

Aus dem Institut für Ernährungswissenschaft der Universität Potsdam und der
Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin

Eingereicht über die Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Vorkommen und diagnostische Bedeutung von Harnpeptiden und -
proteinen bei Hunden mit Nierenerkrankungen und Harnsteinen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Simone Forterre / geb. Deterre
Tierärztin aus Köln

Berlin 2003

Journal-Nr.: 2753

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg
Erster Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg
Zweiter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. F.J. Schweigert
Dritter Prüfer:	Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Grabner

Tag der Promotion: 12.12.2003

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	12
2	Literaturübersicht	13
2.1	Nierenphysiologie	13
2.1.1	Morphologische Grundlagen	13
2.1.2	Glomeruläre Filtration, tubuläre Reabsorption und Sekretion	13
2.1.3	Spezifische Faktoren der Nierenphysiologie	14
2.1.3.1	Vorkommen von Megalin und Cubilin als Rezeptoren und ihre Bedeutung	14
2.1.3.2	Bedeutung der Nieren für die Retinol-Homöostase	15
2.1.3.3	Tamm-Horsfall Protein (THP) und seine Bedeutung für die renale Vitamin-A-Ausscheidung beim Hund	16
2.1.3.4	Filtration und Rückresorption von Albumin	17
2.2	Niereninsuffizienz: Definition, Stadien und Bedeutung	17
2.2.1	Pathophysiologische Aspekte der Niere in der Regulation von Vitaminhaushalt und Proteinen	18
2.2.2	Einteilung der Nephropathien	20
2.2.3	Proteinurie: Definition, Vorkommen, Bedeutung	22
2.2.4	Diagnostische Möglichkeiten zur Identifizierung von Nierenerkrankungen	23
2.2.4.1	Quantitative Parameter zur Bestimmung von Nephropathien beim Hund	23
2.2.4.2	Qualitative Parameter zur Einteilung von glomerulären und tubulären Nierenerkrankungen	23
2.2.4.3	Angewandte qualitative Methoden in der Veterinärmedizin	25
2.2.4.4	Spezifische Markerproteine zur Lokalisierung der Nierenschädigung in der Humanmedizin	26
2.3	Urolithiasis - Definition	30
2.3.1	Vorkommen und Bedeutung der Urolithiasis beim Hund	30
2.3.2	Theorien der Lithogenese	31
2.3.2.1	Funktion und Bedeutung von Regulatoren für die Lithogenese	32
2.3.2.2	Einflussfaktoren auf die Bildung von Steintypen bei Mensch und Hund	33
2.3.3	Harnproteine bei Urolithiasispatienten und ihre Bedeutung für die Lithogenese	34
2.3.4	Matrixbestandteile der Harnsteine	37
2.3.4.1	Vorkommen	37
2.3.4.2	Funktion und Bedeutung von Matrixproteinen bei der Harnsteinbildung	37
2.3.4.3	Die duale Rolle des THP in der Lithogenese	38
3	Material und Methoden	40
3.1	Patienten	40
3.2	Probennahme und –konservierung	40

3.3	Bestimmung klinischer Parameter	40
3.3.1	Blut	40
3.3.2	Harn	40
3.3.3	Methoden	40
3.4	Untersuchung zur Verteilung von Vitamin A, Retinol-Bindungsprotein (RBP), Tamm-Horsfall Protein (THP) in Blutserum und Harn sowie weitere Harnproteine	41
3.4.1	Retinol- und Retinylesterbestimmung	41
3.4.1.1	Extraktionsverfahren	41
3.4.1.2	Umkehrphasen-HPLC-Analysen	41
3.4.1.3	Quantifizierung von Retinol und Retinylester	42
3.4.1.4	Standards und Chemikalien	42
3.4.2	Untersuchungen zum Retinol-Bindungsprotein (RBP)	42
3.4.2.1	Natriumdodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	42
3.4.2.2	Immunologischer Nachweis von RBP mittels Western-Blot	42
3.4.2.3	Immunhistologischer Nachweis von RBP	43
3.4.2.3.1	Histologische Präparation und Färbung	43
3.4.2.3.2	Durchführung und Auswertung	43
3.4.2.4	Quantitative Bestimmung des RBP durch ELISA sowie Validierung der ELISA-Methode	43
3.4.2.5	Antikörper und Standard	44
3.4.2.6	Lösungen und Reagenzien	44
3.4.3	Untersuchungen zum Tamm-Horsfall Protein (THP)	45
3.4.3.1	Immunologischer Nachweis von THP mittels Western-Blot	45
3.4.3.2	Immunhistologischer Nachweis von THP	45
3.4.3.3	Quantitative Bestimmung von THP mittels ELISA	45
3.4.3.4	Standard und Antikörper	45
3.4.4	Untersuchungen zu weiteren Harnproteinen	46
3.4.4.1	Immunologischer Nachweis von IgG mittels Western-Blot	46
3.4.4.2	Immunologischer Nachweis von Albumin mittels Western-Blot	46
3.4.4.3	Immunologischer Nachweis von Transferrin mittels Western-Blot	46
3.4.4.4	Immunologischer Nachweis von Vitamin-D bindendem Protein (DBP) mittels Western-Blot	46
3.4.4.5	Auswertung	46
3.4.4.6	Immunhistologischer Nachweis von Megalin	46
3.4.4.7	Antikörper	47
3.4.5	Charakterisierung einzelner Harnproteine mittels „Surface enhanced laser desorption/ionisation - time-of-flight“ Massenspektrometrie (SELDI – TOF MS)	47

3.5	Untersuchungen zum Vorkommen von Harnproteinen in Harnsteinen von Hunden	48
3.5.1	Charakterisierung der Harnsteinart	48
3.5.2	Extraktion der organischen Matrix	48
3.5.2.1	Struvitsteine	48
3.5.2.2	Calciumoxalatsteine	48
3.5.2.3	Uratsteine	48
3.5.2.4	Chemikalien	48
3.5.3	Charakterisierung der organischen Matrix mittels SDS-PAGE	49
3.5.4	Charakterisierung der organischen Matrix mittels SELDI-TOF MS	49
3.6	Untersuchungen zum Einfluss von Calciumchlorid auf THP und Vitamin A beim Hund	49
3.7	Statistische Auswertung	49
4	Ergebnisse	50
4.1	Niereninsuffiziente Hunde	50
4.1.1	Klinische Parameter	50
4.1.2	Vitamin A, RBP, THP sowie Harnproteine bei niereninsuffizienten Hunden	51
4.1.2.1	Vitamin-A-Gehalt im Blutserum und Harn	51
4.1.2.2	RBP im Blutserum und Harn	54
4.1.2.3	THP im Blutserum und Harn	54
4.1.2.4	Ergebnisse zur Untersuchung der Harnproteine bei niereninsuffizienten Hunden	55
4.1.3	Charakterisierung der Proteinurie mittels „Surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight“ Massenspektrometrie (SELDI)	57
4.1.4	Ergebnisse zur immunhistologischen Untersuchung der Nieren	59
4.2	Harnsteinpatienten	71
4.2.1	Klinische Parameter	72
4.2.2	Konzentrationen von Vitamin A, RBP und THP bei Hunden mit Harnsteinen	74
4.2.2.1	Vitamin A im Blutserum und Harn	74
4.2.2.2	RBP im Blutserum und Harn	75
4.2.2.3	THP im Blutserum und Harn	76
4.2.3	Charakterisierung der Harnproteinprofile mittels SDS-PAGE und Western-Blot	76
4.2.4	Charakterisierung der Harnproteinprofile mittels SELDI	78
4.2.5	Ergebnisse zur Untersuchung von Proteinen der organischen Matrix der Harnsteine	80
4.2.5.1	Darstellung der Proteine durch SDS-PAGE und Western-Blot	80
4.2.5.2	Charakterisierung der Matrixproteine nach Anwendung der SELDI-TOF MS	80
4.3	Ergebnisse zur Untersuchung des Einflusses von Calciumchlorid auf das Verhalten von THP und Vitamin A	82

4.3.1	Veränderungen der THP-Konzentrationen im Harn unter dem Einfluss von Calciumchlorid	83
4.3.2	Veränderungen der Retinol- und Retinylester-Konzentrationen im Harn unter dem Einfluss von Calciumchlorid	83
5	Diskussion	85
5.1	Niereninsuffiziente Hunde	85
5.1.1	Klinische und klinisch-chemische Parameter	85
5.1.2	Veränderungen im Vitamin-A-Stoffwechsel bei niereninsuffizienten Hunden	86
5.1.3	Bedeutung von RBP und Megalin für die renale Clearance und Diagnostik bei niereninsuffizienten Hunden	87
5.1.4	Ausscheidung von THP bei Hunden mit Niereninsuffizienz	88
5.1.5	Bedeutung spezifischer Harnproteine für die Diagnosestellung von Nierenerkrankungen	90
5.2	Urolithiasis	93
5.2.1	Klinische Parameter	93
5.2.2	Einfluss von Vitamin A auf die Lithogenese	94
5.2.3	Bedeutung von RBP	95
5.2.4	Bedeutung von THP auf die Harnsteinbildung beim Hund	95
5.2.5	Bedeutung von Harnproteinen bei Urolithiasis	97
5.2.6	Pathogenetische und diagnostische Bedeutung der Matrixproteine von Harnsteinen	98
5.3	Schlussfolgerungen	99

Abkürzungsverzeichnis

α 1M	Alpha-1-Mikroglobulin
α 2M	Alpha-2-Makroglobulin
β 2M	Beta-2-Mikroglobulin
ρ	(Rho) Korrelationskoeffizient
μ g	Mikrogramm
μ M	Mikromolar
μ mol	mikromol
2D-Gelelektrophorese	Zweidimensionale Gelelektrophorese
Abb.	Abbildung
Apo A1	Apolipoprotein A1
Apo A1 – BP	Apo A1 Bindungsprotein
Apo H	Apolipoprotein H
Apo-RBP	Apo-Retinol-Bindungsprotein (freie Form)
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	zweifach positivgeladenes Calciumion
CaOx	Calciumoxalat
CaP	Calciumphosphat
CNI	Chronische Niereninsuffizienz
COOH	chemische Abkürzung für Carboxylgruppe
DBP	Vitamin-D-Bindungsprotein
di-Albumin	dimeres Albumin
di-Hb	dimeres Hämoglobin
di-L – Ketten	dimere leichte Ketten des Immunglobulins
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme linked immunoabsorbend assay
Fa.	Firma
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GN	Glomerulonephritis
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
HDL	High density Lipoprotein
Holo-RBP	Holo-Retinol-Bindungsprotein (gebundene Form)
HMW - Protein	High molecular weight - Protein
I α I	Inter-alpha-Inhibitor
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm

I	Liter
LDL	Low density Lipoprotein
Leu	Aminosäure Leucin
LMW - Protein	Low molecular weight – Protein
M	Molmasse
M-Hb	Mono-Hämoglobin
MAP	Magnesiumammoniumphosphat
MCP-1	Monozyten chemoattractant Protein 1
mg	Miligramm
min	Minute
mRNA	Messenger RNA
Na ⁺	Natriumion
NAG	N-Acetyl-Glukosaminidase
NEP	Neutrale Endopeptidase
NH ₂	Ammoniumgruppe
nM	nanomolar
n.s.	nicht signifikant
OH	Hydroxylgruppe
PAP	Peroxidase Antiperoxidase
PP	Paraproteinurie
PTH	Parathormon
RBP	Retinol-Bindungsprotein
RNA	Ribonukleinsäure
RP-HPLC	Umkehrphasen-Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
RSS	Relative Supersaturation
SAX	engl.: strong anionic exchange
SDS-PAGE	Sodiumdodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SELDI-TOF MS	Surface enhanced laser desorption/ionisation – time-of-flight Massenspektrometrie
Tab.	Tabelle
TBS	(engl.: tris buffered saline) Tris-Puffer
TBST	Tris-Puffer mit Tween 20
TC-B ₁₂	Transcobalamin B ₁₂
TGF-β	Transforming growth factor beta
THP	Tamm-Horsfall Protein
TTR	Transthyretin
UP 1	Urinprotein 1
(U)PTF 1	(Urin) Prothrombin Fragment 1
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
VLDL	Very low density Lipoproteine
WHO	World Health Organisation

Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. L. Brunnberg, der mir ermöglichte die Untersuchungen sowohl in der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin als auch im Institut für Ernährungswissenschaft der Universität Potsdam durchzuführen, indem er den Kontakt zu Herrn Professor Dr. F. J. Schweigert herstellte.

Meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. F. J. Schweigert, möchte ich ganz herzlich für die Überlassung des interessanten Themas sowie für seine Unterstützung und wertvollen Anregungen bei der Durchführung dieser Arbeit danken.

Bei Herrn Dr. J. Raila möchte ich mich für die jederzeit gewährte, freundliche Unterstützung und die zahlreichen theoretischen Anregungen besonders herzlich bedanken.

Ferner bedanke ich mich bei Frau Professor Dr. B. Kohn, die stets als Ansprechpartner mit wertvollen theoretischen Anregungen zur Verfügung stand.

Bei Herrn Professor Dr. V. Bergmann vom Institut für Pathologie der veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin bedanke ich mich für die Bereitstellung der histologischen Organproben der Hunde.

Frau U. Neumann danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der immunhistologischen Nachweismethoden.

Besonders danke ich Frau E. Pilz und Frau A. Hurtienne für die Einarbeitung und Unterstützung bei den zahlreichen Elektrophoresen, Western-Blot- und chromatographischen Analysen.

Bei allen Mitarbeitern, Doktoranden und Diplomanten des Institutes für Ernährungswissenschaft der Universität Potsdam möchte ich mich für die gute Arbeitsatmosphäre bedanken.

Die Anfertigung dieser Dissertationsschrift wurde durch ein Promotionsstipendium der Hanns-Seidel-Stiftung München e.V. ideell und finanziell unterstützt, wofür ich ebenfalls meinen Dank aussprechen möchte.

Für die Isolierung und Charakterisierung bestimmter Harnproteine mittels SELDI-TOF MS im Harn von nierenkranken Hunden standen dankenswerterweise finanzielle Mittel der Gesellschaft zur Förderung Kynologischer Forschung e.V. bereit.

Lebenslauf

- 19.11.1969 geboren in Köln als Tochter von Wilfried und Ilonka Deterre, geb. Miculcy
- 1976 – 1980 Gemeinschaftsgrundschule Geyen – Sinthern
- 1980 – 1989 Gymnasium Brauweiler
- WS 1989 – SS 1995 Studium der Lebensmittelchemie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- Nov. 1995 1. Staatsexamen für Lebensmittelchemiker an der Universität Bonn
- SS 1995 – WS 1999 Studium der Tiermedizin an der LMU München
- März 2000 3. Staatsexamen Tiermedizin an der LMU München
- April 2000 Approbation als Tierärztin
- Mai 2000 – Juli 2003 Doktorandin an der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin und dem Institut für Ernährungswissenschaft der Universität Potsdam

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Simone Forterre

Berlin, den 15.07.2003