

Aus der Klinik für Innere Medizin – Nephrologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Veränderungen der Expression von Rhodanese, SOD-1 und
gp91^{phox} bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz unter
Hämodialysetherapie.**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anja Jühling
aus Plauen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. M. Tepel
2. Priv.-Doz. Dr. med. O. Süß
3. Priv.-Doz. Dr. med. B. Henning

Datum der Promotion: 18.09.2009

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen und Begriffe	I
1. Einleitung	1
1.1 Die chronische Niereninsuffizienz	1
1.2 Hämodialyseverfahren	3
1.3 Oxidativer Stress. Was ist das?	4
1.4 Antioxidative Enzyme	6
1.4.1 Rhodanese (Rho)	6
1.4.2 Superoxiddismutase (SOD)	8
1.5 Ein oxidatives Enzym - die NAD(P)H-Oxidase (NOX)	10
1.6 Die Rolle des Oxidativen Stress in Bezug auf die Krankheitsentstehung bei Patienten mit chronischer Hämodialysebehandlung.	13
2. Fragestellung	17
3. Geräte und Materialien	19
3.1 Geräte	19
3.2 Chemikalien und Biochemikalien	20
3.2.1 Monozytenisolierung mittels Beads aus Vollblut	20
3.2.2 RNA-Isolierung	21
3.2.3 Agarosegelelektrophorese für den Nachweis von RNA	21
3.2.4 Reverse Transkription von mRNA zu cDNA	21
3.2.5 Real-Time PCR	22
3.2.6 Agarosegelelektrophorese für den Nachweis von cDNA	23
3.2.7 Western Blot	23
3.2.8 In-Cell Western Assay	26
3.2.9 Messung der gesamten antioxidativen Kapazität im Plasma	27
4. Methoden	28
4.1 Isolierung von CD14 positiven Monozyten aus Vollblut	28
4.1.1 Durchführung der Isolierung von CD 14-positiven Monozyten aus Vollblut	29
4.2 RNA-Isolierung	29
4.2.1 Durchführung der RNA-Isolierung	29
4.3. Agarosegelelektrophorese zum Nachweis der RNA	30

4.3.1	Durchführung der Agarosegelelektrophorese	30
4.4	Reverse Transkription von mRNA zu cDNA	30
4.4.1	Durchführung der Reversen Transkription von mRNA zu cDNA	31
4.5	Quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	31
4.5.1	Prinzip der Real-Time PCR mit SYBR Green I	32
4.5.2	Durchführung der Real-Time PCR mit SYBR Green I	33
4.5.3.	Auswertung der Real-Time PCR	34
4.6	Agarosegelelektrophorese zum Nachweis von cDNA	35
4.6.1	Durchführung Agarosegelelektrophorese zum Nachweis von cDNA	35
4.7	Western Blot	35
4.7.1	Durchführung des Western Blots und der Immunopräzipitation	36
4.8	In-Cell Western Assay	38
4.8.1	Prinzip des In-Cell Western Assay	38
4.8.2	Durchführung des In-Cell Western Assays	39
4.8.3	Auswertung des In-Cell Western Assay	40
4.9	Messung der gesamten antioxidativen Kapazität im Plasma	41
4.9.1	Prinzip der Messung	41
4.9.2	Durchführung der Messung der gesamten antioxidativen Kapazität im Plasma	41
4.9.3	Auswertung der gesamten antioxidativen Kapazität im Plasma	42
4.10	Statistik	42
5.	Ergebnisse	43
5.1	Versuche zur DNA-Expression von Rhodanese, SOD-1 und gp91^{phox} in CD14-positiven Monozyten und Quantifizierung mittels Real-Time PCR.	43
5.1.1	Nachweis von isolierter RNA aus CD14-positiven Monozyten Mittels Agarosegelelektrophorese	43
5.1.2	Nachweis von Rhodanese, SOD-1, gp91 ^{phox} , Beta-Aktin und GAPDH nach der Amplifizierung mittels Real-Time PCR.	43
5.1.3	Schmelzkurvenanalyse im Anschluss an die Amplifizierung	46
5.1.4	Serum- und Glukokortikoid induzierbare Kinase (SGK1)-Expression im Verlauf einer Hämodialysebehandlung	47
5.1.5	Nachweis von Rhodanese, SOD-1 und gp91 ^{phox} auf Proteinebene mittels Western Blot	49
5.1.6	Quantitative Bestimmung von Rhodanese, SOD-1 und gp91 ^{phox} auf Proteinebene mittels In-Cell Western Assay	51

5.2	Patienten- und Probandencharakterisierung	53
5.3	Quantitative Bestimmung oxidativer und antioxidativer Enzyme in CD14 positiven Monozyten auf mRNA-Ebene mittels Real-Time PCR.	55
5.3.1	Genexpressionveränderungen von Rhodanese im Verlauf Einer Hämodialysebehandlung	55
5.3.2	Genexpressionveränderungen der Superoxiddismutase (SOD-1) im Verlauf einer Hämodialysebehandlung	56
5.3.3	Genexpressionveränderungen von gp91 ^{phox} im Verlauf einer Hämodialysebehandlung.	57
5.3.4	Genexpressionsveränderungen von antioxidativen und oxidativen Enzymen im Vergleich von Kontrollprobanden, Kontrollpatienten mit CKD-Patienten.	58
5.4	Quantitative Bestimmung oxidativer und antioxidativer Enzyme in CD14 positiven Monozyten auf Proteinebene mittels In-Cell Western Assay.	62
5.4.1	Quantitative Proteinbestimmung von Rhodanese im Verlauf Der Hämodialysebehandlung.	62
5.4.2	Quantitative Proteinbestimmung von SOD-1 im Verlauf der Hämodialysebehandlung.	62
5.4.3	Quantitative Proteinbestimmung von gp91 ^{phox} im Verlauf der Hämodialysebehandlung	63
5.4.4	Quantitative Proteinbestimmung von antioxidativen und oxidativen Enzymen im Vergleich zwischen Kontrollprobanden, Kontrollpatienten und CKD-Patienten.	64
5.5	Bestimmung der antioxidativen Gesamtkapazität im Plasma	67
5.5.1	Bestimmung der antioxidativen Gesamtkapazität im Plasma im Verlauf der Hämodialysebehandlung.	68
5.5.2	Bestimmung der antioxidativen Gesamtkapazität im Plasma im Vergleich von Patienten im CKD-Stadium 5 mit Hämodialysetherapie und Kontrollpatienten	69
6.	Diskussion	71
6.1	Die Rolle von Rhodanese bei oxidativen Stress in der Hämodialyse	72
6.2	Die Rolle von SOD-1 bei oxidativen Stress in der Hämodialyse	75
6.3	Die Rolle von NOX 2 bei oxidativem Stress in der Hämodialyse	79
6.4	Die gesamte antioxidative Kapazität im Plasma	81
7.	Zusammenfassung	86

8. Literatur	88
9. Publikationen	96
10. Danksagung	97
Selbstständigkeitserklärung	98

Abkürzungen und Begriffe

ΔA	Absorption der 1.Messung – Absorption der 2.Messung
A_0	Initialabsorption
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2-Azino-di-[3-ethylbenz-thiazolin-sulphonat]
AK	Antikörper
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
BA	Beta Aktin
BE	Blutentnahme
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
Ca	Kalzium
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
CKD	(engl.) Chronic Kidney Disease (chronische Niereninsuffizienz)
CRP	C- Reaktives Protein
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
D.m.	Diabetes mellitus
EDTA	Ethylene-diamine-tetraacetic acid
F	Forward (Primer)
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GM-CSF	(engl. Granulocyte-macrophage-colony-stimulating Factor) Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
Gpx	Glutathionperoxidase
DTT	Dithiothreitol
evtl.	eventuell
h	Stunden
HBSS	Hank's balanced salt solution
HD	Hämodialyse
HEPES	(N- (2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2- ethansulfonsäure)
HOCl	hypochlorige Säure
HO·	Hydroxylradikal
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HUPO	Humanes Protein
ICAM-1	(engl.) Intercellular Adhesion Molecule 1
kDa	Kilodalton
LB	Loading Buffer
LDL	(engl.) Low Density Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharide
min	Minuten
M	mol pro Liter
mM	millimolar
MOPS	(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	(engl.) messenger Ribonucleic Acid
NADH	Nikotinsäureamidadenindinukleotid (reduzierte Form)

NADPH	Nikotinsäureamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
nm	Nanometer
Nonidet	Nonylphenylpolyethylenglycol
NOX 2	NAD(P)H- Oxidase
NQO1	NAD(P)H- Dehydrogenase
O ₂ ^{·-}	Superoxidanion
PAF	(engl. platelet activating factor) Thombozyten aktivierender Faktor
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBMC	(engl. Peripheral Blood Mononuclear Cell) periphere Mononukleäre Blutzellen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
phox	(engl.) für phagocyte oxidase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
R	Reverse (Primer)
Rho	Rhodanese
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure (engl. Ribonucleic acid)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (engl. Reactive Oxygen Species)
rpm	(engl.) rotation per minute (Umdrehungen pro Minute)
r-RNA	ribosomale RNA
RT-PCR	Real-Time PCR
s	Sekunde
s.	siehe
Salb	Serumalbumin
SDS	(engl.) <u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate
SGK1	(engl.) serum- and glucocorticoidinducible kinase
SHs	Serumharnstoff
SKr	Serumkreatinin
SOD-1	Superoxiddismutase 1, zytoplasmatisch, enthält Kupfer und Zink
SOD-2	Superoxiddismutase 2, mitochondrial, enthält Mangan
T	Thyrosin
Tab.	Tabelle
TAOS	Total Antioxidant Status Assay
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
T _m	melting Temperature
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TST	Thiosulfat Sulfurtransferasen
VCAM-1	(engl.) Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VSMC	(engl.) Vascular Smooth Muscle Cell
UV	Ultraviolett
V	Volt
w/v	(engl.) weight per volume
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Die chronische Niereninsuffizienz

Die Zahl der chronisch niereninsuffizienten Patienten, die ein Nierenersatzverfahren benötigen, steigt zunehmend an. Dabei beschreibt die chronische Niereninsuffizienz (Chronic Kidney Disease, CKD) eine meist progredient verlaufende Nierenerkrankung, die mit einer irreversiblen Einschränkung der glomerulären, tubulären und endokrinen Nierenfunktion einhergeht. Sie wird durch Zeichen einer Nierenerkrankung, wie Albuminurie und Proteinurie, sowie das Ausmaß der Einschränkung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) definiert. Die chronische Niereninsuffizienz (chronic kidney disease; CKD) ist primär bedingt durch eine Vielzahl von verschiedenen Nierenerkrankungen oder tritt sekundär im Rahmen von Systemerkrankungen mit Nierenbeteiligung auf. Laut dem aktuellem QuaSi-Niere Bericht 2006/2007 wurden im Bundesdurchschnitt 808 Dialysepatienten pro Million Einwohner mit einem Dialyseverfahren versorgt. Von 1997 bis 2006 ist im Durchschnitt ein jährlicher Zuwachs der Prävalenz der Patienten mit chronischer Nierenersatztherapie von 4,4 % und der Inzidenz von 5,1 % zu verzeichnen. [1] Als Ursache für das terminale Nierenversagen wurde bei den Patienten unter Dialysetherapie am häufigsten die Diagnose Diabetes mellitus mit 28 %, gefolgt von der Diagnose Glomerulonephritis mit 19 %, angegeben. Die Grunderkrankung vaskuläre Nephropathie nimmt hingegen kontinuierlich zu (17%). Die Haupttodesursachen bei beiden Geschlechtern waren in allen Altersgruppen kardial (39,7%) und infektiös (17,8%) bedingt. Bezüglich der Todesursache bei chronisch niereninsuffizienten Patienten konnte kein Geschlechterunterschied festgestellt werden [1]. Nach der Kidney Disease Outcomes Qualitative Initiative (K/DOQI)-Guidelines wird die chronische Niereninsuffizienz (CKD), zur erleichterten Einschätzung von Diagnostik, Therapie und Qualitätskontrolle, in 5 Stadien eingeteilt (s. Tab. 1.1).

Tab. 1.1: Stadien der chronische Nierenerkrankung (modifiziert nach Grindt M et al. 2005 [2])

Stadium	GFR, ml/min/1,73 m ²	Beschreibung
CKD 1	≥ 90	Strukturelle renale Veränderungen (z.B. Proteinurie) ohne GFR-Verlust
CKD 2	60-89	Strukturelle renale Veränderungen mit leichtem GFR-Verlust
CKD 3	30-59	Moderater GFR-Verlust
CKD 4	15-29	Schwerer GFR-Verlust
CKD 5	≤ 15 oder Dialyse	Präterminales/terminales Nierenversagen

Die chronische Niereninsuffizienz beginnt meist mit einem symptomlosen, kompensierten Dauerstadium, evtl. begleitet von Proteinurie und einer eingeschränkten glomerulären Filtrationsrate (GFR 50-80%). Die GFR ergibt sich aus der Cockcroft/Gault-Formel:

$$\frac{((140 - \text{Alter}) \cdot \text{Gewicht}(kg))}{(72 \cdot \text{Serumkreatinin}(mg / dl))} \cdot (0,85 \text{ bei Frauen})$$

oder aus der MDRD-Formel:

$$(170 \cdot \text{SKr}^{-0,999} \cdot \text{Alter}^{-0,176} \cdot \text{SHs}^{-0,170} \cdot \text{SAlb}^{+0,318}) \cdot (0,762 \text{ bei Frauen bzw. } 1,18 \text{ bei Farbigen})$$

Serumkreatinin wird hierbei mit SKr, Serumharnsäure mit SHs und Serumalbumin mit SAlb abgekürzt. Die Retentionsparameter befinden sich noch im oberen Normbereich und der Säure-Basen-Haushalt ist ausgeglichen. Im Stadium der kompensierten Retention (GFR 20-50%) ist der Patient noch relativ beschwerdefrei. In diesem Stadium kann es jedoch schon zur osmotischen Diurese, renaler Hypertonie und Anämie kommen. Zum Auftreten urämischer Symptome und Störungen im Elektrolyt- und Wasserhaushalt kommt es meist erst im Stadium der dekompenzierten Retention (GFR 10-20%). Die terminale Niereninsuffizienz als letztes Stadium stellt eine Folge einer chronisch fortschreitenden oder akut aufgetretenen Niereninsuffizienz dar und weist aggravierte Symptome und Komplikationen der Niereninsuffizienz auf. Sie tritt bei einer GFR < 10 mL/min/1,73² auf und entspricht somit dem CKD-Stadium 5. Das Auftreten von Urämie mit

Überwässerung, Azidose und Hyperkaliämie kennzeichnet das Vollbild der terminalen Niereninsuffizienz. Um überleben zu können, müssen diese Patienten einem Nierenersatzverfahren unterzogen werden.

1.2 Hämodialyseverfahren

Sobald die renale Entgiftungsfunktion nicht mehr ausreicht, um die harnpflichtigen Substanzen zu eliminieren und Störungen im Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalt anders nicht zu therapieren sind, ist ein Nierenersatzverfahren indiziert. Ein häufig angewandtes Verfahren der Nierenersatztherapie ist die Hämodialyse (ca. 82%). Weitere Verfahren sind die Hämodiafiltration (ca.9%), die Peritonealdialyse (ca. 7%) und die Hämofiltration (ca.1%). [3]

Bei der Hämodialyse steht die Elimination von Wasser und harnpflichtigen Substanzen (z.B. Kreatinin, Harnstoff etc.), sowie die Korrektur von Störungen im Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalt im Vordergrund. Bei dieser Form der Nierenersatztherapie erfolgt der Stofftransport im Dialysator entsprechend eines Konzentrationsgradienten durch eine semipermeable Dialysemembran. Die Siebgröße der Membran bestimmt die Größe des Molekulargewichts der einzelnen Substanzen, die die Membran passieren können. Das z.B. durch Heparin antikoagulierte Blut fließt auf der einen Seite der Membran, während auf der anderen Seite, im Gegenstrom, eine Dialyseflüssigkeit mit bestimmter Elektrolytkonzentration, das sogenannte Dialysat, fließt. Somit kann in Abhängigkeit der Konzentration des Dialysats das Blut von verschiedenen Substanzen gereinigt und ihm auch bestimmte Substanzen, wie Bikarbonat oder Kalzium, zugeführt werden.

In den letzten Jahrzehnten hat sich die Prognose für Patienten mit akutem und auch chronischem Nierenversagen durch den Einsatz von Dialyseverfahren verbessert. Die Lebenserwartung der Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ist wesentlich gestiegen. Ein Überleben, nach Eintritt eines irreversiblen chronischen Nierenfunktionsverlustes von 20 Jahren ist mit Hilfe der künstlichen Niere nicht ungewöhnlich [3].

Die Behandlungsergebnisse sind jedoch zum jetzigen Zeitpunkt, trotz der verbesserten Dialysetechnologie, nicht zufrieden stellend. Die Morbidität und Mortalität infolge Malnutrition, Infektionen und besonders kardiovaskulärer Erkrankungen ist erheblich. So war die letztendliche Todesursache laut QUASI Niere 2006/2007 bei hämodialysepflichtigen Männern und Frauen durch kardiale

Erkrankungen bedingt [1]. In diesem Zusammenhang spielt die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und die Entstehung von oxidativem Stress und die damit einhergehende beschleunigte Bildung von arteriosklerotischen Plaques eine wichtige Rolle.

1.3 Oxidativer Stress. Was ist das?

Um die tägliche Energieversorgung von Lebewesen zu gewährleisten, haben die Zellen die Fähigkeit zur vollständigen Oxidation von Nahrungsstoffen durch Sauerstoff entwickelt. Jedoch birgt dies auch einige Gefahren, denn Sauerstoff selbst und besonders sein Radikal (O_2^-) kann mit nahezu allen Biomolekülen reagieren und diese beeinträchtigen. Um diesen möglichen Schäden entgegenzuwirken, besitzen aerob lebende Zellen enzymatische und nichtenzymatische Schutzmechanismen.

Oxidativer Stress ist definiert als eine Imbalance zwischen der vermehrten Produktion an Oxidanzien, eingeschlossen reaktiven Sauerstoffspezies (engl. Reactive Oxygen Species, ROS), reaktiven Stickstoffspezies (engl. Reactive Nitrogen Species, RNS), chlorierten Verbindungen und den verminderten antioxidativen Abwehrmechanismen der Zelle [4; 5] bzw. als eine Kombination aus beiden Mechanismen [6; 7]. Reaktive Sauerstoffspezies sind eine Gruppe von instabilen, sehr hoch reaktiven Molekülen, die ihre Wirksamkeit durch ein oder mehrere ungepaarte Elektronen entfalten. Sie können dadurch ein Elektron aufnehmen oder ihr ungepaartes Elektron auf ein anderes Molekül übertragen [8]. Üblicherweise folgt die Bildung von ROS einer Kaskade von Reaktionen, die mit der Produktion von Superoxiden beginnt. So können ROS einerseits exogen und andererseits endogen entstehen. Exogene Ursachen sind Zigarettenrauch, Medikamente, UV-Strahlung oder Nahrung. Endogen kann ROS als Teil der oxidativen Phosphorylierung in der mitochondrialen Atmungskette, im Arachidonsäure Pathway, der Lipoxigenase und Cyclooxygenase, Cytochrom p450, bei der Xanthinoxidase, NO-Synthasen, Peroxidasen [9; 10] sowie beim „Respiratory Burst“ in phagozytierenden Zellen durch die NADPH-Oxidase (NOX) entstehen. Zu den dabei gebildeten freien Radikalen zählen Superoxidanionen (O_2^-), Hydroxylradikale (OH^\bullet) [11], Peroxiradikale (ROO^\bullet) und Peroxylradikale (LOO^\bullet). Superoxide können über eine Vielzahl von Mechanismen reagieren. Sie werden spontan, bedingt durch einen niedrigen pH-Wert oder durch die körpereigene Superoxiddismutase (SOD), zu Hydrogenperoxide (H_2O_2) dismutiert und mit Hilfe der

Katalase zu Sauerstoff und Wasser abgebaut [12]. Eisenüberladung, wie sie bei chronisch niereninsuffizienten Patienten, aufgrund der Anämiebehandlung, häufiger auftritt, führt zu einer vermehrten Bildung von ROS [13]. Die durch Eisen katalysierte Fentonreaktion führt zur Bildung von Hydroxylradikalen (OH^\bullet) (s. Abb. 1.1) [12], welche in den Zellen zur Oxidation von DNA, Proteinen und Lipiden führen können.

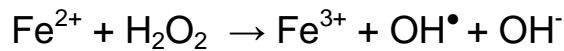


Abb.1.1: Chemische Reaktionsgleichung der Fentonreaktion.

Bei dieser Reaktion wird Wasserstoffperoxid (H_2O_2) unter Oxidation von Eisen (Fe^{2+} zu Fe^{3+}) zu einem Hydroxylradikal und Hydroxylion umgewandelt.

ROS interagieren stark mit einer großen Anzahl von Molekülen, eingeschlossen kleine nicht organische Moleküle sowie Proteine, Lipide, Kohlenhydrate und Nukleinsäuren (DNA). Dadurch können ROS die Zielstrukturen irreversibel zerstören oder ihre Funktion verändern und somit zur Schädigung des Organismus beitragen. Wie beschrieben, entstehen im Körper bei verschiedenen Stoffwechselfvorgängen oder auch exogen zugeführt immer kleine Mengen an ROS. Geringe Mengen an ROS sind für Prozesse der Zellaktivierung erforderlich und dienen dem körpereigenen Abwehrsystem zum Schutz gegen Fremdkörper wie Bakterien und Viren. Große Mengen oder ungezielte Verbreitung von ROS bewirken eine Stressreaktion der Zellen und können somit Zellschädigungen hervorrufen. Dieser Überproduktion an freien Radikalen und der damit verbundenen Ausbildung von oxidativem Stress muss entgegengewirkt werden.

Dafür steht dem Körper ein sogenanntes „antioxidatives System“ zur Verfügung. Dabei kann man exogene und endogene Antioxidanzien unterscheiden. Exogene Antioxidanzien sind Stoffe, die dem Organismus mit der Nahrung oder in Form von Nahrungsergänzungsmitteln zugeführt werden müssen. Dazu zählen z.B. α -Tocopherol (Vitamin E), Ascorbinsäure (Vitamin C) [8], Beta-Carotin (Provitamin A) und Ubichinon (Quenzym, Q10).

Die Abbildung 1.2 stellt den antioxidativen Wirkmechanismus von Ascorbinsäure als Beispiel für exogen zugeführte Radikalfänger dar.

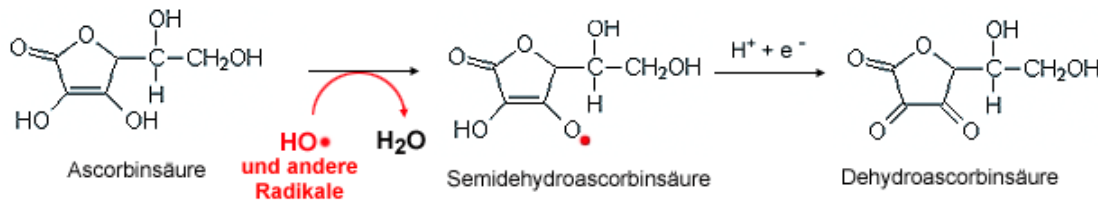


Abb.1.2: Chemische Reaktionsgleichung der antioxidative Wirkungsweise von Ascorbinsäure. Ascorbinsäure wird unter Verbrauch von einem Hydroxylradikal (HO^\bullet) und Bildung von Wasser zu Semidehydroascorbinsäure und anschließend mit Hilfe eines Wasserstoffions (H^+) und eines Elektrons (e^-) zu Dehydroascorbinsäure reduziert.

Endogene Antioxidanzien sind Enzyme, die von den körpereigenen Zellen synthetisiert werden, um sich vor den zellschädigenden freien Radikalen schützen zu können. Zu den endogenen Antioxidanzien, auch „Radikalfänger“ genannt, gehören unter anderem die Katalase, die Superoxiddismutase (SOD), die Glutathionperoxidase (Gpx) [8], die NAD(P)H-Dehydrogenase (NQO1) und im weiteren Sinne das Enzym Rhodanese (Rho). Diese Enzyme sind in der Lage, die im Körper und außerhalb des Körpers entstandenen freien Radikale in weniger schädigende und sogar nichttoxische Substanzen umzuwandeln. Auch andere wasserlösliche körpereigene Stoffe können als sogenannte Antioxidantien fungieren. Zu diesen zählen unter anderem die Harnsäure [14], Billirubin [8; 15; 16], Thiole, und verschiedene Proteine, wie z.B. Albumin [17]. Wasser- und fettlösliche Antioxidanzien sind für den Schutz von Zellmembranen und Lipoproteinen im Plasma wichtig [8].

1.4 Antioxidative Enzyme

1.4.1 Rhodanese (Rho)

1956 wurde Rhodanese, auch bekannt als Thiosulfat-Sulfurtransferase, zum ersten Mal in menschlichen roten Blutzellen identifiziert. Sie gehört in die Gruppe der Sulfurtransferasen. Das ist eine Gruppe von Enzymen, die in Pflanzen, Tieren und Bakterien weit verbreitet sind. Sie katalysiert den Transfer eines Schwefelatoms von einem Donormolekül, z.B. Thiosulfat, Thiocystin oder Thiocystein auf einen thiophiles bzw. nukleophiles Akzeptormolekül, z.B. Zyanid, reduziertes Lipoat oder Mono- bzw. Dithiole [18; 19]. Ihre höchste Konzentration erreicht die Rhodanese in der Leber, im Nierencortex und in der Darmmukosa [20]. Dieses Enzym wird vom Zellkern kodiert, ist aber in der mitochondrialen Matrix und im Zytosol der Zelle lokalisiert.

Die native Form des Enzyms enthält 4 Sulfhydryl(=Thiol)gruppen, aber keine Disulfide. Eine der Sulfhydrylgruppen ist Cystein 247. Dieser Cysteinrest stellt das katalytische Zentrum von Rhodanese dar, welches essentiell ist und für die Aktivität der Rhodanese im reduzierten Zustand vorliegen muss. [20-22] Arginin und Lysin sind entscheidend für die Funktion des Schwefeltransfers [20]. Alle benötigten Aminosäuren für die Katalyse befinden sich am C-Terminus, wohingegen der N-Terminus in die Stabilisierung und Aktivierung der Rhodanese-Struktur involviert ist [20]. Rhodanese ist an der Bereitstellung von labilem Schwefel beteiligt, welches einen charakteristischen Teil der prosthetischen Gruppe von Eisen-Schwefel Proteinen darstellt [23] und somit das Redoxzentrum eines solchen Proteins bildet [24]. Die Bedeutung von Rhodanese liegt somit in der Bildung von Eisen-Schwefel-Proteinen, dem Transfer von Schwefelatomen, Modifikation von schwefelhaltigen Enzymen, in der Entgiftung von Zyaniden [25; 26] und der Beteiligung an der Thiaminbiosynthese und dem Selenmetabolismus [21]. Der durch Rhodanese transferierte Schwefel wird dabei im aktiven Zentrum an der Sulfhydrylgruppe über eine Persulfidbindung (E-S-SH) gebunden. Diese Verbindung ist normalerweise labil, wird aber durch die Interaktion mit dem Protein stabilisiert [22]. Die bisherigen Kenntnisse über Rhodanese zeigen, dass es, aufgrund der Übertragung von Schwefelatomen, zur Aktivierung von Enzymen des oxidativen, aber auch zur Regenerierung von Proteinen (z.B. Glutathion, Thioredoxin) des antioxidativen Metabolismus kommt. Somit spielt die Rhodanese sowohl im oxidativen als auch im antioxidativen Metabolismus eine wichtige Rolle. Glutathion ist eine Sulfhydrylverbindung, die im reduzierten Zustand die SH-Gruppen von Proteinen und Enzymen vor Oxidation schützt und des Weiteren Bestandteil eines Systems zur Entgiftung von Peroxiden (z.B. H_2O_2) ist. So kann z.B. in Anwesenheit von Thioredoxin Rhodanese als Thioredoxinoxidase fungieren [19]. Thioredoxin ist eine Protein-Disulfid-Oxidoreduktase, die an der Umwandlung von Ribosen in Desoxyribosen bei der DNA-Synthese und an der NAD(P)H abhängigen Redoxreaktion der Atmungskette beteiligt ist. Über diesen Mechanismus besteht die Möglichkeit einer Beteiligung an der Beseitigung reaktiver Sauerstoffradikale. Dabei katalysierte die negativere Form der zwei Rhodaneseisoformen die Oxidation von reduziertem Thioredoxin direkt durch ROS [19]. Rhodanese kann selbst von der eigenen Oxidation betroffen sein, denn Zysteinreste sind häufig an Redoxreaktionen beteiligt, wobei die Elektronenübertragung dabei über Thiol-Disulfid-

Austauschreaktionen erfolgt. Diese Eigenschaft macht es gegenüber Oxidation durch ROS sehr empfindlich [27]. Dabei zeigt Rhodanese eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber verschiedenen ROS. Sie wird z.B. von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) schnell inaktiviert, während durch Superoxide (O_2^-) keine Inaktivierung erfolgt. Die vollständige Inaktivierung wird durch Reduktion mit Thiosulfat (SSO_3^{2-}) wieder reaktiviert [28]. Die Oxidation von Rhodanese verändert deren Fähigkeit, Schwefel auf Eisen-Schwefel-Proteine, reversibel zu übertragen. In vivo könnte dies eine Kontrollfunktion der Rhodanese für Elektronentransportproteine der Atmungskette ermöglichen [29]. Die Entgiftung von Zyanid nimmt dabei eine gesonderte Stellung in der Rhodanese-funktion ein. Zyanide und Schwefelwasserstoff (H_2S) sind potentiell toxische Stoffe, die ihren letalen Effekt durch die Bindung an der aktiven Seite der Cytochromoxidase 3a ausüben. Dadurch wird die Übertragung eines Elektrons von NADH auf O_2 verhindert [30] und der aerobe Zellmetabolismus unterbrochen. Die im Körper entstandenen Zyanide, wie sie z.B. bei oxidativen Prozessen in Leukozyten und neuronalen Zellen entstehen, werden durch Rhodanese in die weniger toxischen Thiocyanide (SCN^-) umgewandelt. Dabei katalysieren sie den Transfer eines Schwefel-Atoms von einem Sulfan-Schwefel enthaltenden Donormolekül (Thiosulfat, Persulfide, Polythionate) auf ein thiophiles Akzeptormolekül (Zyanide, Sulfate) [20; 31], s. Abb.1.3. .

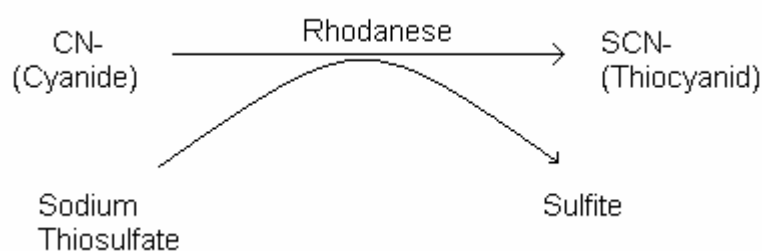


Abb.1.3: Chemische Reaktion der Metabolisierung von Zyanid zu Thiocyanid.

Bei dieser Reaktion wird ein Schwefel-Atom von einem Schwefeldonor, hier Natriumthiosulfat (Sodium Thiosulfate), auf die Thiolgruppe im Cysteinrest C247 von Rhodanese übertragen. Dabei bildet sich ein Disulfan. Anschließend bildet sich die Thiolgruppe zurück, Zyanid wird sulfidiert unter Bildung von Thiocyanid.

1.4.2 Superoxiddismutase (SOD)

Die Superoxiddismutase (SOD) ist als „Radikalfänger“ Bestandteil eines wichtigen Abwehrmechanismus des Körpers gegen freie Sauerstoffradikale. Sie ist in erster

Linie für die Abwehr des ROS vermittelten Schadens verantwortlich [7]. Die Superoxiddismutase (SOD) bildet eine Familie von drei Metalloenzymen, der SOD-1, SOD-2 und SOD-3. Die SOD-2 ist ein 22 kDa schweres Homotetramer, welches ein Manganatom in der katalytischen Untereinheit enthält [8]. Im Gegensatz zur SOD-1 ist die SOD-2 mitochondrial lokalisiert [32]. Die SOD-3 ist eine im extrazellulären Raum vorkommende Kupfer und Zink enthaltene Superoxiddismutase. Sie kommt im Darm, Blut, Lympfhflüssigkeit und in der Synovia vor. [7; 33] Diese drei Enzyme katalysieren die Oxido-Reduktion von reaktiven oxidativen Stoffen (ROS) wie z.B. Superoxidanionen. Jedoch unterscheiden sie sich sowohl in der Lokalisation als auch in ihrem aktiven Zentrum. Allgemein wandelt die SOD zwei Superoxidmoleküle durch Disproportionierung in Sauerstoff (O_2) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) um (s. Abb. 1.5) [8; 32; 34]. Durch diese Umwandlung beugt sie der Bildung von hoch aggressiven Komponenten wie Peroxynitrite ($ONOO^-$) und Hydroxylradikalen (HO^\bullet) vor [8].

Für die Eliminierung von H_2O_2 stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Das entstandene Wasserstoffperoxid (H_2O_2) kann durch die Katalase [8] in Wasser (H_2O) umgewandelt und eliminiert werden. H_2O_2 kann alternativ benutzt werden, um Glutathion zu Glutathion-Disulfid durch die Glutathionperoxidase [8] zu oxidieren, das anschließend durch die Glutathionreduktase reduziert wird (s. Abb. 1.4)

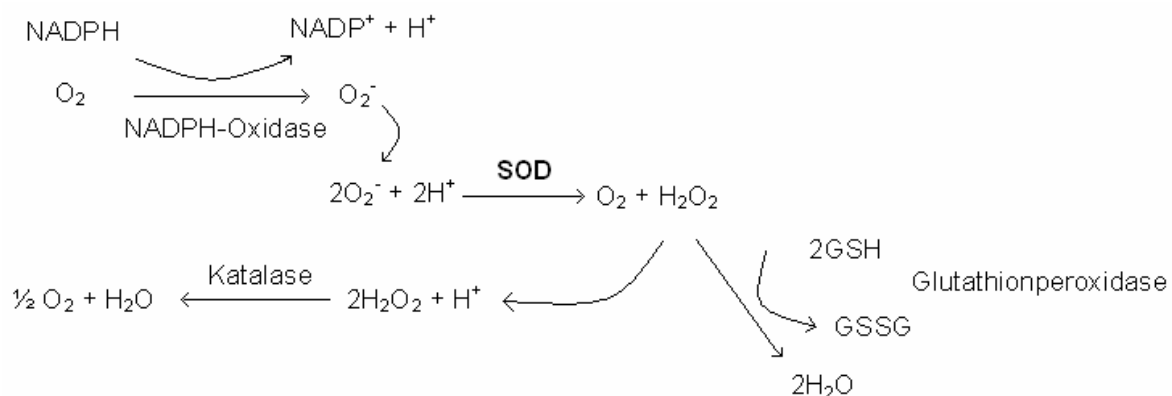


Abb.1.4: Die Zentrale Stellung der SOD in der Detoxifikation von ROS.

Allgemein wandelt die SOD zwei Superoxidmoleküle durch Disproportionierung in Sauerstoff (O_2) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) um. Für die Eliminierung von H_2O_2 stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Das entstandene (H_2O_2) kann durch die Katalase [8] in Wasser (H_2O) umgewandelt und eliminiert sowie benutzt werden, um Glutathion zu Glutathion-Disulfid durch die Glutathionperoxidase [8] zu oxidieren, das anschließend durch die Glutathionreduktase reduziert wird.

Jedoch kann das entstandene H_2O_2 auch in Gegenwart von Eisen (Fe^{2+}) oder anderen Übergangsmetallen (Kupfer (Cu^{2+}), Kobalt (Co^{2+})) sehr schnell, durch Übertragung eines dritten Elektrons, in ein Hydroxyl-Ion und in das sehr reaktive Hydroxylradikal (OH^\bullet) umgewandelt werden [8]. Diese Reaktion wird in biologischen Systemen als eine der Hauptquellen für die Bildung von ROS in der Zelle gesehen. OH^\bullet seinerseits kann Proteine, Lipide und Nukleinsäuren schädigen, in dem es mit ihnen reagiert [8;35-37].

Die SOD-1 (Cu/Zn-SOD) ist ein Isoenzym der Superoxiddismutasefamilie. Dieses lösliche Enzym wird fast ausschließlich im Zytoplasma vieler Körperzellen exprimiert, ist aber auch im Zellkern und in den Räumen zwischen den Mitochondrienmembranen zu finden [8]. Sie funktioniert als Homodimer und weist ein Molekulargewicht von 19 kDa auf. Dieses Homodimer besteht fast nur aus β -Faltblättern, einer α -Helix und der Kupfer-Zink-Verbindung im katalytischen Zentrum jeder Untereinheit. Bisher konnte über die SOD-1 gezeigt werden, dass sie bei Mäusen, die eine SOD-1-Mutation aufweisen, mit einer erhöhten Apoptose und oxidativer Proteinschädigung assoziiert ist [8]. Eine Überexpression von SOD-1 ist mit einem Schutz des zerebralen Gewebes vor Ischämie oder Morbus Parkinson bei Mäusen assoziiert [8; 38]. Studien konnten zeigen, dass sich die SOD-1-Transkription als Antwort auf verschiedene Stimuli, wie Hitzeschock, Sheerstress, Schwermetalle und oxidativen Stress, erhöht. Dies zeigt, dass dieses Enzym in Zellantwort zu verschiedenen Arten von Stress involviert ist. [8]

Beim Menschen ist eine Mutation der SOD-1 verantwortlich für neurodegenerative Erkrankungen (z.B. Amyotrophe Lateralsklerose (ALS)) assoziiert mit oxidativer Schädigung [8; 39]. Des Weiteren ist sie gut charakterisiert als ein Fänger von freien Sauerstoffradikalen, die im Körper gebildet werden. Da SOD-1 eine essentielle endotheliale Vasodilatatorfunktion aufweist, konnten klinische Studien zeigen, dass eine reduzierte SOD-1 mit einem erhöhten vaskulären oxidativen Stress assoziiert ist und dadurch die endothelabhängige Vasodilatation bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit und Herzinsuffizienz beeinträchtigt [40].

1.5. Ein oxidatives Enzym - die NAD(P)H-Oxidase (NOX)

Die NAD(P)H-Oxidase der Phagozyten (NOX 2) wird sehr stark in Granulozyten, Monozyten bzw. Makrophagen exprimiert. Die NOX-Familie besteht aus mehreren NAD(P)H-Oxidasen, welche sich teilweise vom Aufbau sehr unterscheiden und in

verschiedenen Geweben vorkommen. Eines haben sie aber gemeinsam, sie können Elektronen über die Plasmamembran der Zelle transportieren, um Superoxide und andere reaktive Sauerstoffradikale zu bilden. [12] Aufgrund der unterschiedlichen Gewebeverteilung und den verschiedenen Aktivierungsmechanismen der einzelnen „Familienmitglieder“ ist die physiologische Funktion der NOX sehr vielfältig. In Granulozyten und Monozyten liegt das Hauptaugenmerk bei der Abwehr von Mikroorganismen. In anderen Zellen wie glatte Muskelzellen, Endothelzellen oder in verschiedenen Organen wie Leber oder Niere liegen die Funktionen der NOX im Bereich der posttranslationalen Prozessierung von Proteinen, zellulärer Signaltransduktion, Regulation von Genexpression und Zelldifferenzierung [12]. Die NOX ist ein Enzymkomplex, der aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzt ist. Die verschiedenen Komponenten sind teils in der Membran und teils im Zytosol lokalisiert. Die Struktur der NOX stellt sich folgendermaßen dar: Die N-terminale Hälfte beherbergt ein Cluster aus sechs Transmembransegmenten, welche innerhalb der Segmente zwei Häm gebunden haben. An der C-terminalen Hälfte befindet sich eine Bindungsdomäne für FAD und NADPH [41]. Den katalytischen Kern der NOX bildet das Flavocytochrom b_{558} , das die NAD(P)H-abhängige Reduktion von O_2 in das Superoxid anion O_2^- in phagozytierenden, endothelialen Zellen und anderen organspezifischen Zellen wie Niere oder Darm katalysiert [41].

Das Flavocytochrom b_{558} ist ein Heterodimer, welches aus einem großen Glykoprotein $gp91^{phox}$ als β -Untereinheit und einem kleinen nicht glycolysierten Protein $p22^{phox}$ als α -Untereinheit besteht. Diese sind in der Plasmamembran verankert. Die anderen Komponenten der NOX, namens $p47^{phox}$, $p67^{phox}$, $p40$ und $Rac\ 1$ oder $Rac\ 2$, sind wasserlösliche Proteine des Zytosols. Diese zytosolischen Proteine werden bei Zellaktivierung in die Plasmamembran verlagert und führen zur Aktivierung des membranständigen Flavocytochrom b_{558} , welches daraufhin O_2^- bildet (s. Abb. 1.5). [42] Das Glycoprotein $gp91^{phox}$ enthält Bindungsdomänen für NAD(P)H, FAD und Häm. Diese stellen das komplette System des Elektronentransfers von NAD(P)H zu molekularem Sauerstoff dar [41].

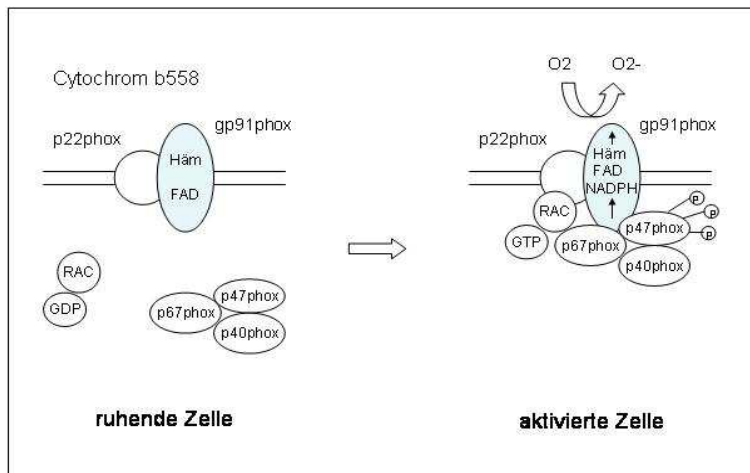


Abb. 1.5: Der NAD(P)H-Oxidase-Komplex in einer ruhenden und aktivierten Zelle.

Bei Stimulierung der Zelle kommt es zur Aktivierung von gp91^{phox} [12; 41]. Diese zytosolischen Proteine werden bei Zellaktivierung in die Plasmamembran verlagert und an p22^{phox} gebunden, was zur Stabilisierung des Komplexes führt [12; 41]. Dies führt zur Aktivierung des membranständigen Flavocytochrom b₅₅₈, welches daraufhin O₂⁻ bildet [42]. In phagozytierenden Zellen befindet sich dieser Komplex in intrazellulären Vesikeln, der bei Aktivierung mit der Zellmembran fusioniert. Anschließend wird das gebildete O₂⁻ in den Extrazellulärraum freigesetzt. [12]

Im Vergleich zur endothelialen NOX ist p22^{phox} zusammen mit gp91^{phox} bei phagozytierenden Zellen in einer Membran eines intrazellulären Vesikels gespeichert. Bei Aktivierung der Zelle kommt es zur Translokation des Vesikels in die Zellmembran oder in die Membran des Phagosoms der Zelle. O₂⁻, das von der NOX generiert und weiter zu H₂O₂ metabolisiert wird, wird im Phagosom durch die Myeloperoxidase (MPO) unter Cl⁻ Verbrauch zu Hypochlorsäure (HOCl) konvertiert. Während der Phagozytose produzieren Makrophagen große Mengen an NO. NO wiederum reagiert mit Superoxiden zu den hochreaktiven Peroxinitriten (ONOO[•]) [43; 44]. Die ROS-Produktion, eingeschlossen die Produktion von Superoxiden und H₂O₂ durch die NOX 2 und HOCl, gebildet durch die MPO, wird mit Gewebeschäden unter chronisch entzündlichen Bedingungen in Verbindung gebracht [44]. Denn ROS löst schädliche Effekte auf die Funktion von Gefäßen durch verschiedene Mechanismen aus. Erstens kann ROS direkt Zellmembranen und Zellkerne schädigen. Zweitens können sie mit endogenen vasoaktiven Mediatoren, die in Endothelzellen gebildet werden, interagieren. Drittens kommt es aufgrund der Lipidperoxidation durch ROS zur Bildung von oxidiertem LDL, das einen Schlüsselmediator bei der Bildung der Arteriosklerose darstellt, denn nur oxidiertes LDL kann in Makrophagen/Monozyten akkumulieren. Zusätzlich ist oxidiertes LDL an der Entwicklung der Arteriosklerose durch zytotoxische und chemotaktische Aktionen bei Monozyten sowie bei der Hemmung der Makrophagen Motilität beteiligt.

[34] Mutationen oder Störungen im Bereich der einzelnen Membran- oder Plasmaproteine führen unter anderem zu Störungen der Funktion der NOX, sodass Mutationen, z.B im Bereich des Cytochrom b_{558} und anderen Subunits, die zur verminderten Aktivität von NOX führen, Immunsuppression, chronische Granulomatose oder Hypothyreose hervorrufen. Eine Überaktivität der NOX spielt in vielen verschiedenen Pathogenesen eine Rolle, jedoch seien besonders die kardiovaskulären und neurodegenerativen Erkrankungen erwähnt. [44]

1.6 Die Rolle des oxidativen Stresses in Bezug auf die Krankheitsentstehung bei Patienten mit chronischer Hämodialysebehandlung.

Freie Sauerstoffradikale sind Nebenprodukte des normalen Zellmetabolismus. Eine Überproduktion der hochtoxischen und zellschädigenden Metabolite verursacht jedoch eine Menge von Krankheiten [8]. So können ROS den Alterungsprozess beschleunigen [45]. Sie sind ein Faktor in der Pathogenese von malignen Erkrankungen [44; 46], Arthritis [8], Anämien [45; 47], Malnutrition, diversen Infektionen, Arteriosklerose und den damit verbundenen kardiovaskulären Erkrankungen [34; 48]. Ein erhöhtes Arterioskloserisiko bei CKD-Patienten unter Hämodialysetherapie ist mit einer vermehrten Bildung von ROS assoziiert. Die antioxidativen Abwehrmechanismen als Gegenspieler der Oxidanzien sind bei Patienten mit Urämie und bei CKD-Patienten stark beeinträchtigt und verschlimmern sich zunehmend mit dem Grad der Niereninsuffizienz. Zudem spielt der Entzündungszustand, der durch die Hämoinkompatibilität des Dialysesystems verursacht wird, eine entscheidende Rolle. So hat sich der oxidative Stress als einer der Hauptbefunde bei CKD-Patienten herausgestellt. Viele Patienten im CKD-Stadium 5 mit Hämodialysetherapie leiden im Verlauf der Behandlung im stärker unter Entzündungen, vermehrten Infektionen, Arteriosklerose, Bluthochdruck und KHK. Unter pathologischen Bedingungen führt eine erhöhte Bioaktivität von ROS zu endothelialen Zellschädigungen mit Erhöhung der Permeabilität und Migration von Entzündungszellen wie neutrophile Granulozyten [8] und Monozyten, sowie zu einer gesteigerter Kontraktilität, Wachstum glatter Gefäßmuskelzellen [43], Lipidperoxidationen [8; 34] und Entzündungen [8]. Diese Veränderungen durch ROS spielen eine wichtige pathophysiologische Rolle bei der Entwicklung von Arteriosklerose und dem damit verbundenen Bluthochdruck dieser Patienten. Es wird davon ausgegangen, dass es durch die Hämodialysetherapie zusätzlich zu einer

Produktion von ROS kommen kann [11]. Diskutiert werden dazu verschiedene Möglichkeiten. Zum einen die Beeinträchtigung des antioxidativen Systems während der Hämodialyse (HD) [49-52], die vermehrte Modifikation von Proteinen [53] sowie die Aktivierung der Zellen des mononukleären Phagozytensystems an der Dialysemembran während der Hämodialyse [52; 54-55]. Die unphysiologische Exposition von Blutzellen an Licht [11], Lipopolysaccharide (LPS) und andere bakterielle Produkte, die im Dialysat vorkommen, kann zu einer Aktivierung der Granulozyten und auch Monozyten führen. Die phagozytierenden Zellen werden einerseits direkt durch Zytokine, wie Interleukin 1 und TNF- α , welche potente „Primer“ zur Aktivierung des „Respiratory Burst“ in neutrophilen Granulozyten sind [56] und andererseits über den alternativen Weg des Komplementsystems aktiviert [45; 57]. Das dabei entstehende C5a führt wie die Stimulation über TNF- α zu einer Aktivierung der NADPH-Oxidase (NOX 2) [9] und einer Inaktivierung der SOD [8]. Die bei Aktivierung der NOX 2 entstandenen Radikale können durch Oxidation von Lipiden und Proteinen zu einer Schädigung von Lipidmembranen und zu Veränderungen der Enzymaktivitäten führen [9]. Oxidiertes LDL ist ein Schlüsselmediator in der Bildung der Arteriosklerose, denn nur oxidiertes LDL kann in Makrophagen/Monozyten akkumulieren [34]. Außerdem triggert es die Adhäsion und die Migration von Monozyten am Endothel [58]. Die Migration in die Gefäßwand ist das kritische Ereignis zu Beginn der Arterioskleroseentstehung [58]. Die Arteriosklerose wiederum ist eine der Ursachen für Hypertonie und kardiovaskuläre Erkrankungen [34; 59] bei CKD-Patienten. Die Arteriosklerose spielt bei CKD-Patienten eine wichtige Rolle im Zusammenhang zwischen der Morbidität und Mortalität. Sie und ihre Folgen stellen die Haupterkrankungs- und Todesursache bei Dialysepatienten dar [15; 56; 59-60]. Ihre Entstehung und die Pathogenese dieser vaskulären Veränderung sind sehr komplex und bisher noch nicht vollständig verstanden. Neben einem erhöhten Blutdruck, der durch eine Veränderung der Gefäßarchitektur und der biophysikalischen Eigenschaften der Arterien und Arteriolen mit Elastizitätsverlust zu Stande kommt, entsteht die plaquebildende Arteriosklerose auf dem Boden einer verstärkten Entzündung, Lipidoxidation und Monozyteneinwanderung bei oxidativem Stress. Ein anderer Ansatz, in Hinsicht auf die Entstehung von arteriosklerotischen Plaques bei CKD-Patienten mit Urämie unter Hämodialysebehandlung, ist die vermehrte Bildung von Zyaniden. Nicht nur Raucher weisen eine vermehrte Plasmakonzentration an Cyaniden und Thiocyaniden [61], die

die Arteriosklerosebildung beschleunigen, auf, sondern auch CKD-Patienten [62]. Thiocyanide stellen, so weiß man, ein Substrat für die Leukozytenperoxidase dar. Dieses Peroxidase/Thiocanid/H₂O₂ -System treibt die Lipidperoxidation und die Carbamylierung von Lipoproteinen voran. [61] Dies ist ein prädisponierender Faktor für die Entstehung von Entzündungen und die Bildung von arteriosklerotischen Plaques. Die Lipidperoxidation wird durch SCN in Gegenwart von MPO in einem dosisabhängigen Verhalten beschleunigt [63]. Diese arteriosklerotischen Plaques können suffizient größer werden und den Blutfluss in den Gefäßen blockieren. Die wichtigste klinische Komplikation ist dabei ein akuter Verschluss aufgrund der Bildung eines Thrombus oder eines Blutgrinnsels. Dieser akute Verschluss hat meist einen Myokardinfarkt oder cerebralen Insult zur Folge. [34] Andere Ursachen für einen erhöhten Blutdruck niereninsuffizienter Patienten bestehen darin, dass die Bioverfügbarkeit von NO vermindert ist. ROS inaktiviert NO [64]. Denn NO besitzt über einen vasodilatierenden Effekt Einfluss auf die Tonizität und endotheliale Funktion von Gefäßen [43]. Die Hypertonie der CKD-Patienten wird verstärkt, weil eine Verminderung an NO zudem eine verstärkte Vasokonstriktion der renalen Gefäße zur Folge hat [65] Diese Vasokonstriktion führt zur Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems mit gesteigerter Natriumreabsorption und zunehmender Vasokonstriktion im vaskulären System und letztendlich zu einem erhöhten Blutdruck [66]. Die gesteigerte Aktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems bedingt eine vermehrte Stimulierung des AT₁-Rezeptors, der in peripheren endothelialen Gefäßzellen und Fibroblasten eine Stimulierung der nicht-phagozytischen NADPH-Oxidase verursacht [66]. Dadurch wird eine weitere Bildung von ROS angeregt und ein so genannter Circulus vitiosus aufrecht erhalten. Dieser Bluthochdruck kann im Verlauf der Erkrankung Gefahren eines Insults, Myokardinfarkts, diverse Organschäden und eine Verstärkung der Arteriosklerosebildung zur Folge haben.

Bisherige epidemiologische Studien zeigten, dass geringe Mengen an Antioxidanzien mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen assoziiert sind [64]. Der genaue Mechanismus von CKD-induziertem oxidativen Stress konnte bisher noch nicht eindeutig herausgefunden werden. Bekannt ist z.B., dass Erythrozyten aufgrund einer verminderten SOD und somit einer verminderten antioxidativen Kapazität in CRF-Pateienten eine verminderte Lebensdauer aufweisen [64; 67-70]. Jedoch ist noch unbekannt, ob die SOD aufgrund einer Aktivitätsminderung durch

das Urämische Milieu oder aufgrund von SOD-Protein-Verminderung zu Stande kommt [7]. Die SOD und andere Antioxidanzien kommen nicht nur in Erythrozyten, sondern auch in Endothel- und glatten Muskelzellen sowie in Zellen des mononukleären Phagozytensystem vor, sodass auch bei diesen Zellen die Lebensdauer bei Enzymmangel durchaus beeinträchtigt ist. Von Lim WHL et al. wurde beschrieben, dass Leukozyten von Urämiepatienten in ihrer Funktion gestört sind [71]. Somit stellt sich die Frage, ob CD 14-positive Monozyten zum oxidativen Stress bei niereninsuffizienten Patienten über eine vermehrte Bildung von ROS mit Hilfe der NAD(P)H-Oxidase oder eine verminderte antioxidative Enzymexpression von Rhodanese und SOD-1 während einer Hämodialysebehandlung beitragen.

2. Fragestellung

Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz weisen ein erhöhtes Risiko kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität auf [15; 56 ;58-60], was mit gestörter Endothelfunktion und den daraus resultierenden Folgen, wie Arteriosklerose, Hypertonie und koronarer Herzkrankheit (KHK), einhergeht. Diese gestörte endotheliale Funktion ist unter anderem auf den Oxidativen Stress zurückzuführen, dem CKD-Patienten verstärkt unterliegen. Die Ursachen des oxidativen Stresses bei CKD-Patienten mit Hämodialysetherapie sind bis jetzt noch nicht eindeutig geklärt. Mögliche Stimuli für eine erhöhte Produktion an ROS bei hämodialysepflichtigen Patienten sind unter anderem der Urämiestatus, die Wahl der Dialysemembran und die mögliche bakterielle Kontamination des Dialysats [56]. Da die Radikale in einer geringen Konzentration [11] vorliegen und flüchtig [72] sind, ist es sehr schwierig, den direkten Beweis der Radikalproduktion in lebenden Organismen zu erbringen. Um den oxidativen Stress zu messen, kann man antioxidative und oxidative Enzyme in verschiedenen Zellen und im Plasma eruieren. In der hier vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Hämodialysetherapie über eine Aktivierung der CD14-positiven Monozyten mit einer erhöhten Produktion an ROS und/oder antioxidativen Enzymen assoziiert ist. Des Weiteren ist zu eruieren, ob der Grad der Niereninsuffizienz einen Einfluss auf die Entstehung des oxidativen Stresses hat. Weiße Blutzellen sind nicht nur eine Quelle der Bildung von ROS, sie sind auch Ziel ihrer eigenen, endogen produzierten Radikale [74]. CD14-positive Monozyten, als Blutphagozyten, sind daher für das Monitoring von oxidativen Stress geeignet. In der hier vorliegenden Arbeit liegt das Augenmerk bei den von CD14-positiven Monozyten synthetisierten endogenen Enzymen Rhodanese, SOD-1 und NOX 2.

Es soll mit molekularbiologischen Methoden darüber Aufschluss gegeben werden, ob die, jeweils vor und nach der Hämodialysebehandlung, gewonnenen CD 14-positiven Monozyten einer Veränderung der Expression von antioxidativen und oxidativen Genen bzw. Proteinen unterliegen und somit Bedeutung in der Rolle des oxidativen Stresses bei hämodialysepflichtigen CKD-Patienten erlangen. Des Weiteren werden lösliche Antioxidanzien im Plasma der CKD-Patienten eruieren, da diese eine noch nicht eindeutige Rolle in der Pathogenese des oxidativen Stresses spielen.

Im Einzelnen ergeben sich in der hier vorliegenden Arbeit folgende Fragen:

1. Lässt sich bei Patienten im CKD-Stadium 5, mit Hilfe der Real-Time PCR, eine Veränderung der Genexpression auf Transkriptionsebene von antioxidativ und oxidativ wirkenden Enzymen wie Rhodanese, SOD-1 und NOX 2 im Verlauf der Hämodialysebehandlung feststellen?
2. Kann mit Hilfe des In-Cell Western Assays eine quantitative Veränderung der Proteinexpression der intrazellulär in CD 14-positiven Zellen vorkommenden Rhodanese, SOD-1 und NOX 2 im Verlauf einer Hämodialysebehandlung verifiziert werden?
3. Ergeben sich mittels Real-Time PCR und In-Cell Western Assay auf Gen- und Proteinebene unterschiedliche Expressionsmuster zwischen CKD-Patienten im Stadium 5 der chronischen Niereninsuffizienz mit Hämodialysebehandlung, CKD-Patienten ohne Hämodialysetherapie und gesunden Kontrollprobanden?
4. Ergeben sich quantitative Veränderungen in der Konzentration löslicher Antioxidanzien im Verlauf einer Hämodialysebehandlung und welche Rolle spielen diese für CKD-Patienten?
5. Gibt es Unterschiede im Konzentrationsgehalt der löslichen Antioxidanzien zwischen CKD-Patienten im Stadium 5 der chronischen Niereninsuffizienz mit Hämodialysebehandlung, CKD-Patienten ohne Hämodialysetherapie und gesunden Kontrollprobanden?

3. Geräte und Materialien

3.1 Geräte

Die für alle Methoden verwendeten Geräte sind gesamt in Tabellenform nachstehend aufgeführt.

Tab. 3.1: Geräte

Blotkammer	Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, BIO-RAD, Laboratories, Inc., Hercules, USA
Gelelektrophoresekammer	BIO-RAD Laboratories, Inc., Hercules, USA
Feinwaage	Sartorius [®] , Göttingen, Deutschland
Fluoreszenzmesser	Odyssey [®] Infrared Imaging System, LICOR [®] , Lincoln, USA
LightCycler 2.0 Instrument	Roche [®] Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Magnet für Reaktionsgefäße	DYNAL MPC [®] - S, DYNAL [®] Biotech, Oslo, Norwegen
Magnetplatten für Mikrotiterplatten	DYNAL MPC [®] , Oslo, Norwegen
Mikrotiterschüttler	IKA [®] MTS 2/4 digital, Staufen, Deutschland
Spektrophotometer	Multiscan Ascent Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finland
Ultraschallbad	Sonorex RK 52H, Bandelin [®] , Mörfelden-Walldorf, Deutschland
UV-Flächenstrahler	Fluorescent Tables Renner GmbH, Darmstadt, Deutschland
Vortexer	Vibrofix VF 1 Electronic, IKA [®] , Staufen, Deutschland
Zentrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
PTC-100 [™] Thermocycler	MJ Research, Inc., Watertown, USA

Tab. 3.2: Verbrauchsmaterialien

Vakutainerröhrchen für BE	BP Vacutainer Systems, Plymouth, UK
Zentrifugal Filter	Amicon Ultra, Millipore [®] , Inc., Austin, USA
96- Well- Platten	Nunc [®] , Roskilde, Dänemark
Stahlkanüle (30 GA ½ IN, 0,3x13 mm)	Becton Dickinson S.A., Madrid, Spanien

3.2 Chemikalien und Biochemikalien

Alle Chemikalien und Biochemikalien sind hier einzeln für die jeweilige Methode aufgeführt.

3.2.1 Monozytenisolierung mittels Beads aus Vollblut

Histopaque [®] -1077	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dynabeads [®] M450 CD14	DYNAL [®] Biotech, Oslo, Norwegen
RNA ^{later} [®] (RNA stabilisierende Lösung)	Ambion, Inc., Austin, USA
HBSS (s. Tab. 3.3)	

Alle Chemikalien zur Herstellung von HBSS-Puffer stammen von folgenden Firmen:

FLUKA Chemika	Steinheim, Deutschland
Sigma-Aldrich [®]	Steinheim, Deutschland

Tab. 3.3: Zusammensetzung des HBSS-Puffers (Hank's Balanced Salt Solution)

	Konzentration (g/L)	molare Masse (mM)
NaCl ₂	7,94	136,00
KCl	0,40	5,40
KH ₂ PO ₄	0,06	0,44
Na ₂ HPO	0,06	0,34
D-Glucose	1,00	5,60
CaCl ₂	0,147	1,00
MgCl ₂	0,203	1,00
HEPES	2,383	10,00

Die Konzentration bezieht sich auf 1 L Aqua bidest.
Der pH- Wert wurde mit 1 M Natronlauge (NaOH) auf 7,4 titriert.

3.2.2 RNA-Isolierung

High Pure RNA Isolation Kit	Roche [®] Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Polypropylenröhrchen	Roche [®] Diagnostics, Mannheim, Deutschland

3.2.3 Agarosegelelektrophorese für den Nachweis von RNA

Agarose	SeaKem [®] CAMBREX Bio Science Rockland, Inc., Rockland, USA
MOPS-EDTA-Sodium Azetat Puffer	SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Deutschland
Ladepuffer (2-fach)	Ambion Inc., Austin, USA
Ethidiumbromid	SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Deutschland

3.2.4 Reverse Transkription von mRNA zu cDNA

DEPC- Wasser	Ambion Inc., Austin, USA
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche [®] Diagnostics, Mannheim, Deutschland

3.2.5 Real-Time PCR

LightCycler[®] FastStart DNA Master^{Plus}

SYBR Green I Kit

Roche[®] Diagnostics,
Mannheim, Deutschland

Primer (s. Tab. 4)

Metabion[®], Martinsriet,
Deutschland

DEPC- Wasser

Ambion Inc., Austin, USA

Tab. 3.4: PCR Primer

Gene	Primer Sequenz: 5' → 3'	Größe (bp)
SOD1	F: CAGTGCAGGTCCTCACTTTA R: CCTGTCTTTGTACTTTCTTC	240
Rho	F: TGGTGGATGTTCCGTGTGTT R: TGAAAGGCATGTTGACGGCA	305
gp91 ^{phox}	F: TCACTTCCTCCACCAAACC R: GGGATTGGGCATTCCTTTAT	211
BA	F: GGACTTCGAGCAAGAGATGG R: AGCACTGTGTTGGCGTACAG	234
GAPDH	F: AACTGATTAGCACCCCTGGC R: ATGACCTTGCCCACAGCCTT	200
SGK 1	F: TTCTCTTTCCAGACTGCTGA R: TGGATGTTGTGCTGTTGTGT	277

3.2.6 Agarosegelelektrophorese für den Nachweis von cDNA

Agarose	SeaKem [®] LE, CAMBREX Bio Science Rockland, Inc., Rockland, USA
TBE- Puffer	Invitrogen [™] , Carlsbad, USA
Marker	New England BioLabs Inc., Ipswich, USA
Ethidiumbromid	SIGMA-ALDRICH [®] , Steinheim, Deutschland
SDS- Ladepuffer	eigene Herstellung

3.2.7 Western Blot

Alle benutzten Chemikalien für den Western Blot stammen von folgenden Firmen:

Ambion Inc., Austin, USA

Biochrom AG Inslamed[®], Berlin, Deutschland

BIO-RAD, Laboratories, Inc., Hercules, USA

Invitrogen[™], Carlsbad, USA

LI-COR[®], Lincoln, USA

New England Biolabs Inc., Ipswich, USA

Roche[®] Diagnostics, Mannheim, Deutschland

ROTH[®], Karlsruhe, Deutschland

SIGMA-ALDRICH[®], Steinheim, Deutschland

Immunopräzipitation

Tab. 3.5: Lysepuffer 1 (=Waschpuffer I)

	mM
Tris-HCl pH 8.0	25
NaCl	1000
NaF	1000
β-ME	1000
EDTA	200
Complete Mini	

Tab. 3.6: Lysepuffer 2 (=Waschpuffer I)

	mM
dest. Wasser	
Sucrose	700
HEPES pH 7,2	200
EDTA	200
DTT	100
PMSF	200
Complete Mini	

Tab. 3.7: Waschpuffer II

	mM
Tris pH 7.5	50
NaCl	500
	% (w/v)
Nonidet P40	0,1
Natriumdeoxycholat	0,05

Tab. 3.8: Waschpuffer III

	mM
Tris pH 7.5	50
	% (w/v)
Nonidet P40	0,1
Natriumdeoxycholat	0,05

SDS- Page

Tab. 3.9: Separationsgel, 12,5%

	mM
TrisHCL pH 8,8	1500
	% (w/v)
SDS	10
APS	10
ACRYL/BIS	30
H ₂ O	
TEMED	

Tab. 3.10: Sammelgel

	mM
TrisHCL pH 6,8	1000
	% (w/v)
ACRYL/BIS	30
SDS	10
APS	10
H ₂ O	
TEMED	

Tab. 3.11: Elektrophoresepuffer, 10-fach
(BIO-RAD, Laboratories, Inc., Hercules, USA)

	mM
Glycin	192
Tris.HCL, pH 8,3	25
	% (w/v)
SDS	0,1

Tab. 3.12: SDS Ladepuffer, 2-fach

	mM
Tris.HCL, pH 6,8	50
	% (w/v)
SDS	1
Glycerol	15
β- Mercaptoethanol	1
Bromphenol Blau	0,05
H ₂ O	

Tab. 3.13: Towbin Puffer, 10-fach, pH 8,3
(BIO-RAD Laboratories, Inc., Hercules, USA)

	mM
Tris.HCL,	25
Glycin	193

Antikörper

gp91 ^{phox} (H60)	Santa Cruz Biotechnologie, Ing., Santa Cruz, USA
gp91 ^{phox} (C-15)	Santa Cruz Biotechnologie, Ing. , Santa Cruz, USA
Rhodanese	Santa Cruz Biotechnologie, Ing. , Santa Cruz, USA
SOD 1	Abcam Ltd., Cambridge, UK
GAPDH (V-18)	Santa Cruz Biotechnologie, Ing. , Santa Cruz, USA
Beta Aktin	Abcam Ltd., Cambridge, UK
Alexa Fluor [®] 680	MoBiTec, Eugene, Origen, USA
IRDye [™] 800 CW	CAMBREX Bio Science Rockland, Inc., Rockland, USA

Tab. 3.14: Art und Verdünnung der Antikörper

Primäre Antikörper		Verdünnung
Gp91 ^{phox} (H60)	rabbit anti-human	1:500
Gp91 ^{phox} (C-15)	goat anti-human	1:500
Rhodanese	rabbit anti-human	1:500
SOD-1	sheep anti-human	1:500
Beta Aktin	rabbit anti-human	1:500
GAPDH (V-18)	goat anti-human	1:500
Sekundäre Antikörper		
Alexa Fluor [®] 680	donkey anti-goat IgG (H+L)	1:1000
Alexa Fluor [®] 680	donkey anti-sheep IgG (H+L)	1:1000
IRDye [™] 800 CW	sheep anti-rabbit IgG (H+L)	1:1000
IRDye [™] 800 CW	goat anti-rabbit IgG (H+L)	1:1000

3.2.8 In-Cell Western Assay

Alle Chemikalien für den In-Cell Western Assay stammen von den Firmen:

AUG. HEDINGER Chemikalien, Stuttgart, Deutschland

LI-COR[®], Lincoln, USA

SIGMA-ALDRICH[®], Steinheim, Deutschland

Antikörper

Für den In-Cell Western Assay wurden die Antikörper der gleichen Firmen wie im Western Blot benutzt.

Tab. 3.15: Art und Verdünnung der Antikörper

Primäre Antikörper		Verdünnung
SOD-1	sheep anti-human	1:1000
Rho	rabbit anti-human	1:1000
gp91 ^{phox} (H60)	rabbit anti-human	1:1000
gp91 ^{phox} (C-15)	goat anti-human	1:1000
Beta-Aktin	rabbit anti-human	1:1000
GAPDH (V-18)	goat anti-human	1:1000
Sekundäre Antikörper		Verdünnung
Alexa Fluor [®] 680	donkey anti-goat IgG (H+L)	1:1000
Alexa Fluor [®] 680	donkey anti-sheep IgG (H+L)	1:1000
IRDye [™] 800 CW	goat anti-rabbit IgG (H+L)	1:1000
IRDye [™] 800 CW	sheep anti-rabbit IgG (H+L)	1:1000

3.2.9 Messung der gesamten antioxidativen Kapazität im Plasma

Alle benutzten Reagenzien, zur Messung der gesamten antioxidativen Kapazität im Plasma, stammen aus dem Total Antioxidant Status Assay Kit von Calbiochem[®], Darmstadt, Deutschland.

4. Methoden

4.1 Isolierung von CD14 positiven Monozyten aus Vollblut

Vollblut von Dialysepatienten wurde aus dem arteriellen Teil des arteriovenösen Shunts in eine heparinisierte Einmalspritze, jeweils vor und nach der Dialysebehandlung, entnommen. Bei gesunden Probanden und nicht-hämodialysepflichtigen Patienten wurde das Blut mittels heparinisierte Einmalspritze aus dem venösen System, meist über die Vena cubiti, entnommen.

Die CD 14-positiven Monozyten wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation und anschließend mit Hilfe von Dynabeads[®] aus dem Vollblut isoliert. Diese Zellen haben die Eigenschaft, in einem starken Zentrifugationsfeld zu sedimentieren und sich entsprechend ihrer Größe entlang eines Gradienten einzuordnen. Dieser lineare Gradient wird durch eine Saccharoselösung erzeugt. Des Weiteren wird die Sedimentation durch das Gewicht, die Dichte und durch die Gestalt der Zellen bestimmt. Durch die Zentrifugation entstehen Banden, welche man optisch erfassen und mit Hilfe von dünnen Einmalpipetten absaugen kann (s. Abb. 4.1). Um CD 14-positive Monozyten zu isolieren, wurden die Zellen zusätzlich mit Dynabeads[®] inkubiert. Diese sind monoklonale Antikörper, markiert mit einem superparamagnetischen Polystyrenbead. Dynabeads[®] binden spezifisch über eine Glycosylphosphatidylverbindung an der Oberfläche von CD 14-positiven Zellen.

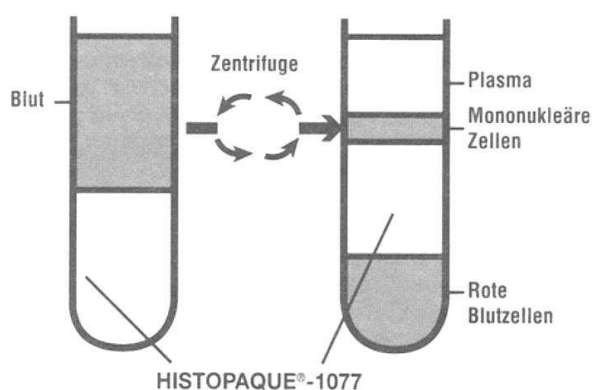


Abb. 4.1: Schematische Darstellung des Prinzips der Dichtegradientenzentrifugation.

Die Abbildung zeigt ein Röhrchen vor (rechts) und ein Röhrchen nach (links) der Dichtegradientenzentrifugation. Auf die mit Weiß dargestellte Saccharoselösung (Histopaque[®]-1077) wurde Vollblut (Grau) pipettiert. Die zu untersuchenden Zellen sedimentieren in einem starken Zentrifugationsfeld und ordnen sich anschließend entsprechend ihrer Größe entlang eines Gradienten ein. Dieser lineare Gradient wird durch die Saccharoselösung erzeugt. Mononukleäre Zellen befinden sich nach der Zentrifugation, aufgrund ihrer Größe, Dichte und Gewicht, als so genannter Leukozytenring über der Saccharoselösung.

4.1.1 Durchführung der Isolierung von CD 14-positiven Monozyten aus Vollblut

20 mL Vollblut wurde jeweils auf zwei Zentrifugationsröhrchen verteilt und anschließend zentrifugiert. Das Plasma, welches nun überstand, wurde mittels Einmalpipette abgesaugt und für weitere Tests (TAOS- Assay) bei -30°C zwischengelagert. Der sogenannte Hämatokrit wurde 1:1 mit HBSS versetzt und dann in Zentrifugationsröhrchen mit Histopaque®-1077 aufgetragen. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation. Der Leukozytenring wurde mit einer Einmalpipette abgesaugt und ein weiteres Mal zentrifugiert. Nach Dekandieren des Überstandes wurde das Pellet mit 1 mL HBSS versetzt, 25 µL Dynabeads® zugegeben und bei 4°C eine Stunde inkubiert. Nach der Inkubation wurden die von den Beads gebundenen CD 14-positiven Monozyten mit Hilfe eines Magneten (DYNAL MPC® - S) isoliert. Das erhaltene Pellet wurde in 100 µL HBSS resuspendiert.

4.2 RNA-Isolierung

Für die Isolierung von RNA wurde ein High Pure RNA Isolation Kit (Roche® Diagnostics, Mannheim, Germany) verwendet. Dieser Kit ist für die schnelle Isolierung von Gesamt-RNA aus verschiedenen Geweben und Zellen konstruiert. Die Isolierung basiert darauf, dass die zu untersuchenden Zellen zuerst lysiert und die Zelltrümmer nach Auftragen auf das Glasfaserfließ durch Zentrifugation abgetrennt werden. Die freiliegende RNA bindet das Glasfaserfließ, während Kontaminierungen, z.B. mit Salzen, Proteinen und anderen zellulären Bestandteilen, ausgewaschen werden. Die in den Zellen vorhandene DNA wird mit Zuhilfenahme von DNase denaturiert und anschließend eliminiert. Mit Hilfe eines Eluierungspuffers wird die gesamte RNA aus der Glasfaserschicht eluiert.

4.2.1 Durchführung der RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung wurde laut Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Isolierung der RNA, aus den mit RNAlater® haltbar gemachten CD 14-positiven Monozyten, erfolgte in Polypropylenröhrchen mit zwei Glasfaserfliessschichten (Roche®). Nach Resuspension der Zellen in HBSS wurden diese mit Lyse- und Bindungspuffer inkubiert, gevortext und anschließend in die Filterröhrchen pipettiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden mit DNase und Inkubationspuffer für 15 min inkubiert. Im letzten Schritt wurden die Proben mit Elutionspuffer versetzt und nochmals bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die eluierte RNA wurde anschließend bei -30°C aufgehoben.

4.3. Agarosegelelektrophorese zum Nachweis der RNA

Um den Nachweis zu erbringen, dass tatsächlich RNA isoliert wurde, wurde im Anschluss an die RNA-Isolierung eine Gelelektrophorese mit Agarose durchgeführt.

4.3.1 Durchführung der Agarosegelelektrophorese

Für die Agarosegelelektrophorese wurden 1-%ige Agarosegele (10 mg/mL MOPS-Puffer) verwendet. Dazu wurden 0,5 g Agarose in 50 mL MOPS- Puffer für RNA-Gele in der Mikrowelle vollständig gelöst. Nach Abkühlen der Agarose bis auf Handwärme erfolgte die Zugabe einer Ethidiumbromidlösung (10 mg/mL H₂O). Nach Gießen und Polymerisation des Gels wurde es in eine Elektrophoresekammer eingelegt, mit MOPS-Puffer überschichtet und anschließend beladen. Zu 10 µL RNA wurden 2 µL Ladungspuffer pipettiert und davon 10 µL auf das Gel aufgetragen. Die Laufzeit variierte zwischen 40 und 60 min bei 80 V. Das Gel ließ sich mit einem UV-Flächenstrahler betrachten und durch ein Foto dokumentieren.

4.4 Reverse Transkription von mRNA zu cDNA

Unter der reversen Transkription versteht man eine enzymatische Reaktion, bei der mittels des Enzyms Reverse Transkriptase mRNA in einzelsträngige cDNA (complementary oder copy Desoxyribonukleinsäure) umgeschrieben wird. Die cDNA ist stabiler als die mRNA und kann mittels DNA-Polymerasen wie der Taq-DNA-Polymerase leicht amplifiziert werden (Prinzip der Transkription, s. Abb. 4.2).

Für die Transkription von mRNA in cDNA wurde der Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche[®] Diagnostics, Mannheim, Germany) verwendet. Die Proben wurden mit Anchored-oligo (dT)₁₈ Primer transkribiert. Anchored-oligo (dT)₁₈ Primer sind kurze, zu DNA- Abschnitten komplementäre Primerstücke, die sich an den Poly-A-Schwanz der mRNA anlagern und dort die Synthese der cDNA beginnen.

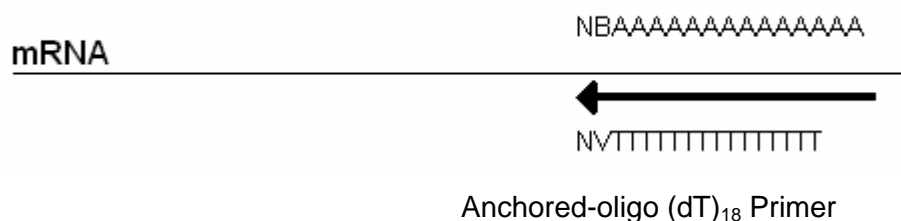


Abb. 4.2: Prinzip der Transkription von mRNA zu cDNA

Die kurzen des Anchored-oligo (dT)₁₈ Primerstücke lagern sich an den Poly-A-Schwanz der mRNA an. Durch das Enzym Reverse Transkriptase wird die mRNA in einzelsträngige cDNA umgeschrieben.

4.4.1 Durchführung der Reversen Transkription von mRNA zu cDNA

Von der, aus den CD 14-positiven Monozyten isolierten, Gesamt-RNA wird nur die mRNA in cDNA umgeschrieben. Im ersten Schritt der Transkription wurden 12 µL der extrahierten RNA mit jeweils 1 µL des Anchored-oligo (dT)₁₈ Primers für 10 Minuten bei 65°C inkubiert. Im zweiten Schritt wurde auf diesen Reaktionsansatz jeweils 4 µL RT-Reaktionspuffer, 0,5 µL RNase Inhibitor, 2 µL Deoxynukleotide Mix und 0,5 µL Reverse Transkriptase pipettiert. Dieser Ansatz wurde anschließend eine Stunde bei 50°C und 5 Minuten bei 85°C inkubiert. Im Anschluss an die Transkription wurden die Proben 1:10 mit DEPC- Wasser verdünnt und bei -20°C eingefroren .

4.5 Quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR ist eine *in-vitro* Methode, um einen definierten Bereich der DNA in kürzester Zeit millionenfach zu kopieren (Prinzip der PCR s. Abb. 4.3).

Die aus der reversen Transkription gewonnene cDNA enthält Gene, die zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme exprimiert wurden. Einzelne Gene können gesondert betrachtet werden, indem sie über spezifische Primer mittels PCR amplifiziert werden.

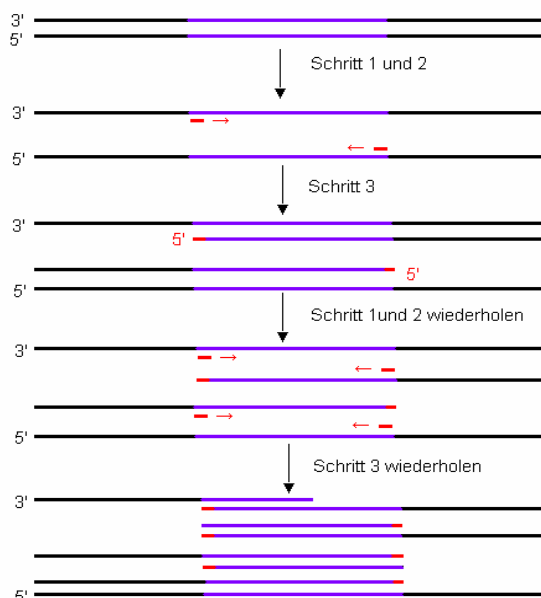


Abb. 4.3: Schematische Darstellung zum Prinzip der PCR.

Im Schritt 1 kommt es durch Temperaturerhöhung auf mind. 65°C zur Denaturierung der Doppelstrang-DNA. Im zweiten Schritt lagern sich die synthetischen Oligonucleotid-Primer unter Abkühlung der Temperatur an die Einzelstränge an. Durch die thermostabilen DNA-Polymerase in Schritt 3 werden aus einer Doppelstrang- DNA zwei Doppelstrang-DNA synthetisiert. Die Vervielfältigung der DNA kann mehrfach wiederholt werden, indem die Schritte 1-3 wiederholt werden. Nach 20 Zyklen ist die Zielsequenz auf das ca. 10^6 -fache amplifiziert. (Modifizierte Grafik nach Löffler, Biochemie&Pathobiochemie 2007.)

Bei der hier vorgelegten Untersuchung wurde die Real-Time PCR mit dem Light Cycler System von Roche[®] angewendet. Die Real-Time PCR ist eine Methode zur Detektion und Quantifizierung von Nukleinsäuren in Echtzeit. Zum Light Cycler System von Roche[®] gehören der LightCycler[®] FastStart DNA Master^{Plus} SYBR Green I Kit und das Light Cycler 2.0 Instrument mit dazugehöriger Software 4.0. Für den Nachweis der Genexpression von Antioxidanzien wie der kupfer- und zinkhaltigen Superoxiddismutase (SOD-1), Rhodanese (Rho), sowie dem oxidativ wirkenden Enzym NAD(P)-Oxidase (gp91^{phox}) und den Referenzen (Housekeeping-Genes) wie Beta-Aktin und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurden Primer, sogenannte Starthilfen, die komplementär zur cDNA-Vorlage sind, mit Hilfe von Primer 3 ausgewählt. Primer 3 ist ein Programm, bei dem man PCR-Primer von einer DNA-Sequenz auswählen kann. Referenzen sind Gene, die weitgehend konstant in einer Zelle exprimiert werden und keiner Regulation unterliegen. Diese bieten daher die Möglichkeit zur Normierung unterschiedlicher Expressionsanalysen bei der relativen Quantifizierung mittels Real-Time PCR. Folgende Kriterien wurden bei der Auswahl der Primer berücksichtigt: Länge zwischen 18 und 27 Basenpaaren, Schmelztemperaturen (optimal T_m 58°C), Gehalt an G/C reichen Sequenzen (optimal 50 %). Des Weiteren wurde auf die Überspannung von Introns geachtet. Um die Größe der Amplifikate zu bestimmen, wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt und mit Hilfe eines Markers die Größe der Amplifikate bestimmt.

4.5.1 Prinzip der Real-Time PCR mit SYBR Green I

Der Nachweis der Amplifikate wurde mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green I erbracht. Nach Denaturierung der cDNA liegen die DNA-Stränge als Einzelstränge vor. Fluoreszenzfarbstoff bindet nicht an Einzelstrang-DNA und dadurch besteht zu diesem Zeitpunkt eine geringe Hintergrundfluoreszenz. Nach Anlagerung der spezifischen Primer und Synthese von Doppelsträngen lagern sich einige SYBR Green I Moleküle an diese Doppelstränge an, wodurch die Fluoreszenz von SYBR Green I sehr stark erhöht wird. Während der Elongation werden immer mehr SYBR Green I Moleküle an doppelsträngiger DNA (dsDNA) gebunden und die Fluoreszenz steigt weiter an (s. Abb. 4.4). Diese Fluoreszenz wird im Light Cycler 2.0 durch spezifische Messkanäle gemessen. SYBR Green I kann bei 494 nm und 530 nm bestimmt werden. Bei diesen Untersuchungen wurde SYBR Green I bei 530 nm gemessen. Zur Bestimmung der Amplifikate wurde die Schmelzkurvenanalyse genutzt. Die spezifischen Produkte

besitzen eine bestimmte Temperatur, bei der die DNA wieder denaturiert. Diese als Schmelzpunkt bezeichnete Temperatur beruht auf der Länge und dem G/C-Gehalt des zu amplifizierenden Produktes. Unspezifische Produkte, wie z.B. Primer-Dimere, schmelzen bei einer anderen, meist niedrigeren Temperatur.

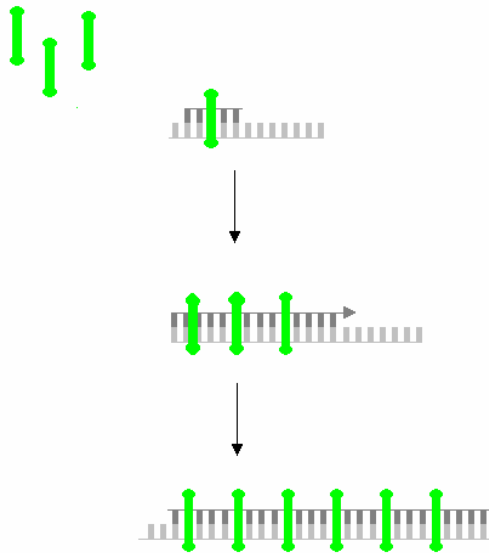


Abb. 4.4: Prinzip der Real-Time PCR mit SYBR Green I

Nach Anlagerung der Primer kommt es zur Bildung von doppelsträngiger DNA. SYBR Green I bindet an dieser neu synthetisierten dsDNA. Wenn SYBR Green I die dsDNA gebunden hat, erfolgt eine Erhöhung des Fluoreszenzsignals. In der Elongationsphase wird zunehmend dsDNA gebildet, was zu einer weiteren Erhöhung der SYBR Green I Fluoreszenz führt. Am Ende der Elongationphase hat die maximale Menge an SYBR Green I die dsDNA gebunden und somit die maximale Fluoreszenz erreicht. Diese Fluoreszenz wird am Ende jeder Elongation bei 530 nm gemessen.

4.5.2 Durchführung der Real-Time PCR mit SYBR Green I

Um SYBR Green I Master Mix herzustellen, werden 14 μL Enzym in ein Röhrchen Reaktionsmix pipettiert. Primerpaare werden immer zusammen angesetzt. Diese liegen im Stock als jeweils 100 μMol vor. Dieser Stock setzt sich aus 10 μL Forward (F) und 10 μL Reverse (R) und 180 μL DEPC-Wasser zusammen. Dieser Ansatz entspricht 5 μM .

Ansatz

(einfach, auf Eis)

cDNA (1/10 verdünnt)	2 μL
Wasser	12 μL

SYBR Green I Master Mix	4 μ L
Primer Mix (5 μ M each)	2 μ L

In die PCR-Kapillaren wurden jeweils 18 μ L des PCR-Ansatzes vorgelegt und 2 μ L der cDNA dazugegeben. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert.

Die Real Time PCR lief im Allgemeinen unter den in Tab. 4.1 aufgelisteten Bedingungen ab.

Tab. 4.1: Amplifizierungsbedingungen der Real-Time PCR mit SYBR Green I

	SOD-1	Rho	gp91 ^{phox}	BA	GAPDH	SGK1
Denaturierung (°C)	95	95	95	95	95	95
Primer Annealing (°C)	55	60	58	60	50	60
Elongation (°C)	72	72	72	72	72	72
Zyklen	45	45	35	40	40	45
Schmelzen						

4.5.3. Auswertung der Real-Time PCR

Die Auswertung der Real-Time PCR erfolgt über die kalibratornormalisierte, relative Quantifizierung mit Hilfe von Standardkurven, welche zuvor bestimmt wurden. Das heißt, dass in jeder Real-Time PCR ein Kalibrator, der aus dem gleichen Material wie die zu untersuchenden Proben besteht, mitläuft. Dieser dient zur Normalisierung der Endresultate und zur Korrektur von Chargen-zu-Chargen- und Lauf-zu-Lauf-Variationen.

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse sind als „normalisierte“ Ratio der Konzentration von Ziel-mRNA (Im weiteren Verlauf als „Target“ bezeichnet.) und Referenz mRNA angegeben (s. Abb. 4.5). Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression der Zielgene mit der eines weitgehend konstant in der Zelle exprimierten und nicht regulierten Referenzgen normalisiert. Die Expression des zu untersuchenden Gens wird auf das Referenzgen bezogen. Die Vorteile der Normalisierung liegen in der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, da Gewebe- und Matrixeffekte, unterschiedliche RNA Extraktionseffizienzen sowie Fehler bei der Reversen Transkriptase innerhalb einer experimentellen Probe gleichermaßen das Zielgen und das Referenzgen betreffen.

$$\text{Normalized Ratio} = \frac{\text{Konz. Target (Probe)}}{\text{Konz. Referenz (Probe)}} : \frac{\text{Konz. Target (Kalibrator)}}{\text{Konz. Referenz (Kalibrator)}}$$

Abb. 4.5: Dargestellt ist die Formel zur Errechnung der „normalisierten“ Ratio (Normalized Ratio). Dabei wird die Ratio, die sich aus dem Target und Referenz in der zu untersuchenden Probe ergibt, in das Verhältnis zur Ratio der Konzentration (Konz.) des Targets im Kalibrator und der Konzentration der Referenz im Kalibrator gesetzt.

4.6 Agarosegelelektrophorese zum Nachweis von cDNA

Im Anschluss an die Real-Time PCR wurde, als eine weitere Kontrolle, ergänzend zur Schmelzkurvenanalytik, eine Agarosegelelektrophorese für den Nachweis des Amplifikates erbracht. Dabei wurde ein Marker der Firma New England BioLabs® für die Größenbestimmung der Basenpaare des Amplifikates verwendet.

4.6.1 Durchführung Agarosegelelektrophorese zum Nachweis von cDNA

Für die Agarosegelelektrophorese zum Nachweis von cDNA wurden 1-%ige Agarosegele verwendet. Dazu wurde die eingewogene Agarose 1 g in 100 mL 0,5x TBE-Puffer für DNA-Gele in der Mikrowelle vollständig gelöst. Nach Abkühlen der Agarose bis auf Handwärme erfolgte die Zugabe von 2 µL einer Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml H₂O). Nach Gießen und Polymerisation des Gels wurde dieses in eine Elektrophoresekammer eingelegt, mit 0,5x TBE-Puffer für DNA-Gele überschichtet und anschließend beladen. Zu 10 µL cDNA wurden 2 µL Ladepuffer pipettiert und danach auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich zu cDNA Proben wurde noch ein Marker zur Bestimmung der Basenpaargrößen hinzugefügt. Die Laufzeit betrug ca. 50 min bei 75 V. Im Anschluss wurde das Gel unter einem UV-Flächenstrahler betrachtet und durch ein Foto dokumentiert.

4.7 Western Blot

Analog zur Analyse von DNA-Fragmenten lassen sich bei dieser Methodik Proteine mit spezifischen Antikörpern nachweisen. Vor dem eigentlichen Western Blot wird ein Proteingemisch mit Hilfe eines SDS- Page (engl. sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) in Banden entsprechend ihrer Größe und Ladung aufgetrennt.

Als Trennmedium bei dieser Art der Elektrophorese dient ein Gel auf Polyacrylamidbasis. Natriumdodecylsulfat, ein anionisches Tensid, überdeckt die Eigenladung der Proteine.

Ein senkrecht zum Polyacrylamidgel gerichtetes elektrisches Feld bringt die Proteine dazu, vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran zu wandern. Aufgrund hydrophober Wechselwirkungen bleiben diese an der Membranoberfläche haften. Die Proteinbanden, welche sich nun auf der Membran befinden, können mit Hilfe von spezifischen Antikörpern identifiziert werden.

4.7.1 Durchführung des Western Blots und der Immunopräzipitation

Als Ausgangsmaterial dienten für die Immunopräzipitation zweimal 20 mL und für den Lyseaufschluss viermal 20 mL Vollblut. Das Vollblut stammte von vier dialysepflichtigen, chronisch niereninsuffizienten Patienten. Es wurden zwei Blutproben entnommen. Jeweils vor und nach der vierstündigen Dialysebehandlung.

Die zu untersuchenden Proben wurden mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation aus Vollblut gewonnen. Um mehr Ausgangsmaterial zur Verfügung zu haben, wurde nur bis zum Leukozytenring, der Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten enthielt, gearbeitet und anschließend pelletiert.

Immunopräzipitation

Für die Immunopräzipitation wurden zwei unterschiedliche Lysepuffer (L1 und L2) verwendet. Die Pellets wurden in 1 mL L1 und L2 aufgenommen, 10 min auf Eis inkubiert und anschließend mehrere Sekunden in ein Ultraschallwellenbad getaucht. Nach der zehnminütigen Zentrifugation wurde der Überstand vom Pellet getrennt. Pellet und Überstand wurden je in ein Reaktionsgefäß pipettiert und jeweils mit 25 µL Protein G Agarose zwei Stunden bei 4 °C schüttelnd inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde nochmals zentrifugiert. Überstand und Pellet wurden in 1 mL HBSS mit 10 µL primären Antikörper versetzt und eine Stunde bei 4°C schüttelnd inkubiert. Danach wurde Protein G Agarose dazugegeben und wieder 2 h bei 4 °C und schüttelnd inkubiert. Das Pellet wurde in 1 mL Waschpuffer I aufgenommen und 20 min bei 4°C inkubiert. Es schlossen sich zwei weitere Waschschrte mit den Waschpuffern II und III, Zentrifugation und Inkubation an. Nach der letzten Inkubation und Zentrifugation wurde die Pellets in 1x SDS- Ladepuffer aufgenommen. Der Überstand wurde mit 5x SDS- Ladepuffer versetzt

und aufgekocht. Im Anschluss erfolgte eine weitere Zentrifugation, um die Protein G Agarose Beads abzutrennen.

Lyseaufschluss

Als Ausgangsmaterial für den Lyseaufschluss dienten 4 x 20 mL Vollblut von CKD-Patienten vor der Hämodialyse. Für den Lyseaufschluss wurde ähnlich verfahren wie bei der Immunopräzipitation. Nachdem die Proben pelletiert und halbiert wurden, wurden sie in Lysepuffer 1 (L1) aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 4°C zentrifugiert. Die sich daraus ergebenden Pellets wurde mit 25 mM Tris-HCl, pH 8.0 resuspendiert und anschließend mit fünffach konzentriertem SDS-Ladungspuffer aufgekocht. Der Überstand wurde mit Amicon Millipore aufkonzentriert. Dazu wurde zunächst zentrifugiert und der Überstand mit 25mM Tris-HCl, pH 8.0 versetzt. Die Hälfte des Überstandes wurde mit fünffachem SDS- Ladungspuffer aufgekocht, die andere Hälfte nicht. Alle Proben wurden anschließend mit einfachem SDS-Ladungspuffer versetzt. Das Vollblut (5 x 20 mL) der CKD-Patienten nach der Hämodialysebehandlung erfolgte gleich der Probenbehandlung der CKD-Patienten vor der Hämodialyse, nur dass vor der dreißigminütigen Inkubation auf Eis die Proben mehrmals durch eine Stahlkanüle (30 GA ½ IN, 0,3x13 mm) gezogen wurden und als Lysepuffer der Lysepuffer 2 verwendet wurde.

SDS- Page

Das noch flüssige Separationsgel wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit Wasser überschichtet, sodass eine waagerechte, gerade Trennkante gewährleistet werden konnte. Anschließend wurde das Sammelgel auf das auspolymerisierte Separationsgel gegossen und die Kämme zur Ausbildung der Probenaschen eingesetzt. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Gel mit Elektrophoresepuffer übergossen und die Taschen mit den Proteinproben beladen. Zusätzlich wurden noch zwei Marker, M1 und M2 (M1 von Biorad® und M2 von Invitrogen®) als Standard aufgetragen. Die Größenauftrennung der in den Proben enthaltenen Proteine erfolgte insgesamt über 7 h und 42 min. Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung wurde das Gel in Towbinpuffer äquilibriert.

Western Blot

Für den Blot wurden zuvor die Nitrocellulosemembran, die Pads und Papiere in Towbinpuffer bei 4°C inkubiert. Das Gel, die die Nitrocellulosemembran, die Pads und Papiere wurden, wie in Abb. 4.6 in eine Gelkassette und Blotkammer der Firma BIO-RAD Inc., Hercules, USA, geschichtet. Der Blot erfolgte über Nacht bei 13V.

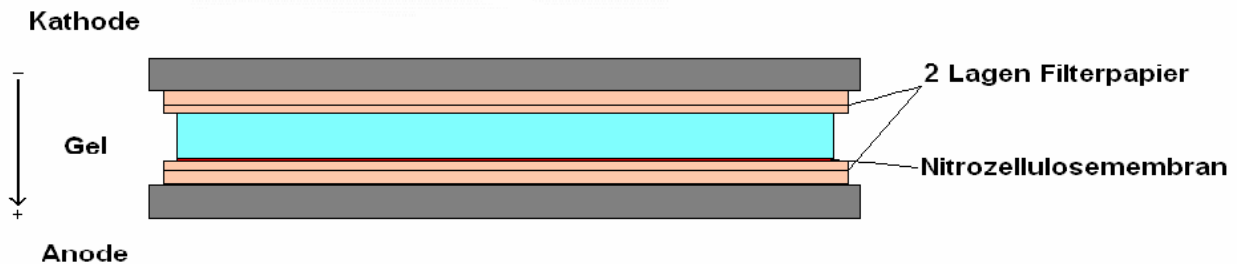


Abb. 4.6 : Aufbau eines Western Blots

Die Abbildung zeigt die graphische Darstellung eines Blots. In einer Gelkassette werden Filterpapier (Rosa), Gel (Blau) und der Nitrocellulosemembran (Rot) geschichtet und anschließend in eine Blotkammer eingesetzt und diese mit einer elektrischen Spannung versetzt. Die Proteine wandern aufgrund ihrer Ladung von der Kathode zur Anode und somit von dem Gel auf die Nitrocellulosemembran.

4.8 In-Cell Western Assay

Um Veränderungen bezüglich der Expression von antioxidativ und oxidativ wirkenden Proteinen in CD 40-positiven Monozyten im Verlauf der Hämodialysebehandlung darzustellen, wurde der In-Cell Western Assay, eine spezielle Art der Immunoblot-Technik, angewendet. Im In-Cell Western Assay werden Proteine mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern quantifiziert. Durchgeführt wurde die quantitative Proteinbestimmung von oxidativen, gp91^{phox} (NOX 2) und antioxidativen Superoxiddismutase (SOD-1) und Rhodanese (Rho) Enzymen. Als Referenzproteine dienten Beta-Aktin und GAPDH.

4.8.1 Prinzip des In-Cell Western Assay

Der Proteinnachweis erfolgte direkt in der Zelle. Die adhären Zellen wurden in Mikrotiterplatten fixiert. Daraufhin erfolgte eine Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörpern. Die primären Antikörper binden das nachzuweisende Protein spezifisch. Der sekundäre Antikörper bindet wiederum den primären Antikörper, sodass im Fluoreszenzmessgerät die gemessene Fluoreszenz die Menge an gebundenem Protein

widerspiegelt. Die Sekundärantikörper sind dabei mit Infrarotfarbstoffen konjugiert. Die Detektion der fluoreszierenden Antikörper erfolgte im infraroten Wellenbereich mit einem LI-COR Odyssey® Infrared Imager. Dies ist ein Fluoreszenzmesser, der zwei voneinander separierte Fluoreszenzkanäle enthält und somit den simultanen Nachweis von zwei Zielstrukturen ermöglicht.

Der in dieser hier vorgestellten Arbeit durchgeführte In-Cell-Western Assay wurde leicht zum ursprünglichen In-Cell-Western Assay mit Zellkulturen verändert. Es wurden CD 14-positive Monozyten, die vorher aus Vollblut isoliert wurden, verwendet. Diese CD 14-positiven Monozyten waren über die Dauer des In-Cell-Western Assays mit monoklonalen superparamagnetischen Polystyrenbeads markiert. Die Zellen waren somit nur am Boden der 96-Well-Platte fixiert, wenn sich ein Magnet an der Unterseite der Mikrotiterplatte befand. Inkubationsschritte und Dekantierungen erfolgten ausschließlich mit einem Magneten, sodass keine Zellen verloren gingen.

4.8.2 Durchführung des In-Cell Western Assay

Im Anschluss an die Isolierung von CD14 positiven Monozyten aus Vollblut erfolgte der In-Cell-Western Assay auf einer 96-Well-Platte. Dazu wurden die Zellen mit HBSS ohne Kalzium gewaschen und anschließend in 1,6 mL HBSS mit Kalzium aufgenommen. Daraufhin wurde die 100 µL der Zellsuspension pro zu untersuchender Probe gleichmäßig in die Wells der Platte vorgelegt. Nach Vorlegen der Platte wurde in jedes mit Proben beladene Well Fixierlösung (35% Formaldehyd) hinzugegeben und für 20 min bei Raumtemperatur auf dem Magneten inkubiert. Im Folgenden wurden die Zellen mehrmals mit Triton® X-100 (0,01%) unter ständigem Rütteln gewaschen. Nach dem ersten Waschschrift wurden die Zellen über Nacht mit Blocking Buffer bei 4°C inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die primären Antikörper hinzugefügt. Pro Well wurde eine 1:1000 verdünnte primäre Antikörperlösung pipettiert. Um unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers in der späteren Berechnung vernachlässigen zu können, wurden Zellen nur mit sekundärem Antikörper 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Statt des primären Antikörpers wurde HBSS/Blocking Buffer pipettiert. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Zellen unter ständigem Rütteln mehrmals mit Tween®-20 (0,01%) gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe der sekundären Antikörper, welche mit 0,1 % Tween®-20 versetzt wurden. Die Inkubationszeit betrug 1 h, lichtgeschützt unter Raumtemperatur und unter ständigem Rütteln. Die Zellen wurden nach der Inkubation mit den sekundären Antikörpern

mehrmals mit Tween[®]-20 Waschlösung (0,01%) gewaschen. Die Fluoreszenz der gebundenen sekundären Antikörper wurde im Fluoreszenzmesser gemessen. Die Emission von Alexa Fluor[®] 680 wurde bei 700nm bei einer Exzitationswellenlänge von 680nm und die von IRDye[™] 800 CW bei 800nm bei einer Exzitationswellenlänge von 780nm gemessen.

Die Auswertung der jeweiligen Targetfluoreszenz erfolgte im Verhältnis zur Referenzfluoreszenz, GAPDH oder Beta-Aktin. Dabei wurde gp91^{phox} und Rhodanese bei einer Wellenlänge von 800 nm nachgewiesen, bei gleichzeitiger Messung des Referenzproteins GAPDH, welches bei 700 nm gemessen werden konnte. Für SOD-1 wurde das Referenzprotein Beta-Aktin gewählt, der sekundäre Antikörper hierfür fluoreszierte bei einer Wellenlänge von 700 nm, sodass der Nachweis von SOD-1 bei einer Wellenlänge von 800 nm erbracht werden konnte.

4.8.3 Auswertung des In-Cell Western Assay

Die Auswertung des In-Cell Western Assay erfolgte mit dem Fluoreszenzmesser Odyssey[®] Infrared Imaging System (Lincoln, USA). Die Fluoreszenz wurde über der gesamten Fläche des jeweiligen Wells gemessen und in so genannten „Measurement counts“ angegeben. Die zu untersuchenden Proben wurden jeweils vierfach aufgetragen und daraus der Mittelwert ermittelt. Von diesem Mittelwert wurde der Mittelwert der „Measurement counts“ des Hintergrundes (Wells gefüllt mit beads markierten CD 14-positiven Monozyten und sekundärem Ak) abgezogen. Um die Proben miteinander vergleichen zu können, wurde ein Quotient aus den zu untersuchenden Zielproteinen und den Referenzproteinen gebildet. Bei der quantitativen Proteinbestimmung im In-Cell Western Assay wird die Expression der Zielproteine mit der eines weitgehend konstant in der Zelle exprimierten und nicht regulierten Referenzproteins normalisiert. Die Expression des zu untersuchenden Proteins wird auf das Referenzprotein bezogen. Die Vorteile der Normalisierung liegen in der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, da Gewebe- und Matrixeffekte innerhalb der zu untersuchenden Probe gleichermaßen das Zielprotein und das Referenzprotein betreffen.

4.9 Messung der gesamten antioxidativen Kapazität im Plasma

4.9.1 Prinzip der Messung

Um die antioxidative Gesamtkapazität des Plasmas der Patienten zu messen, wurden die Total Antioxidant Status Assay Kits von Calbiochem® zu Hilfe gezogen. Dieser Assay nutzt in jeder Probe die Fähigkeit der gesamt vorhandenen Antioxidantien aus, die Oxidation von ABTS™ (2,2-Azino-di-[3-ethylbenz-thiazolin-sulphonat]) zu ABTS™^{•+} durch die Peroxidase Metmyoglobin zu hemmen. Die Menge an ABTS™^{•+}, die produziert wird, kann bei einer Wellenlänge von 595 nm absorptionspektrophotometrisch gemessen werden. Unter diesen Reaktionsvoraussetzungen verursachen die Antioxidanzien in der jeweiligen Probe eine Suppression der bei 595 nm gemessenen Absorption, die indirekt proportional zur Konzentration der im Plasma vorhandenen Antioxidanzien ist. Von der gemessenen Absorption konnte also auf die Konzentration der Antioxidanzien im Plasma geschlossen werden. Dies war mit Hilfe einer gleichzeitig gemessenen Standardkonzentration möglich.

4.9.2 Durchführung der Messung der gesamten antioxidativen Kapazität im Plasma

Als zu untersuchende Proben wurde Blutplasma verwendet, welches zuvor durch Zentrifugation aus Vollblut gewonnen wurde.

Für die photometrischen Messungen wurden 96-Well-Platten verwendet. Dabei wurden Chromogen (Methmyoglobin und ABTS™) und Substrat (stabilisiertes H₂O₂) vorgelegt und 5 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben auf das inkubierte Chromogen in die 96-Well-Platten aufgetragen. Zur Kontrolle wurden eine Leerprobe (Blank), die nur deionisiertes Wasser enthielt und eine Standardlösung (1,70 mM; 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxyl Säure) aufgetragen. Im Photometer wurde als erste Messung die Initialabsorption (A₀) des Blanks, des Standards und der aufgetragenen Plasmaproben gemessen. Im Anschluss wurde das inkubierte Substrat auf die zu untersuchenden, mit Chromogen beladenen Wells pipettiert. Es folgte eine zweite Absorptionsmessung bei 595 nm nach exakt 3 min.

4.9.3 Auswertung der gesamten antioxidativen Kapazität im Plasma

Die Gesamtkonzentration der antioxidativen Kapazität errechnete sich wie folgt:

$$\text{antioxidative Gesamtkapazität (nM)} = \frac{\text{Konzentration des Standards}^* \cdot (\Delta A \text{ Leerprobe} - \Delta A \text{ Probe})}{(\Delta A \text{ Leerprobe} - \Delta A \text{ Standard})}$$

* 1,70 mM

- ΔA = Absorption der 1.Messung – Absorption der 2.Messung

4.10 Statistik

Die Daten wurden als Mittelwerte mit dem Standardfehler der Mittelwerte (\pm SEM) angegeben. Statistische Signifikanzen für Vergleiche von Datengruppen wurden mit einer Varianzanalyse (ANOVA), Student's t-Test und mit dem Mann-Whitney-Test ermittelt. Die jeweiligen p-Werte, sowie die Anzahl der zur Auswertung herangezogenen unabhängigen Einzelexperimente (n) sind angegeben. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ im zweiseitigen Test wurde als signifikant angenommen.

Die Auswertung und graphische Darstellung der Daten erfolgte mit Hilfe des statistischen Computerprogramms GraphPad prism 5.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA).

5. Ergebnisse

5.1 Versuche zur DNA-Expression von Rhodanese, SOD-1 und gp91^{phox} in CD14-positiven Monozyten und Quantifizierung mittels Real-Time PCR

5.1.1 Nachweis von isolierter RNA aus CD14-positiven Monozyten mittels Agarosegelelektrophorese

Nach der RNA-Isolierung wurde für alle Proben der Nachweis für das Vorhandensein von RNA durch Agarosegelelektrophorese erbracht. Da bei dieser Form der Isolierung die gesamte in der Zelle enthaltene RNA isoliert wird, lassen sich in der Gelelektrophorese die 28S- und 18S- Banden der r-RNA (ribosomale RNA) nachweisen.

Die Abbildung 5.1. zeigt stellvertretend für alle Proben den Nachweis der 28s- und 18s- Banden der isolierten Gesamt-RNA.

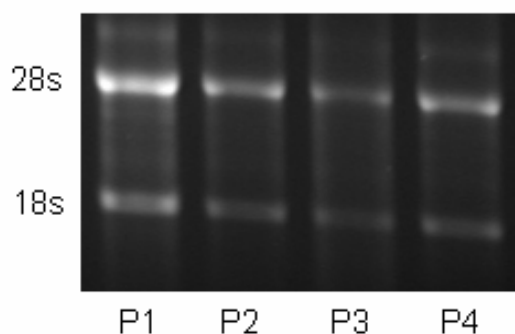


Abb 5.1: Die Abbildung zeigt das Ergebnis einer Agarosegelelektrophorese.

Mit „P“ wurden die verschiedenen Proben gekennzeichnet, bei denen aus Vollblut CD 14-positive Monozyten isoliert und anschließend die gesamte RNA isoliert wurde. Diese Abbildung zeigt die 28s- und 18s-Untereinheiten der r-RNA zum Nachweis für das Vorhandensein der isolierten Gesamt-RNA.

5.1.2 Nachweis von Rhodanese, SOD-1, gp91^{phox}, Beta-Aktin und GAPDH nach der Amplifizierung mittels Real-Time PCR

Für jede der zu untersuchenden RNA-Proben wurden drei verschiedene reverse Transkriptionen durchgeführt. Bei der ersten und zweiten reversen Transkription wurden einerseits die RNA-Proben ohne Reverse Transkriptase (RT-) und andererseits ohne isolierte RNA (P-) transkribiert. Somit konnte der Nachweis einer sauberen Transkription und das Nichtvorliegen einer Transkription von genomischer

DNA erbracht werden. Die dritte Transkription der jeweiligen Probe enthielt die extrahierte RNA und die zur Transkription benötigte Reverse Transkriptase. Aus diesen Ergebnissen ließ sich ableiten, dass tatsächlich nur die von uns aus CD 14-positiven Monozyten extrahierte RNA in cDNA transkribiert und anschließend in der Real-Time PCR amplifiziert wurde. In den Abbildungen 5.2 a bis c und 5.3 a und b ist dieser Nachweis für jedes der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Enzyme und Referenzgene dargestellt. Des Weiteren konnte damit der Nachweis für das spezifische Produkt erbracht werden. Mittels eines Markers wurde die Basenpaargröße der amplifizierten Produkte bestimmt. Wie man in den Abbildungen gut erkennen kann, zeigen die Fragmente in der Agarosegelelektrophorese die aufgrund der verwendeten Primerpaare erwarteten Größen. Wie erwartet hatte Rhodanese eine Basenpaargröße von 305 bp, SOD-1 von 240 bp und gp91^{phox} von 211 bp. Auch die Referenzgene Beta-Aktin und GAPDH stellten sich in der Agarosegelelektrophorese entsprechend der verwendeten Primerpaare mit der zu erwartenden Größe von 234 bp und 200 bp dar.

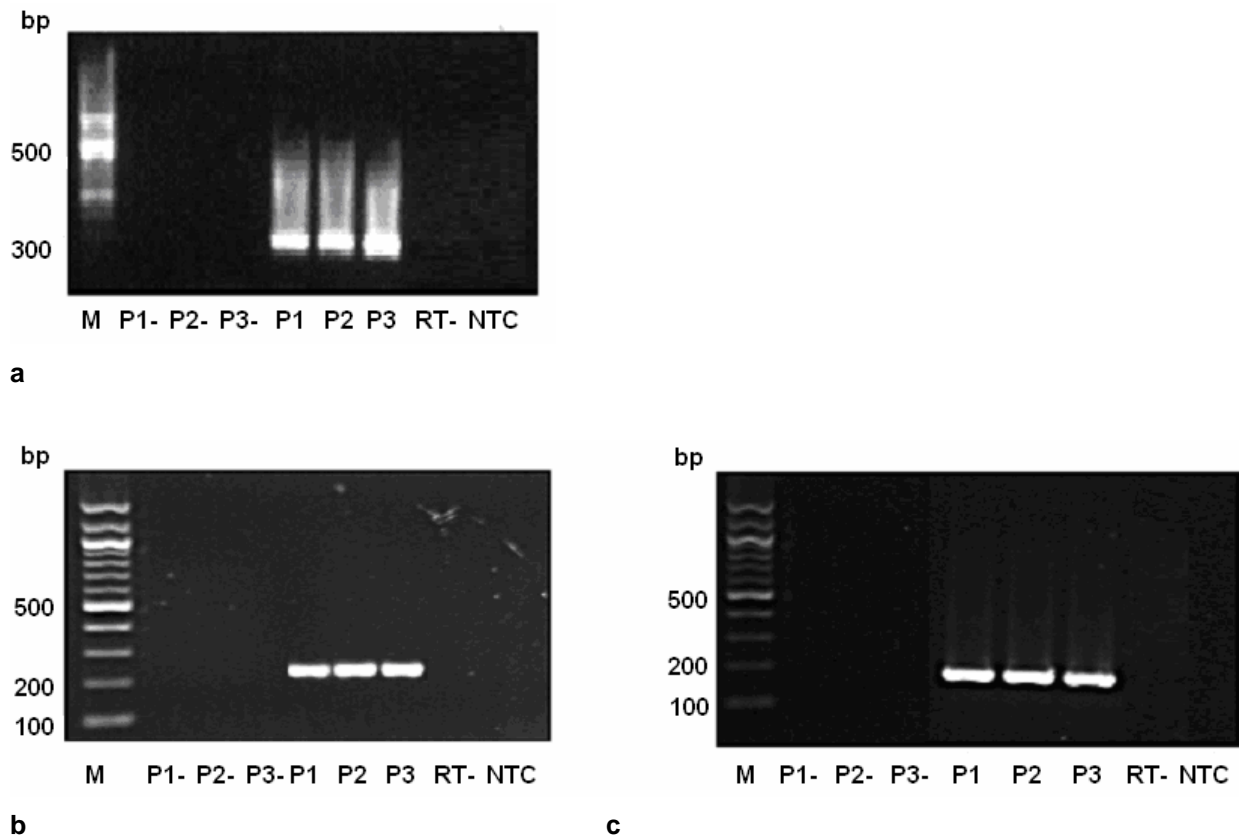


Abb. 5.2: Dargestellt ist die Agarosegelelektrophorese der Enzyme nach Amplifizierung mittels Real-Time PCR.

Die zu untersuchenden Proben wurden auf Agarose aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Abbildung **a** zeigt den Nachweis von Rhodanese, welche entsprechend der Basenpaargröße bei 305 bp identifiziert wurde. Abbildung **b** zeigt den Nachweis von SOD-1 mit der erwarteten Größe von 240 bp und Abbildung **c** zeigt die cDNA für gp91^{phox} mit der Größe von 211 bp. Die dazugehörigen Basengrößen können anhand des Marker „M“ abgelesen werden. Die mit „P“ gekennzeichneten Proben stellen die vollständig transkribierten Proben dar. Als Kontrollproben dienen die mit „P-“ gekennzeichneten Proben, die keine RNA und mit „RT-“, die keine reverse Transkriptase enthielten sowie die mit „NTC“ (No Template Control) gekennzeichneten Proben bei denen nur mit Wasser anstatt mit RNA transkribiert wurde. Die Kontrollproben, welche nur Wasser, keine reverse Transkriptase oder keine RNA enthielten, zeigen keinen Nachweis des Produktes.

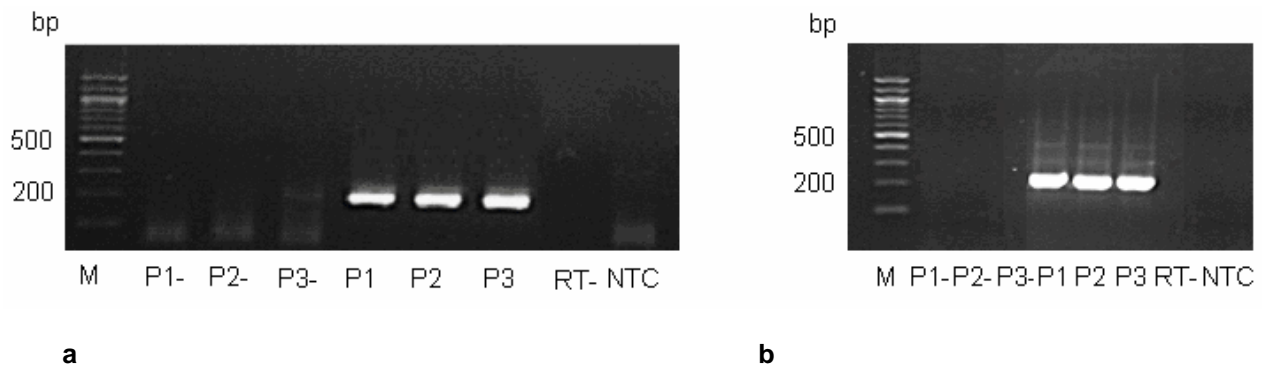


Abb. 5.3: Dargestellt ist die Agarosegelelektrophorese der Referenz-DNA nach Amplifizierung mittels Real-Time PCR.

Die zu untersuchenden Proben wurden auf Agarose aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. In der Abbildung **a** ist das Referenzgen GAPDH dargestellt, welches sich bei 200 bp identifizieren ließ. Das Referenzgen Beta-Aktin stellte sich erwartungsgemäß bei 234 bp in der Agarosegelelektrophorese dar. Die dazugehörige Basenpaargröße kann vom Marker „M“ abgelesen werden. Die mit „P“ gekennzeichnete Proben stellen die vollständig transkribierten Proben, die mit „P-“, gekennzeichneten Proben stellen dabei die Proben, die ohne RNA transkribiert wurden, dar. RT- kennzeichnet eine Probe, die ohne reverse Transkriptase transkribiert wurde und NTC (No Template Control) stellt die Wasserprobe dar. In den Abbildungen erkennt man, dass die entsprechenden Referenzgene bei der entsprechenden Basenpaargröße vorhanden sind. Die Kontrollproben, die nur Wasser, keine reverse Transkriptase oder mRNA enthielten, zeigen keinen Nachweis des Produktes.

5.1.3 Schmelzkurvenanalyse im Anschluss an die Amplifizierung

Im Anschluss an die RT-PCR wurde ein weiterer Schritt zur cDNA-Diagnostik angehängt. Nach der Amplifizierung wurde eine Schmelzkurvenanalyse zur Identifizierung des Produkts durchgeführt. Jede cDNA des nachzuweisenden Enzyms oder Referenzgens degeneriert bei einer für sie charakteristischen Temperatur, der Schmelztemperatur. Mit Hilfe einer Schmelzkurvenanalyse kann nach erfolgter RT-PCR zwischen dem Zielprodukt und unspezifischer DNA differenziert werden. In Abhängigkeit der Nukleotidlänge und –zusammensetzung (GC-Gehalt) zerfällt jeder DNA-Doppelstrang in seine beiden Einzelstränge. Da die doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt hat als unspezifisch entstehende Primerdimere, ist auch deren Unterscheidung anhand der Fluoreszenz bei der jeweiligen Temperatur möglich.

Die Schmelzkurvenanalyse erfolgte mit dem LightCycler 2.0 Instrument und der dazugehöriger Software 4.0 (s. Abb. 5.4)

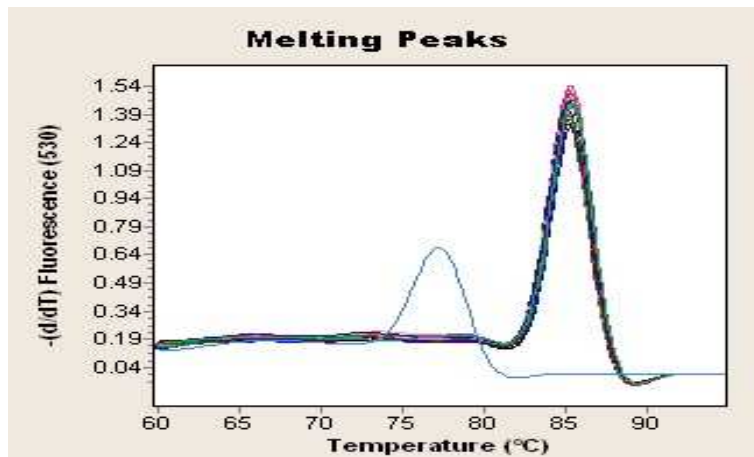


Abb. 5.4: Die Abbildung zeigt die Schmelzkurven mit dem so genannten Melting Peaks der Real-Time PCR auf.

Nach Abschluss der Amplifizierungszyklen erfolgte in der RT-PCR eine Schmelzkurvenanalyse, bei der die amplifizierten Produkte bei einer für sie bestimmten Temperatur wieder aufgetrennt werden. Dies geschieht bei den zu untersuchenden Produkten bei einer höheren Temperatur als bei unspezifisch gebundenen Produkten. Die blaue Kurve stellt die Wasserkontrolle dar, die anderen Kurven zeigen die Schmelzkurve für das zu untersuchende Produkt mit einem charakteristischen Peak bei 85°C.

5.1.4 Serum- und Glukokortikoid induzierbare Kinase (SGK1)-Expression im Verlauf einer Hämodialysebehandlung

Es wurden CD 14-positive Monozyten von CKD-Patienten im Stadium 5 der chronischen Niereninsuffizienz zu Beginn und am Ende der Hämodialysebehandlung auf die Genexpression von SGK1 mittels RT-PCR hin untersucht. Dies erfolgte zur Validierung der eigenen, angewandten Methode der Real-Time PCR für die Genexpression der Referenzgene und der zu untersuchenden Enzyme in CD14-positiven Monozytenzellen im Verlauf der Hämodialysebehandlung und im Vergleich zu verschiedenen Kontrollgruppen. *Friedrich et al.* veröffentlichten 2005 einen Artikel, in dem publiziert wurde, dass die Expression von SGK1 bei CKD-Patienten im Stadium 5 der chronischen Niereninsuffizienz während der Hämodialysebehandlung signifikant zunimmt [73]. Für diese Untersuchung wurde mRNA von CD 14-positiven Monozyten aus Vollblut von CKD-Patienten im Stadium 5 der chronischen Niereninsuffizienz (n=29) jeweils vor und nach der Hämodialysebehandlung isoliert, anschließend transkribiert und in der Real-Time PCR amplifiziert. In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Methode der RT-PCR verwendet und ähnlich in der Präparation zur RNA-Isolierung der mononukleären Zellen vorgegangen wie bei *Friedrich et al.* [73]. Die RT-PCR wurde gewählt, um die Genexpression von antioxidativen und oxidativen Enzymen auf Ebene der Transkription vor und nach der Hämodialysebehandlung zu untersuchen. Dazu wurde die Genexpression der SGK1

im Verlauf einer Hämodialysebehandlung zur Überprüfung unserer eigenen Methode zu Hilfe gezogen.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden CD 14-positive Monozyten mittels Dichtegradientenzentrifugation und monoklonalen Antikörpern, die mit einem superparamagnetischen Polystyrenbead markiert waren, aus dem Vollblut der Patienten im CKD-Stadium 5 verwendet. Das weitere Verfahren war gleich dem von *Friedrich et al.* [73]. Als Referenzgen wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Referenzgene sind Gene, die weitgehend konstant in einer Zelle exprimiert werden und keiner Regulation, z.B. hier durch den Einfluss der Hämodialysebehandlung, unterliegen. Diese bieten daher die Möglichkeit zur Normierung unterschiedlicher Expressionsanalysen bei der relativen Quantifizierung mittels Real-Time PCR. Aus den mit Hilfe eines Kalibrators gebildeten Ratios von SGK1 und GAPDH wurde ein Quotient gebildet, der dann als vergleichbarer Wert für eine Aussage zu Hilfe gezogen wurde. Mit den hier gewonnenen Ergebnissen ließ sich die gleiche Aussage wie bei *Friedrich et al.* erzielen. Nach der Hämodialysebehandlung kam es zu einem signifikanten Anstieg der SGK1-Expression auf mRNA-Ebene.

In Abb. 5.5 stellt sich graphisch der Anstieg der Expression von SGK1 nach der Hämodialysebehandlung dar. Die Auswertung erfolgte mit dem Student's t-test. In der Auswertung zeigte sich eine signifikante Veränderung im Verlauf einer Hämodialysebehandlung ($p=0,025$). Es ist festzustellen, dass SGK1 vor der Hämodialysebehandlung weniger stark in den CD 14-positiven Monozyten exprimiert wird als am Ende der Hämodialysebehandlung (s. Abb. 5.5).

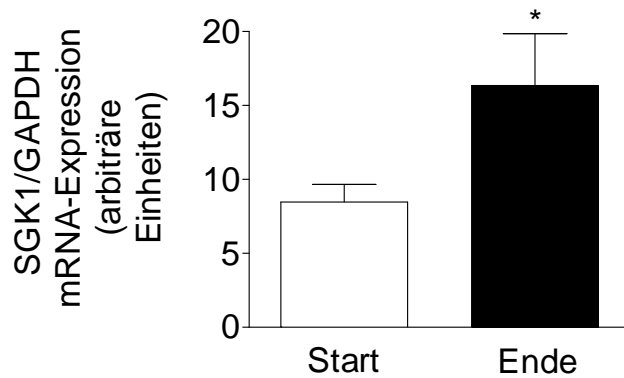


Abb. 5.5: Serum- und Glukokortikoid induzierbare Kinase (SGK1)-Expression in CD 14-positiven Monozyten bei CKD-Patienten im Stadium 5 mit Hämodialysetherapie (n=29).

Es wurde die SGK1-Expression von CKD-Patienten zu Beginn und am Ende der Hämodialysebehandlung untersucht. Graphisch dargestellt ist der Quotient der SGK1-Expression in Relation zur Expression von GAPDH als Referenzgen. Es zeigte sich, dass SGK1 im Verlauf der Hämodialysebehandlung signifikant ($p < 0,05$) verstärkt exprimiert wird. „**“ $p < 0,05$

Nachdem wir die Ergebnisse von *Friedrich et al.* in der hier vorliegenden Arbeit reproduzieren konnten, ergab sich für die weiteren hier verwendeten Untersuchungen, dass die RT-PCR mit dem Referenzgen GAPDH als zu verwendende Methode zur quantitativen Bestimmung von Enzymen auf Transkriptionsebenen im Verlauf einer Hämodialysebehandlung geeignet ist.

5.1.5 Nachweis von Rhodanese, SOD-1 und gp91^{phox} auf Proteinebene

mittels Western Blot

Zwischen der Expression eines Gens und der Produktion zum fertigen Protein liegen noch weitere verschiedene Schritte, wie z.B. Translation und posttranslationale Modifizierung, bei deren Ablauf noch Einfluss auf das zu entstehende Protein genommen werden kann. Deswegen wurde im Anschluss an die Untersuchung der Genexpression von den zu bestimmenden Enzymen mittels RT-PCR untersucht, ob sich Veränderungen auf der Ebene der Proteinexpression ergeben. Somit wurde im weiteren Verlauf der Untersuchungen ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Proteinen angewendet, um zu überprüfen, ob Veränderungen während der Hämodialysebehandlung auf Proteinebene auftreten. Vorerst wurde mittels konventionellen Western Blot ein Vorhandensein der zu eruierten Proteine, Rhodanese, SOD-1 und gp91^{phox}, sowie der Referenzproteine GAPDH und Beta-Aktin nachgewiesen. Hierbei wurden aus Vollblut unter Zuhilfenahme der Dichtegradientenzentrifugation die mononukleären Zellen isoliert. In den folgenden

Abbildungen, die mit Hilfe des Odyssey[®] - Fluoreszenzmessers (Lincoln, USA) gewonnen wurden, ist der Nachweis für das Vorhandensein der zu untersuchenden Proteine in den mononukleären Zellen erbracht. Der sekundäre Antikörper für das Referenzprotein GAPDH war Alexa Fluor[®] 680, die Emission von diesem wurde bei 700 nm bei einer Exzitationswellenlänge von 680 nm gemessen. Ein weiteres Referenzprotein, Beta-Aktin, wurde mit dem sekundären Antikörper von IRDye[™] 800 CW bei 800 nm bei einer Exzitationswellenlänge von 780 nm gemessen. Die Ergebnisse dazu sind graphisch in Abb. 5.6 a und b, 5.7 a-c dargestellt.

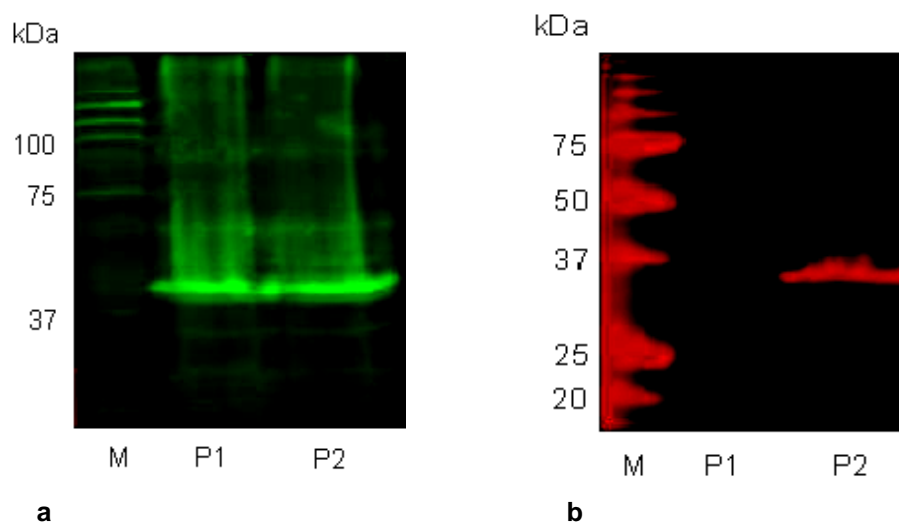


Abb. 5.6a und b: Nachweis der Referenzproteine GAPDH und Beta-Aktin im konventionellen Western Blot.

In der Abbildung a ist der Nachweis von Beta-Aktin im Western Blot dargestellt. Beta-Aktin stellt sich, wie erwartet bei 45 kDa dar. In b ist der Nachweis des Referenzproteins GAPDH im Western Blot abgebildet. GAPDH stellte sich wie erwartet bei 37 kDa dar. Mit „M“ wurde der Marker zur Bestimmung des Molekulargewichts bezeichnet. „P“ ist eine Proteinprobe, die von einem CKD-Patienten im Stadium 5 mit Hämodialysetherapie nach Isolierung der mononukleären Zellen gewonnen wurde.

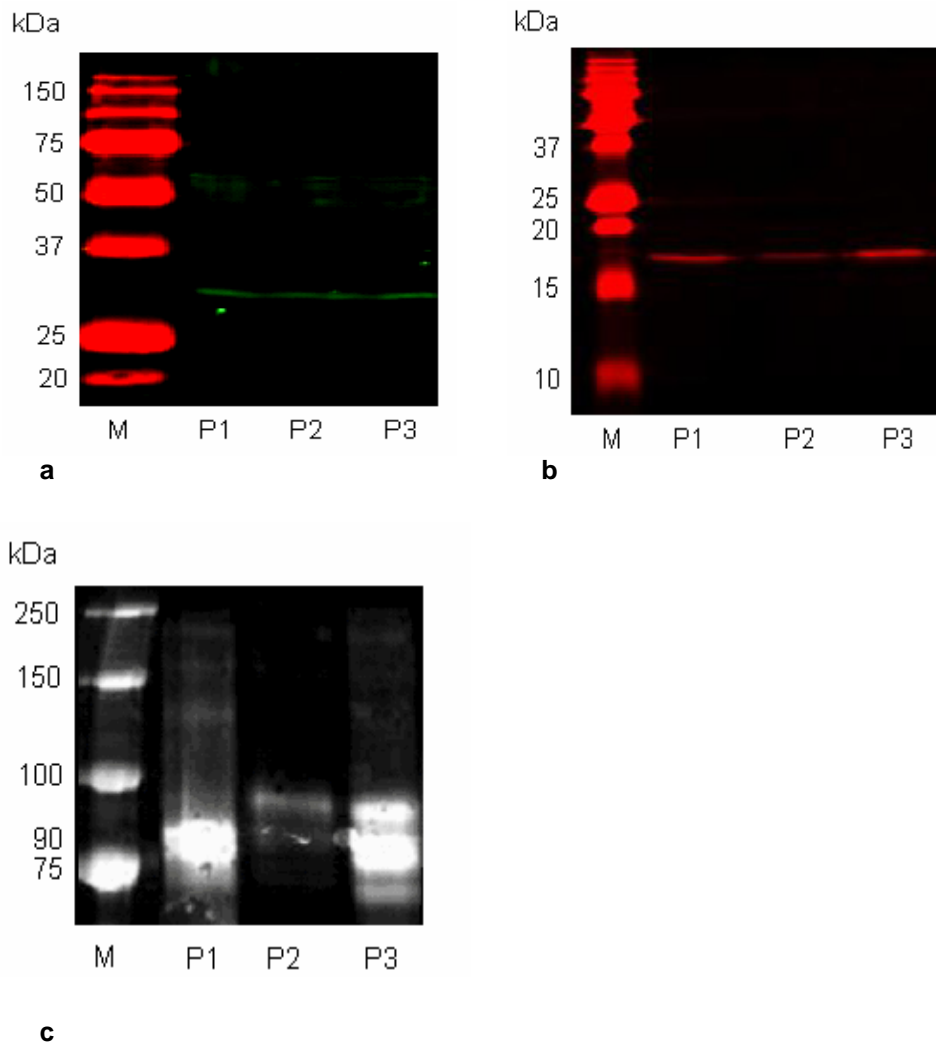


Abb. 5.7 a-c: Nachweis von Rhodanese, SOD-1 und gp91^{phox} im konventionellen Western Blot. Als „M“ wurde ein Marker (BIO-RAD, Hercules, USA) zur Bestimmung des Molekulargewichts bezeichnet und als „P“ die jeweiligen zu untersuchenden Proben dargestellt. In der Abbildung **a** stellt sich Rhodanese wie erwartet bei 33 kDa, in Abbildung **b** SOD-1 bei 17 kDa und gp91^{phox} in Abbildung **c** wie erwartet bei 91 kDa dar.

Da sich im Western Blot die Proteine Rhodanese, SOD-1 und gp91^{phox} in mononukleären Zellen nachweisen ließen, wurde der In-Cell Western Assay als modifiziertes Verfahren des Western Blots zur quantitativen Bestimmung dieser Proteine angewendet.

5.1.6 Quantitative Bestimmung von Rhodanese, SOD-1 und gp91^{phox} auf Proteinebene mittels In-Cell Western Assay

Im In-Cell Western Assay wurden, wie auch im konventionellen Western Blot, Rhodanese, SOD-1 und gp91^{phox} mit den Referenzproteinen Beta-Aktin und GAPDH untersucht. Referenzproteine sind Proteine, die ubiquitär und homogen in einer Zelle exprimiert werden und keinen Regulationen unterliegen.

Zu Anfang wurden die CD 14-positiven Monozyten laut Vorschrift isoliert. Im Anschluss daran wurden die isolierten Zellen, wie in Abb. 5.8 a-c dargestellt, auf die 96-Well-Platten aufgetragen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzmessers Odyssey[®] Infrared Imaging System (Lincoln, USA). Dabei wurde die Fluoreszenz bei 700 nm und 800 nm über der gesamten Fläche des jeweiligen Wells gemessen und in so genannten „Measurement counts“ angegeben. Die zu untersuchenden Proben wurden jeweils vierfach aufgetragen und daraus der Mittelwert berechnet, da evtl. ungleiches Auftragen der Proben oder eine ungleiche Verteilung der Zellen pro Well berücksichtigt werden musste. Aus den vier Wells ohne primären Antikörper, aber sekundären Antikörper, wurde ebenfalls ein Mittelwert gebildet, der dann vom Mittelwert der Proben mit primären und sekundären Antikörpern abgezogen wurde. Dadurch wurde gewährleistet, dass unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers nicht mit in die quantitative Berechnung eingingen.

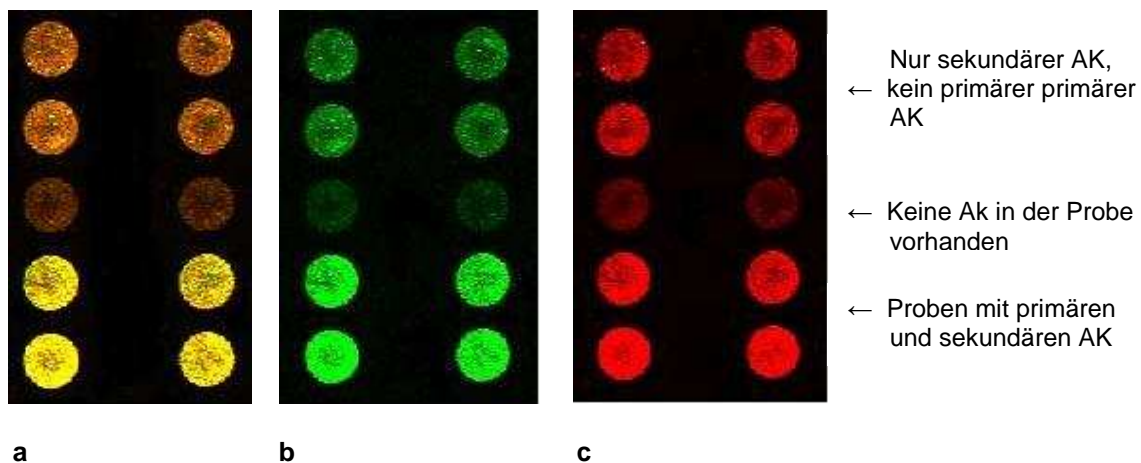


Abb. 5.8 a-c: Dargestellt ist das Ergebnis am Beispiel für eine vermessene Probe mit gp91^{phox}, welches durch den Fluoreszenzmesser Odyssey[®] Infrared Imaging System erreicht wurde.

In Abbildung a wurden die Fluoreszenzen im Bereich von 700 nm und 800 nm übereinander gelegt. Die Abbildung b stellt die Fluoreszenz bei 800nm grün und in Abbildung c eine Floreszenz bei 700nm rot dar. Aus den Fluoreszenzen, die hier bildlich dargestellt sind, wurde von dem mitgelieferten Programm pro Well die Stärke der Fluoreszenz in Zahlenwerten, den „Measurement Counts“, angegeben, um eine Aussage über quantitative Veränderungen der Proteine während der Hämodialysebehandlung treffen zu können. Als Kontrolle, um unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers herauszurechnen, dienten vier Wells mit CD 14-positiven Monozyten und einem sekundären Ak. Diese vier Wells bilden den Hintergrund, der dann von den Wells mit CD 14-positiven Monozyten, primären und sekundären AK, die ebenfalls vierfach aufgetragen wurden abgezogen wurde. Da die mit Dynabeads behafteten CD 14-positiven Monozyten ebenfalls fluoreszieren, wurden zusätzlich zwei Wells ohne AK befüllt.

5.2 Patienten- und Probandencharakterisierung

Für die Untersuchungen auf Ebene der mRNA und der Proteine wurden Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (n=66; mittleres Alter in Jahren: 64 ± 13), die dreimal wöchentlich über im Mittel vier Stunden hämodialysiert wurden und altersgematchte, nicht-dialysepflichtige CKD-Patienten (n=43; mittleres Alter in Jahren: 63 ± 16) untersucht. Als eine weitere Kontrolle wurden junge, gesunde Probanden (n=40; mittleres Alter in Jahren: 26 ± 1) eingebunden. Das Plasma für den Total Antioxidant Status Assay zur Bestimmung der gesamten antioxidativen Kapazität des Plasmas wurde von chronisch niereninsuffizienten Patienten (n=76; mittleres Alter in Jahren: 64 ± 13), altersgematchten, nicht-hämodialysepflichtige Kontrollpatienten (n=48; mittleres Alter in Jahren: 64 ± 15) und jungen, gesunden Probanden (n=40; mittleres Alter in Jahren: 26 ± 4) gewonnen. Die klinische sowie laborchemische Charakterisierung der einzelnen Probanden und Patientengruppen wurde tabellarisch in den Tabellen 5.1 und 5.2 aufgelistet.

Für den Vorgang der Hämodialyse wurde eine biokompatible Polysulfonmembran (17L, Gambro Dialysatoren GmbH, Hechingen, Deutschland) benutzt. Das Standarddialysat beinhaltete 1.75 mmol/l Calcium und enthielt Bikarbonat. Des Weiteren wurde die MDRD-Formel (Modification of Diet in Renal Disease) für die CKD (Chronic Kidney Disease) -Patienten und Kontrollpatienten zur Berechnung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und somit zur Einteilung des Niereninsuffizienzstadiums herangezogen.

Zu den Einschlusskriterien gehörten neben der Volljährigkeit (Alter >18 Jahre), die Zustimmungsfähigkeit, beiderlei Geschlecht sowie die schriftliche und mündliche Zustimmung. Ausschlusskriterien gab es bis auf akute Entzündungen und Infektionen nicht.

Die Untersuchung wurde durch die zuständige Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin geprüft und genehmigt.

Tab. 5.1: Klinische Charakterisierung der untersuchten CKD-Patienten, Kontrollpatienten sowie Kontrollprobanden.

Charakteristika	CKD-Patienten Mittelwerte \pm SEM	Kontrollpatienten n Mittelwerte \pm SEM	Kontrollprobanden Mittelwerte \pm SEM
Anzahl	66	43	40
Alter (Jahre)	64 \pm 13	63 \pm 16	26 \pm 1
Frauenanteil (%)	17 (25,8)	18 (41,9)	17 (42,5)
Hämodialysetherapie (Monate)	25 \pm 37	-	-
Dauer der Einzeldialyse (h)	3,7 \pm 0,7	-	-
Körpergewicht (kg)	75,1 \pm 15,1	75,0 \pm 18,8	71,2 \pm 10,7
BMI	25,1 \pm 4,4	25,7 \pm 4,6	26,3 \pm 7,9
Raucher (absolut)/(%)	13 (19,7)	12 (27,9)	6 (18,2)
Bluthochdruck (absolut)/(%)	58 (87,9)	32 (74,4)	-
Diabetes mellitus (absolut)/(%)	28 (42,4)	8 (18,6)	-
pAVK (absolut)/(%)	16 (24,2)	8 (18,6)	-
KHK (absolut)/(%)	25 (37,9)	17 (39,5)	-
Insult (absolut)/(%)	6 (9,1)	10 (23,3)	-
Tumor (absolut) (%)	13 (19,7)	10 (23,3)	-

Tab. 5.2: Klinische Charakterisierung der mit dem TAOS-Assay untersuchten CKD-Patienten, Kontrollpatienten sowie Kontrollprobanden.

Charakteristika	CKD-Patienten Mittelwerte \pm SEM	Kontrollpatienten n Mittelwerte \pm SEM	Kontrollprobanden Mittelwerte \pm SEM
Anzahl	76	48	40
Alter (Jahre)	64 \pm 13	64 \pm 15	26 \pm 4
Frauenanteil (%)	17 (22,4)	19 (39,6)	19 (47,5)
Hämodialysetherapie (Monate)	36,6 \pm 24,7	-	-
Dauer der Einzeldialyse (h)	3,7 \pm 0,7	-	-
Körpergewicht (kg)	75,1 \pm 15,2	79 \pm 15,9	71,2 \pm 10,7
BMI	25 \pm 4,5	27,2 \pm 5,3	29 \pm 7,6
Raucher (absolut)/(%)	13 (17,1)	-	6 (15)
Bluthochdruck (absolut)/(%)	58 (76,3)	25 (52,1)	-
Diabetes mellitus (absolut)/(%)	28 (36,8)	6 (12,5)	-
pAVK (absolut)/(%)	16 (21,1)	1 (2,1)	-
KHK (absolut)/(%)	25 (32,9)	1 (2,1)	-
Insult (absolut)/(%)	6 (7,9)	1 (2,1)	-
Tumor (absolut)/(%)	13 (17,1)	3 (6,3)	-

5.3 Quantitative Bestimmung oxidativer und antioxidativer Enzyme in CD 14-positiven Monozyten auf mRNA-Ebene mittels Real-Time PCR

5.3.1 Genexpressionveränderungen von Rhodanese im Verlauf einer Hämodialysebehandlung

Nach der Monozytenisolierung, RNA-Isolierung und Transkription der isolierten mRNA in cDNA wurde mittels RT-PCR der Nachweis über die Veränderung von Rhodanese im Verlauf einer Hämodialysebehandlung in CD 14-positiven Monozyten erbracht. In diesem Teil der Untersuchung wurde die Genexpression von Rhodanese bei CKD-Patienten (n=25; mittleres Alter in Jahren: 64 ± 13), die im Mittel drei Mal die Woche für jeweils ca. vier Stunden einer Hämodialysebehandlung unterzogen wurden, bestimmt. Aufgrund der reproduzierbaren Ergebnisse im SGK1-Versuch wurde für diese und alle weiteren Untersuchungen mittels RT-PCR die Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) als Referenzgen benutzt. Im Verlauf einer Hämodialysebehandlung zeigte sich für das Enzym Rhodanese in CD 14-positiven Monozyten auf Transkriptionsebene eine signifikante Verminderung von Start bis Ende ($13,4 \pm 2,8$ vs. $7,4 \pm 1,2$; $p=0,04$). Abb.5.9

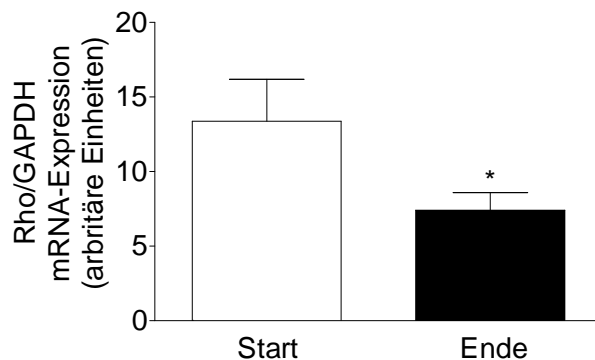


Abb.5.9: Genexpression von Rhodanese in CD 14-positiven Monozyten bei CKD-Patienten im Verlauf einer Hämodialysebehandlung.

Dargestellt ist der Quotient aus der normalisierten Ratio der Rhodanese-Genexpression in Relation zur normalisierten Ratio der Genexpression von GAPDH. Es zeigt sich eine signifikante Verminderung der Rhodanese-Genexpression in CD14-positiven Monozyten während einer Hämodialysebehandlung (Start vs. Ende; $p<0,05$). „*“ $p<0,05$.

Um die Signifikanz zu verdeutlichen, wurde in der Abb. 5.10 der Quotient aus der normalisierten Ratio der Rhodanese-Genexpression in Relation zur normalisierten Ratio der Genexpression von GAPDH pro Patient aufgetragen. Es lässt sich

erkennen, dass die Rhodanese-Genexpression in 18 von 25 gemessenen Proben im Verlauf der Hämodialysebehandlung abfiel.

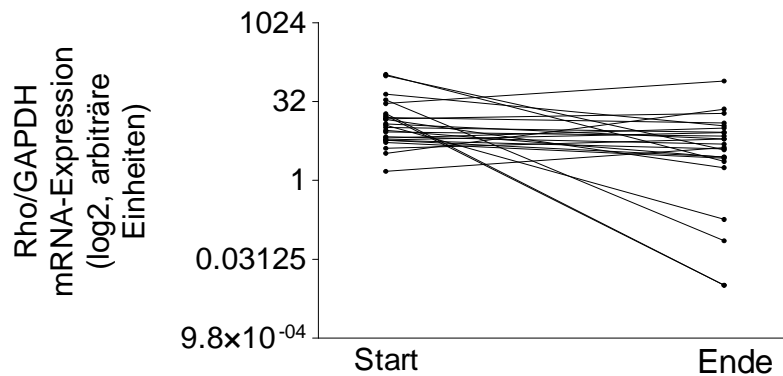


Abb. 5.10: Rhodanese-Genexpression in CD 14-positiven Monozyten pro CKD-Patienten im Verlauf einer Hämodialysebehandlung.

Es wurde der Quotient aus der normalisierten Ratio der Rhodanese-Genexpression in Relation zur normalisierten Ratio der Genexpression von GAPDH pro Patient aufgetragen. Es lässt sich erkennen, dass die Rhodanese-Genexpression in 18 von 25 gemessenen Proben der CKD-Patienten im Verlauf der Hämodialysebehandlung abfiel.

5.3.2 Genexpressionveränderungen der Superoxiddismutase (SOD-1) im

Verlauf einer Hämodialysebehandlung

Die Superoxiddismutase (SOD-1) ist eine zytosolische Metalloprotease. Das antioxidative Potential spielt eine große Rolle in Bezug auf den oxidativen Stress bei CKD-Patienten im Stadium 5 unter Hämodialysebehandlung. Unter dem Aspekt, dass die SOD-1 wichtig für die Abwehr von freien Radikalen ist, wurde in dieser hier vorliegenden Arbeit die Genexpression des Enzyms in CD 14-positiven Monozyten bei CKD-Patienten jeweils am Start und am Ende einer Hämodialysebehandlung untersucht.

Dazu wurde von den CKD-Patienten ($n=50$; mittleres Alter in Jahren: 64 ± 13) vor und nach der Hämodialysebehandlung Vollblut gewonnen. Nach Aufarbeitung des Blutmaterials wurde mittels RT-PCR die mRNA-Expression der SOD-1 bestimmt.

Im Verlauf einer Hämodialysebehandlung zeigte sich für SOD-1 in CD 14-positiven Monozyten auf Transkriptionsebene keine signifikante Veränderung von Start und Ende ($17,7 \pm 2,1$ vs. $17,1 \pm 2,6$; $p=0,71$). Abb.5.11

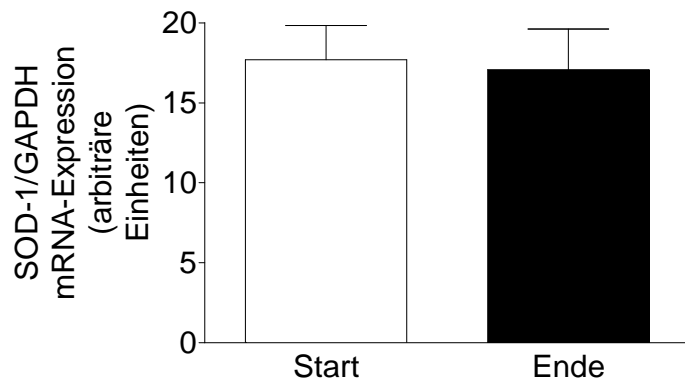


Abb. 5.11: Genexpression von SOD-1 in CD 14-positiven Monozyten bei CKD-Patienten im Verlauf einer Hämodialysebehandlung.

Dargestellt ist der Quotient aus der normalisierten Ratio der SOD-1-Genexpression in Relation zur normalisierten Ratio der Genexpression von GAPDH. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der SOD-1-Genexpression zwischen den CKD-Patienten bei Start und am Ende der Hämodialysebehandlung ($p > 0,05$).

5.3.3 Genexpressionveränderungen von gp91^{phox} im Verlauf einer Hämodialysebehandlung.

Die Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat-Oxidase (NADPH-Oxidase) der Phagozyten war die Erste und ist auch das am besten untersuchte Mitglied der NOX-Familie. Sie wird stark von Granulozyten, Monozyten bzw. Makrophagen exprimiert. Das gp91^{phox} ist eine membranständige Untereinheit des NADPH-Komplexes. Diese Untereinheit wird bei Aktivierung der Zelle und des Komplexes stärker exprimiert als im Ruhezustand der Zelle. In der hier vorliegenden Arbeit war diese Untereinheit von Bedeutung, da anhand derer unterschieden werden kann, ob die Aktivität der CD 14-positiven Monozyten und somit der NADPH-Oxidase im Verlauf der Hämodialysebehandlung einer Regulation unterliegt.

Um Veränderung während der Hämodialysebehandlung in der Genexpression von gp91^{phox} zu untersuchen, wurde Vollblut vor und nach einer Hämodialysebehandlung von CKD-Patienten ($n=29$; mittleres Alter in Jahren: 64 ± 13) gewonnen und die RNA aus den darin enthaltenen CD 14-positiven Monozyten isoliert und transkribiert.

Im Verlauf einer Hämodialysebehandlung zeigt sich für gp91^{phox} in CD 14-positiven Monozyten auf Transkriptionsebene keine signifikante Veränderung von Start und Ende ($16,04 \pm 4,5$ vs. $19,64 \pm 6,1$; $p=0,51$). Abb.5.12

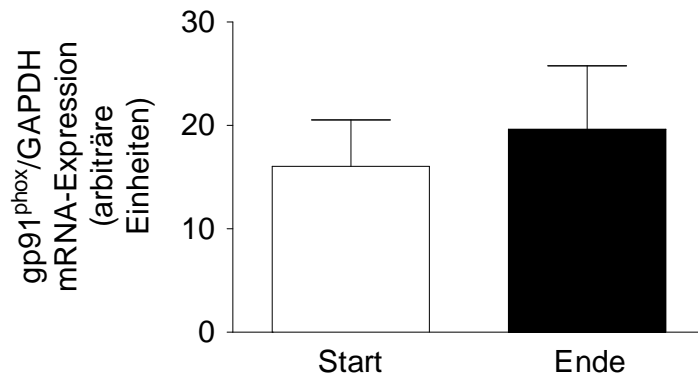


Abb. 5.12: Genexpression von gp91^{phox} in CD 14-positiven Monozyten bei CKD-Patienten im Verlauf einer Hämodialysebehandlung.

Dargestellt ist der Quotient aus der normalisierten Ratio der gp91^{phox}-Genexpression in Relation zur normalisierten Ratio der Genexpression von GAPDH. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der gp91^{phox}-Genexpression zwischen den CKD-Patienten (n=29) am Start und am Ende einer Hämodialysebehandlung ($p > 0,05$).

5.3.4 Genexpressionsveränderungen von antioxidativen und oxidativen

Enzymen im Vergleich von Kontrollprobanden, Kontrollpatienten mit CKD-Patienten

Zur Feststellung, ob Genexpressionsveränderungen in den zu untersuchenden Enzymen Rhodanese, SOD-1 und gp91^{phox} als Untereinheit der NOX 2 durch die chronische Hämodialysetherapie zu verzeichnen sind, wurde die Genexpression von Kontrollprobanden, Kontrollpatienten mit der Genexpression der CKD-Patienten untersucht. Als Kontrollgruppe wurden Kontrollprobanden (n=40; mittleres Alter in Jahren: 26 ± 1), Kontrollpatienten, die nicht-hämodialysepflichtige CKD-Patienten darstellten (n=43; mittleres Alter in Jahren: 63 ± 16) zum Vergleich zu CKD-Patienten (n=66; mittleres Alter in Jahren: 64 ± 13) hinzugezogen. Die Kontrollpatienten wurden zuvor je nach dem Grad der Niereninsuffizienz auf eine veränderte Expression auf Transkriptionsebene untersucht. Diese Untersuchung ergab keine signifikante Veränderung der Genexpression zwischen den 5 chronischen Niereninsuffizienzstadien ($p > 0,05$, keine Abb.). Es zeigt sich, dass CKD-Patienten am Start einer Hämodialysebehandlung eine verminderte Rhodaneseexpression in CD 14-positiven Monozyten im Vergleich zu Kontrollprobanden (n=40) aufweisen ($24,8 \pm 3,3$ vs. $13,4 \pm 2,8$; $p < 0,01$). Diese verminderte Expression von Rhodanese fällt während einer Hämodialysebehandlung nochmals signifikant von $13,4 \pm 2,8$ auf $7,4 \pm 1,2$ ab ($p = 0,04$). Zwischen den Kontrollpatienten (n=33) und den CKD-Patienten ist kein Unterschied in der Rhodaneseexpression auf

Transkriptionsebene zu verzeichnen ($p > 0,05$). Jedoch zeigt sich eine verminderte Genexpression von Rhodanese in den Kontrollpatienten im Vergleich zu den Kontrollprobanden ($24,8 \pm 3,3$ vs. $16,5 \pm 2,9$; $p < 0,05$). Abb. 5.13

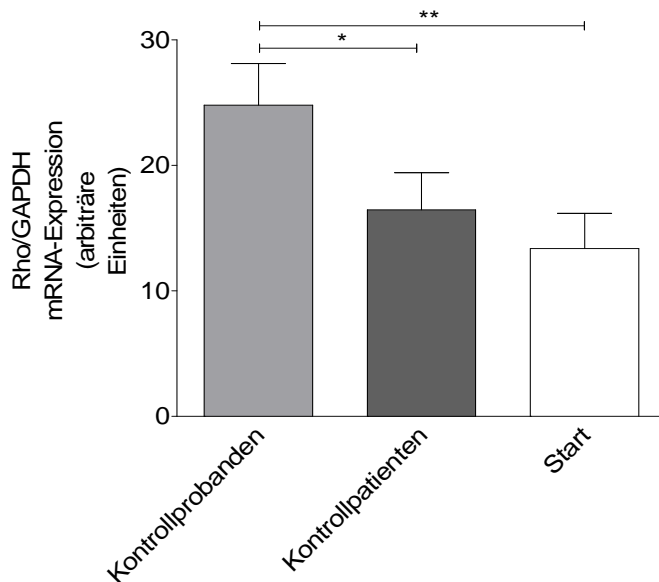


Abb.5.13: Genexpressionsveränderungen von Rhodanese in CD 14-positiven Monozyten im Vergleich von Kontrollprobanden, Kontrollpatienten, und CKD-Patienten.

Dargestellt ist der Quotient aus der normalisierten Ratio der Rhodaneseexpression in Relation zur normalisierten Ratio der Genexpression von GAPDH. Es zeigt sich, dass die CKD-Patienten Rhodanese weniger exprimieren als die Kontrollprobanden und diese verminderte Expression nochmals durch die Hämodialysebehandlung abnimmt (siehe vorherige Abbildung). Zwischen den Kontrollpatienten und den CKD-Patienten ist kein signifikanter Expressionsunterschied zu verzeichnen. Kontrollpatienten exprimieren Rhodanese weniger als Kontrollprobanden. „*“ $p < 0,05$ und „**“ $p < 0,01$.

Für das antioxidative Enzym SOD-1 zeigte sich eine Mehrexpression auf Transkriptionsebene bei Kontrollprobanden im Vergleich zu Kontrollpatienten ($30,8 \pm 4,2$ vs. $18,1 \pm 2,7$; $p < 0,05$) und zu den CKD-Patienten am Start ($30,8 \pm 4,2$ vs. $17,7 \pm 2,1$; $p > 0,05$) und am Ende ($30,8 \pm 4,2$ vs. $17,1 \pm 2,6$; $p < 0,01$) einer Hämodialysebehandlung. Zwischen den Kontrollpatienten und den CKD-Patienten am Start und am Ende einer Hämodialysebehandlung existiert kein signifikanter Unterschied ($18,1 \pm 2,7$ vs. $18 \pm 2,1$ und $17,1 \pm 2,6$; $p > 0,05$).

Die Hämodialysebehandlung besitzt keinen Einfluss auf Veränderungen der Genexpression von SOD-1 bei CKD-Patienten ($18 \pm 2,1$ vs. $17,1 \pm 2,6$; $p > 0,05$).

Abb.5.14

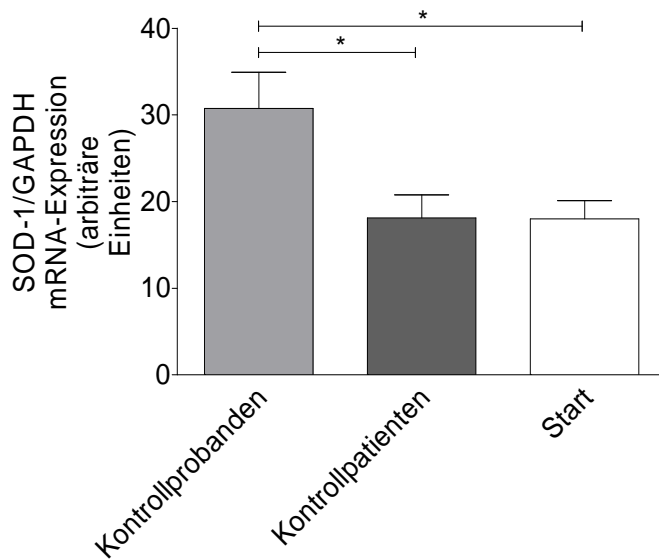


Abb.5.14: Genexpressionsveränderungen von SOD-1 in CD 14-positiven Monozyten im Vergleich von Kontrollprobanden, Kontrollpatienten und CKD-Patienten.

Dargestellt ist der Quotient aus der normalisierten Ratio der SOD-1-Genexpression in Relation zur normalisierten Ratio der Genexpression von GAPDH. Es zeigt sich, dass die Kontrollprobanden im Vergleich zu den Kontrollpatienten und den CKD-Patienten eine höhere SOD-1-Expression auf Transkriptionsebene aufweisen. „*“ $p < 0,05$

Für die Untereinheit $gp91^{phox}$ der NAD(P)H-Oxidase zeigt sich, im Gegensatz zu Rhodanese und SOD-1, dass es zwischen den Kontrollprobanden ($n=40$), den Kontrollpatienten ($n=43$) und den CKD-Patienten ($n=66$) keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression gibt ($p > 0,05$). Abb. 5.15

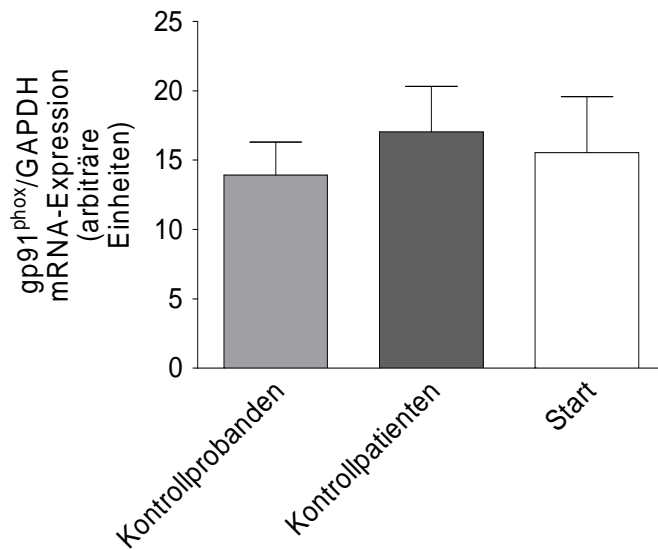


Abb.5.15: Genexpressionsveränderungen von gp91^{phox} in CD 14-positiven Monozyten im Vergleich von Kontrollprobanden, Kontrollpatienten und CKD-Patienten.

Dargestellt ist der Quotient aus der normalisierten Ratio der gp91^{phox}- Genexpression in Relation zur normalisierten Ratio der Genexpression von GAPDH. Zwischen den Kontrollprobanden (n=40), Kontrollpatienten (n=43) und CKD-Patienten (n=66) zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Genexpression von gp91^{phox} ($p > 0,05$).

Bei den hier durchgeführten Untersuchungen mittels Real-Time PCR zeigt sich, dass das Enzym Rhodanese bei Kontrollpatienten sowie bei CKD-Patienten im Stadium 5 mit Hämodialysetherapie im Vergleich zu den Kontrollprobanden signifikant vermindert auf Transkriptionsebene exprimiert wird. Die Genexpression von Rhodanese verringerte sich während einer Hämodialysebehandlung nochmals signifikant ($13,4 \pm 2,8$ vs. $7,4 \pm 1,2$; $p < 0,05$). Auch bei SOD-1 zeigt sich, dass die Kontrollprobanden signifikant mehr SOD-1 auf Transkriptionsebene exprimieren im Vergleich zu den Kontrollpatienten und den CKD-Patienten im Stadium 5 mit Hämodialysetherapie, jedoch ist im Verlauf der Hämodialysebehandlung keine signifikante Veränderung auf Transkriptionsebene in diesem Enzym zu verzeichnen. Für die Untereinheit gp91^{phox} der NAD(P)H-Oxidase konnte bezüglich einer Genexpressionsveränderung während einer Hämodialysebehandlung und im Vergleich zu Kontrollprobanden und Kontrollpatienten kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Für die untersuchten Enzyme Rhodanese, SOD-1 und gp91^{phox} als Untereinheit der NAD(P)H-Oxidase zeigte sich, dass das Stadium der Niereninsuffizienz keinen Einfluss auf die Genexpression der untersuchten Enzyme in CD 14-positiven Monozyten besitzt.

5.4 Quantitative Bestimmung oxidativer und antioxidativer Enzyme in CD 14-positiven Monozyten auf Proteinebene mittels In-Cell Western Assay.

5.4.1 Quantitative Proteinbestimmung von Rhodanese im Verlauf der Hämodialysebehandlung.

Mittels In-Cell Western Assay wurde die Expression von Rhodanese auf Proteinebene charakterisiert. Um die Expression des Proteins Rhodanese in CD 14-positiven Monozyten verlässlich zu quantifizieren, wurde eine Ratio zwischen der Proteinexpression von Rhodanese und GAPDH als Referenzprotein gebildet.

An der Untersuchung nahmen CKD-Patienten (n=11, mittleres Alter in Jahren: 66 ± 4) teil. Es war festzustellen, dass die Hämodialysebehandlung keinen Einfluss auf die Proteinexpression von Rhodanese hat. Im Verlauf der Hämodialysebehandlung kam es zu keinen signifikanten Veränderungen in der Proteinexpression des Enzyms bei den CKD-Patienten ($0,41 \pm 0,02$ vs. $0,40 \pm 0,02$; $p=0,67$). Abb. 5.16

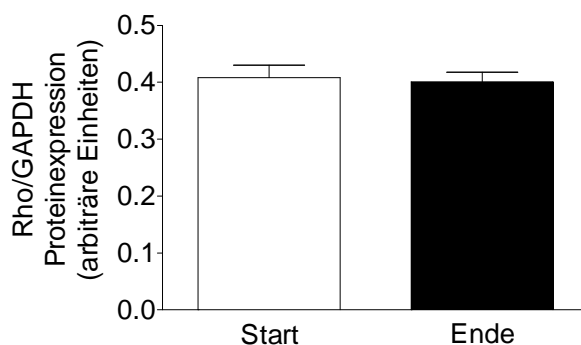


Abb. 5.16: Proteinexpression von Rhodanese in CD 14-positiven Monozyten bei CKD-Patienten im Verlauf einer Hämodialysebehandlung.

In der Abbildung ist der Quotient der Rhodaneseproteinexpression in Relation zur Proteinexpression von GAPDH dargestellt. Es zeigte sich keine signifikante Veränderung in der Proteinexpression von Rhodanese zwischen den CKD-Patienten am Start und am Ende einer Hämodialysebehandlung ($p>0,05$).

5.4.2 Quantitative Proteinbestimmung von SOD-1 im Verlauf der Hämodialysebehandlung.

Die Proteinexpression von SOD-1 wurde in CD 14-positiven Monozyten bei CKD-Patienten (n=13, mittleres Alter in Jahren: 62 ± 5) untersucht. Im Verlauf einer Hämodialysebehandlung zeigt sich keine signifikante Veränderung der

Proteinexpression von SOD-1. Start $12,43 \pm 1,42$ vs. Ende $11,40 \pm 1,64$; $p=0,31$.

Abb. 5.17

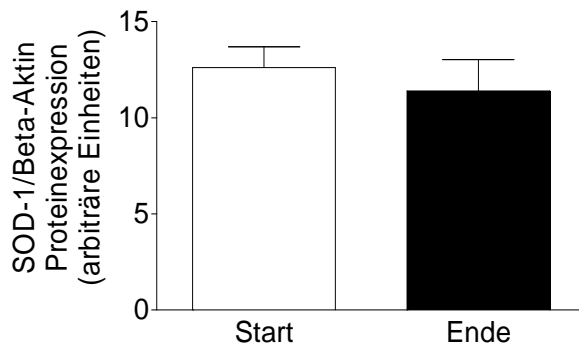


Abb. 5.17: Proteinexpression von SOD-1 in CD 14-positiven Monozyten bei CKD-Patienten im Verlauf einer Hämodialysebehandlung.

In der Abbildung ist der Quotient der SOD-1-Proteinexpression in Relation zur Proteinexpression von Beta-Aktin dargestellt. Es zeigte sich keine signifikanten Veränderungen in der Proteinexpression von SOD-1 zwischen den CKD-Patienten am Start und am Ende einer Hämodialysebehandlung ($p>0,05$).

5.4.3 Quantitative Proteinbestimmung von gp91^{phox} im Verlauf der

Hämodialysebehandlung

Für die Ermittlung der quantitativen Proteinexpression von gp91^{phox} in CD14-positiven Monozyten wurden CKD-Patienten ($n=30$, mittleres Alter in Jahren: 64 ± 9) auf eine Veränderung im Verlauf der Hämodialysebehandlung hin untersucht. Die Proteinexpression von gp91^{phox} am Start veränderte sich bis zum Ende der Hämodialysebehandlung nicht signifikant ($0,28 \pm 0,03$ vs. $0,33 \pm 0,05$; $p=0,35$). Es zeigt sich, ähnlich wie bei den Ergebnissen der antioxidativen Enzyme, dass es im Verlauf einer Hämodialysebehandlung zu keiner signifikanten Veränderung in der Proteinexpression kommt. Abb. 5.18

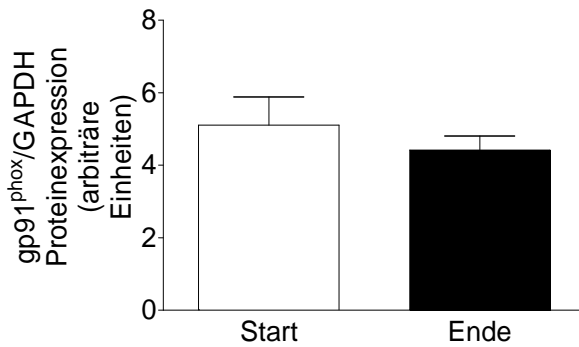


Abb. 5.18: Proteinexpression von gp91^{phox} in CD 14-positiven Monozyten bei CKD-Patienten im Verlauf einer Hämodialysebehandlung.

In der Abbildung ist der Quotient der SOD-1-Proteinexpression in Relation zur Proteinexpression von GAPDH dargestellt. Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen in der Proteinexpression von gp91^{phox} zwischen den CKD-Patienten am Start und am Ende einer Hämodialysebehandlung ($p > 0,05$).

5.4.4 Quantitative Proteinbestimmung von antioxidativen und oxidativen Enzymen

im Vergleich zwischen Kontrollprobanden, Kontrollpatienten und CKD-Patienten

Für die Untersuchungen zum Nachweis der antioxidativ und oxidativ wirkenden Enzyme auf Proteinebene mittels In-Cell Western Assay wurden analog zu den Untersuchungen mittels RT-PCR Kontrollprobanden ($n=40$; mittleres Alter in Jahren: 26 ± 1) und Kontrollpatienten ($n=43$; mittleres Alter in Jahren: 63 ± 16) als Vergleichsgruppe zu CKD-Patienten ($n=66$; mittleres Alter in Jahren: 64 ± 13) hinzugezogen. Die Kontrollpatienten wurden zuvor je nach dem Grad der Niereninsuffizienz auf eine veränderte Expression auf Proteinebene untersucht. Trotz der bei diesen nicht-hämodialysepflichtigen Kontrollpatienten stark variierenden GFR, ergab sich bei dieser Untersuchung keine signifikante Veränderung der Proteinexpression zwischen den 5 chronischen Niereninsuffizienzstadien ($p > 0,05$, keine Abb.).

Für das antioxidativ wirkende Enzym Rhodanese wurden die CKD-Patienten ($n=11$, mittleres Alter in Jahren: 66 ± 4) mit Kontrollprobanden ($n=14$, mittleres Alter in Jahren: 32 ± 2) in Bezug auf die Proteinexpression von Rhodanese in CD 14-positiven Monozyten verglichen. Bei dieser Untersuchung zeigte sich, dass sich die Kontrollprobanden in Hinblick auf die Proteinexpression von Rhodanese in CD14-positiven Monozyten nicht von den Patienten im CKD-Stadium zu Beginn und am Ende der Hämodialysebehandlung unterscheiden ($0,42 \pm 0,04$ vs. $0,41 \pm 0,03$ bzw. $0,40 \pm 0,02$; $p > 0,05$). Abb. 5.19

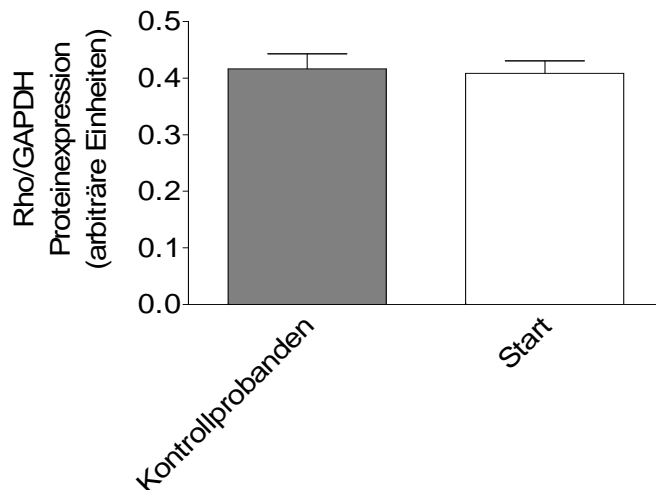


Abb. 5.19: Proteinexpressionsveränderungen von Rhodanese in CD 14-positiven Monozyten im Vergleich zu Kontrollprobanden und CKD-Patienten.

Dargestellt ist der Quotient aus der Rhodaneseexpression in Relation zur Proteinexpression von GAPDH. Es zeigt sich, dass zwischen den Kontrollprobanden und den CKD-Patienten keine Unterschiede in der quantitativen Proteinexpression von Rhodanese vorhanden sind ($p > 0,05$).

Für das Protein SOD-1 zeigte sich eine signifikante Mehrexpression in den CD 14-positiven Monozyten der Kontrollpatienten ($n=13$) im Vergleich zu den CKD-Patienten ($n=13$) ($22,94 \pm 3,71$ vs. $12,60 \pm 1,10$ bzw. $11,39 \pm 1,64$; $p < 0,05$). Keine signifikanten Proteinexpressionsveränderungen zeigten sich in der Untersuchung zwischen den Kontrollpatienten und den Kontrollprobanden ($n=35$); $22,94 \pm 3,71$ vs. $15,44 \pm 1,62$; $p > 0,05$. Kontrollprobanden zeigen keinen Unterschied hinsichtlich der Proteinexpression zu den CKD-Patienten sowohl am Start als auch am Ende einer Hämodialysebehandlung ($15,44 \pm 1,62$ vs. vs. $12,60 \pm 1,10$ bzw. $11,39 \pm 1,64$; $p > 0,05$). Abb. 5.20

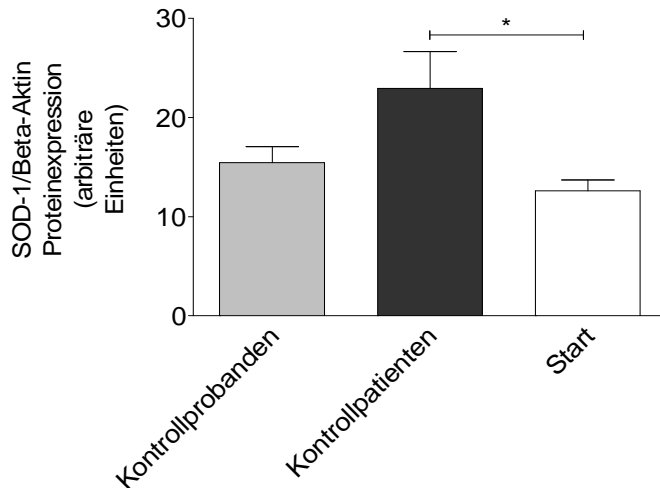


Abb. 5.20: Proteinexpressionsveränderungen von SOD-1 in CD 14-positiven Monozyten im Vergleich von Kontrollprobanden, Kontrollpatienten und CKD-Patienten.

Dargestellt ist der Quotient aus der SOD-1-Proteinexpression in Relation zur Proteinexpression von Beta-Aktin. Es zeigt sich, dass die Kontrollprobanden (n=35) im Vergleich zu den Kontrollpatienten (n=13) und den CKD-Patienten (n=13) keine Unterschiede in der quantitativen Proteinexpression von SOD-1 aufweisen ($p > 0,05$). Dagegen besitzen die Kontrollpatienten im Vergleich zu den CKD-Patienten sowohl am Start als auch am Ende einer Hämodialysebehandlung eine signifikant höhere Proteinexpression ($p < 0,05$). Die Hämodialyse zeigt keinen Einfluss auf die Proteinexpression von SOD-1 ($p > 0,05$), „*“ $p < 0,05$

Für das oxidativ wirkende Enzym gp91^{phox} wurden die verschiedenen Niereninsuffizienzstadien der nicht-hämodialysepflichtigen Kontrollpatienten (n=43, mittleres Alter in Jahren: 63 ± 16) ebenfalls eruiert. Auch für das oxidativ wirkende Enzym NAD(P)H-Oxidase sind im In-Cell Western Assay keine signifikanten Veränderungen bezüglich der Proteinexpression in den einzelnen Niereninsuffizienzstadien sowie im Vergleich zwischen den Kontrollprobanden (n=19) und den Kontrollpatienten (n=43) und zu den CKD Patienten (n=34) nachweisbar (Abb.5.21).

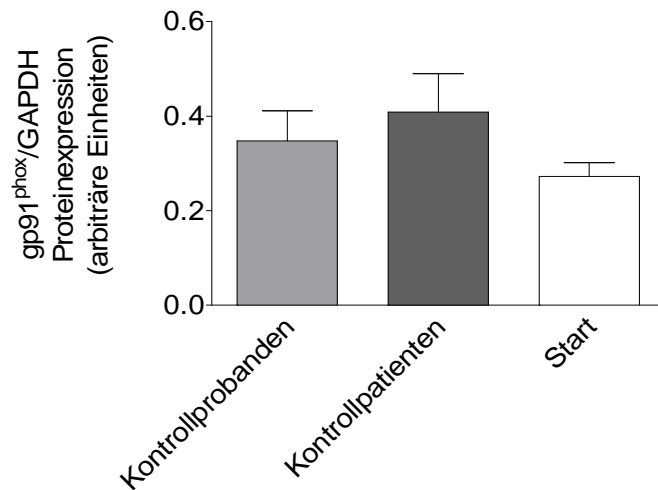


Abb. 5.21: Proteinexpressionsveränderungen von gp91^{phox} in CD 14-positiven Monozyten im Vergleich von Kontrollprobanden, Kontrollpatienten und CKD-Patienten.

Dargestellt ist der Quotient aus der gp91^{phox}-Proteinexpression in Relation zur Proteinexpression von GAPDH. Es zeigt sich, dass zwischen den Kontrollprobanden, den Kontrollpatienten und den CKD-Patienten keine Unterschiede in der quantitativen Proteinexpression von gp91^{phox} vorhanden sind ($p > 0,05$).

Bei den hier durchgeführten Untersuchungen zur quantitativen Bestimmung der Proteinexpression mittels In-Cell Western Assay konnte bei dem Enzym Rhodanese nicht wie bei der quantitativen Untersuchung der Genexpression mittels Real-Time PCR eine Veränderung im Verlauf einer Hämodialysetherapie gezeigt werden. Bei Rhodanese konnte auch kein Expressionsunterschied auf Proteinebene zwischen den Kontrollprobanden und CKD-Patienten eruiert werden.

Ähnlich wie Rhodanese verhält sich das Enzym SOD-1, jedoch konnte gezeigt werden, dass die Kontrollpatienten im Vergleich zu den CKD-Patienten sowohl am Start als auch am Ende einer Hämodialysebehandlung eine höhere Proteinexpression in den CD14-positiven Monozyten aufweisen. Ein Unterschied zu den Kontrollprobanden besteht nicht. Für die Untereinheit gp91^{phox} der NAD(P)H-Oxidase konnte bezüglich einer Proteinexpressionsveränderung im Verlauf einer Hämodialysebehandlung und im Vergleich zu Kontrollprobanden und Kontrollpatienten kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

5.5 Bestimmung der antioxidativen Gesamtkapazität im Plasma

Um die antioxidative Kapazität, d.h. alle antioxidativ wirkenden Substanzen im Plasma der Kontrollprobanden, -patienten und CKD-Patienten, zu messen, wurde das Verfahren eines Total Antioxidant Status Assay Kit (Calbiochem[®], Darmstadt,

Deutschland) angewendet. Mit Hilfe dieses Verfahrens, welches die im Plasma vorhandenen löslichen Antioxidantien nutzt, um die Reaktion von ABTSTM (2,2-Azino-di-[3-ethylbenz-thiazolin-sulphonat]) zu ABTS^{TM•+} zu hemmen, soll die im Plasma vorhandene gesamte antioxidative Kapazität gemessen werden. Die Menge an ABTS^{TM•+} die produziert wird, kann anschließend bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen werden. Diese gemessene Absorption ist indirekt proportional zu der Konzentration der im Plasma vorhandenen Antioxidantien.

5.5.1 Bestimmung der antioxidativen Gesamtkapazität im Plasma im Verlauf der Hämodialysebehandlung

Gemessen wurde die antioxidative Kapazität im Plasma, welches zuvor durch Zentrifugation von Vollblut gewonnen wurde. Bei CKD-Patienten (n=76; mittleres Alter in Jahren: 64 ± 13) wurde am Start und am Ende einer Hämodialysebehandlung die Gesamtkapazität der Antioxidantien im Plasma bestimmt. Es lässt sich nachweisen, dass sich die antioxidative Gesamtkapazität am Start der Hämodialysebehandlung signifikant von $0,9 \pm 0,03$ mM auf eine antioxidative Gesamtkapazität von $0,6 \pm 0,03$ mM am Ende einer Hämodialysebehandlung verminderte ($p < 0,0001$). Abb. 5.22

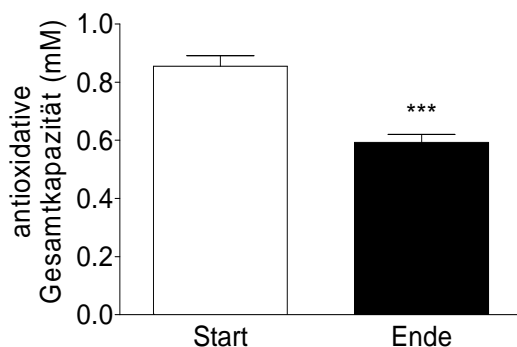


Abb. 5.22: Die antioxidative Gesamtkapazität des Plasmas im Verlauf der Hämodialysebehandlung.

Dargestellt wurde die Konzentration in mM der gesamten antioxidativen Kapazität im Plasma der CKD-Patienten im Stadium 5 der chronischen Niereninsuffizienz mit Hämodialysebehandlung. Dabei zeigt sich, dass sich zu Beginn der Hämodialysebehandlung eine signifikant höhere Konzentration an antioxidativ wirkenden Substanzen, im Vergleich zum Ende der Behandlung, im Plasma der CKD-Patienten nachweisen lässt (n=76; $p < 0,0001$). *** $p < 0,0001$

Um die Signifikanz zu verdeutlichen, wurde in der Abb. 5.23 die antioxidative Gesamtkapazität im Plasma pro Patient jeweils am Start und am Ende einer Hämodialysebehandlung dargestellt. Es lässt sich erkennen, dass die antioxidative Gesamtkapazität im Plasma in 74 von 76 gemessenen Proben im Verlauf der Hämodialysebehandlung abfiel. Abb.5.23

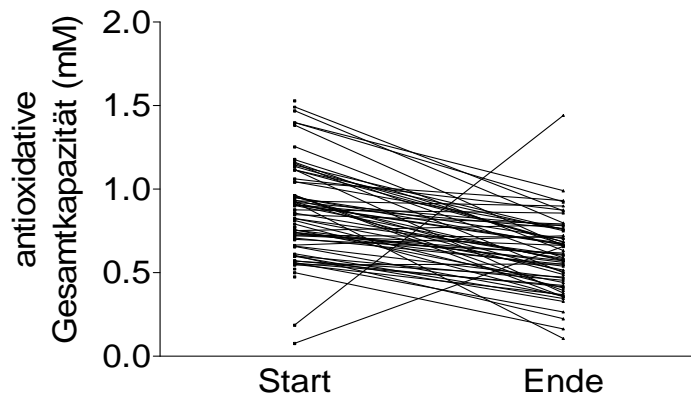


Abb. 5.23: Die antioxidative Gesamtkapazität des Plasmas im Verlauf einer Hämodialysebehandlung pro CKD-Patient.

Dargestellt wurde die Konzentration in mM der antioxidativen Gesamtkapazität im Plasma der CKD-Patienten im Stadium 5 der chronischen Niereninsuffizienz mit Hämodialysebehandlung. Dabei zeigt sich, dass sich bei 74 CKD-Patienten am Start einer Hämodialysebehandlung eine signifikant höhere Konzentration an antioxidativ wirkenden Substanzen im Vergleich zum Ende der Behandlung im Plasma der CKD-Patienten nachweisen lässt.

5.5.2 Bestimmung der antioxidativen Gesamtkapazität im Plasma im Vergleich von Patienten im CKD-Stadium 5 mit Hämodialysetherapie und Kontrollpatienten

Des Weiteren wurde, entsprechend den Untersuchungen mittels RT-PCR und In-Cell Western Assay, die gesamte antioxidative Kapazität von Kontrollprobanden ($n=40$; mittleres Alter in Jahren: 26 ± 4), Kontrollpatienten ($n=48$; mittleres Alter in Jahren: 64 ± 15) als Kontrollgruppe für die CKD-Patienten ($n=76$; mittleres Alter in Jahren: 64 ± 13) hinzugezogen. Dazu wurde analog zu den vorherigen Untersuchungen eruiert, ob die gesamte antioxidative Kapazität im Plasma durch die verschiedenen Niereninsuffizienzstadien bei den Kontrollpatienten einer Veränderung unterliegt. So ergaben sich für die zu vergleichenden Gruppen der unterschiedlichen Niereninsuffizienzstadien keine signifikanten Veränderungen der antioxidativen Gesamtkapazität ($p > 0,05$; keine Abbildung). Die gesamte antioxidative Kapazität im Plasma von Kontrollprobanden ist signifikant geringer als bei den zu vergleichenden Kontrollpatienten ($0,34 \pm 0,02$ vs. $0,78 \pm 0,04$; $p < 0,0001$), sowie bei den CKD-

Patienten am Start ($0,34 \pm 0,02$ vs. $0,84 \pm 0,04$; $p < 0,0001$) und am Ende ($0,34 \pm 0,02$ vs. $0,6 \pm 0,03$; $p < 0,0001$) einer Hämodialysebehandlung. Ein signifikanter Unterschied in der gesamten antioxidativen Kapazität zwischen den Kontrollpatienten und den CKD-Patienten am Start einer Hämodialysebehandlung besteht nicht ($0,78 \pm 0,04$ vs. $0,84 \pm 0,04$; $p > 0,05$). Die vermehrte antioxidative Gesamtkapazität im Plasma der CKD-Patienten vermindert sich jedoch im Verlauf von $0,84 \pm 0,04$ auf $0,6 \pm 0,03$ bis zum Ende einer Hämodialysebehandlung ($p < 0,0001$). Abb. 5.23

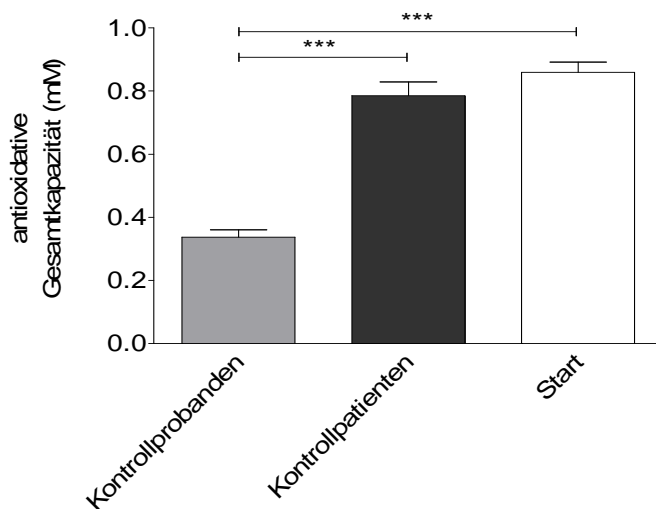


Abb. 5.23: Die antioxidative Gesamtkapazität des Plasmas im Vergleich von Kontrollprobanden, Kontrollpatienten und CKD-Patienten.

In der Abbildung wurde die Konzentration in mM der gesamten im Plasma vorhandenen antioxidativen Substanzen aufgetragen. Es zeigt sich, dass die Kontrollprobanden im Vergleich zu den Kontrollpatienten und den CKD-Patienten eine signifikant geringere gesamte antioxidative Kapazität aufweisen ($p < 0,0001$). Keinen signifikanten Unterschied gibt es zwischen den Kontrollprobanden und den CKD-Patienten am Start der Hämodialysebehandlung ($p > 0,05$). „***“ $p < 0,0001$

Die gesamte antioxidative Kapazität im Plasma bei CKD-Patienten und Kontrollpatienten ist größer als bei den Kontrollprobanden. Kontrollpatienten unterscheiden sich in der gesamten antioxidativen Kapazität nicht von den CKD-Patienten am Start der Hämodialysebehandlung. Während einer Hämodialysebehandlung kommt es jedoch zu einem signifikanten Abfall der antioxidativen Gesamtkapazität im Plasma. Diese ist trotz des starken Abfalls jedoch noch höher als die antioxidative Gesamtkapazität der Kontrollprobanden.

6. Diskussion

Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz weisen ein erhöhtes Risiko kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität auf [14-15; 56; 59-60], welches mit einer gestörten Endothelfunktion und den daraus resultierenden Folgen, wie Arteriosklerose, Hypertonie und koronare Herzerkrankungen einhergeht. Diese gestörte endotheliale Funktion ist unter anderem auf den oxidativen Stress zurückzuführen, dem die CKD-Patienten verstärkt unterliegen. Der oxidative Stress wird durch ein Ungleichgewicht zwischen einer inadäquaten Produktion von Oxidanzien, eines verminderten antioxidativen Abwehrmechanismus der Zelle oder durch eine Kombination aus beiden verursacht [6; 7]. Die Ursachen des oxidativen Stresses bei CKD-Patienten unter Hämodialysetherapie sind bis jetzt noch nicht eindeutig geklärt wurden. Mögliche Stimuli für eine erhöhte Produktion an ROS bei hämodialysepflichtigen Patienten sind unter anderem der Urämiestatus, die Wahl der Dialysemembran und die mögliche bakterielle Kontamination des Dialysats [56]. Da die freien Radikale in einer geringen Konzentration [11] vorliegen und äußerst flüchtig [73] sind, gestaltet es sich als sehr schwierig, den direkten Beweis der Radikalproduktion in lebenden Organismen zu erbringen. Da Sauerstoffradikale verschiedene Gewebe und Lipidmembranen zerstören können, kann die Lipidperoxidation als indirekter Marker für oxidativen Stress benutzt werden [11]. Alternativ kann man, um den oxidativen Stress zu messen, antioxidative und oxidative Enzyme in verschiedenen Zellen und im Plasma eruieren.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Hämodialysetherapie über eine Aktivierung der CD 14-positiven Monozyten mit einer erhöhten Produktion an ROS und/oder antioxidativen Enzymen assoziiert ist. Des Weiteren wurde eruiert, ob der Grad der Niereninsuffizienz einen Einfluss auf die Entstehung des oxidativen Stresses besitzt. Dafür wurden die antioxidativen Abwehrsysteme von Rhodanese (Rho) und der Superoxiddismutase-1 (SOD-1), sowie das oxidative System der NAD(P)H-Oxidase (NOX 2) auf mRNA- und Proteinebene in CD 14-positiven Monozyten untersucht. Weiße Blutzellen sind nicht nur eine Quelle für die Bildung von ROS, sie sind auch Ziel ihrer eigenen, endogen produzierten Radikale [74]. CD 14-positive Monozyten, als Blutphagozyten, sind daher für das Monitoring von oxidativen Stress geeignet. Des Weiteren wurde das im Plasma vorhandene lösliche

antioxidative Abwehrsystem unter dem Einfluss der Hämodialysebehandlung untersucht.

6.1 Die Rolle von Rhodanese bei oxidativem Stress in der Hämodialysebehandlung

Rhodanese ist eine Thiosulfat-Sulfurtransferase, die als erstes in menschlichen roten Blutzellen identifiziert wurde. In der hier vorliegenden Arbeit wurde Rhodanese hinsichtlich der mRNA- und Proteinexpression in CD 14-positiven Monozyten untersucht. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden das Vorkommen und die Funktion des Enzyms in diesen Zellen nicht beschrieben. Die biologische Rolle und die Funktion von Rhodanese werden breit diskutiert. Zu den bekannten Funktionen von Rhodanese zählen die Entgiftung von Cyaniden, die Bildung von prosthetischen Gruppen in Eisen-Schwefel-Proteinen und der Schwefeltransfer für die Synthese von Thiaminen und 4-Thiouridine in tRNA [75]. Als antioxidatives Enzym besitzt Rhodanese in Hinblick auf die Übertragung von Schwefelatomen eine wichtige Funktion. Es dient als Akzeptor von Schwefelatomen von Thiocysteinen, Thiocystine [76] und Thiosulfaten [20]. Anschließend als Schwefelatom-Donator für Thiocyanide [20], Eisen-Schwefel-Verbindungen [75], diversen Enzymen (z.B. Xanthinoxidase, Succinatdehydrogenase), sowie für Glutathion und Thioredoxin. Glutathion ist eine Sulfhydrylverbindung, die im reduzierten Zustand die SH-Gruppen von Proteinen und Enzymen vor Oxidation schützt. Es ist Bestandteil eines Systems zur Entgiftung von Peroxiden (z.B. H_2O_2) und wirkt somit protektiv gegen oxidativen Stress. Wie aus den Funktionen der Rhodanese hervorgeht, ist Rhodanese ein Enzym, welches sowohl antioxidative als auch oxidative Funktionen aufrechterhält.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde als Erstes das Expressionsniveau von Rhodanese auf Transkriptionsebene bei gesunden Kontrollprobanden untersucht. Dabei zeigte sich, dass nierengesunde Kontrollprobanden ($n=40$) Rhodanese auf Transkriptionsebene deutlich mehr exprimieren als Kontrollpatienten ohne Hämodialysetherapie ($n=33$; $24,8 \pm 3,3$ vs. $16,5 \pm 2,9$; $p<0,05$) und CKD-Patienten im Stadium 5 ($n=25$; $24,8 \pm 3,3$ vs. $13,4 \pm 2,8$; $p<0,01$). Allerdings unterschied sich die mRNA-Expression des Enzyms in den verschiedenen Stadien der Niereninsuffizienz bei den Kontrollpatienten nicht. Zudem fand sich kein Unterschied zwischen Kontrollpatienten und CKD-Patienten im Stadium 5 mit Hämodialysetherapie. Somit beeinflusst die Niereninsuffizienz, aber nicht das Stadium der Niereninsuffizienz, die Rhodaneseexpression auf Transkriptionsebene in CD 14-positiven Monozyten.

Bisher wurde nur wenig über die Expression von Rhodanese in Leukozyten publiziert. Die meisten Untersuchungen stützen sich auf Messungen im Serum oder in Erythrozyten. *Sorbo BH* z.B. untersuchte die Aktivität von Rhodanese im Serum und in Erythrozyten gesunder Probanden. Bei diesen Untersuchungen gesunder Probanden konnte er jedoch feststellen, dass die Aktivität des Enzyms Rhodanese viel niedriger und zudem und auch leichter zu inaktivieren ist [62; 77]. Da in der hier vorliegenden Arbeit mittels Real-Time PCR das Enzym Rhodanese quantitativ in CD 14-positiven Monozyten untersucht wurde, lassen sich bezüglich der Aktivität und Inaktivierbarkeit des Enzyms nur indirekte Rückschlüsse ziehen. Untersuchungen, die zeigten, dass Rhodanese vermindert bei Kontrollprobanden vorkommt, untersuchten nicht die Rhodaneseexpression in CD 14-positiven Monozyten, sondern in Erythrozyten [62; 77]. Erythrozyten sind frei von DNA, sodass eine Regulierung von Rhodanese, auf Gen-Ebene, im akuten oxidativen Stress nicht möglich ist. Des Weiteren wurde in der hier vorliegenden Arbeit nicht zwischen Rauchern und Nichtrauchern in der Kontrollprobandengruppe unterschieden. *Hasuike et al.* konnten zeigen, dass in den Erythrozyten von Nichtrauchern eine geringere Rhodanesekonzentration als bei Rauchern und CKD-Patienten im Stadium 5 der chronischen Niereninsuffizienz, sowohl vor als auch nach der Hämodialysebehandlung, vorhanden war [62].

Mittels Real-time PCR konnten wir zeigen, dass es bei Patienten im CKD-Stadium 5 im Verlauf einer Hämodialysebehandlung zu einer signifikanten Minderung der Rhodaneseexpression auf Transkriptionsebene in CD 14-positiven Monozyten kam ($13,4 \pm 2,8$ vs. $7,4 \pm 1,2$; $p=0,04$). Diese Verminderung der Rhodaneseexpression auf Transkriptionsebene führen wir auf die Hämodialysebehandlung zurück. Es ist bekannt, dass nach einer Hämodialysebehandlung die Antioxidanzien vermindert sind [4; 78] und durch die, während der Hämodialysebehandlung, steigende Konzentration an reaktiven Sauerstoffradikalen [15] der oxidative Stress verursacht wird. Dazu passt, dass nach der Hämodialysebehandlung mehr Endprodukte der Lipidperoxidation, oxidierte und carbamylierte Proteine [79], als Marker für oxidativen Stress vorliegen. Diese Proteine und Lipide werden direkt von ROS modifiziert [4]. Rhodanese kann durch Oxidation von reduziertem Thioredoxin in seine Disulfidform, NAD(P)H, sehr schnell oxidieren, da Thioredoxin durch NAD(P)H und die Thioredoxinreduktase reduziert wird [80]. Durch die Oxidation von NAD(P)H kommt es in der Atmungskette zu einer verminderten Produktion an Sauerstoffradikalen, da

keine Elektronen von NAD(P)H auf Sauerstoff übertragen werden können. Über diesen Mechanismus besteht die Möglichkeit einer Beteiligung an der Beseitigung dieser reaktiven Stoffe. Das heißt, wenn nach der Hämodialysebehandlung weniger Rhodanese zur Verfügung steht, kann man somit auf eine vermehrte Produktion an ROS über diesen Mechanismus schließen. Bekannt ist, dass CKD-Patienten ohne und mit Hämodialysetherapie im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden verstärkt unter oxidativem Stress leiden [4; 81-82]. Mit den hier erzielten Ergebnissen, dass gesunde Kontrollprobanden Rhodanese auf Transkriptionsebene stärker als die Kontrollpatienten und die CKD-Patienten mit Hämodialysebehandlung exprimieren, lässt sich die antioxidative Eigenschaft von Rhodanese bekräftigen.

Mittels In-Cell Western Assay konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es nach einer Hämodialysebehandlung nicht zu einer verminderten Rhodaneseexpression auf Proteinebene kommt. Es kam nicht, wie aufgrund der Real-Time PCR-Ergebnisse vermutet, zu einer geringeren Rhodaneseexpression auf Proteinebene nach einer Hämodialysebehandlung bei Patienten im CKD-Stadium 5. Dies kann dadurch bedingt sein, dass die Messung der Proteinexpression direkt nach der Hämodialysebehandlung stattfand, sodass die Expression von Rhodanese auf Transkriptionsebene, jedoch noch nicht auf Proteinebene, nachweisbar war. Ursachen für die Diskrepanz zwischen mRNA- und Proteinexpression können unter anderem dadurch bedingt sein, dass die Expression von Genen durch viele Mechanismen, eingeschlossen die Transkription, mRNA-Splicing, mRNA-Stabilisierung, Translation und posttranslationale Modifizierung von Proteinen, kontrolliert wird [83]. Die Halbwertszeit individueller mRNA innerhalb bestimmter eukaryontischer Zellen kann zwischen Größenordnungen von wenigen Minuten bis viele Stunden und in manchen Fällen sogar Tagen variieren. Einer der Haupt-mRNA-Zerfallswege wird durch Kürzung des Poly-A-Schwanzes initiiert, gefolgt von Decapping, was letztendlich zur 5' → 3' exonucleotitischen Verminderung von mRNA führt [83]. Somit können diese Mechanismen die Bildung des Proteins verzögern bzw. hemmen. Eine vermehrte Rhodaneseexpression auf Transkriptionsebene hat somit nicht zwangsläufig eine vermehrte Proteinexpression in CD 14-positiven Monozyten zur Folge. Hinweise auf eine verminderte Konzentration bzw. Aktivität von Rhodanese nach einer Hämodialysebehandlung kann man indirekt über die Funktion finden. Rhodanese bildet durch Übertragung von Schwefelatomen aus Zyaniden Thiocyanide [62; 84]. Die Untersuchungen von

Hasuike et al. konnten zeigen, dass zu Beginn einer Hämodialysebehandlung die Thiocyanidkonzentration im Plasma höher war als am Ende der Hämodialysebehandlung [62]. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass es durch die HD-Therapie zu einer verminderten Rhodaneseexpression und damit zu einem Abfall seines Produktes Thiocyanid kommt. Die Untersuchungen von *Hasuike et al.* konnten zudem noch eine erhöhte Konzentration an Thiocyanid im Plasma von CKD-Patienten sowohl vor als auch nach einer Hämodialysebehandlung und bei rauchenden Kontrollprobanden im Vergleich zu nicht rauchenden Kontrollprobanden zeigen [62]. Thiocyanid stellt den stärkste Risikofaktor für Arteriosklerose bei Rauchern und Urämiepatienten dar [62] und fördert auch die Bildung von oxidativem Stress, weil es das bevorzugte Substrat für die Leukozytenperoxidase darstellt. Dieses Peroxidase/Thiocyanid/H₂O₂-System treibt die Lipidperoxidation voran [62]. *Zhang et al.* demonstrierten, dass die Lipidperoxidation in Gegenwart der Myeloperoxidase (MPO) in einem dosisabhängigen Verhalten durch Thiocyanid beschleunigt wird [63]. Die, in der hier vorliegenden Arbeit, teilnehmenden Kontrollprobanden wurden nicht nach Raucher und Nichtraucher getrennt.

6.2 Die Rolle von SOD-1 bei oxidativem Stress in der Hämodialysebehandlung

ROS spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese von CKD-Patienten und den daraus folgenden Komplikationen. Nicht nur Nierenparenchymzellen, sondern auch polymorphkernige Leukozyten, Monozyten [56] und andere zirkulierende Zellen des Immunsystems können eine Quelle von ROS sein. Die Superoxiddismutase (SOD) bildet als „Radikalfänger“ einen Bestandteil eines wichtigen Abwehrmechanismus des Körpers gegen freie Sauerstoffradikale. Sie zeichnet sich in erster Linie bei der Abwehr des ROS vermittelten Schadens aus [7], indem sie das hochreaktive Sauerstoffradikal (O₂⁻) zu Wasserstoffperoxid (H₂O₂) dismutiert. Eine Überexpression von SOD hemmt effektiv die VCAM-1 und ICAM-1-Expression und die Bindung von neutrophilen Granulozyten in TNF-α stimulierten Endothelzellen [60]. Dadurch wird die Konzentration von O₂⁻ vermindert. Erhöhter oxidativer Stress stellt einen wichtigen Risikofaktor für Arteriosklerose und kardiovaskuläre Erkrankungen dar. In den hier vorgelegten Untersuchungen wurde die zytosolische CuZn-SOD (SOD-1) analysiert. Es wird davon ausgegangen, dass mononukleäre Zellen während der Hämodialysebehandlung an der Oberfläche der Dialysemembran und dem Schlauchmaterial aktiviert werden [11; 15; 85; 86]. Dabei setzen sie die von

Sauerstoff stammenden freien Radikale wie Superoxidanionen (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroxylradikale (HO^\bullet) und Hypochlorsäure (HOCL) frei [11]. Luger *et al.* konnten zeigen, dass die Interaktion der Dialysemembran mit den Monozyten die Zytokinproduktion in den Monozyten während der Hämodialyse auslöst, die dann wiederum die ROS-Produktion vorantreiben und schließlich die antioxidative Enzymaktivität in Granulozyten induzieren [87]. Die Dialysemembran induziert in Monozyten Apoptose [45; 88], die durch die SOD und andere Antioxidanzien vorgebeugt werden kann [88].

In der hier vorliegenden Arbeit wurde zur Beobachtung des oxidativen Stresses unter anderem SOD-1 als antioxidatives Enzym quantitativ in CD 14-positiven Monozyten untersucht. Mittels RT-PCR wurde quantitativ die SOD-1 bei nierengesunden Kontrollprobanden im Vergleich zu Kontrollpatienten ohne Hämodialysetherapie und CKD-Patienten im Stadium 5 mit Hämodialysetherapie verglichen. Dabei zeigte sich, auf Transkriptionsebene eine signifikante Mehrexpression der SOD-1 in CD 14-positiven Monozyten nierengesunder Kontrollprobanden im Vergleich zu Kontrollpatienten ohne Hämodialysetherapie ($30,8 \pm 4,2$ vs. $18,1 \pm 2,7$; $p < 0,05$). Auch im Vergleich zu Patienten im CKD-Stadium 5 mit Hämodialysetherapie ist die Genexpression von SOD-1 zu Beginn ($30,8 \pm 4,2$ vs. $18 \pm 2,1$; $p < 0,05$) und am Ende ($30,8 \pm 4,2$ vs. $17,1 \pm 2,6$; $p < 0,01$) der Hämodialysebehandlung deutlich erhöht. Des Weiteren konnten wir keinen Unterschied der SOD-1-Expression auf Transkriptionsebene in CD 14-positiven Monozyten bei CKD-Patienten im Stadium 5 während einer Hämodialysebehandlung ($18 \pm 2,1$ vs. $17,1 \pm 2,6$; $p > 0,05$) feststellen. Diese Ergebnisse weisen bei nierengesunden Kontrollprobanden auf eine stärkere antioxidative Abwehrkraft gegenüber ROS in CD14-positiven Monozyten durch SOD-1 hin. Eine erhöhte Aktivität von antioxidativen Enzymen kann der Entwicklung von Arteriosklerose entgegenwirken [60] bzw. eine verminderte Aktivität die verstärkte Entwicklung von Arteriosklerose bei CKD-Patienten begründen. Dadurch wird die Konzentration von O_2^- vermindert. Erhöhter oxidativer Stress stellt einen wichtigen Risikofaktor für Arteriosklerose und kardiovaskuläre Erkrankungen dar. Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurde berichtet, dass gesunde Probanden weniger SOD-1 in Granulozyten und polymorphkernigen weißen Blutzellen auf Transkriptionsebene exprimieren als Patienten im CKD-Stadium 5 mit Hämodialysetherapie [74; 86]. Jedoch konnten diese beiden Arbeitsgruppen, wie auch in der vorliegenden Arbeit in CD 14-positiven Monozyten gezeigt, keinen

kurzfristigen Einfluss einer Hämodialysebehandlung auf die vermehrte Expression in Granulozyten, polymorphkernigen weißen Blutzellen von SOD bzw. SOD-1 nachweisen.

Weiterhin konnte in dieser Dissertationsarbeit, hinsichtlich der SOD-1-Expression in CD 14-positiven Monozyten, kein Unterschied im Vergleich von Kontrollpatienten ohne Hämodialysetherapie mit Patienten im CKD-Stadium 5 sowohl zu Beginn als auch am Ende einer Hämodialysebehandlung gezeigt werden ($18,1 \pm 2,7$ vs. $18 \pm 2,1$ und $17,1 \pm 2,6$; $p > 0,05$). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch die Niereninsuffizienz per se die Expression von SOD-1 auf Transkriptionsebene in CD 14-positiven Monozyten vermindert ist, da nierengesunde Kontrollprobanden mehr SOD-1 exprimieren als die Kontrollpatienten ohne und CKD-Patienten mit Hämodialysetherapie. Im Gegensatz dazu konnten *Akijama et al.* zeigen, dass bei CKD-Patienten ohne HD-Therapie SOD-1 geringer auf Transkriptionsebene exprimiert wird als bei Patienten im CKD-Stadium 5 mit HD-Therapie [86]. Bei diesen Untersuchungen wurden die Leukozyten jedoch ohne Differenzierung in die Untersuchung eingeschlossen. Ein direkter Rückschluss auf CD 14-positive Monozyten lässt sich dementsprechend nicht ziehen. Zahlreiche Arbeiten bestärken jedoch unsere Ergebnisse. So wurde in verschiedenen Arbeiten beschrieben, dass Leukozyten von Urämiepatienten in ihrer Funktion gestört sind [56; 71; 89; 90]. Des Weiteren konnten *Lim WHL et al.* demonstrieren, dass dendritische Zellen von nicht hämodialysepflichtigen Patienten, die in urämischem Serum inkubiert wurden, anschließend eine verminderte Endozytose und eine Beeinträchtigung in der Reifung aufwiesen [71]. *Conchol M.* zeigte auf, dass Funktionsstörungen, einschließlich der Beeinträchtigung der Phagozytose in polymorphkernigen Zellen, durch die Hämodialyse und durch eine Vielzahl von anderen Faktoren, wie Urämietoxinen, Eisenüberladung, Niereninsuffizienz bedingte Anämie und eine mögliche Biokompatibilität des Dialysators, bedingt sind [56; 89]. Die phagozytierende Aktivität in nicht-hämodialysepflichtigen Patienten ist ähnlich zu den hämodialysierten und peritonealdialysierten Kontrollpatientengruppen stark vermindert [90]. Die Verminderung von SOD-1 konnte auch in anderen Zellpopulationen, z.B. in Erythrozyten bei niereninsuffizienten Patienten, gezeigt werden [7; 45; 91].

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnissen zum Nachweis des Proteins SOD-1 in CD 14-positiven Monozyten mittels In-Cell Western Assay konnte zeigen,

dass es zwischen den nierengesunden Kontrollprobanden und den Kontrollpatienten ohne HD-Therapie keinen signifikanten Unterschied zwischen der quantitativen Proteinmenge an SOD-1 gibt ($22,94 \pm 3,71$ vs. $15,44 \pm 1,62$; $p > 0,05$). Ein signifikanter Mehrexpression des Proteins konnte bei Kontrollpatienten ohne Hämodialysetherapie verglichen mit den Patienten im CKD-Stadium 5 vor und nach einer Hämodialysebehandlung gemessen werden ($22,94 \pm 3,71$ vs. $12,60 \pm 1,10$ bzw. $11,39 \pm 1,64$; $p < 0,05$). Das bedeutet, dass diese Patienten mehr SOD-1 in den CD 14-positiven Monozyten exprimieren und dies eine bessere Abwehrfunktion gegen das endogen produzierte ROS darstellt als bei Patienten mit Hämodialysetherapie. Dass die Aktivität der SOD bei gesunden Probanden im Gegensatz zu CKD-Stadium 5 mit Hämodialysetherapie vermindert ist, konnte von *Schettler V et al.* gezeigt werden [11], jedoch fanden diese Aktivitätsmessungen in neutrophilen Granulozyten statt. Weiterhin wurde von *Dursun E et al.* beschrieben, dass die SOD-Aktivität in Erythrozyten bei HD-Patienten vor und nach der HD sowohl mit als auch ohne Diabetes Mellitus im Vergleich zu gesunden Kontrollen und Diabetespatienten ohne renale Erkrankungen geringer ist [4]. Eine mögliche Ursache für eine verminderte SOD-1-Proteinexpression kann ein geringeres Vorhandensein von Kofaktoren des Enzyms sein. *Zwolińska D et al.* konnten nachweisen, dass bei hämodialysepflichtigen Kindern die Spurenelemente Kupfer, Zink und Selen im Plasma und in den Erythrozyten vermindert sind [45]. Diese Spurenelemente wurden in der hier vorliegenden Arbeit bei den zu untersuchenden CKD-Patienten, Kontrollpatienten sowie -probanden nicht gemessen. Eine Veränderung der SOD-1-Expression auf Proteinebene in CD 14-positiven Monozyten im Verlauf einer Hämodialysebehandlung konnte in den hier durchgeführten Untersuchungen nicht gezeigt werden ($12,43 \pm 1,42$ vs. Ende $11,40 \pm 1,64$; $p = 0,31$). Auch andere Untersuchungen in Granulozyten [11] und Erythrozyten [73] konnten bisher keine Veränderungen der Proteinexpression und -aktivität im Verlauf einer Hämodialysebehandlung festgestellt werden.

Die hier dargestellten Ergebnisse der Genexpression und der Proteinexpression von SOD-1 korrelieren nicht eindeutig miteinander. Eine verstärkte mRNA-Expression von SOD-1 bei nierengesunden Kontrollprobanden lässt sich auf Proteinebene nicht darstellen. Die Ursachen dafür können, wie bereits im vorangegangenen Text erwähnt, durch zahlreiche Mechanismen bedingt sein [83]. Der Status der SOD scheint aber bei hämodialysepflichtigen Patienten sehr variabel zu sein.

Untersuchungen in verschiedenen Zellen und im Plasma von hämodialysepflichtigen Patienten zeigen immer wieder unterschiedliche Ergebnisse.

In der hier vorgelegten Arbeit konnte eine verminderte Proteinexpression des Enzyms SOD-1 in CD 14-positiven Monozyten bei CKD-Patienten mit Hämodialysetherapie gegenüber den Kontrollpatienten ohne Nierenersatztherapie gezeigt werden. Jedoch ist dies auf Transkriptionsebene des Enzyms nicht nachweisbar. In Erythrozyten und Granulozyten von hämodialysepflichtigen Patienten wurde festgestellt, dass die SOD-Aktivität vermindert [7; 78; 91] oder erhöht [11] sein kann.

6.3 Die Rolle von NOX 2 bei oxidativem Stress in der Hämodialysebehandlung

Die NAD(P)H-Oxidase (NOX) hat sich als eine Hauptquelle der ROS-Produktion in der Niere und im kardiovaskulären System [13], sowie in Zellen des phagozytierenden Abwehrsystems erwiesen. Phagozyten, wie neutrophile Granulozyten und Monozyten, produzieren ROS als einen Teil ihrer Abwehr gegen eingedrungene Bakterien. Diese Zellen generieren ROS unter Benutzung der NOX [56]. Die ROS-Bildung ist um vieles größer, wenn die Zellen Stresssignale erhalten [93]. Diese Granulozyten und Monozyten werden nicht nur durch eingedrungene Bakterien, sondern auch durch Zytokine wie TNF- α , den Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF), Interleukin-8, bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) [56] und durch Entzündungsmediatoren wie die Komplement stimulierenden Komponenten C3a und C5a [57] oder den Thrombozyten aktivierender Faktor (PAF) während der Hämodialysebehandlung [56] aktiviert. Die erhöhte NOX-vermittelte Superoxidproduktion ist an der Pathogenese der Bildung und Ruptur von arteriosklerotischen Plaques beteiligt. Gp91^{phox} bildet eine membranständige Untereinheit der NOX, die die Reaktion der Reduktion von O₂ durch Übertragung eines Elektrons in das Superoxidanion O₂⁻ katalysiert [13; 41]. Eine erhöhte Superoxidproduktion führt zu einer verminderten Bioverfügbarkeit von NO. Die Reaktion von O₂⁻ mit NO führt zur Bildung von Peroxinitriden. Peroxinitride (ONOO⁻) sind hochreaktive Oxidanzien, die für verschiedene Gewebeschäden verantwortlich sind, da sie Oxidationen von Proteinen, DNA und Lipiden in den Gefäßzellen verursachen. Die Verminderung von NO führt zu einer Verschlechterung der endothelialen Funktion mit dadurch bedingter verminderter endothelabhängiger Vasodilatation, Hypertrophie und Hyperplasie von glatten Gefäßmuskelzellen [43].

Neutrophile Granulozyten, die von hämodialysepflichtigen Patienten vor und nach einer Hämodialysebehandlung gewonnen wurden, zeigen eine höhere spontane Rate an ROS-Produktion als neutrophile Granulozyten von gesunden Kontrollen, sowie eine Neigung zum verstärkten „Respiratory Burst“ bei Exposition zu festen und löslichen Stimuli [56].

Eine Aktivierung in CD 14-positiven Monozyten konnte mit dieser hier vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden. In den hier untersuchten CD 14-positiven Monozyten im Blut nierengesunder Kontrollprobanden, Kontrollpatienten ohne HD-Therapie und Patienten im CKD-Stadium 5 mit Hämodialysetherapie zeigten sich sowohl in der mRNA-Expression als auch in der Proteinexpression von gp91^{phox} keine Unterschiede ($p > 0,05$). Im Verlauf einer Hämodialysebehandlung konnten keine Veränderungen von gp91^{phox} der mRNA- ($16,04 \pm 4,5$ vs. $19,64 \pm 6,1$; $p = 0,51$) und Proteinexpression ($0,28 \pm 0,03$ vs. $0,33 \pm 0,05$; $p = 0,35$) nachgewiesen werden. Folglich kam es zu keiner Aktivitätszunahme oder –abnahme der NOX. Diese hier eruierten Ergebnisse deuten darauf hin, dass der erhöhte oxidative Stress, dem die hämodialysepflichtigen CKD-Patienten unterliegen, nicht durch eine Hochregulation der NOX 2 in CD 14-positiven Monozyten bedingt ist. Bisherige Studien weisen eine gesteigerte NOX-Expression lediglich im Leber- und Nierengewebe bei niereninsuffizienten Ratten auf [7]. Weiterhin lassen hochfrequente bakterielle Infektionen bei CKD-Patienten im Stadium 5 der chronischen Niereninsuffizienz vermuten, dass eine Dysfunktion von neutrophilen Granulozyten [15], aber auch von CD 14-positiven Monozyten eine Rolle in einem abgeschwächten Immunsystem spielt.

Patienten unter chronischer Hämodialysebehandlung leiden vermehrt unter oxidativem Stress. Eine Möglichkeit der ROS Entstehung bei niereninsuffizienten Patienten im Verlauf der Hämodialysebehandlung besteht darin, dass nicht nur phagozytierende Zellen wie Monozyten und Granulozyten durch Aktivierung ROS generieren, sondern auch Endothelzellen und glatte Muskelzellen der Gefäße. Die NADPH-Oxidase ist ein konstitutives Enzym, welches durch physikalische Faktoren, wie laminaren und oszillatorischen Scheerstress [43], Dehnung und humorale Faktoren wie Zytokine, Wachstumsfaktoren und vasoaktive Substanzen aktiviert [65] werden kann. Für die endotheliale NAD(P)H-Oxidase wurde eine Aktivierung mit anschließender Hochregulation des Enzyms durch Angiotensin II beschrieben [43]. Als potentielle Quelle für ROS, die NO inaktivieren können, gilt nicht nur die NOX,

sondern auch die mitochondriale Atmungskette, Enzyme des Arachidonsäure Pathway, Lipoxygenase und Cyclooxygenase, Cytochrom p450, die Xanthinoxidase, NO-Synthasen, Peroxidasen und Hämoproteine [9-10].

6.4 Die gesamte antioxidative Kapazität im Plasma

Kardiovaskuläre Erkrankungen bilden die Haupttodesursache bei niereninsuffizienten Patienten unter Hämodialysetherapie [14]. Gesteigerte Lipidperoxidationen sind ein Kennzeichen des oxidativen Stresses, der die strukturelle Integrität von Zellmembranen zerstört. Durch die Oxidation von LDL können sich kurzkettige Aldehyde bilden und die Lysinreste an Apolipoprotein B modifizieren. Das modifizierte LDL kann von Makrophagen aufgenommen werden und zur Schaumzellbildung führen [14]. Diese Lipidperoxidation führt über die Schädigung der Membranen zu einer endothelialen Dysfunktion [6], die eine Voraussetzung für die Bildung von Arteriosklerose darstellt. Verschiedene Antioxidanzien, wie die SOD oder die Glutathionperoxidase (Gpx) sowie wasser- und fettlösliche Antioxidanzien (Vitamin C und E), helfen, der LDL-Oxidation vorzubeugen [14]. Die primäre Abwehr gegen oxidativen Stress in der extrazellulären Flüssigkeit wird durch zahlreiche niedermolekulargewichtigen antioxidative Moleküle, die entweder wasser- oder fettlöslich sind, gebildet. Diese löslichen Antioxidanzien werden entweder während des endogenen Metabolismus (z.B. Harnsäure, Bilirubin, Albumin oder Thiole) oder durch Nahrungsmittel, die reich an Antioxidanzien sind (Olivenöl, Früchte und Gemüse, Tee, Wein, etc.), aufgenommen [94]. Die Summe aus endogenen und exogenen Antioxidanzien bildet die gesamte antioxidative Kapazität der extrazellulären Flüssigkeit. Veränderungen dieser Antioxidanzien reflektieren deren Verbrauch während eines akuten oxidativen Stresszustandes. Durch die gesamte antioxidative Kapazität erhält man relevantere Informationen, verglichen zu dem, was durch Messungen einzelner Biomarker aufgezeigt werden kann. Da die gesamte antioxidative Kapazität den kumulativen Effekt aller Antioxidanzien, die gegenwärtig im Plasma und in den Körperflüssigkeiten vorhanden sind, betrachtet. Die Oxidierbarkeit von Serumkomponenten ist ein leicht zugänglicher Parameter für die Bestimmung der antioxidativen Eigenschaften des Serums, aus diesem Grund stellt die Messung der totalen antioxidativen Kapazität im Serum mittels TAOS ein gutes Mittel dar, um Veränderungen während der HD-Behandlung zu bewerten [52]. Die

Kooperation zwischen verschiedenen antioxidativen Systemen bietet einen größeren Schutz gegen den Angriff von reaktiven Sauerstoff- oder Nitroxidradikalen [94].

In Hinblick auf das erhöhte kardiovaskuläre Risiko, dem die niereninsuffizienten Patienten mit und ohne Hämodialysetherapie unterliegen, wurde in der hier vorliegenden Arbeit der Effekt einer Hämodialysebehandlung auf die gesamte antioxidative Kapazität im Plasma gemessen, da es während der HD-Behandlung nicht nur zu einem Verlust harnpflichtiger Substanzen, sondern auch zum Verlust essenzieller Substanzen, wie Antioxidanzien und Spurenelemente, kommt. Dies ist relevant für die wasserlöslichen und ungebundenen kleinmolekulargewichtigen Substanzen, da die HD einen nonselektiven Prozess darstellt, der aufgrund seiner siebenden Eigenschaften der Membran, Stoffe aufgrund ihres Molekulargewichts trennt. Weiterhin wurden gesunde Kontrollprobanden und Kontrollpatienten ohne Nierenersatztherapie auf ihre gesamte antioxidative Kapazität im Plasma hin untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die gesunden Kontrollprobanden primär eine geringere Konzentration der gesamten antioxidativen Kapazität im Plasma aufwiesen, im Vergleich zu Kontrollpatienten ohne Nierenersatztherapie ($0,34 \pm 0,02$ vs. $0,78 \pm 0,04$; $p < 0,0001$) und zu den Patienten im CKD-Stadium 5 zu Beginn ($0,34 \pm 0,02$ vs. $0,84 \pm 0,04$; $p < 0,0001$) und am Ende ($0,34 \pm 0,02$ vs. $0,6 \pm 0,03$; $p < 0,0001$) einer Hämodialysebehandlung. Das heißt, dass bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz eine signifikant höhere antioxidative Kapazität im Plasma vorliegt. Ein signifikanter Unterschied in der totalen plasmatischen antioxidativen Kapazität zwischen Kontrollpatienten ohne Nierenersatztherapie und Patienten im CKD-Stadium 5 vor und nach der Hämodialysebehandlung konnte nicht eruiert werden. Auch *Mayer B et al.* konnten in ihren Versuchen nachweisen, dass sich kein signifikanter Unterschied der gesamten antioxidativen Kapazität im Plasma zwischen CKD-Patienten im Stadium 5 zu Beginn der HD-Behandlung und der Kontrollgruppe nachweisen lässt [52]. Leider wurde in der Arbeit von *Mayer B et al.* die Kontrollgruppe nicht näher definiert, sodass kein Hinweis darauf besteht, ob es sich um gesunde Probanden oder Patienten ohne HD-Therapie handelt. Zudem wurde in ihrer Arbeit gezeigt, dass die Harnsäurewerte bei CKD-Patienten vor der HD-Behandlung im Vergleich zu Normalwerten erhöht, jedoch die Albuminwerte erniedrigt waren. Dies könnte das Fehlen eines Nettoeffekts im TAOS erklären, der durch Albumin und Harnsäure vorherrschend bestimmt wird [52]. Auch die Gruppe um *Soska V et al.* [15] zeigten, dass die Kontrollprobanden ohne

Hämodialysetherapie eine signifikant verminderte totale antioxidative Kapazität im Plasma aufwiesen als CKD-Patienten im Stadium 5 unter Hämodialysebehandlung [15]. *Abdel-Naeem NM et al.* zeigten, dass CKD-Patienten ohne Hämodialysetherapie und Patienten im CKD-Stadium 5 mit Hämodialysetherapie eine verminderte antioxidative Kapazität im Plasma aufwiesen im Gegensatz zu den untersuchten Kontrollprobanden [95]. Auch *Dursun B et al.* konnten zeigen, dass die gesamte oxidative Kapazität bei hämodialysepflichtigen Patienten niedriger ist als bei gesunden Kontrollprobanden [96].

In der hier vorliegenden Arbeit zeigte sich bei Patienten im CKD-Stadium 5 nach einer HD-Behandlung ein signifikanter Abfall der gesamten antioxidativen Konzentration im Plasma ($0,9 \pm 0,03$ mM vs. $0,6 \pm 0,03$ mM; $p < 0,0001$). Dies bestätigt die Ergebnisse von *Mayer B et al.*, die ebenfalls eine drastische Abnahme der totalen antioxidativen Kapazität im Plasma während einer HD-Behandlung beschreiben. Diese geht parallel mit einer Zunahme der Proteinoxidation einher [52]. Dies kann durch einen starken Verlust von Harnsäure und Ascorbinsäure während einer HD-Behandlung bedingt sein [52]. Vitamin C ist ein wasserlösliches Molekül. Es ist wahrscheinlich, dass es während der Hämodialysebehandlung aufgrund der Siebeigenschaften der Dialysemembran verloren geht [94]. Verlustsyndrome von wasserlöslichen Vitaminen wurden bei chronisch niereninsuffizienten Patienten gut beschrieben. Diese werden mit einem Substanzverlust während der Hämodialyse in Verbindung gebracht [97]. Zusätzlich ist die Plasmakonzentrationen von Vitamin C bei Patienten unter Hämodialysetherapie sehr niedrig, da die meisten Patienten nur geringe Mengen an Obst zu sich nehmen, um die Kaliumaufnahme gering zu halten [64; 94; 98-99]. Vitamin C ist jedoch nur bei einem Teil, aber nicht bei allen Patienten mit HD-Therapie vermindert vorhanden. Dies hängt möglicherweise davon ab, ob die Patienten einer Substitutionstherapie mit Vitamin C unterliegen oder nicht [56]. Bei den hier untersuchten CKD-Patienten mit Hämodialysetherapie, Kontrollpatienten ohne Nierenersatzverfahren, sowie bei den gesunden Kontrollprobanden wurde die Substitution von Vitaminpräparaten nicht eruiert. Vitamin C stellt die endotheliale Funktion durch Wiedererlangung der NO-vermittelten Vasodilatation bei Patienten mit Hypertonie wieder her [43; 100]. Die Menge an ROS-Fängern, wie z.B. Vitamin E, Glutathion oder SOD ist bei Hypertoniepatienten erniedrigt. Meist liegt der Vitamin E-Gehalt bei chronisch niereninsuffizienten Patienten mit Hämodialysetherapie im Normbereich [56]. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass fettlösliche Vitamine

wie Vitamin E spezifisch an Plasmaproteine und/oder an Lipoproteinen gebunden sind und nicht signifikant während der Hämodialyse eliminiert werden [97]. Eine Verminderung solcher reaktionsfolgeabbrechender antioxidativer Enzyme kann aus einem Ungleichgewicht mit oxidativem Stress und konsequenter Beschleunigung der Arterioskleroseentstehung aufgrund der vermehrten Lipidoxidation resultieren [14-15]. Eine erhöhte antioxidative Gesamtkapazität vor der Hämodialysebehandlung wird auf einen erhöhten prädialytischen Gehalt an Harnsäure zurückgeführt [15; 52; 101], sowie auf einen höheren Gehalt an wasserlöslichen Antioxidanzien wie Vitamin C [52; 94]. Der deutliche Abfall der gesamten antioxidativen Kapazität nach einer Hämodialysebehandlung in dieser Arbeit ist womöglich auf die Eliminierung der Harnsäure und der wasserlöslichen Vitamine zurückzuführen. Diese Verminderung der im Plasma gelösten Antioxidanzien kann zu einer insuffizienten antioxidativen Abwehr führen, welche bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz eine therapeutische Substitution bedingt [94]. Eine Vitamin E Substitution von 50 IU pro Tag soll bei niereninsuffizienten Patienten die Anfälligkeit zur Oxidation von LDL reduzieren [102]. *Islam KN et al.* berichten, dass eine Vitamin E Substitution mit einem verminderten Risiko an KHK assoziiert ist, da es sehr reichlich vorhanden und das am stärkste lipidlösliche Antioxidanz in LDL und Geweben ist. Eine Substitution von mindestens 400 IU pro Tag Vitamin E reduziert bei gesunden Männern und Frauen die LDL-Oxidation [48]. Und bedingt zudem eine verminderte Sterblichkeit an kardiovaskulär Ereignissen und nicht tödlichen Myokardinfarkten bei Patienten [48]. Vitamin E beugt den oxidativen Stress während Anämietherapie vor und verbessert die Erythropoetinantwort, die oft durch oxidativen Stress beeinträchtigt ist [64]. Auch mit Vitamin E modifizierte Dialysemembranen haben gezeigt, dass sie potent sind, den oxidativen Stress zu reduzieren [47; 64]. *Satoh M et al.* berichten, dass Vitamin E überzogene erneuerte Zellulosemembranen effektiver als Polysulfonemembranen während der HD, speziell bei Patienten mit Diabetes mellitus sind. Durch den Gebrauch von Vitamin E überzogenen Zellulosemembranen können Patienten gegen oxidativen Stress geschützt werden. Weiterhin kann der Gebrauch dieser Membranen, die Dialyse induzierte Amyloidose, Arteriosklerose, das Risiko für Malignome und anderen Erkrankungen die durch oxidativen Stress bedingt sind, reduzieren [47; 64].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in der hier vorliegenden Arbeit die gesamte antioxidative Kapazität des Plasmas bei niereninsuffizienten Patienten mit

HD-Therapie erhöht ist. Dazu existieren verschiedene Arbeiten, die einerseits die höchste gesamte antioxidative Kapazität bei CKD-Patienten ohne Hämodialysetherapie [15] als auch die höchste gesamte antioxidative Kapazität bei gesunden Kontrollprobanden [95; 96] darstellten. Eine Erhöhung der gesamten antioxidativen Kapazität kommt fast ausschließlich durch die relativ hohen plasmatischen Harnsäurewerte zustande. Die gesamte antioxidative Kapazität fällt nach einer Hämodialysebehandlung signifikant ab. Durch erhöhte Harnsäureplasmawerte kann eine Depletion von Vitamin C, Vitamin E oder anderen antioxidativen Substanzen verschleiert und trotzdem eine verbesserte antioxidative Kapazität vorgetäuscht werden. In ähnlicher Weise bedeutet eine geringe gesamte antioxidative Kapazität, wie es in der gesunden Kontrollgruppe der Fall ist, nicht, dass der Organismus einem erhöhten oxidativen Stress ausgesetzt war. Da der oxidative Stress eine Imbalance zwischen Antioxidanzien und Oxidanzien darstellt, besteht die Möglichkeit, dass bei den gesunden Kontrollprobanden die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies vermindert war und daher auch die antioxidativen Schutzmechanismen dem Organismus angepasst wurden.

7. Zusammenfassung

Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz haben ein erhöhtes kardiovaskuläres Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko. Neben klassischen Risikofaktoren könnte dabei der oxidative Stress eine wesentliche Rolle spielen.

In der vorliegenden Untersuchung wurden die Expression der Thiosulfat-Sulfurtransferase Rhodanese, der Superoxiddismutase 1 (SOD-1) und einer Untereinheit der NAD(P)H-Oxidase gp91^{phox} in CD 14-positiven Monozyten von 66 Hämodialysepatienten, 43 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und 40 gesunden Kontrollpersonen untersucht. Die Transkripte wurden mittels quantitativer RT-PCR und die Protein-Expression wurde mittels quantitativen In-Cell Western Assay bestimmt. Weiterhin wurde die gesamte antioxidative Kapazität im Plasma mit Hilfe eines Total Antioxidant Status Assay Kits photometrisch bestimmt.

Kontrollpersonen hatten signifikant erhöhte Transkripte für Rhodanese und SOD-1 im Vergleich mit Hämodialysepatienten und mit Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz. Die Rhodanese-Transkripte waren $13,4 \pm 2,8$ (Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes; n=25) für Hämodialysepatienten, $16,5 \pm 2,9$ (n=33) für Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und $24,8 \pm 3,3$ (n=40) für Kontrollpersonen ($p < 0,0001$ mittels ANOVA). Die SOD-1-Transkripte waren $18,00 \pm 2,1$ (Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes; n=50) für Hämodialysepatienten, $18,1 \pm 2,7$ (n=33) für Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und $30,8 \pm 4,2$ (n=40) für Kontrollpersonen ($p < 0,0004$ mittels ANOVA). Die gp91^{phox}-Transkripte waren nicht unterschiedlich zwischen den Gruppen. Während einer Hämodialysebehandlung kam es zu einer signifikanten Veränderung der Expression der Rhodanese-Transkripte $13,4 \pm 2,8$ vs. $7,4 \pm 1,2$ (n=25; $p = 0,04$), jedoch zu keiner signifikanten Veränderung bei SOD-1 und gp91^{phox} auf Transkriptionsebene.

Im Gegensatz zu den Transkripten war die Expression von SOD-1 Proteinen signifikant geringer bei Hämodialysepatienten ($12,60 \pm 1,1$) im Vergleich zu Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ($22,94 \pm 3,71$ $p < 0,05$).

Während einer Hämodialysebehandlung kam es zu keiner signifikanten Veränderung der Expression von Rhodanese-Protein, SOD-1-Protein oder gp91^{phox}-Protein.

Hämodialysepatienten und Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz hatten eine signifikant erhöhte gesamte antioxidative Kapazität im Plasma im Vergleich mit Kontrollpersonen. Während der Hämodialyse kam es zu einer signifikanten

Verminderung der gesamten antioxidativen Kapazität von $0,9 \pm 0,03$ mM auf $0,6 \pm 0,03$ mM ($p < 0,0001$).

Die signifikante Verminderung von Rhodanese auf Transkriptionsebene während einer Hämodialyse und die signifikant verringerten Rhodanese- und SOD-1 Transkripte sowie die Verminderung der SOD-1-Proteine und die gesteigerte antioxidative Kapazität bei Hämodialysepatienten belegt die Bedeutung des oxidativen Stress bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz.

8. Literatur

1. Frei U, Schober-Halstenberg HJ: Nierenersatztherapie in Deutschland; Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland. QUASI-Niere Bericht 2006/2007
2. Grindt M, Kuhlmann M, Köhler H, Aktuelle Behandlungsstrategien in der Hämodialyse. 1.Auflage, UNI-MED Verlag AG, 2005.
3. Samtleben W, Blumstein M: Indikation und Auswahl der Dialyseverfahren bei akuter und chronischer Niereninsuffizienz einschließlich kontinuierlicher Verfahren. *internist* 1999; 40:3-12
4. Dursun E, Dursun B, Suleymanlar G et al: Effect of haemodialysis on the oxidative stress and antioxidants in diabetes mellitus. *Acta Diabetol* 2005; 42:123–128
5. Loughrey CM, Young IS, Ughtbody JH et al.: Oxidative stress in haemodialysis. *Q J Med* 1994; 87:679-683
6. Valentini J, Grotto D, Paniz C et al.: The influence of the hemodialysis treatment time under oxidative stress biomarkers in chronic renal failure patients. *Biomed Pharmacother.* 2007; 1-5
7. Varizi ND, Dicus M, Ho ND et al.: Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency. *Kidney Int.* 2003; 63(1):179-85
8. Afonso V, Champy R, Mitrovic D et al.: Reactive oxygen species and superoxide dismutases: Role in joint diseases. *Joint Bone Spine* 74, 2007;324-329
9. Cai H, Harrison DG: Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases The Role of Oxidant Stress. *Circ Res.* 2000;87:840-844
10. Hordijk PL: Regulation of NADPH Oxidases: The Role of Rac Proteins. *Circ Res.* 2006; 98:453-462
11. Schettler V, Wieland E, Methe H et al: Oxidative Stress during dialysis: effect on free radical scavenging enzymes (FRSE) activities and glutathion (GSH) konzentration in granulocytes. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13: 2588-2593
12. Bedard K., Krause KH: The nox family of ros-generating nadph oxidase: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2005; 87:245-313
13. Lim CS, Vaziri ND: Iron and Oxidative Stress in Renal Insufficiency. *American Journal of Nephrology.* 2004; 24:569-575

14. Jackson P, Loughrey CM, Lightbody JH et al.: Effect of Hemodialysis on Total Antioxidant Capacity and Serum Antioxidants in Patients with Chronic Renal Failure. *CLIN. CHEM.* 1995; 41/8:1135-1138
15. Soska V, Ciz M, Kubala L et al.: Phagocyte-derived oxidants and plasma antioxidants in haemodialysed patients. *Scand J Clin Lab Invest* 2007; 67:343-351
16. Mayer M. association of serum bilirubin concentration with risk of coronary artery disease. *Clin Chem* 2000; 46:1723-1727
17. Soejima A, Matsuzawa N, Miyake N et al.: Hypoalbuminemia accelerates erythrocyte membrane lipid peroxidation in chronic hemodialysis patients. *Clin Nephrol* 1999; 51:92-7
18. Melkani GC, Zardeneta G, Mendoza JA: GroEL interacts transiently with oxidatively inactivated rhodanese facilitating its reactivation. *Biochemical and Biophysical research Communications* 2002; 294:893-899
19. Nandi DL, Horowitz PM, Westley J: Rhodanese as a thioredoxin oxidase. *IJBCB* 2000; 32:465-473
20. Billaut-Laden I, Allorge D, Crunelle-Thibaut A et al.: Evidence for a functional genetic polymorphism of the human thiosulfate sulfurtransferase (Rhodanese), a cyanide and H₂S detoxification enzyme. *Toxicology*. 2006; 225(1):1-11
21. Bordo D, Bork P: The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily. Sequence-structure-function relations. *EMBO Rep.* 2002; 3:741-746
22. Horowitz PM, Bowman S: Conformational Changes Accompany the Oxidative Inactivation of Rhodanese by a Variety of Reagents. *J Biol Chem* 1987; 262: 8728-8733
23. Horowitz PM, Criscimagna NL: Sulfhydryl-directed Triggering of Conformational Changes in the Enzyme Rhodanese. 1988; 263, 21:10278-10283
24. www.unics.uni-hannover.de/nheajupa/f-jupa.html
25. Nakamura T, Yamaguchi Y, Sano H: Plant mercaptopyruvate sulfurtransferases Molecular cloning, subcellular localization and enzymatic activities, *Eur. J. Biochem.* 2000; 267:5621-5630
26. Dennis DJ., Mills JW, Smith RP: Histochemical Localization of Rhodanese Activity in Rat Liver and Skeletal Muscle. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1989; 97(2):247-55.
27. Leichert LI, Jakob U: Protein thiol modifications visualized in vivo. *PLoS Biol* 2004; 2(11):e333

28. Canella C, Berni R: Interaction of Rhodanese with intermediates of oxygen reduction. *FEBS Lett* 1983; 162:180-184
29. Ogata K, Dai X, Volini M: Bovine Mitochondrial Rhodanese is a Phosphoprotein. *J Biol Chem* 1989; 264:2718-2725
30. Beasley DMG: Cyanide Poisoning: pathophysiology and treatment recommendations. *Occup Med (Lond)*. 1998; 48(7):427-31
31. Iciek M, Wodek L: Biosynthesis and biological properties of compounds containing highly reactive, reduced sulfane sulfur. *Pol J Pharmacol*. 2001; 53(3):215-25.
32. Harris ED: Copper as a cofactor and regulator of copper, zinc superoxide dismutase. *J Nutr*. 1992; 122(3 Suppl):636-40.
33. Fridovich I: Superoxide Radical and Superoxide Dismutase. *Annu. Rev. Biochem.* 1995; 64:97-112
34. Bonomini F, Tengattini S, Fabiano A et al.: Atherosclerosis and oxidative stress. *Histol Histopathol*; 2008; 23:381-390
35. Wiseman H, Halliwell B.: Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 1996; 313:17-29.
36. Bruckdorfer KR.: Lipid oxidation products and vascular function. *Free Radic Res* 1998; 28:573-581.
37. Tiku ML, Gupta S, Deshmukh DR.: Aggrecan degradation in chondrocytes is mediated by reactive oxygen species and protected by antioxidants. *Free Radic Res* 1999; 30:395-405
38. Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Noshita N, Sugawara T, Kawase M, Chan PH: The cytosolic antioxidant copper/zinc-superoxide dismutase prevents the early release of mitochondrial cytochrome c in ischemic brain after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci* 2000; 20:2817-2824
39. Okado-Matsumoto A, Fridovich I: Amyotrophic lateral sclerosis: a proposed mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:9010-4
40. Yan C, Huang A, Wu Z et al.: Increased superoxide leads to decreased flow-induced dilation in resistance arteries of Mn-SOD-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physio*. 2005; 288:2225-2231.
41. Takeya R, Sumimoto H.: Molecular mechanism for activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *Mol Cells*. 2003; 16(3):271-7.

42. Vignais PW: The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism, *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 2002; 59:1428–1459
43. Zalba G, San José G, Moreno MU et al.: Oxidative Stress in Arterial Hypertension Role of NAD(P)H Oxidase.; *Hypertension* 2001; 38;1395-1399
44. Lambeth JD: Nox enzymes, ROS, and chronic disease: An example of antagonistic pleiotropy; *Free Radical Biology & Medicine* 2007; 43:332–347
45. Zwołńska D, Grzeszczak W, Szczepańska M et al.: Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in children on maintenance dialysis *Pediatr Nephrol* 2006; 21: 705–710
46. Loughrey CM, Young IS, Lightbody JH, et al: Oxidative stress in haemodialysis. *Q J Med* 1994; 87:679–683,
47. Satoh M, Yamasaki Y, Nagake Y, et al : Oxidative stress is reduced by the long-term use of vitamin E-coated dialysis filters. *Kidney Int.* 2001; 59(5):1943-50.
48. Islam KN, O'Byrne D, Devaraj S, Palmer B, Grundny SM, Jialal I: Alpha-tocopherol supplementation decreases the oxidative susceptibility of LDL in renal failure patients on dialysis therapy. *Atherosclerosis* 2000; 150:217-224,
49. Morane M, Cristol JP, Canaud B.: Why hemodialysis patients are in a prooxidant state? What could be done to correct the pro/antioxidant imbalance, *Blood Purif.* 2000; 18:191– 199
50. Weinstein T, Chagnac A, Korzets A, et al: Hemodialysis in hemodialysis patients: evidence for impaired defence mechanisms against oxidative stress, *Nephrol. Dial. Transplant.* 2000; 15:883– 887
51. Miyazaki H, Matsuoka H, Itabe H, et al: Hemodialysis impairs endothelial function via oxidative stress: effects of vitamin E-coated dialyzer, *Circulation* 2000; 101:1002– 1006
52. Mayera B, Zittab S, Greilberger J et al: Effect of hemodialysis on the antioxidative properties of serum. *Biochim Biophys Acta.* 2003; 30;1638(3):267-72
53. Miyata T, Kurokawa K, Van Ypersele de Strihou C: Relevance of oxidative and carbonyl stress to long-term uremic complications, *Kidney Int.* 2000; 58 (76):120–125
54. Itoh S, Susuki C, Tsuji T: Platelet activation through interaction with hemodialysis membranes induces neutrophils to produce reactive oxygen species. *J Biomed Mater Res A.* 2006; 77(2):294-303.

55. Kuwahara T, Markert M, Wauters JP: Neutrophil oxygen radical production by dialysis membranes. *Nephrol Dial Transplant.* 1988; 3(5):661-5.,
56. Ward RA, McLeish KR: Oxidant Stress in Hemodialysis Patients: What Are the Determining Factors? *Artificial Organs.* 2003; 27(3):230-236
57. Ceballos-Picot I, Witko-Sarsat V, Merad-Boudia M et al.: Glutathione antioxidant System as a marker of oxidative stress in chronic renal failure. *Free Radic. Eiol. Med.* 1996; 6:845-853
58. Apostolov JEO, Shah SV, Ok E et al.: Adhesion Molecule-1 Endothelial Cells Through Intercellular Adhesion Molecule-1 and Vascular Cell Carbamylated Low-Density Lipoprotein Induces Monocyte Adhesion to Arterioscler. *Thromb. Vasc. Biol.* 2007; 27:826-832
59. Locatelli F, Marcelli D, Conte F et al.: Cardiovascular disease in chronic renal failure: the challenge continues. *Nephrol Dial transplant* 2000; 15:69-80
60. Lin SJ, Shyue SK, Hung YY et al.: Superoxide Dismutase Inhibits the Expression of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 and Intracellular Cell Adhesion Molecule-1 Induced by Tumor Necrosis Factor- α in Human Endothelial Cells Through the JNK/p38 Pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25(2):334-40
61. Wang Z, Nicholls SJ, Rodriguez ER et al.: Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherosclerosis. *Nat Med.* 2007; 13(10):1176-84.
62. Hasuike Y, Nakanishi T, Moriguchi R et al.: Accumulation of cyanide and thiocyanate in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2004; 19(6):1474-9
63. Zhang R, Shen Z, Nauseef WM et al.: Defects in leukocyte-mediated initiation of lipid peroxidation in plasma as studied in myeloperoxidase-deficient subjects: systematic identification of multiple endogenous diffusible substrates for myeloperoxidase in plasma. *Blood.* 2002; 99(5):1802-10
64. Manning RD, Niu Tian Shumei Meng J: Oxidative Stress and Antioxidant Treatment in Hypertension and the Associated Renal Damage *Am J Nephrol* 2005; 25:311–317
65. Touyz RM: Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension.* 2004; 44(3):248-52

66. Touyz RM, Tabet F, Schiffrin EL: Redox-dependent signalling by angiotensin II and vascular remodelling in hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2003; 30(11):860-6
67. Shainkin-Kestenbaum R, Caruso C, Berlyne GM: Reduced superoxide dismutase activity in erythrocytes of dialysis patients: a possible factor in the etiology of uremic anemia. *Nephron* 1990; 55:251–253
68. Durak I, Akyol O, Basesme E, Canbolat O, Kavutcu M: Reduced erythrocyte defense mechanisms against free radical toxicity in patients with chronic renal failure. *Nephron* 1994; 66:76–80
69. Eschbach JW, Adamson JW: Anemia of endstage renal disease (ESRD). *Kidney Int* 1985; 28: 1–5
70. Turi S, Nemeth I, Vargha I, Matkovics B, Dobos E: Erythrocyte defense mechanisms against free oxygen radicals in haemodialysed uraemic children. *Pediatr Nephrol* 1991; 5:179–183
71. Lim WH, Kireta S, Leedham E et al.: Uremia impairs monocyte and monocyte-derived dendritic cell function in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 2007; 72(9):1138-48
72. Dakshinamurty KV, Saibaba KS, Sheela RB et al.: Oxidative stress in hemodialysis-postdialytic changes. *Clin Lab.* 2003; 49(5-6):255-61
73. Friedrich B, Alexander D, Aicher WK et al.: Influence of standard hemodialyses treatment on transcription of human serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1 and taurine transporter TAUT in Blood leukocytes, *Nephrol Dia Transplant.* 2005; 20:768-774
74. Schettler V, Kühn W, Kleinoeder T et al.: No acute impact of haemodialysis treatment on free radical scavenging enzyme gene expression in white blood cells. *Journal of Internal Medicine;* 253: 201–207, 2003
75. Cereda A, Carpen A, Picariello G et al.: Effects of the deficiency of the rhodanese-like protein RhdA in *Azotobacter vinelandii*. *FEBS Lett.* 2007 Apr 17;581(8):1625-30. Epub 2007 Mar 20
76. Kwiecień I, Sokołowska M, Włodek L.: Nephroprotective effect of cystathionine is due to its diverse action on the kidney and Ehrlich ascites tumor cells. *Pharmacol Rep.* 2007; 59(5):553-64
77. Sorbo BH: Rhodanese methods in *Enzymology.* Academic Press, New York: 1955; 2:334-337
78. Shurtz-Swirski R, Mashiach E, Kristal B et al.: Antioxidant enzymes activity in polymorphonuclear leukocytes in chronic renal failure. *Nephron.* 1995; 71(2):176-9.

79. Donate T, Herreros A, Martinez E et al.: Protein oxidative stress in dialysis patients. *Adv Perit Dial* 2000; 18:15–17
80. Nandi DL, Horowitz PM, Westley J: Rhodanese as a thioredoxin oxidase. *IJBCB* 2000; 32:465-473
81. Calabrese V, Mancuso C, Sapienza M, Puleo E, Calafato S, Cornelius C, Finocchiaro M, Mangiameli A, Di Mauro M, Stella AM, Castellino P: Oxidative stress and cellular stress response in diabetic nephropathy. *Cell Stress Chaperones*. 2007;12(4):299-306
82. Tepel M, Echelmayer M, Orle NN, Zidek W: Increased intracellular reactive oxygen species in patients with end-stage renal failure: Effect of hemodialysis. *Kidney International*. 2000; 58:867-872
83. Day DA and Tuite MF: Post-transcriptional gene regulatory mechanisms in eukaryotes: an overview *Journal of Endocrinology*. 1998; 57: 361–371
84. Leung P, Ray LE, Sander C et al.: Encapsulation of thiosulfate: cyanide sulfurtransferase by mouse erythrocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1986; 83(1):101-7
85. Cristol JP, Canard B, Rabesandratana H et al.: Enhancement of reactive oxygen species production and cell surfacemarkers expression due to haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant*. 1994; 9:389-394
86. Akiyama S, Inagaki M, Tsuji M et al.: mRNA Study on Cu/Zn Superoxide Dismutase Induction by Hemodialysis Treatment. *Nephron Clin Pract*. 2005; 99:c107–c114
87. Luger A, Kovarik J, Stummvoll HK et al.: Blood-membrane interaction in hemodialysis leads to increased cytokine production. *Kidney Int*. 1987; 32(1):84-8
88. Bhaskaran M, Radhakrishnan N, Patni H et al.: Dialysis Membrane-Induced Oxidative Stress: Role of Heme Oxygenase-1 *Nephron Exp Nephrol* 2007;105:24–32
89. Chonchol M: Neutrophil dysfunction and infection risk in end-stage renal disease. *Semin Dial*. 2006;19(4):291-296
90. Wierusz-Wysocka B, Wysocki H, Michta G et al.: Phagocytosis and neutrophil bactericidal capacity in patients with uremia. *Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch*. 1984;111(5):589-594
91. Kestenbaum RS, Caruso C, Berlyne GM: Reduced superoxide hypertension in the rat increases vascular superoxide production dismutase activity in erythrocytes of dialysis patients: A possible factor in the etiology of uremic anemia. *Nephron* 1990; 55:251–253

92. Hörl WH.: Hemodialysis membranes: interleukins, biocompatibility, and middle molecules. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13:S62-71
93. Wardle EN: Cellular oxidative processes in relation to renal disease. *Am J Nephrol.* 2005;25(1):13-22
94. Malliaraki N, Mpliamplias D, Kampa M et al.: Total and corrected antioxidant capacity in hemodialyzed patients. *BMC Nephrol.* 2003 Jul 1; 4:4.
95. Abdel-Naeem NM, Kandell NF, El.Shamaa AA et al.: Biocompatible dialysis membranes and oxidative stress in patients with end-stage renal disease on maintenance haemodialysis. *J Egypt Soc Parasitol.* 2005; 35:1173-1197
96. Dursun B, Dursun E, Capraz I et al.: Are uremia, diabetes, and atherosclerosis linked with impaired antioxidant mechanisms? *J Investig Med.* 2008; 56(2):545-552
97. Balatkrishnan VS, Blumberg J, Pereira BJJ et al: Antioxidant and Oxidative Stress Indices in Dialysis-Dependent Acute Renal Failure. *Blood Purif* 2003; 21:213–219
98. Deicher R, Horl WH: Vitamin C in chronic kidney disease and hemodialysis patients. *Kidney Blood Press Res* 2003; 26:100–106
99. Fumeron C, Nguyen-Khoa T, Saltiel C et al : Effects of oral vitamin C supplementation on oxidative stress and inflammation status in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2005; 20(9):1874-9
100. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L et al: Vitamin C improves endothelium dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. *Circulation.* 1998; 97:2222–2229
101. N.J. Miller, C. Rice-Evans, M.J. Davies, V. Gopinathan, A. Milner, A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates, *Clin. Sci.* 1993; 407– 412
102. Panzetta O, Cominacini L, Garbin U, et al. Increased susceptibility of LDL to in vitro oxidation in patients on maintenance hemodialysis: effects of fish oil and vitamin E administration. *Clin Nephrol* 1995; 44:303–9

9. Publikationen

Im Rahmen dieser Arbeit sind folgende Publikationen entstanden:

- Krueger K, Koch K, Jühling A, Tepel M, Scholze A. Low expression of thiosulfate sulfurtransferase (rhodanese) predicts mortality in hemodialysis patients. Eingereicht.
- Scholze A, Krueger K, Barrie L, Jühling A, Koch K, Räth C, Torges A, Jankowski J, Maier A, Zidek W, Tepel M. Proteomic analysis in monocytes of hemodialysis patients: superoxide dismutase type 1 and survival. Eingereicht.

10. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Martin Tepel für die freundliche Bereitstellung und Betreuung dieser Arbeit.

Des Weiteren gilt mein Dank Frau Dr. Alexandra Scholze für die wissenschaftliche Betreuung und Förderung dieser Arbeit, Katharina Krueger für die Einführung ins experimentelle Arbeiten und die unentwegte Unterstützung sowie Lea Barrie für die aufmunternde und kollegiale Atmosphäre im Labor.

Weiterhin danke ich meinem Freund Philipp Lohneis und Katrin Gerbeth für die Beratung und hilfreiche konstruktive Kritik.

Ich danke den Mitarbeitern der Dialysestation und der Station 10A der Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin.

Besonderen Dank verdienen auch meine Eltern und meine Schwester, die mir meine Ausbildung erst ermöglicht haben.

Selbstständigkeitserklärung

„Ich, Anja Jühling, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „*Veränderungen der Expression von Rhodanese, SOD-1 und gp91^{phox} bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz unter Hämodialysetherapie.*“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift