA8_MOUSE) zugeordnet werden. Das Protein konnte aber nicht weiter betrachtet werden, da es bisher nicht als Phosphoprotein beschrieben worden ist. Mit der Aktin-bindenden Protein 2/3 Komplex Untereinheit 3 (ARPC3_MOUSE) enthält der Proteinspot aber auch ein mögliches Phosphoprotein. Es handelt es sich dabei um ein Aktin-bindendes Zytoskelettprotein, das an Zellausstülpungen und Lamellipodien (sehr flach und breit angelegte Zellfortsätze) beteiligt ist und Bestandteil des Arp2/3 Komplex ist. Der Arp2/3 Komplex erzeugt und vermittelt in beweglichen Zellen verzweigte Aktin-Filamente. Durch das Umorganisieren bestehender und die Bildung neuer Aktinfilamente wird das lokale Zellwachstum gesteuert (Pollard und Borisy 2003). Es gibt Hinweise das der Arp2/3-Komplex auch an der Zellentwicklungssteuerung von Podozyten beteiligt ist (Akiyama et al. 2008; Miao et al. 2009). Die an der Entwicklung einer chronisch progredienten Niereninsuffizienz im Rahmen des Alport-Syndroms beteiligten Podozyten spielen beim DDR1 (Discoidin Domain Rezeptor 1) vermittelten Fortschreiten der Nierenfibrose und -entzündung eine Schlüsselrolle (Gross et al. 2010). In einer neueren Studie konnte zudem nachgewiesen werden, dass die Threonin- und Tyrosin-Phosphorylierung für einen Teil der Arp2/3 Komplex Funktionen sehr wichtig sind, da sie unter anderem eine große Rolle in der Regelung der Zellentwicklung spielen (Choi et al. 2013).

Die Phosphorylierung des Phosphoproteinspots 2 (~MW: 75 kDa, ~pI: 5,5) war in der PLC-Versuchstiergruppe signifikant erhöht. Bei den MMF-Mäusen war die Phosphorylierung gegenläufig und mit der WT-Versuchstiergruppe vergleichbar. Der Proteinspot enthielt entsprechend der Datenbankauswertung 4 denkbare Phosphoproteine: Serumalbumin (ALBU_MOUSE), Adseverin (ADSV_MOUSE), Hitzeschock-verwandtes 71 kDa Protein (HSP7C_MOUSE) und Plastin-3 (PLST_MOUSE). ALBU_MOUSE kam im identifizierten Proteinspot am häufigsten vor und konnte auch extrazellulär nachgewiesen werden. Es ist das Hauptprotein im Blutplasma und an der Aufrechterhaltung des kolloid-osmotischen Drucks beteiligt. Zudem ist es ein wichtiges Transportprotein (siehe Kap. 1.3), das an zellulären Reaktionen auf Substratmangel, der Apoptose-Hemmung und vielen weiteren Prozessen beteiligt ist. ADSV_MOUSE ist an der Durchtrennung von Aktinfilamenten, der

Zellproliferationshemmung sowie der Apoptoseinduktion beteiligt. Die Proteine HSP7C_MOUSE und PLST_MOUSE konnten im Phosphoproteinspot 2 nur in geringem Umfang nachgewiesen werden. HSP7C_MOUSE ist ein Repressor der transkriptionalen Aktivierung. Es hemmt die transkriptionale Koaktivator-Aktivität des CITED1-Gens bei SMAD-Protein gesteuerter Transkription, die beispielsweise für die Realisierung von Signalwegen der TGF- β -Familie verantwortlich ist (Blahna und Hata 2012). PLST_MOUSE ist ein Aktin-bündelndes Protein, das sich in den Mikrovilli des Darms sowie fibroblastischen Filopodien (fadenförmige Ausstülpungen der Zelle) befindet. Das Protein ist sowohl an der Beweglichkeit wie auch an Polarität (spezifische Ausrichtung der Zellstruktur) und Chemotaxis (Beeinflussung der Fortbewegungsrichtung von Zellen durch ein Konzentrationsgefälle) beteiligt. PLST_MOUSE gehört zu einer aus 3 sehr homologen Isoformen bestehenden Plastin-Proteinfamilie. Die 3 verschiedenen Isoformen werden in unterschiedlichen Zellen exprimiert: das in Darm- und Nierenzellen vorkommende I-Plastin, das in Leukozyten und Krebszellen exprimierte L-Plastin und das in festen Geweben (z.B. in Neuronen) vorhandene T-Plastin (Shinomiya 2012). Bisher konnte eine Phosphorylierung nur in der L-Plastin Isoform nachgewiesen werden (Delanote et al. 2005). Es wurde als Transformation- induziertes Polypeptid neoplastischer Fibroblasten identifiziert (Shinomiya 2012). Darüber hinaus ist L-Plastin Bestandteil eines neuartigen Serum-Markers zur Früherkennung von malignen Nierentumoren (Su Kim et al. 2013).

Phosphoproteinspot 3 (~MW: 45 kDa, ~pI: 7,5) zeigte in der PLC-Versuchstiergruppe eine signifikante Phosphorylierungserhöhung, die bei den mit MMF behandelten Mäusen aufgehoben war. Dem Proteinspot konnten 3 passende Phosphoproteine zugeordnet werden: Als Hauptprotein die Glutamat-Dehydrogenase 1, mitochondrial (DHE3_Mouse), ATP Synthase Untereinheit Alpha, mitochondrial (ATPA_MOUSE) sowie Katalase (CATA_MOUSE). Das DHE3_MOUSE spielt, da es L-Glutamat in Alpha-Ketoglutarat umwandelt, eine Schlüsselrolle im Zitratzyklus. Zudem wird eine Beteiligung an Lern- und Gedächtnisreaktionen vermutet (Csibi et al. 2013). ATPA_MOUSE ist, da es ADP mithilfe des an der Mitochondrienmembran bestehenden Protonengradienten in das energiereichere ATP umwandelt, sowohl an der Embryonalentwicklung wie auch der Proliferationshemmung von Endothelzellen beteiligt. Hinsichtlich der Entwicklung einer Nierenfibrose ist das Protein CATA_MOUSE, obwohl es nur in geringer Menge im Phosphospot 3 nachgewiesen werden konnte, von großem Interesse. Es handelt sich dabei um eine Oxidoreduktase die als Peroxisomen-Enzym an zahlreichen biologischen Prozessen, einschließlich der Nierenentstehung, Apoptosehemmung und Induktion der Zellteilung, beteiligt ist. Interessanterweise fördert es auch das Wachstum unterschiedlichster Zellen. Darunter befinden sich T- und B-Lymphozyten aber auch Fibroblasten und Fibrozyten. Eine kürzlich veröffentlichte Studie konnte zeigen, dass T-Lymphozyten und das Zytokin IL-6 (Regulation

der Entzündungsreaktion im Körper) eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer Nierenfibrose spielen (Yhee et al. 2008). Möglicherweise beeinflussen Monozyten die Myofibroblasten-Akkumulation über das Zytokin TGF- β und sind auf diese Weise an der Entstehung einer Tubulusatrophie bei Alport-Mäusen beteiligt (Rodgers et al. 2003).

Der Phosphoproteinspot 4 (~MW: 27 kDa, ~pI: 6,5) zeigte in der PLC-Versuchstiergruppe eine signifikant erhöhte Phosphorylierung. Durch die Behandlung mit MMF wurde der Phosphorylierungsgrad bei den MMF-Mäusen gesenkt und entsprach damit dem Niveau der WT-Mäuse. Als Hauptprotein konnte bei allen 3 Versuchstiergruppen die Östradiol 17-Beta-Dehydrogenase 8 (DHB8_MOUSE) identifiziert werden. Dieses im Proteinspot am stärksten ausgeprägte Protein ist vermutlich am Aufbau von Fettsäuren in den Mitochondrien beteiligt, wurde bisher aber noch nicht als Phosphoprotein beschrieben. Mit dem Serin/Arginin-reichen Spleißfaktor 1 (SRSF1_MOUSE) und dem 26S Proteasom der nicht-ATPase regulierenden Untereinheit 9 (PSMD9_MOUSE) wurden aber auch 2 mögliche Phosphoproteine identifiziert. Die Funktion des SRSF1_MOUSE wird im Rahmen der Diskussion des Phosphoproteinspots 6 noch eingehend besprochen. Das PSMD9_MOUSE ist ein Chaperon. Chaperone sind Proteine die komplexe neu synthetisierte Protein unterstützen die richtige Faltstruktur einzunehmen (Buchner 2002). Hier wird der Zusammenbau des 26S Proteasom (Peptidase zum Abbau von Proteinen) unterstützt.

Dem Phosphoproteinspot 5 (~MW: 15 kDa, ~pI: 8,5) konnten 3 mögliche Phosphoproteine zugeordnet werden. Die Intensität des Proteinspots war in der PLC-Versuchstiergruppe signifikant heruntergeregelt. Durch die Behandlung mit MMF wurde die Phosphorylierung bei den MMF-Mäusen auf das Niveau der WT-Mäuse angehoben. Bei den korrespondierenden Proteinen handelt es sich um Destrin OS (DEST_MOUSE), 40S ribosomales Protein S14 (RS14_MOUSE) und die Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase A (PPIA_MOUSE). Das PPIA_MOUSE war innerhalb des Proteinspots am stärksten ausgeprägt. Es ist Bestandteil von Entzündungsprozessen und beschleunigt die Faltung von Proteinen sowie die Proteinsekretion (Sherry et al. 1992). In einer Studie an humanen Dickdarm-Krebszellen konnte vor kurzem gezeigt werden, dass DEST_MOUSE, vermutlich als Antwort auf ein pro-invasives neuroendokrines Peptid, zur Initiierung der Zellwanderung und Zellinvasion benötigt wird. Diese Fähigkeit stand im Zusammenhang mit einer Destrin-abhängigen Phosphorylierung eines p130Crk-verbundenen Substrats (p130Cas) bei der Zelladhäsion (Estornes et al. 2007). Die Familie der Cas-Proteine spielt eine sehr wichtige Rolle bei der Steuerung krebsabhängiger Signale. Dabei können Cas-Proteinen die Bildung von Metastasen und Medikamentenresistenzen fördern, die Krebsentwicklung beeinflussen sowie zur Entstehung von Herz- und Lungenerkrankungen beitragen (Nikonova et al. 2014). Das RS14_MOUSE konnte allerdings bei der Spektralanalyse nur in geringem Umfang

nachgewiesen werden. Es steuert die Translation (Synthese von Proteinen in den Zellen lebender Organismen) und spielt als Bestandteil des 40S Ribosoms (makromolekularer Proteinen-RNA-Komplex zur Herstellung von Proteinen) eine wichtige Rolle hinsichtlich Funktion und Aufbau der ribosomalen 40S Untereinheit (Rhoads und Roufa 1985).

Phosphoproteinspot 6 (~MW: 26 kDa, ~pI: 7,0) zeigte in der PLC-Versuchstiergruppe eine signifikante Erniedrigung der Phosphorylierung, welche bei den mit MMF behandelten Mäusen aufgehoben war. Dem Proteinspot konnten 2 mögliche Phosphoproteine zugeordnet werden. Dabei handelte es sich um das bereits im Phosphoproteinspot 4 identifizierte Serin/Arginin-reicher Spleißfaktor 1 (SRSF1_MOUSE) und das Omega-Amidase NIT2 (NIT2_MOUSE). Das bislang nicht als Phosphoprotein beschriebene NIT2_MOUSE wurde bei allen 3 Versuchstiergruppen als Hauptprotein identifiziert. Es kann vermutet werden, dass die Erhöhung der Phosphorylierung im Phosphoproteinspot 4 und die Erniedrigung im Phosphoproteinspot 6 in Verbindung mit dem SRSF1_MOUSE steht, da eine Erhöhung der Anzahl phosphorylierter Phosphorylierungstellen den isoelektrischen Punkt (pI) auf niedrigere Werte verschieben kann. SRSF1_MOUSE ist an der Steuerung des grundlegenden und alternativen Spleißens. beteiligt. In einer kürzlich veröffentlichten Übersichtsarbeit wurde erwähnt, dass SRSF1_MOUSE über verschiedenen Mechanismen die Transformation und das Wachstum eines Tumors fördert. Bspw. wird die mRNA des Anti-Apoptose-Faktors 21 stabilisiert und durch alternatives Spleißen inaktive Tumorsuppressor-Proteine erzeugt (Aksaas et al. 2011). Reversible Phosphorylierungskaskaden sind in der Lage Signale zügig durch eine Zelle zu leiten und spielen höchstwahrscheinlich eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung von extrazellulären Signalen an das Spleißosom (Stamm 2008). In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass die Expression von SRSF1 in T-Lymphozyten durch die Ubiquitinierung (reversible Bindung von Ubiquitin an Proteine und damit einhergehend Veränderung der Proteineigenschaften) gesteuert wird. Zudem wurde durch die Stimulation von T-Lymphozyten ein rascher und signifikanter Anstieg der SRSF1-mRNA induziert. Interessanterweise zeigten die T-Lymphozyten der an SLE erkrankten Patienten im Vergleich zu den T-Lymphozyten gesunder Patienten eine erhöhte Ubiquitinierung (Moulton et al. 2014).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Phosphoproteom-Untersuchung eine Reihe von Proteinen, die mit wichtigen Zelleigenschaften verbunden sind, identifizieren konnte. Die ermittelten Proteine spielen bei Zellausbuchtungen, Zellbeweglichkeit, Zellwanderung, Zellinvasion, Zellpolarität, Zelltransformation und Zellwachstum (T-, B-Lymphozyten und Fibroblasten) eine maßgebliche Rolle und können damit den Verlauf einer chronisch progredienten Niereninsuffizienz erheblich beeinflussen.

4.3.2 Veränderungen des Proteoms

Die Proteine des Nierengewebes wurden einer vergleichenden quantitativen Untersuchung unterzogen, um die MMF assoziierten Proteinexpressionsprofilveränderungen identifizieren zu können. Aufgrund der erforderlichen Signifikanz-Unterschiede zwischen den Versuchstiergruppen (signifikante Veränderung zwischen WT- und PLC- bei nicht signifikanter Veränderung zwischen WT- und MMF-Mäusen) konnten 4 Proteine mit unterschiedlicher Proteingesamtmenge identifiziert werden (siehe Kap. 3.4.2).

Die Intensität der 4 identifizierten Proteinspots war in der COL4A3-defizienten PLC-Versuchstiergruppe im Vergleich zu den WT-Mäusen immer signifikant erniedrigt. Zugleich war die Intensität zwischen den COL4A3-defizienten MMF- und WT-Versuchstieren nicht signifikant erniedrigt.

Dem Silberproteinspot 1 (~MW: 26 kDa, ~pI: 9) konnten mithilfe der UniProt/SwissProt-Datenbank 3 korrespondierende Proteine zugeordnet werden. Als Hauptprotein wurde dabei allen 3 Versuchstiergruppen die mitochondriale GTP:AMP Phosphotransferase AK3 (KAD3_MOUSE) zugeordnet. Dieses Enzym befindet sich in der mitochondrialen Matrix und ist an der Homöostase (Gleichgewichtszustand eines offenen dynamischen Systems) zellulärer Nukleotide beteiligt, indem es die Interkonversion von Nucleosidphosphaten katalysiert. Bspw. konnte im Parasit und Malariaerreger *Plasmodium falciparum* eine verstärkte KAD3_MOUSE-Aktivität zur Bewältigung des hohen Energiebedarfs nachgewiesen werden (Ulschmid et al. 2004). Andererseits konnte aber in einer anderen Studie gezeigt werden, dass Hefen auf dieses mitochondriale Enzym auch komplett verzichten können (Schricker et al. 1995). Die Dehydrogenase/Reduktase SDR (DHRS4_MOUSE) wurde ebenfalls im Silberproteinspot 1 identifiziert. Diese Oxidoreduktase (Katalyse von Redoxreaktionen) ist an diversen Abbauprozessen, bspw. von Alkohol, Keton aber auch der Netzhaut beteiligt. Beim dritten nachgewiesenen Protein handelte es sich um das Protein NipSnap homolog (NIPS1_MOUSE). NIPS1_MOUSE wurde bisher nur im zentralen Nervensystem nachgewiesen (Nautiyal et al. 2010). Offensichtlich fungiert es als Neurotransmitterbindung und ist an der sensorischen Schmerzwahrnehmung beteiligt. Es scheint hierbei jedoch kein Zusammenhang mit der Entstehung einer chronisch progredienten Niereninsuffizienz und Nierenfibrose zu bestehen.

Im Silberproteinspot 2 (~MW: 40 kDa, ~pI: 8,0) und Silberproteinspot 4 (~MW: 40 kDa, ~pI: 8,0) wurden jeweils identische Proteine identifiziert. Da sich die beiden Proteinspots auf dem 2DE-Polyacrylamidgel direkt nebeneinander befanden (siehe Kap. 3.4.2) wurde das Protein offensichtlich nicht optimal fokussiert oder das Protein unterlag einer posttranslationalen

Modifikation. Es handelte sich dabei um die peroxisomale Acyl-Coenzym A Oxidase (ACOX1_MOUSE) des Fettsäurenstoffwechsels. ACOX1_MOUSE ist in den Peroxisomen lokalisiert und katalysiert dort den Fettsäurenabbau (Beta-Oxidation). In einer vor kurzem veröffentlichten Studie wurde herausgefunden, dass vermutlich ein direkter Zusammenhang zwischen verminderter Peroxisomen-Aktivität und der Entstehung sowie Progression von Lungenfibrose besteht. Wahrscheinlich führt die verminderte Aktivität zu einer exazerbierenden Lungenentzündung und verstärkt die fibrotische Antwort. Zudem wurde die Aktivität von Peroxisomen in mit TGF- β und TNF- α behandelten Fibroblasten über den AP-1-Signalweg herunterregelt (Oruqaj et al. 2015). In einer tierexperimentellen Studie an Ratten mit Steatosis hepatis konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Rosuvastatin nicht nur zum Rückgang der Fettleber führte, sondern über eine gesteigerte Peroxisomen-Aktivität auch eine Verbesserung der Leberschädigung und -fibrose bewirkte (Okada et al. 2013).

Die Acyl-CoA Dehydrogenase (ACD10_MOUSE) war das einzige identifizierte Protein im Silberproteinspot 3. ACD10_MOUSE ist eine Oxidoreduktase im Fettsäurenstoffwechsel und katalysiert den Anfangsschritt beim Abbau von Fettsäuren (Beta-Oxidation) im Mitochondrium. In einer kürzlich veröffentlichten *in vivo* Studie an PPAR- α -defizienten Mäusen konnte ein Zusammenhang zwischen dem Vorkommen freier Fettsäuren und der Entstehung einer Proteinurie assoziierten tubulären Toxizität hergestellt werden (Kamijo et al. 2007). Eine unzureichende Beta-Oxidation initiiert eine gestörte Fettsäuren-Homöostase und Kumulation freier Fettsäuren. Der Überschuss unverarbeiteter freier Fettsäuren führte in den Nieren der Versuchstiere zu pathologischen Veränderungen proximaler Tubuluszellen, einer fortschreitenden Entzündung, vermehrtem oxidativen Stress und einer erhöhten Apoptoserate (Kees-Folts et al. 1994; Nishi et al. 2013).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die mittels Proteom-Analyse erfassten Proteine an essentiellen Zellprozessen beteiligt sind. Sie beeinflussen die Homöostase von Nukleotiden im Mitochondrium, verschiedene Abbauprozesse und den Fettsäure-Stoffwechsel, insbesondere den Fettsäurenabbau (Beta-Oxidation). Im Rahmen der Proteinspotanalyse zeigte sich, dass die angeführten Abbauprozesse bei den PLC- im Vergleich zu den MMF-Versuchstieren deutlich stärker ausgeprägt waren und somit eine erheblich stärker ausgeprägte katabole Stoffwechsellage implizieren. Infolgedessen haben sie auf den Verlauf einer chronisch progredienten Niereninsuffizienz ebenfalls einen erheblichen Einfluss.

4.4 MMF als therapeutische Option bei chronischer Niereninsuffizienz

Aus dem Gewichtsverlauf der Versuchstiere während der 14-tägigen Behandlungsphase kann indirekt abgeleitet werden, dass die Behandlung mit MMF einen zwar geringfügigen aber positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf der chronischen Niereninsuffizienz hatte. Die PLC-Mäuse verloren während der zweiwöchigen Behandlung im Durchschnitt 14% ihres Körpergewichts. Im gleichen Zeitraum nahm das durchschnittliche Ausgangsgewicht der MMF-Versuchstiere nur um 10% ab. Die progrediente Verschlechterung des Allgemeinzustands mit Aktivitäts- und Vigilanzminderung war in der MMF-Versuchstiergruppe überdies zumindest nach subjektiver Beurteilung schwächer ausgeprägt. Somit können der Gewichtsverlauf und die Entwicklung des Allgemeinzustands unter MMF-Therapie als erstes Anzeichen einer moderat verbesserten Nierenfunktion gewertet werden.

Im Gegensatz zu anderen Tierarten sind Mäuse äußerst unempfindlich gegenüber MMF (Heller et al. 2008). Im Rahmen dieser Arbeit wurde den Versuchstieren der MMF-Gruppe 100 mg/kg/d des Wirkstoffs verabreicht. Daraus ergaben sich MPA-Spiegel zwischen 20 und 40 mg/l und MPAG-Konzentrationen zwischen 9 und 26 mg/l. Im Vergleich dazu bekommen Menschen nach einer Nierentransplantation täglich zwischen 1,0 g und 1,5 g MMF verabreicht (Chen und Chen 2014). Der daraus resultierende therapeutische Bereich (Talspiegel) ist deutlich niedriger und liegt bei einer MPA-Konzentration zwischen 1,3 und 3,5 mg/l bzw. 1,9 und 4,0 mg/l, je nach Komedikation mit Cyclosporin oder Tacrolimus (Shaw et al. 2001; van Gelder et al. 2006). Diese Talspiegel-Referenzbereiche gelten bei Nierentransplantationen. Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten MPA- und MPAG-Talspiegel sind mit den Werten aus der Vorgängerstudie vergleich- und vereinbar (Brehmer 2011). Da die Wirkung der MMF-Behandlung erneut nicht im gewünschten Ausmaß erreicht wurde und bei den Versuchstieren keinerlei medikamentenassoziierte Nebenwirkungen auftraten, sollte man in einer zukünftigen Arbeit nochmals die Möglichkeit einer Dosiserhöhung in Betracht ziehen.

Bei den mit MMF behandelten Alport-Mäusen war im Vergleich zu den PLC-Versuchstieren eine verbesserte Nierenfunktion erkennbar. Dies zeigte sich vor allem an den signifikant erniedrigten Harnstoff-N-, erniedrigten Kreatinin-Konzentrationen sowie einer in den H.E.-gefärbten Nierenschnittpräparaten tendenziell geringer ausgeprägten tubulointerstitiellen Fibrose. Nichts desto trotz lagen die therapieassoziierten Veränderungen deutlich hinter den prognostizierten und erwarteten Auswirkungen der MMF-Therapie zurück. Die chronisch progrediente Niereninsuffizienz im Rahmen eines Alportsyndroms ist nicht angeboren, sondern entwickelt sich erst im Laufe der Zeit aufgrund COL4A3-defizienter Kollagenstrukturen. Ursprünglich liegen die Basalmembranen in ihrer embryonalen

Kollagenstruktur ($\alpha1/\alpha1/\alpha2$ (IV)) vor und modifizieren sich erst später zur adulten Form ($\alpha3/\alpha5/\alpha5$ (IV)) (Kalluri et al. 1997; Abrahamson et al. 2003). Demzufolge bietet erst die adulte pathologische Kollagenstruktur die Grundlage zur Entwicklung einer chronisch progredienten Niereninsuffizienz (Kruegel et al. 2013). Zudem konnte in einer anderen Studie an Alport-Mäusen gezeigt werden, dass ein früher Behandlungsbeginn (4. Lebenswoche) mit Ramipril den Progress der interstitiellen Fibrose und Proteinurie im Gegensatz zu einem späten Behandlungsbeginn (7. Lebenswoche) begrenzen konnte (Gross et al. 2003). Offensichtlich sinken die Erfolgsaussichten einer antifibrotischen Therapie bei einem spät terminierten Behandlungsbeginn aufgrund des fortgeschrittenen Nierenschadens. Daher sollte erwogen werden, die antifibrotische Therapie mit MMF in diesem Tiermodell bereits bei noch bestehender embryonaler Kollagenstruktur zu beginnen.

Desweiteren gibt es mittlerweile auch Hinweise, dass neben den Zellen des lymphatischen Systems auch nicht-lymphatische Zellen, wie bspw. Fibroblasten durch MPA beeinflusst werden. Die Expression und Synthese der antifibrotisch wirkenden interstitiellen Kollagenase (Matrix-Metallo-Proteinase-1) wird durch MMF verbessert. Desweiteren wird durch MMF auch das Vermögen von Fibroblasten ungeladene Kollagenetze zu kontrahieren vermindert, die Beweglichkeit von Fibroblasten herabgesetzt und die Synthese von α -smooth muscle actin, einem Marker des kontraktiven Myofibroblasten-Phänotyps, verringert. Das α -smooth muscle actin induziert eine Verdickung der Tunica Intima und spielt damit offenbar eine Rolle bei der Organabstossung nach Transplantation. Die Eigenschaften von MMF trugen dazu bei, die Entwicklung einer Fibrose im Rahmen von *Graft-versus-Host* Reaktionen (Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion) oder systemischer Sklerose einzuschränken. (Roos et al. 2007). In einem Tierversuch an herztransplantierten Ratten konnte zudem gezeigt werden, dass die Fibroblasten-Proliferation unter MMF-Applikation nahezu zum Erliegen gebracht werden konnte (Johnsson et al. 2004). Zudem zeigte eine retrospektive Kohortenstudie an Patienten nach Nierentransplantation, dass neben den immunsupprimierenden auch die antifibrotischen Eigenschaften von MMF einen positiven Einfluss auf den Progress einer chronischen Transplantatdysfunktion haben. Eine höhere MMF-Dosierung führt zu einem langsameren Fortschreiten der interstitiellen Fibrose und tubulären Atrophie (Mihovilović et al. 2014). Die im Einzelnen zugrunde liegenden Mechanismen konnten bisher aber noch nicht aufgeklärt werden.

Der TGF- β -Signalweg wurde bereits in einer vorhergehenden Arbeit als spezifischer Angriffspunkt zur Unterdrückung und/oder Modulation des Fibroseprozesses identifiziert (Brehmer 2011). Das als profibrotische Antigen fungierende TGF β 1 spielt offensichtlich bei der Entstehung einer Fibrose eine wichtige Rolle (Zeisberg et al. 2001). Bspw. konnte mithilfe eines Cyclosporin induzierten chronischen Nephrotoxizitätsmodell an Ratten gezeigt

werden, dass MMF die Synthese von TGF β 1 reduziert (Shihab et al. 2003). Bei der Untersuchung des Phosphoproteoms identifizierten wir das HSP7C_MOUSE als Protein, dessen Phosphorylierung in der PLC-Versuchstiergruppe signifikant heraufgeregt war. Es inhibiert die Smad-Protein gesteuerte Transkription, die unter anderem auch für die Umsetzung von Signalwegen der TGF- β -Familie verantwortlich ist. Durch die MMF-Behandlung konnten die COL4A3-Defizienz assoziierten Veränderungen der Proteinphosphorylierung wieder rückgängig gemacht werden. Welche Auswirkungen aus einer veränderten Phosphorylierung folgen kann noch nicht prognostiziert werden, da es sich bei den Signalwegen der TGF- β -Familie um sehr komplexe und bisher noch nicht vollständig verstandene Steuerungsvorgänge handelt (Macias et al. 2015).

ACE-Hemmer, AT-1-Antagonisten, Paricalcitol (biologisch aktives Vitamin-D-Analogon), Aldosteron-Antagonisten, Statine und Renin-Antagonisten werden derzeit erfolgreich zur Hemmung Alport-Syndrom assoziierter Veränderungen eingesetzt (Gross et al. 2014). Daher sollte bei einer zukünftigen Arbeit in Betracht gezogen werden die antifibrotische Wirkung von MMF, im Rahmen einer Kombinationstherapie mit einem dieser Medikamente, zu verstärken. Durch die additiven und synergistischen Effekte besteht die Möglichkeit das Fortschreiten chronisch progredienter Nierenerkrankungen zukünftig zum Erliegen zu bringen. Eine Kombination synergistisch wirkender Medikamente, die zu einem besseren therapeutischen Effekt bei gleichzeitiger Reduktion bzw. Diversifizierung der Nebenwirkungen führen, wird bspw. im Rahmen der medikamentösen Verhinderung einer Abstoßungsreaktion oder bei medikamentöser Chemotherapie erfolgreich eingesetzt. Einen ersten Anhalt für die Effektivität und Effizienz einer Kombinationstherapie gibt die tierexperimentelle Studie von Rubel et alii (2014). Die Alport-Mäuse wurden gleichzeitig mit dem ACE-Hemmer Ramipril sowie dem Vitamin-D-Analog Paricalcitol behandelt. Wie bereits oben besprochen führt die alleinige Behandlung mit Ramipril zu einer Überlebenszeitverlängerung von ca. 50%. Durch die simultane Paricalcitol-Behandlung wurde die Überlebenszeit bei verbesserter Nierenfunktion um weitere 18% verlängert. Die Akkumulation der Extrazellulärmatrix und Vernarbung der Niere verminderte sich ebenfalls (Rubel et al. 2014). Demzufolge wäre es sicherlich eine interessante Option diese nachgewiesenen wirksamen Kombinationstherapie durch das immunmodulatorische MMF zu erweitern. Bereits in früheren tierexperimentellen Untersuchungen an Ratten konnte für Kombinationstherapien mit MMF ein positiver Effekt postuliert werden (Remuzzi et al. 1999; Fujihara et al. 2000; Liu et al. 2009).

Durch die MMF-Behandlung konnten COL4A3-Defizienz assoziierte Veränderungen der Proteinphosphorylierung und damit einhergehende Modifikationen des Phosphoproteoms bestimmter Kandidatenproteinen rückgängig gemacht werden (siehe Kap. 4.3.1). Als

Kandidatenproteine wurden dabei die Phosphoproteine ARCP3_MOUSE, ALBU_MOUSE, ADSV_MOUSE, HSP7C_MOUSE, PLST_MOUSE, DHE3_MOUSE, ATPA_MOUSE, CATA_MOUSE, SRSF1_MOUSE, PSMD9_MOUSE, DEST_MOUSE, RS14_MOUSE und PPIA_MOUSE identifiziert. Die MMF-Behandlung hatte auf die quantitative Expression von Proteinen des Nierengewebes ebenfalls Auswirkungen. Die Proteingesamtmengen identifizierter Kandidatenproteine waren in der unbehandelten PLC-Versuchstiergruppe jeweils stark erniedrigt. Durch die Behandlung mit MMF konnte diese Entwicklung nahezu rückgängig gemacht werden (siehe Kap. 4.3.2). In diesem Zusammenhang wurden die quantitativ veränderten Nierenproteine KAD3_MOUSE, DHRS4_MOUSE, ACOX1_MOUSE, ACD10_MOUSE als mögliche Kandidatenproteine identifiziert. Welche spezifische Rolle die mittels Phospho- und Silberfärbung identifizierten Proteine bei der Entwicklung einer chronisch progredienten Niereninsuffizienz spielen, sollte daher Bestandteil weiterführender Studien sein.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die potentiell antifibrotischen und/oder nephroprotektiven Effekte der Behandlung mit Mycophenolat-Mofetil (MMF) an COL4A3-defizienten Mäusen hinsichtlich der Nierenfunktion, quantitativer Veränderung von Nierenproteinen und deren Phosphorylierungsstatus untersucht. Die Untersuchungen erfolgten *in vivo* an einem nicht-hypertensiven Tiermodell für die autosomal-rezessive Form des Alport Syndroms.

Die im Zusammenhang mit dieser Arbeit erhobenen Daten bestätigen, dass MMF die Fähigkeit besitzt, eine moderate Verbesserung der Nierenfunktion zu bewirken. Dabei wird die Nierenfunktion vermutlich durch eine Hemmung der tubulointerstitiellen Fibrose verbessert.

Die COL4A3-defizienten Versuchstiere wurden ab der 6. Lebenswoche einer 14-tägigen gewichtsadaptierten Behandlungsphase mit MMF (100 mg/kg/d) unterzogen. Darunter kam es zu einer deutlichen Verbesserung der Nierenretentionsparameter (signifikante Veränderung der Harnstoff-N-Konzentration). Der Zentralwert (= Median) der Harnstoff-N-Konzentration konnte im Vergleich zu den unbehandelten COL4A3-defizienten Mäusen um nahezu 25%, die 25% Perzentile um annähernd 20% und die 75% Perzentile um fast 35% gesenkt werden. In der MMF-Versuchstiergruppe wurden darüber hinaus auch diskret erniedrigte Kreatinin-Konzentrationen festgestellt, und die Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Nierenschnittpräparate zeigten eine tendenziell geringer ausgeprägte tubulointerstitielle Fibrose.

In dem vorliegenden Tiermodell einer progredienten renalen Fibrose wurden die Auswirkungen einer MMF-Behandlung auf das Proteom und den Phosphorylierungsstatus von Proteinen untersucht. Dabei wurde der auf einer COL4A3-Defizienz beruhende veränderte Phosphorylierungsstatus bestimmter Nierenproteine rückgängig gemacht. Desweiteren wurde die exprimierte Gesamtmenge einzelner Nierenproteine auf das Niveau der exprimierten Proteing Gesamtmenge in gesunden Wildtyp-Mäusen angehoben.

Dabei sind die beteiligten Phosphoproteine mit einer Reihe von wichtigen Zelleigenschaften verbunden. Sie spielen bei Zellausbuchtungen, Zellbeweglichkeit, Zellwanderung, Zellinvasion, Zellpolarität, Zelltransformation und Zellwachstum (T-, B-Lymphozyten und Fibroblasten) eine maßgebliche Rolle.

Die hinsichtlich ihrer Gesamtmenge beeinflussten Proteine sind an der Homöostase von Nukleotiden, Abbauprozessen und dem Fettsäurenstoffwechsel, insbesondere dem Fettsäurenabbau (Beta-Oxidation) beteiligt.

Die gewonnenen Untersuchungsergebnisse stehen im Einklang mit den Resultaten aus *In-vitro-Untersuchungen* an humanen HK-2 Epithelzellen der proximalen Tubuli (Koch et al. 2012) und COS-7 Fibroblasten aus Affennieren (Petrova et al. 2010).

Die chronisch progrediente Niereninsuffizienz sowie die damit einhergehende Nierenfibrose COL4A3-defizienter Mäuse konnte durch die MMF-Behandlung nicht oder nur unvollständig beeinflusst werden. Die zugrunde liegenden Ursachen sind vermutlich multifaktoriell. Es sollte daher kritisch hinterfragt werden, welchen Einfluss der späte Behandlungsbeginn, die kurze Behandlungsdauer und die applizierte Wirkstoffdosis auf das unzureichende Behandlungsergebnis hatten. Unter Umständen ist auch eine Kombinationstherapie mit einem anderen antifibrotisch wirksamen Medikament ein erfolgsversprechendes Vorgehen.

Weiterführende Studien sind erforderlich, um die bisher gewonnenen Erkenntnisse weiter auszubauen und noch unerforschte Zusammenhänge zu beleuchten. Dabei sollte versucht werden, die mithilfe der Proteomanalyse und Untersuchung des Phosphorylierungsstatus ermittelten Nierenproteine in einer zukünftigen Studie zu bestätigen und ihre Funktionen im Rahmen von Signalwegen bestimmter Wachstumsfaktoren (Arp2/3 Komplex, Katalase, Serin/Arginin-reicher Spleißfaktor) weiter zu entschlüsseln.

6. Anhang

6.1 Publikationsliste

Petrova DT, Schultze FC, Brandhorst G, **Luchs K-D**, Lenz C, Urlaub H, Rubel D, Gross O, Walson PD, Oellerich M (2014): Effects of mycophenolate mofetil on kidney function and phosphorylation status of renal proteins in Alport COL4A3-deficient mice. *Proteome Sci* 12, 56 8 (Full Text paper)

Petrova DT, **Luchs K-D**, Schultze FC, Alwahsh SM, Rubel D, Gross O, Oellerich M, Brandhorst G (2012): Nierenfunktion und histopathologische Unterschiede in Alportmäusen hervorgerufen durch Mycophenolatmofetil. P007, DGKL 2012, 9. Jahrestagung, 26.-29. September 2012, Congress Center Rosengarten, Mannheim. *Clin Chem Lab Med*; 50(9):A227-A228 (Abstract)

7. Literaturverzeichnis

- Abrahamson DR, Prettyman AC, Robert B, St John PL (2003): Laminin-1 reexpression in Alport mouse glomerular basement membranes. *Kidney Int* 63, 826–834
- Akiyama K, Morita H, Suetsugu S, Kuraba S, Numata Y, Yamamoto Y, Inui K, Ideura T, Wakisaka N, Nakano K, et al. (2008): Actin -related protein 3 (Arp3) is mutated in proteinuric BUF/Mna rats. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc* 19, 41–50
- Aksaas AK, Eikvar S, Akusjärvi G, Skålhegg BS, Kvissel AK (2011): Protein kinase a-dependent phosphorylation of serine 119 in the proto-oncogenic serine/arginine-rich splicing factor 1 modulates its activity as a splicing enhancer protein. *Genes Cancer* 2, 841–851
- Allison AC, Eugui EM (2000): Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology* 47, 85–118
- Allison AC, Hovi T, Watts RW, Webster AD (1975): Immunological observations on patients with Lesch-Nyhan syndrome, and on the role of de-novo purine synthesis in lymphocyte transformation. *Lancet* 2, 1179–1183
- Allison AC, Kowalski WJ, Muller CJ, Waters RV, Eugui EM (1993): Mycophenolic acid and brequinar, inhibitors of purine and pyrimidine synthesis, block the glycosylation of adhesion molecules. *Transplant Proc* 25, 67–70
- Alport AC (1927): HEREDITARY FAMILIAL CONGENITAL HAEMORRHAGIC NEPHRITIS. *Br Med J* 1, 504–506
- Arastéh K (Hrsg.): Innere Medizin: 643 Tabellen. (Duale Reihe). 2., vollst. überarb. und erw. Auflage; Thieme, Stuttgart 2009
- Baer PC, Wegner B, Geiger H (2004): Effects of mycophenolic acid on IL-6 expression of human renal proximal and distal tubular cells in vitro. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc* 19, 47–52
- Bakris GL, Ritz E, World Kidney Day Steering Committee (2009): The message for World Kidney Day 2009: Hypertension and kidney disease: a marriage that should be prevented. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc* 24, 695–697
- Bechtel W, Zeisberg M (2009): Twist: a new link from hypoxia to fibrosis. *Kidney Int* 75, 1255–1256
- Blahna MT, Hata A (2012): Smad-mediated regulation of microRNA biosynthesis. *FEBS Lett* 586, 1906–1912
- Blum H, Beier H, Gross HJ (1987): Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93–99
- Boguski MS, McIntosh MW (2003): Biomedical informatics for proteomics. *Nature* 422, 233–237
- Boor P, Sebeková K, Ostendorf T, Floege J (2007): Treatment targets in renal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc* 22, 3391–3407

- Boor P, Ostendorf T, Floege J (2010): Renal fibrosis: novel insights into mechanisms and therapeutic targets. *Nat Rev Nephrol* 6, 643–656
- Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248–254
- Brandhorst G, Streit F, Goetze S, Oellerich M, Armstrong VW (2006): Quantification by liquid chromatography tandem mass spectrometry of mycophenolic acid and its phenol and acyl glucuronide metabolites. *Clin Chem* 52, 1962–1964
- Brandhorst G, Brehmer F, Petrova DT, Gross O, Miosge N, Armstrong VW, Oellerich M (2010): Mycophenolic acid predose concentrations and renal function in a mouse model for progressive renal fibrosis. *Ther Drug Monit* 32, 73–78
- Brehmer F: Der Einfluss von Mycophenolat-Mofetil (MMF) auf die renale Fibrogenese: Bedeutung für neue therapeutische Ansätze. Med. Diss. Göttingen 2011
- Buchner J (2002): Introduction: the cellular protein folding machinery. *Cell Mol Life Sci CMLS* 59, 1587–1588
- Chen H, Chen B (2014): Clinical mycophenolic acid monitoring in liver transplant recipients. *World J Gastroenterol WJG* 20, 10715–10728
- Choe LH, Lee KH (2003): Quantitative and qualitative measure of intralaboratory two-dimensional protein gel reproducibility and the effects of sample preparation, sample load, and image analysis. *Electrophoresis* 24, 3500–3507
- Choi C-H, Thomason PA, Zaki M, Insall RH, Barber DL (2013): Phosphorylation of actin-related protein 2 (Arp2) is required for normal development and cAMP chemotaxis in *Dictyostelium*. *J Biol Chem* 288, 2464–2474
- Chomczynski P, Sacchi N (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156–159
- Cohn RG, Mirkovich A, Dunlap B, Burton P, Chiu SH, Eugui E, Caulfield JP (1999): Mycophenolic acid increases apoptosis, lysosomes and lipid droplets in human lymphoid and monocytic cell lines. *Transplantation* 68, 411–418
- Compton SJ, Jones CG (1985): Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem* 151, 369–374
- Copeland JWGV, Beaumont BW, Merrilees MJ, Pilmore HL (2007): Epithelial-to-mesenchymal transition of human proximal tubular epithelial cells: effects of rapamycin, mycophenolate, cyclosporin, azathioprine, and methylprednisolone. *Transplantation* 83, 809–814
- Cosgrove D, Meehan DT, Grunkemeyer JA, Kornak JM, Sayers R, Hunter WJ, Samuelson GC (1996): Collagen COL4A3 knockout: a mouse model for autosomal Alport syndrome. *Genes Dev* 10, 2981–2992
- Csibi A, Fendt S-M, Li C, Poulogiannis G, Choo AY, Chapski DJ, Jeong SM, Dempsey JM, Parkhitko A, Morrison T, et al. (2013): The mTORC1 pathway stimulates glutamine metabolism and cell proliferation by repressing SIRT4. *Cell* 153, 840–854

- Delanote V, Vandekerckhove J, Gettemans J (2005): Plastins: versatile modulators of actin organization in (patho)physiological cellular processes. *Acta Pharmacol Sin* 26, 769–779
- Deutsche Gesellschaft für Nephrologie.
<http://www.dgfn.eu/presse/downloadbereich/dialyse.html>; Zugriff am 27.04.2015
- Dong S, Geng L, Shen M-D, Zheng S-S (2015): Natural Killer Cell Activating Receptor NKG2D Is Involved in the Immunosuppressive Effects of Mycophenolate Mofetil and Hepatitis B Virus Infection. *Am J Med Sci* 349, 432–437
- DuBose TD (2007): American Society of Nephrology Presidential Address 2006: chronic kidney disease as a public health threat--new strategy for a growing problem. *J Am Soc Nephrol JASN* 18, 1038–1045
- Dubus I, L'Azou B, Gordien M, Delmas Y, Labouyrie J-P, Bonnet J, Combe C (2003): Cytoskeletal reorganization by mycophenolic acid alters mesangial cell migration and contractility. *Hypertension* 42, 956–961
- Duffield JS, Humphreys BD (2011): Origin of new cells in the adult kidney: results from genetic labeling techniques. *Kidney Int* 79, 494–501
- Eddy AA (1996): Molecular insights into renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol JASN* 7, 2495–2508
- Eddy AA (2014): Overview of the cellular and molecular basis of kidney fibrosis. *Kidney Int Suppl* 4, 2–8
- Epinette WW, Parker CM, Jones EL, Greist MC (1987): Mycophenolic acid for psoriasis. A review of pharmacology, long-term efficacy, and safety. *J Am Acad Dermatol* 17, 962–971
- Estornes Y, Gay F, Gevrey J-C, Navoizat S, Nejjari M, Scoazec J-Y, Chayvialle J-A, Saurin J-C, Abello J (2007): Differential involvement of destrin and cofilin-1 in the control of invasive properties of Isreco1 human colon cancer cells. *Int J Cancer J Int Cancer* 121, 2162–2171
- Eugui EM (2002): Fibrogenesis in chronic allograft rejection: underlying mechanisms and pharmacological control. *Transplant Proc* 34, 2867–2871
- Fachinformation (2014): MYCOPHENOLAT MOFETIL ACCORD 250 mg.
- Faulkner JL, Szykalski LM, Springer F, Barnes JL (2005): Origin of interstitial fibroblasts in an accelerated model of angiotensin II-induced renal fibrosis. *Am J Pathol* 167, 1193–1205
- Filler G, Buffo I (2007): Safety considerations with mycophenolate sodium. *Expert Opin Drug Saf* 6, 445–449
- Fragiadaki M, Mason RM (2011): Epithelial-mesenchymal transition in renal fibrosis - evidence for and against. *Int J Exp Pathol* 92, 143–150
- Fujihara CK, Noronha IDL, Malheiros, Antunes GR, de Oliveira IB, Zatz R (2000): Combined mycophenolate mofetil and losartan therapy arrests established injury in the remnant kidney. *J Am Soc Nephrol JASN* 11, 283–290

- Gensburger O, Picard N, Marquet P (2009): Effect of mycophenolate acyl-glucuronide on human recombinant type 2 inosine monophosphate dehydrogenase. *Clin Chem* 55, 986–993
- Ginzler EM, Dooley MA, Aranow C, Kim MY, Buyon J, Merrill JT, Petri M, Gilkeson GS, Wallace DJ, Weisman MH, Appel GB (2005): Mycophenolate mofetil or intravenous cyclophosphamide for lupus nephritis. *N Engl J Med* 353, 2219–2228
- Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W (2000): The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21, 1037–1053
- Gross O, Weber M (2005): [From the molecular genetics of Alport's syndrome to principles of organo-protection in chronic renal diseases]. *Med Klin Munich Ger* 1983 100, 826–831
- Gross O, Beirowski B, Koepke M-L, Kuck J, Reiner M, Addicks K, Smyth N, Schulze-Lohoff E, Weber M (2003): Preemptive ramipril therapy delays renal failure and reduces renal fibrosis in COL4A3-knockout mice with Alport syndrome. *Kidney Int* 63, 438–446
- Gross O, Schulze-Lohoff E, Koepke M-L, Beirowski B, Addicks K, Bloch W, Smyth N, Weber M (2004): Antifibrotic, nephroprotective potential of ACE inhibitor vs AT1 antagonist in a murine model of renal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc* 19, 1716–1723
- Gross O, Girgert R, Beirowski B, Kretzler M, Kang HG, Kruegel J, Miosge N, Busse A-C, Segerer S, Vogel WF et al. (2010): Loss of collagen-receptor DDR1 delays renal fibrosis in hereditary type IV collagen disease. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol* 29, 346–356
- Gross O, Perin L, Deltas C (2014): Alport syndrome from bench to bedside: the potential of current treatment beyond RAAS blockade and the horizon of future therapies. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc* 29 Suppl 4, iv124–130
- Gupta S, Clarkson MR, Duggan J, Brady HR (2000): Connective tissue growth factor: potential role in glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis. *Kidney Int* 58, 1389–1399
- Gygi SP, Corthals GL, Zhang Y, Rochon Y, Aebersold R (2000): Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9390–9395
- Hallbach J: *Klinische Chemie und Hämatologie: biomedizinische Analytik für MTLA und Studium*; 154 Tabellen; [Lösungen online!]. 3., überarb. Auflage; Thieme, Stuttgart 2011
- Heemann U, Azuma H, Hamar P, Schmid C, Tilney N, Philipp T (1996): Mycophenolate mofetil inhibits lymphocyte binding and the upregulation of adhesion molecules in acute rejection of rat kidney allografts. *Transpl Immunol* 4, 64–67
- Heidet L, Gubler M-C (2009): The renal lesions of Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol JASN* 20, 1210–1215

- Heikkilä P, Tryggvason K, Thorner P (2000): Animal models of Alport syndrome: advancing the prospects for effective human gene therapy. *Exp Nephrol* 8, 1–7
- Heller T, Geide A, Bonitz U, Wegner U, Gröne H-J, Armstrong VW, Oellerich M (2008): Effect of the antioxidant idebenone on adverse events under mycophenolate mofetil therapy in a rat model. *Transplantation* 85, 739–747
- Hodgkins KS, Schnaper HW (2012): Tubulointerstitial injury and the progression of chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol Berl Ger* 27, 901–909
- Huber LA (2003): Is proteomics heading in the wrong direction? *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 74–80
- Hübner M.
http://www.aerztezeitung.de/politik_gesellschaft/versorgungsforschung/article/858107/zukunftsvision-dialysen-eigenen-vier-waenden.html; Zugriff am 28.04.2015
- Hudson BG, Tryggvason K, Sundaramoorthy M, Neilson EG (2003): Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. *N Engl J Med* 348, 2543–2556
- Hunter T (2000): Signaling--2000 and beyond. *Cell* 100, 113–127
- Johnsson C, Gerdin B, Tufveson G (2004): Effects of commonly used immunosuppressants on graft-derived fibroblasts. *Clin Exp Immunol* 136, 405–412
- Kalluri R, Zeisberg M (2006): Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 392–401
- Kalluri R, Shield CF, Todd P, Hudson BG, Neilson EG (1997): Isoform switching of type IV collagen is developmentally arrested in X-linked Alport syndrome leading to increased susceptibility of renal basement membranes to endoproteolysis. *J Clin Invest* 99, 2470–2478
- Kamijo Y, Hora K, Kono K, Takahashi K, Higuchi M, Ehara T, Kiyosawa K, Shigematsu H, Gonzalez FJ, Aoyama T (2007): PPARalpha protects proximal tubular cells from acute fatty acid toxicity. *J Am Soc Nephrol JASN* 18, 3089–3100
- Kaminska D, Tyran B, Mazanowska O, Letachowicz W, Kochman A, Rabczynski J, Szyber P, Patrzalek D, Chudoba P, Klinger M (2005): Mycophenolate mofetil but not the type of calcineurin inhibitor (cyclosporine vs tacrolimus) influences the intragraft mRNA expression of cytokines in human kidney allograft biopsies by in situ RT-PCR analysis. *Transplant Proc* 37, 770–772
- Kaneko JJ: *Clinical biochemistry of domestic animals*. Academic Press, New York 1980
- Karow T, Lang-Roth R: *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 23. Auflage; Thomas Karow, Köln 2014
- Kashtan CE (2004): Familial hematuria due to type IV collagen mutations: Alport syndrome and thin basement membrane nephropathy. *Curr Opin Pediatr* 16, 177–181
- Kees-Folts D, Sadow JL, Schreiner GF (1994): Tubular catabolism of albumin is associated with the release of an inflammatory lipid. *Kidney Int* 45, 1697–1709
- Khoshnoodi J, Pedchenko V, Hudson BG (2008): Mammalian collagen IV. *Microsc Res Tech* 71, 357–370

- Koch C, Petrova DT, Eberle C, Schultze F, Brandhorst G, Oellerich M: The functional effect of mycophenolic acid on renal renal fibrosis in vitro; in: Clin Chem Lab Med 2012, Band 50:A205-A270. P06; Mannheim 2012
- Koepke M-L, Weber M, Schulze-Lohoff E, Beirowski B, Segerer S, Gross O (2007): Nephroprotective effect of the HMG-CoA-reductase inhibitor cerivastatin in a mouse model of progressive renal fibrosis in Alport syndrome. Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc 22, 1062–1069
- Kruegel J, Rubel D, Gross O (2013): Alport syndrome--insights from basic and clinical research. Nat Rev Nephrol 9, 170–178
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680–685
- Lamb EJ, Levey AS, Stevens PE (2013): The Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) guideline update for chronic kidney disease: evolution not revolution. Clin Chem 59, 462–465
- LeBleu VS, Taduri G, O'Connell J, Teng Y, Cooke VG, Woda C, Sugimoto H, Kalluri R (2013): Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. Nat Med 19, 1047–1053
- Levey AS, Coresh J, Balk E, Kausz AT, Levin A, Steffes MW, Hogg RJ, Perrone RD, Lau J, Eknoyan G, National Kidney Foundation (2003): National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. Ann Intern Med 139, 137–147
- Liu W, Tang N, Zhang Q (2009): Could mycophenolate mofetil combined with benazapril delay tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats? Chin Med J (Engl) 122, 199–204
- López-Hernández FJ, López-Novoa JM (2012): Role of TGF- β in chronic kidney disease: an integration of tubular, glomerular and vascular effects. Cell Tissue Res 347, 141–154
- Lottspeich F, Engels JW (Hrsg.): Bioanalytik. 2. Auflage; Spektrum Akad. Verl, München 2006
- Luhn S, Berth M, Hecker M, Bernhardt J (2003): Using standard positions and image fusion to create proteome maps from collections of two-dimensional gel electrophoresis images. Proteomics 3, 1117–1127
- Lui SL, Ramassar V, Urmson J, Halloran PF (1998): Mycophenolate mofetil reduces production of interferon-dependent major histocompatibility complex induction during allograft rejection, probably by limiting clonal expansion. Transpl Immunol 6, 23–32
- Macias MJ, Martin-Malpartida P, Massagué J (2015): Structural determinants of Smad function in TGF- β signaling. Trends Biochem Sci 40 (6), 296-308
- McCarthy S, McMullen M (1997): Autosomal dominant polycystic kidney disease: pathophysiology and treatment. ANNA J Am Nephrol Nurses Assoc 24, 45–51; quiz 52–53
- Merville P, Bergé F, Deminière C, Morel D, Chong G, Durand D, Rostaing L, Mourad G, Potaux L (2004): Lower incidence of chronic allograft nephropathy at 1 year post-

- transplantation in patients treated with mycophenolate mofetil. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg* 4, 1769–1775
- Miao J, Fan Q, Cui Q, Zhang H, Chen L, Wang S, Guan N, Guan Y, Ding J (2009): Newly identified cytoskeletal components are associated with dynamic changes of podocyte foot processes. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc* 24, 3297–3305
- Mihovilović K, Maksimović B, Kocman B, Guštin D, Vidas Z, Bulimbašić S, Ljubanović DG, Matovinović MS, Knotek M (2014): Effect of mycophenolate mofetil on progression of interstitial fibrosis and tubular atrophy after kidney transplantation: a retrospective study. *BMJ Open* 4, e005005
- Moulton VR, Gillooly AR, Tsokos GC (2014): Ubiquitination regulates expression of the serine/arginine-rich splicing factor 1 (SRSF1) in normal and systemic lupus erythematosus (SLE) T cells. *J Biol Chem* 289, 4126–4134
- Nangaku M (2004): Mechanisms of tubulointerstitial injury in the kidney: final common pathways to end-stage renal failure. *Intern Med Tokyo Jpn* 43, 9–17
- National Kidney Foundation (2002): K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found* 39, S1–266
- Nautiyal M, Sweatt AJ, MacKenzie JA, Mark Payne R, Szucs S, Matalon R, Wallin R, Hutson SM (2010): Neuronal localization of the mitochondrial protein NIPSNAP1 in rat nervous system. *Eur J Neurosci* 32, 560–569
- Nikonova AS, Gaponova AV, Kudinov AE, Golemis EA (2014): CAS proteins in health and disease: an update. *IUBMB Life* 66, 387–395
- Nishi Y, Satoh M, Nagasu H, Kadoya H, Ihoriya C, Kidokoro K, Sasaki T, Kashihara N (2013): Selective estrogen receptor modulation attenuates proteinuria-induced renal tubular damage by modulating mitochondrial oxidative status. *Kidney Int* 83, 662–673
- Nowak I, Shaw LM (1995): Mycophenolic acid binding to human serum albumin: characterization and relation to pharmacodynamics. *Clin Chem* 41, 1011–1017
- O'Farrell PH (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250, 4007–4021
- Okada Y, Yamaguchi K, Nakajima T, Nishikawa T, Jo M, Mitsumoto Y, Kimura H, Nishimura T, Tochiki N, Yasui K, et al. (2013): Rosuvastatin ameliorates high-fat and high-cholesterol diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in rats. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver* 33, 301–311
- Olejarz W, Bryk D, Zapolska-Downar D (2014): Mycophenolate mofetil--a new atheropreventive drug? *Acta Pol Pharm* 71, 353–361
- Oruqaj G, Karnati S, Vijayan V, Kotarkonda LK, Boateng E, Zhang W, Ruppert C, Günther A, Shi W, Baumgart-Vogt E (2015): Compromised peroxisomes in idiopathic pulmonary fibrosis, a vicious cycle inducing a higher fibrotic response via TGF- β signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, E2048–2057

- Petrova DT, Brandhorst G, Brehmer F, Gross O, Oellerich M, Armstrong VW (2010): Mycophenolic acid displays IMPDH-dependent and IMPDH-independent effects on renal fibroblast proliferation and function. *Ther Drug Monit* 32, 405–412
- Petrova DT, Brehmer F, Schultze FC, Asif AR, Gross O, Oellerich M, Brandhorst G (2011): Differential kidney proteome profiling in a murine model of renal fibrosis under treatment with mycophenolate mofetil. *Pathobiol J Immunopathol Mol Cell Biol* 78, 162–170
- Petrova DT, Schultze FC, Brandhorst G, Luchs K-D, Lenz C, Urlaub H, Rubel D, Gross O, Walson PD, Oellerich M (2014): Effects of mycophenolate mofetil on kidney function and phosphorylation status of renal proteins in Alport COL4A3-deficient mice. *Proteome Sci* 12, 56
- Pollard TD, Borisy GG (2003): Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453–465
- Qi W, Chen X, Poronnik P, Pollock CA (2006): The renal cortical fibroblast in renal tubulointerstitial fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 38, 1–5
- Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T, Croker BP, Demetris AJ, Drachenberg CB, Fogo AB, et al. (1999): The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 55, 713–723
- Raggi MC, Siebert SB, Abendroth DK, Steimer W, Friess H, Thorban SG (2010): Neither mycophenolate acyl-glucuronide levels nor their areas under the curve are responsible for the gastrointestinal side effects in kidney transplant recipients receiving EC-MPA: a prospective trial. *Transplant Proc* 42, 4049–4052
- Remuzzi G, Zoja C, Gagliardini E, Corna D, Abbate M, Benigni A (1999): Combining an antiproteinuric approach with mycophenolate mofetil fully suppresses progressive nephropathy of experimental animals. *J Am Soc Nephrol JASN* 10, 1542–1549
- Rhoads DD, Roufa DJ (1985): Emetine resistance of Chinese hamster cells: structures of wild-type and mutant ribosomal protein S14 mRNAs. *Mol Cell Biol* 5, 1655–1659
- Rodemann HP, Müller GA (1991): Characterization of human renal fibroblasts in health and disease: II. In vitro growth, differentiation, and collagen synthesis of fibroblasts from kidneys with interstitial fibrosis. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found* 17, 684–686
- Rodgers KD, Rao V, Meehan DT, Fager N, Gotwals P, Ryan ST, Koteliansky V, Nemori R, Cosgrove D (2003): Monocytes may promote myofibroblast accumulation and apoptosis in Alport renal fibrosis. *Kidney Int* 63, 1338–1355
- Roos N, Poulalhon N, Farge D, Madelaine I, Mauviel A, Verrecchia F (2007): In vitro evidence for a direct antifibrotic role of the immunosuppressive drug mycophenolate mofetil. *J Pharmacol Exp Ther* 321, 583–589
- Rubel D, Stock J, Ciner A, Hiller H, Girgert R, Müller G-A, Gross O (2014): Antifibrotic, nephroprotective effects of paricalcitol versus calcitriol on top of ACE-inhibitor therapy in the COL4A3 knockout mouse model for progressive renal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc* 29, 1012–1019

- Ryu M, Mulay SR, Miosge N, Gross O, Anders H-J (2012): Tumour necrosis factor- α drives Alport glomerulosclerosis in mice by promoting podocyte apoptosis. *J Pathol* 226, 120–131
- Schricker R, Magdolen V, Strobel G, Bogengruber E, Breitenbach M, Bandlow W (1995): Strain-dependent occurrence of functional GTP:AMP phosphotransferase (AK3) in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 270, 31103–31110
- Schröder S, Zhang H, Yeung ES, Jänsch L, Zabel C, Wätzig H (2008): Quantitative gel electrophoresis: sources of variation. *J Proteome Res* 7, 1226–1234
- Shaw LM, Holt DW, Oellerich M, Meiser B, van Gelder T (2001): Current issues in therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid: report of a roundtable discussion. *Ther Drug Monit* 23, 305–315
- Sherry B, Yarlett N, Strupp A, Cerami A (1992): Identification of cyclophilin as a proinflammatory secretory product of lipopolysaccharide-activated macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 3511–3515
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M (1996): Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68, 850–858
- Shihab FS, Bennett WM, Yi H, Choi SO, Andoh TF (2003): Mycophenolate mofetil ameliorates arteriopathy and decreases transforming growth factor-beta1 in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg* 3, 1550–1559
- Shinomiya H (2012): Platin family of actin-bundling proteins: its functions in leukocytes, neurons, intestines, and cancer. *Int J Cell Biol* 2012, 213492
- Shipkova M, Armstrong VW, Wieland E, Niedmann PD, Schütz E, Brenner-Weiss G, Voihsel M, Braun F, Oellerich M (1999): Identification of glucoside and carboxyl-linked glucuronide conjugates of mycophenolic acid in plasma of transplant recipients treated with mycophenolate mofetil. *Br J Pharmacol* 126, 1075–1082
- Shipkova M, Armstrong VW, Oellerich M, Wieland E (2005): Mycophenolate mofetil in organ transplantation: focus on metabolism, safety and tolerability. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 1, 505–526
- Smith MR, Cooper SC (2014): Mycophenolate mofetil therapy in the management of inflammatory bowel disease--a retrospective case series and review. *J Crohns Colitis* 8, 890–897
- Stamm S (2008): Regulation of alternative splicing by reversible protein phosphorylation. *J Biol Chem* 283, 1223–1227
- Streit F, Shipkova M, Armstrong VW, Oellerich M (2004): Validation of a rapid and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for free and total mycophenolic acid. *Clin Chem* 50, 152–159
- Strutz F, Neilson EG (2003): New insights into mechanisms of fibrosis in immune renal injury. *Springer Semin Immunopathol* 24, 459–476
- Strutz F, Müller GA (2006): Renal fibrosis and the origin of the renal fibroblast. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc* 21, 3368–3370

- Su Kim D, Choi YD, Moon M, Kang S, Lim J-B, Kim KM, Park KM, Cho NH (2013): Composite three-marker assay for early detection of kidney cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol* 22, 390–398
- Truong LD, Choi YJ, Tsao CC, Ayala G, Sheikh-Hamad D, Nassar G, Suki WN (2001): Renal cell apoptosis in chronic obstructive uropathy: the roles of caspases. *Kidney Int* 60, 924–934
- Ulschmid JK, Rahlfs S, Schirmer RH, Becker K (2004): Adenylate kinase and GTP:AMP phosphotransferase of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. Central players in cellular energy metabolism. *Mol Biochem Parasitol* 136, 211–220
- Van Gelder T, Le Meur Y, Shaw LM, Oellerich M, DeNofrio D, Holt C, Holt DW, Kaplan B, Kuypers D, Meiser B, et al. (2006): Therapeutic drug monitoring of mycophenolate mofetil in transplantation. *Ther Drug Monit* 28, 145–154
- Villarroel MC, Hidalgo M, Jimeno A (2009): Mycophenolate mofetil: An update. *Drugs Today Barc Spain 1998* 45, 521–532
- Wada T, Sakai N, Sakai Y, Matsushima K, Kaneko S, Furuichi K (2011): Involvement of bone-marrow-derived cells in kidney fibrosis. *Clin Exp Nephrol* 15, 8–13
- Weimer R, Mytilineos J, Feustel A, Preiss A, Daniel V, Grimm H, Wiesel M, Opelz G (2003): Mycophenolate mofetil-based immunosuppression and cytokine genotypes: effects on monokine secretion and antigen presentation in long-term renal transplant recipients. *Transplantation* 75, 2090–2099
- Whaley-Connell A, Sowers JR, McCullough PA, Roberts T, McFarlane SI, Chen S-C, Li S, Wang C, Collins AJ, Bakris GL, KEEP Investigators (2009): Diabetes mellitus and CKD awareness: the Kidney Early Evaluation Program (KEEP) and National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found* 53, S11–21
- Willis BC, Borok Z (2007): TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293, L525–534
- Wynn TA (2007): Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest* 117, 524–529
- Wynn TA (2008): Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 214, 199–210
- Yhee J-Y, Yu C-H, Kim J-H, Sur J-H (2008): Effects of T lymphocytes, interleukin-1, and interleukin-6 on renal fibrosis in canine end-stage renal disease. *J Vet Diagn Investig Off Publ Am Assoc Vet Lab Diagn Inc* 20, 585–592
- Zeisberg M, Kalluri R (2004): The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis. *J Mol Med Berl Ger* 82, 175–181
- Zeisberg M, Strutz F, Müller GA (2001): Renal fibrosis: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 10, 315–320
- Zhang W, Ding C, Zheng S (2014): Enteric-coated mycophenolate sodium: an update. *Int J Clin Pract Suppl* 1–3

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen Beteiligten, die zum Entstehen und Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Oellerich für die Bereitstellung der interessanten Fragestellung, die Möglichkeit des experimentellen Arbeitens in seinem Bereich sowie die kompetente und professionelle fachliche Gesamtbetreuung dieses Projekts.

Meinen beiden Betreuern, Frau Dr. Darinka Petrova und Herrn PD Dr. Gunnar Brandhorst möchte ich ebenfalls zu tiefst und von ganzem Herzen für die hervorragende Betreuung und fachkompetente Unterstützung danken. Insbesondere Frau Dr. Darinka Petrova gilt aufgrund der ausgezeichneten Anregungen und Ideen sowie der gezeigten Hilfsbereitschaft und Motivation mein ganz besonderer Dank.

Herrn Prof. Dr. Hassan Dihazi und Herrn PD Dr. Abdul Rahman Asif möchte ich für die Gerätenutzung zur Herstellung der 2DE-Gele danken. Des Weiteren gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Henning Urlaub und Herrn Dr. Christof Lenz für die massenspektrometrische Proteinidentifizierung.

Herrn Prof. Dr. Gross und seinen Mitarbeitern, im Besonderen Frau Dr. Diana Rubel, möchte ich für deren Hilfsbereitschaft, die Bereitstellung des Tiermodells sowie die Unterstützung mit fachlicher Kompetenz danken. Herrn Dr. Schultze und den Mitarbeitern seiner ehemaligen Arbeitsgruppe an der Universitätsmedizin Göttingen danke ich für die fachkundige Unterstützung bei Erstellung der Nierenschnittpräparate.

Bei sämtlichen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Klinischen Chemie möchte ich mich für die außergewöhnliche und ausgezeichnete technische Assistenz, die unermüdliche und geduldige Beantwortung meiner Fragen bedanken. Dabei gilt mein besonderer Dank Frau Susanne Goldmann und Christina Wiese, die mir tatkräftig und kompetent bei der Laborarbeit zur Seite gestanden haben.

Bei der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin e.V. (DGKL) bedanke ich mich für die Finanzierung dieses Forschungsvorhabens sowie die Möglichkeit, unsere gewonnenen Daten auf der DGKL-Jahrestagung 2012 zu präsentieren.

Lebenslauf

Ich wurde am 12. April 1976 in Stuttgart, Baden-Württemberg, geboren. Meine schulische Laufbahn beendete ich im Juni 1996 am Beruflichen Schulzentrum in Leonberg, Baden-Württemberg mit der fachgebundenen Hochschulreife.

Im Zeitraum von Juli 1996 bis Juli 1999 durchlief ich innerhalb der Bundeswehr die Ausbildung zum Offizier. Danach studierte ich an der Universität der Bundeswehr in München, Bayern, Betriebswirtschaftslehre und legte im März 2003 meine Diplomprüfung als Diplom-Betriebswirt (Fachhochschule) ab. Im Anschluss durchlief ich mehrere Verwendungen als Offizier und beendete Ende Dezember 2007 meine Dienstzeit bei der Bundeswehr.

Das Studium der Humanmedizin nahm ich im April 2008 an der Georg-August-Universität in Göttingen, Niedersachsen, auf. Im April 2010 absolvierte ich den Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Physikum) und im April 2014 den Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Staatsexamen).

Seit Juli 2014 arbeite ich als Arzt an der Medizinischen Hochschule in Hannover und befinde mich z. Zt. in der Weiterbildung zum Facharzt im Bereich Strahlentherapie/Radioonkologie.