

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

DISSERTATION

Hydrophobe Metabolite der Urämie:  
Proteinaffinität, Quantifizierung und methodische Ansätze zur  
Untersuchung vaskulärer Effekte

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Marieke Rüth

aus Erlenbach am Main

Datum der Promotion: 26.02.2016

## Inhaltsverzeichnis

|  |            |
|--|------------|
| <b>Inhaltsverzeichnis .....</b>  | <b>II</b>  |
| <b>Zusammenfassung/Abstract .....</b>  | <b>III</b> |
| <b>1 Einführung und Zielsetzung der Arbeit.....</b>  | <b>1</b>   |
| <b>2 Methodik .....</b>  | <b>3</b>   |
| 2.1 Publikation 1: <i>Guanidinylierungen von Albumin verringern die Bindungskapazität für hydrophobe Metabolite .....</i>                                | 3          |
| 2.2 Publikation 2: <i>Bindungsaffinität und -kapazität des Urämietoxins Indoxylsulfat in Plasma .....</i>  | 5          |
| 2.3 Publikation 3: <i>Entwicklung einer künstlichen Arterie als in-vitro-Perfusionsmodell zur Detektion des Einflusses gefäßschädigender Faktoren...</i> | 6          |
| <b>3 Ergebnisse.....</b>   | <b>8</b>   |
| 3.1. Publikation 1: <i>Guanidinylierungen von Albumin verringern die Bindungskapazität für hydrophobe Metabolite .....</i>                               | 8          |
| 3.2. Publikation 2: <i>Bindungsaffinität und -kapazität des Urämietoxins Indoxylsulfat in Plasma .....</i>   | 11         |
| 3.3. Publikation 3: <i>Entwicklung einer künstlichen Arterie als in-vitro-Perfusionsmodell zur Detektion des Einflusses gefäßschädigender Faktoren.</i>  | 13         |
| <b>4 Diskussion.....</b>   | <b>16</b>  |
| <b>5 Literaturverzeichnis.....</b>   | <b>21</b>  |
| <b>Eidesstattliche Versicherung/Anteilserklärung .....</b>   | <b>25</b>  |
| <b>Druckexemplare der ausgewählten Publikationen .....</b>   | <b>27</b>  |
| <b>Lebenslauf.....</b>   | <b>63</b>  |
| <b>Publikationsliste .....</b>   | <b>65</b>  |
| <b>Danksagung .....</b>  | <b>68</b>  |

## Zusammenfassung

Etwa 11 % der Bevölkerung leiden an chronischer Niereninsuffizienz. Im Rahmen dieser Erkrankung ist die Eigenschaft des Plasmaproteins Albumin zum Transport hydrophober Liganden, wie Urämietoxinen, Medikamenten und Stoffwechselmetaboliten beeinträchtigt, ohne dass die zugrundeliegenden Mechanismen bisher vollständig aufgeklärt sind. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit nach Ursachen für die verringerte Bindungskapazität des Albumins chronisch-niereninsuffizienter Patienten gesucht.

Im ersten Abschnitt dieser Dissertation wurde Albumin aus Plasma nierengesunder Probanden und chronisch-niereninsuffizienter Patienten isoliert, massenspektrometrisch analysiert und in Bezug auf die Bindung zweier repräsentativer Liganden, Indoxylsulfat und Tryptophan, charakterisiert. Die Untersuchung zeigte, dass Albumin chronisch-niereninsuffizienter Patienten guanidinyliert vorliegt und sich diese pathologische posttranslationale Modifikation negativ auf die Bindungskapazität hydrophober Metabolite auswirkt.

Hydrophobe Urämietoxine können auf Grund ihrer Albuminbindung nur schwer durch extrakorporale Dialyseverfahren entfernt werden und haben zudem einen entscheidenden Anteil an der vermehrten Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen bei chronischer Niereninsuffizienz. Daher wurde im zweiten Abschnitt der Dissertation eine Methode entwickelt, um den freien Anteil hydrophober Urämietoxine im Plasma zu erhöhen und so eine verbesserte Entfernung während der Hämodialyse zu erreichen. Sowohl eine Verdünnung des Plasmas als auch eine Erhöhung von Ionenstärke sowie der Temperatur führte zu einer Erhöhung des freien Anteils an Indoxylsulfat.

Gegenstand des dritten Abschnitts der Dissertation war die Etablierung eines *in-vitro*-Perfusionsmodells einer künstlichen Arterie, um Interaktionen und metabolische Funktionen von Mediatoren, Urämietoxinen oder auch posttranslational modifiziertem Albumin auf das vaskuläre System untersuchen zu können. Die Funktionalität und Validität eines derartigen Modells wurde mittels verschiedener Assays dargestellt.

Die vorliegende Dissertationsschrift hat damit die Basis geschaffen, guanidinyliertes Albumin chronisch-niereninsuffizienter Patienten als potentiellen Biomarker der chronischen Niereninsuffizienz zu verwenden. Die Methode zur Erhöhung des freien Anteils proteingebundener Urämietoxine kann deren Entfernung durch Hämodialyse

verbessern und dadurch zu einer Verringerung von Morbidität und Mortalität chronisch-niereninsuffizienter Patienten beitragen. Des Weiteren stellt die künstliche Arterie mit den in dieser Studie verwendeten Assays und Endpunktanalysen ein validiertes *in-vitro*-Modell zur Testung von Mediatoren bzw. pathophysiologischen Metaboliten und deren Auswirkungen auf das vaskuläre System dar und ist als Ersatz für einige Tiermodelle denkbar.

## **Abstract**

Approximately 11 % of the population is affected by chronic kidney disease. In the context of this disease the property of the plasma protein albumin is impaired for the transport of hydrophobic ligands such as uremic toxins, drugs and metabolites. The underlying mechanisms are not completely understood to date. Therefore, in the present work we investigated the causes of the reduced binding capacity of albumin from patients with chronic kidney disease.

In the first part of this thesis, albumin was isolated from plasma of control subjects and patients with chronic kidney disease, analyzed by mass-spectrometry and characterized with respect to the binding of two ligands (indoxyl sulfate and tryptophan). The study showed that albumin from patients with chronic kidney disease is guanidylated and this post-translational modification adversely affects the binding capacity of hydrophobic metabolites.

Hydrophobic uremic toxins can be poorly removed by extracorporeal renal replacement therapies due to their albumin binding and they moreover have a critical role in the development of cardiovascular disease in chronic kidney disease. Consequently, a method was developed in order to increase the free fraction of hydrophobic uremic toxins in the plasma and to achieve improved removal during hemodialysis. Both, a dilution of the plasma and an increase of ionic strength as well as increased temperature, resulted in an increase of the free fraction of indoxyl sulfate.

Subject of the third section of the thesis was the development and establishment of an *in-vitro*-artificial artery perfusion model to study interactions and metabolic functions of mediators, vascular damaging uremic toxins, or post-translationally

modified albumin on the vascular system. The functionality and validity of such a model was demonstrated by various assays.

The results of this thesis have set up the basis to use guanidinylated albumin as a potential biomarker for the chronic kidney disease. In addition, the developed methods for increasing the free fraction of protein-bound uremic toxins may increase their removal by hemodialysis and may thus contribute to a reduction of morbidity and mortality of patients with chronic kidney disease. Furthermore, the artificial artery developed in this study is now a validated *in-vitro*-model for testing mediators or pathophysiological metabolites and their effects on the vascular system and is suitable to replace animal models.

### 1 Einführung und Zielsetzung der Arbeit

Weltweit leiden etwa 11 % der Bevölkerung an einer chronischen Niereninsuffizienz<sup>1</sup>. Im Rahmen dieser Erkrankung können harnpflichtige Substanzen nicht über die Niere ausgeschieden werden und akkumulieren infolgedessen im Plasma der Patienten. Tragen diese harnpflichtige Substanzen zu pathologischen Veränderungen im Organismus bei, werden diese Substanzen Urämietoxine genannt. Vor allem hydrophobe Urämietoxine scheinen für pathologische Effekte ursächlich zu sein<sup>2</sup>, da sie auf Grund ihrer Eigenschaften oft proteingebunden vorliegen und in Folge des damit verbundenen scheinbar erhöhten Molekulargewichts nicht durch extrakorporale Dialyseverfahren entfernt werden können.

Neben Hormonen, Fettsäuren, Vitaminen und Medikamenten<sup>3</sup> bindet Albumin hydrophobe Urämietoxine wie z.B. Indoxylsulfat oder p-Cresylsulfat<sup>4</sup>. Albumin nimmt im Rahmen der chronischen Niereninsuffizienz eine Schlüsselfunktion für den Krankheitsverlauf ein, da die Bindung hydrophober Liganden an Albumin chronisch-niereninsuffizienter Patienten gestört ist<sup>5</sup>. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind bisher jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt.

Als Ursache für die verminderte Bindungskapazität werden u.a. posttranslationale Modifikationen diskutiert<sup>5,6</sup>. Posttranslationale Modifikationen, wie Glykosylierungen<sup>7,8</sup>, Oxidationen<sup>9,10</sup>, Nitrosylierungen<sup>11</sup>, Carbamylierungen<sup>12</sup> oder Acetylierungen<sup>13</sup> können die physiologischen und pathophysiologischen Eigenschaften von Proteinen im Allgemeinen verändern.

Zur Klärung der Frage, warum die Bindungskapazität hydrophober Liganden an Albumin bei chronisch-niereninsuffizienten Patienten verringert ist, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit Albumin chronisch-niereninsuffizienter Patienten massenspektrometrisch auf posttranslationale Modifikationen untersucht.

Anschließend wurden die physiologischen und pathophysiologischen Effekte der posttranslationalen Modifikationen des Albumins auf die Bindung repräsentativer hydrophober Metabolite charakterisiert. Als Liganden wurden prototypisch für die Urämietoxine Indoxylsulfat und als physiologisch relevante Substanz die essentielle Aminosäure Tryptophan verwendet.

Auf Grund der Albuminbindung hydrophober Urämietoxine kann nur der freie (ungebundene) Anteil durch extrakorporale Therapien entfernt werden. Infolgedessen findet im Plasma eine Akkumulation der hydrophoben Urämietoxine statt.

Daher sind, trotz der verringerten Bindungskapazitäten des Albumins chronisch-niereninsuffizienter Patienten, die Konzentrationen hydrophober Urämietoxine im Plasma der Patienten im Vergleich zu nierengesunden Personen stark erhöht<sup>14</sup>.

Hydrophobe Urämietoxine haben einen entscheidenden Anteil an der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen und an der Mortalität chronisch-niereninsuffizienter Patienten<sup>15-17</sup>. Eine Schwächung der betreffenden Interaktion von Albumin und Urämietoxinen würde zu einer Erhöhung des freien (ungebundenen) Urämietoxingehaltes führen, was infolgedessen zu einer vermehrten Abtrennung während der Dialyse beitragen könnte.

Um eine bessere Entfernung proteingebundener Urämietoxine durch Dialyseverfahren zu erreichen, war es Ziel dieser Arbeit, Methoden zu entwickeln, die eine Schwächung der Proteinbindung und Verringerung der Bindungskapazität im Plasma hervorrufen.

Da hydrophobe Urämietoxine zur Progression kardiovaskulärer Erkrankungen chronisch-niereninsuffizienter Patienten beitragen, werden *in-vitro*-Modelle benötigt, um pathophysiologische Mechanismen im Zusammenhang mit kardiovaskulärer Morbidität durch hydrophobe Urämietoxine vereinfacht untersuchen zu können. Mit Hilfe dieser *in-vitro*-Modelle ließen sich ebenfalls neue therapeutische Ansätze zur Senkung der kardiovaskulären Komorbidität und Mortalität bei chronisch niereninsuffizienten Patienten prüfen.

Im Rahmen dieser Dissertation war es daher ein weiteres Ziel, ein *in-vitro*-Perfusionsmodell einer Arterie zu etablieren und über funktionale Assays zu validieren. Mit diesem Modell ist es auch denkbar, den Einfluss gefäßschädigender Urämietoxine, wie z.B. Indoxylsulfat<sup>18</sup>, oder posttranslational modifizierten Albumins *in-vitro* zu untersuchen.

## 2 Methodik

Im Folgenden werden die wesentlichen Methoden aus den der Dissertation zugrundeliegenden Publikationen beschrieben. Eine detaillierte Beschreibung der verwendeten Materialien (Hersteller, Land) sind den entsprechenden Publikationen zu entnehmen.

### 2.1 Publikation 1: *Guanidinylierungen von Albumin verringern die Bindungskapazität für hydrophobe Metabolite*

#### **Probenbeschreibung und -gewinnung:**

Albumin wurde aus Plasma nierengesunder Probanden und chronisch-niereninsuffizienter Patienten (Stadium 5D) mittels Ionenaustausch- und Gelchromatographie isoliert und durch SDS-PAGE auf Homogenität geprüft. Kommerzielles, fettsäurefreies, > 99 % homogenes, humanes Albumin (isoliert aus Serum) wurde auf die Abwesenheit von posttranslationalen Modifikationen mittels Massenspektrometrie untersucht und für die *in-vitro*-Modifikation verwendet. Die *in-vitro*-Guanidinylierung des nativen Albumins erfolgte nach Kimmel et al.<sup>19</sup>.

#### **Proteinanalyse mittels MALDI-Massenspektrometrie**

Die isolierten Albumine wurden mit wässriger Ammoniumbicarbonat-Lösung (50 mM) und 0,2 % w/v Trypsin für 24 Stunden bei 37 °C verdaut. Die resultierenden tryptischen Peptide wurden mittels ZipTip<sub>C18</sub>-Pipettenspitzen (Millipore, USA) unter Verwendung von 0,1 % wässriger Trifluoressigsäure und 80 % Acetonitril aufkonzentriert und entsalzen. Das resultierende Eluat wurde mit  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymethylsäure als Matrix vermischt und maschinell (Freedom-Evo, Schweiz) auf einen metallischen MALDI-Proben-träger (Bruker Daltonics, Deutschland) aufgetragen. Die Proben wurden mit einem MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometer UltraFlex-III (Bruker Daltonics, Deutschland) analysiert. Die Kalibrierung der Massenspektren erfolgte unter Verwendung der Software Biotoools 3.2 (Bruker, Deutschland) in Kombination mit der MASCOT 2.2 Datenbank (Matrix Science, England), die die experimentellen Daten mit den berechneten Daten für jeden Eintrag in der Sequenz-Datenbank verglich.

### **Quantifizierung des proteingebundenen Anteils von Indoxylsulfat bzw. Tryptophan an Albumin**

Zur Bestimmung des freien (ungebundenen) und proteingebundenen Anteils des Indoxylsulfats bzw. Tryptophans wurde Albumin mit dem entsprechenden Liganden versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Indoxylsulfat und Tryptophan adsorbieren an Albumin unter diesen Bedingungen. Zur Bestimmung des freien Anteils wurde die Inkubationslösung über einen Zentrifugationsfilter fraktioniert (Ausschlussgröße: 30 kDa). Das an das Albumin gebundene Indoxylsulfat bzw. Tryptophan verblieb im Retentat. Der freie Anteil im Filtrat wurde quantifiziert. In einem parallelen Ansatz wurde die Lösung bei 95 °C für 30 min erhitzt, anschließend zentrifugiert und die Gesamtkonzentration (frei und gebunden) an Indoxylsulfat bzw. Tryptophan quantifiziert.

Die Menge des proteingebundenen Anteils  $c_{gebunden}$  von Indoxylsulfat bzw. Tryptophan wurde aus der Gesamtmenge und der freien Menge anhand von folgender Beziehung berechnet:

$$c_{gebunden} = \frac{c_{gesamt} - c_{frei}}{c_{gesamt}} \times 100$$

mit  $c_{gebunden}$  in [%],  $c_{gesamt}$  und  $c_{frei}$  in jeweils [ $\mu$ M].

### **Bestimmung der Dissoziationskonstante $K_D$ und der maximalen Anzahl der Bindungsstellen $B_{max}$ für Indoxylsulfat**

Albumin (37,5  $\mu$ M), isoliert aus Plasma nierengesunder Probanden und chronisch-niereninsuffizienter Patienten, wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen von Indoxylsulfat inkubiert und der gebundene Anteil quantifiziert. Die Dissoziationskonstante  $K_D$  als ein Maß für die Affinität eines Liganden und  $B_{max}$  als ein Maß für die maximale Anzahl der Bindungsstellen wurden durch lineare Regression bestimmt und entsprechende Bindungskurven erstellt.

### ***In-vitro*-Dialyse von Albumin chronisch-niereninsuffizienter Patienten und nierengesunder Probanden**

Albumin (75,0  $\mu$ M), isoliert aus Plasma nierengesunder Probanden und chronisch-niereninsuffizienter Patienten, wurde in Dialysekassetten (Ausschlussgröße 3,5 kDa) gegen 1 M NaCl-Lösung für 24, 48 und 96 Stunden dialysiert. Anschließend wurden die Proben durch Dialyse gegen PBS entsalzen und der Anteil des proteingebundenen Indoxylsulfats quantifiziert.

## **2.2 Publikation 2: Bindungsaffinität und -kapazität des Urämietoxins Indoxylsulfat in Plasma**

Die Bestimmung der Bindungskapazität und –affinität von Indoxylsulfat erfolgte mit Plasma nierengesunder Probanden und chronisch-niereninsuffizienter Patienten.

### **Bindungskapazität von Plasma nierengesunder Probanden und chronisch-niereninsuffizienter Patienten für Indoxylsulfat in Abhängigkeit von der Ionenstärke**

Für die Bindungsstudien wurde 0,5 ml Plasma nierengesunder Probanden und chronisch-niereninsuffizienter Patienten mit unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen (0,15 M, 0,30 M, 0,50 M und 0,75 M NaCl) versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Plasma der nierengesunden Probanden wurde zusätzlich mit Indoxylsulfat (8-150  $\mu$ M Endkonzentration) versetzt. Nach Zugabe der NaCl- und Indoxylsulfatlösung wurde das Probenvolumen mit PBS angepasst, so dass für alle Proben eine 1:2-Verdünnung des Plasmas erzielt wurde. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurde ein Toxin/Albumin-Verhältnis von  $< 1,0$  eingestellt. Für die Charakterisierung der Bindungen wurde die Dissoziationskonstante  $K_D$  und der proteingebundene Anteil des Indoxylsulfats bestimmt.

### **Bindungskapazität von Plasma nierengesunder Probanden und chronisch-niereninsuffizienter Patienten für Indoxylsulfat in Abhängigkeit von Temperatur und Verdünnung**

Zur Untersuchung, ob die Temperatur einen Einfluss auf die Bindungskapazität hat, wurde Plasma nierengesunder Probanden sowohl bei 25 °C als auch bei 37 °C in Anwesenheit unterschiedlicher NaCl-Konzentrationen (0,15 M bzw. 0,61 M) mit Indoxylsulfat versetzt und das gebundene Indoxylsulfat quantifiziert. Für den Einfluss der Plasmaverdünnung wurde Plasma mit PBS, NaCl-Lösung und Indoxylsulfat versetzt, so dass eine finale NaCl-Konzentration von 0,15 M bzw. 0,50 M und eine 1:2- bzw. 1:10-Verdünnung des Plasmas resultierte. Für die Charakterisierung der Bindungen wurde die Dissoziationskonstante  $K_D$  und die maximale Anzahl der Bindungsstellen  $B_{max}$  bestimmt.

### **2.3 Publikation 3: *Entwicklung einer künstlichen Arterie als in-vitro-Perfusionsmodell zur Detektion des Einflusses gefäßschädigender Faktoren***

Zur Etablierung eines *in-vitro*-Modells einer künstlichen Arterie erfolgte die Besiedlung von Hohlfasermembranen in einem Bioreaktor mit humanen, primären Endothelzellen auf der Innenseite und mit humanen, primären glatten Muskelzellen auf der Außenseite. Es wurde ein Zellkulturmedium verwendet, das die optimale Proliferation beider Zelltypen ermöglichte. Die Inkubationsschritte wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt in einem Brutschrank durchgeführt.

#### **Kokultur von Endothel- und Muskelzellen zur Etablierung einer künstlichen Arterie**

Zunächst wurden die in einem Polycarbonatgehäuse parallel angeordneten Hohlfasermembranen aus Polypropylen mit 70 % Ethanol hydrophilisiert, mit bidestilliertem Wasser gewaschen und anschließend für 48 Stunden mit PBS unter laminarem Fluss gespült (0,1 N/m<sup>2</sup>). In einem zweiten Schritt erfolgte am Tag der Besiedlung eine Fibronectinbeschichtung (10 µg/ml) auf der Innen- und Außenseite der Membranen für 1,5 Stunden unter statischen Bedingungen. Nach einem einstündigen Äquilibrationsschritt mit Zellkulturmedium wurden die Endothelzellen mit einer Konzentration von 2x10<sup>5</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> Membranfläche in den Innenraum eingebracht und für 1 Stunde unter statischen, anschließend für 2,5 Stunden unter dynamischen Bedingungen bei abluminalem Fluss inkubiert. Die Besiedlung des Außenraums erfolgte mit glatten Muskelzellen mit einer Konzentration von 2x10<sup>5</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> Membranfläche. Nach einer Adhäsionszeit von 1,5 Stunden wurde über die Flussgeschwindigkeit auf die Endothelzellen ein Scherstress von 0,1 N/m<sup>2</sup> (Kontrolle) bzw. 3 N/m<sup>2</sup> angelegt, der den maximal vorkommenden Fluss in Arterien *in-vivo* simulierte<sup>20</sup>.

#### **Quantifizierung der Besiedlung durch Zellkernfärbung**

Zur Fixierung und Färbung der Zellkerne wurden die Hohlfasermembranen mit PBS gespült, 3 min mit 2,5 % Glutardialdehydlösung fixiert und mit 10 µg/ml Fluoreszenz-Farbstoff Höchst 33342 für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Bioreaktor geöffnet und für die Auswertung am Mikroskop aus den Hohlfasermembranen Längs- und Querschnitte angefertigt.

Detaillierte Beschreibungen sowohl des Bioreaktors, der Standard-Kultivierungsbedingungen der Primärzellen als auch der Read-Out Methoden (RNA Isolation und Quantifizierung, Semiquantitative Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion, Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation Massenspektrometrie, Isolierung von Dinukleosid-Polyphosphaten, Rasterelektronenmikroskopie) sind in der Publikation Janke et al.<sup>21</sup> gegeben.

### **Statistische Methoden**

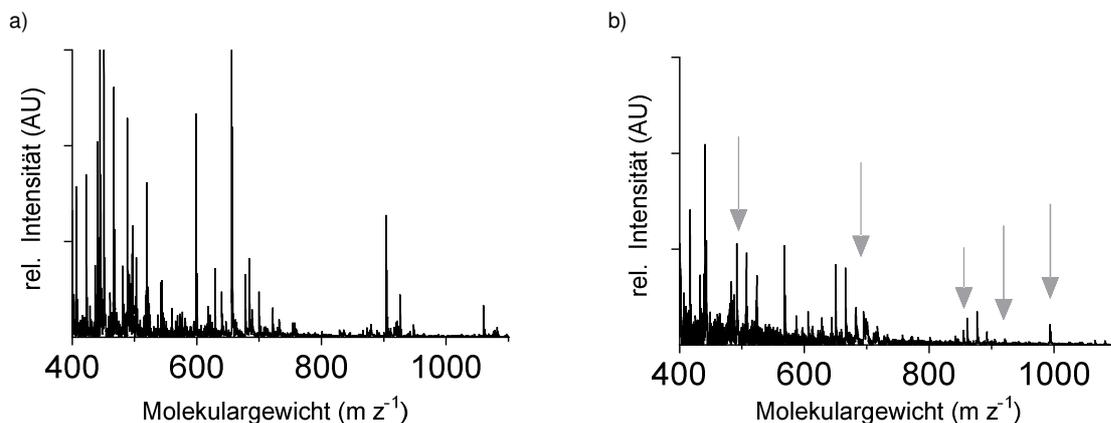
Für die statistische Auswertung der experimentellen Daten wurde, entsprechend der Anwendbarkeit, der ungepaarte bzw. gepaarte t-Test, der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test oder eine Ein-Weg-ANOVA eingesetzt (GraphPad Prism Software, V5.0, USA bzw. SPSS Software für Windows, V12.0m, USA). Falls nicht anders beschrieben, sind die Daten als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Bei einem *P*-Wert < 0,05 wurde das Ergebnis als signifikant erachtet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1. Publikation 1: *Guanidinylierungen von Albumin verringern die Bindungskapazität für hydrophobe Metabolite*

Die Bindungskapazität hydrophober Liganden an Albumin chronisch-niereninsuffizienter Patienten ist im Rahmen der chronischen Niereninsuffizienz gestört<sup>24-28</sup>. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind bis zum heutigen Tage jedoch nur unvollständig aufgeklärt worden. Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Arbeit bei Albumin chronisch-niereninsuffizienter Patienten massenspektrometrisch posttranslationale Modifikationen identifiziert und quantifiziert. In einem zweiten Schritt wurden die physiologischen und pathophysiologischen Effekte der identifizierten posttranslationalen Modifikationen des Albumins auf die Bindung repräsentativer hydrophober Metabolite (Indoxylsulfat bzw. Tryptophan) charakterisiert.

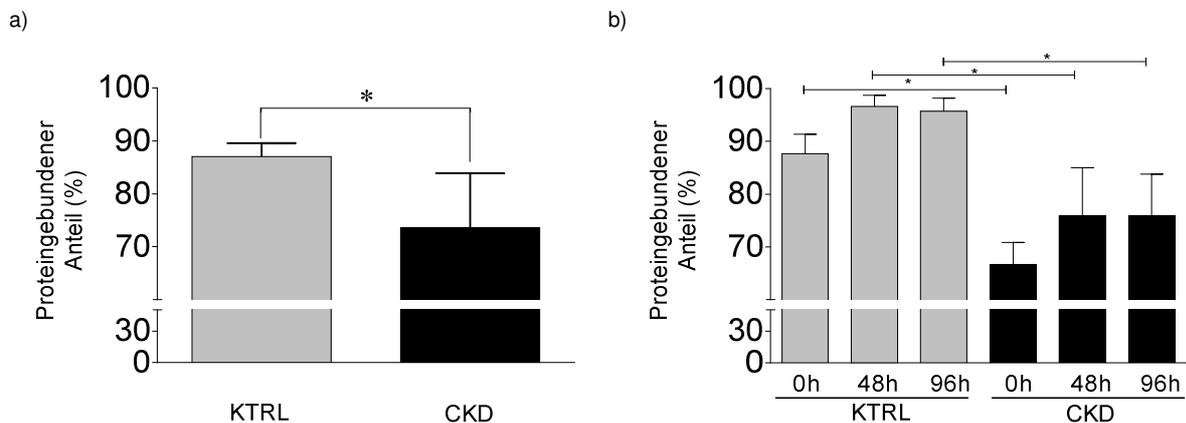
Albumin, isoliert aus dem Plasma chronisch-niereninsuffizienter Patienten, war im Gegensatz zu Albumin nierengesunder Probanden spezifisch am Lysin an den Positionen 249, 468, 548, 565 und 588 posttranslational modifiziert. Im Vergleich zu Albumin, isoliert aus Plasma nierengesunder Probanden, konnte ein signifikanter Anstieg der entsprechenden Massensignale im Albumin chronisch-niereninsuffizienter Patienten aufgezeigt werden (Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Charakteristischer "Peptidmassenfingerprint" von Albumin nierengesunder Probanden (a) und chronisch-niereninsuffizienter Patienten (b). Pfeile zeigen signifikante Unterschiede zu den Massensignalen in a)

Mittels Massenspektrometrie konnten die betreffenden posttranslationalen Modifikationen als Guanidinylierungen identifiziert werden. Eine Quantifizierung der betreffenden Massensignale ergab, dass bis zu 98 % der oben genannten Lysine im Albumin chronisch-niereninsuffizienter Patienten guanidinyliert waren.

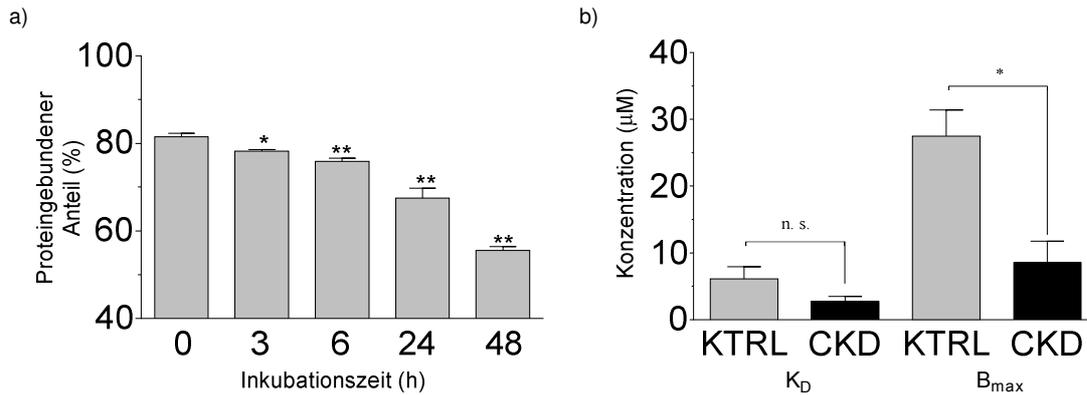
Im Vergleich zu Albumin, isoliert aus dem Plasma nierengesunder Probanden, wies modifiziertes Albumin chronisch-niereninsuffizienter Patienten eine um 14 % signifikant verringerte Bindungskapazität für Indoxylsulfat auf (Abbildung 2a). Eine verminderte Bindungskapazität könnte durch endogene Liganden verursacht werden, die bereits die Bindungsstelle des Albumins besetzen. Zur Entfernung potentiell gebundener Liganden erfolgte eine 96-stündige Dialyse des Albumins gegen 1 M NaCl-Lösung. Nach 48-stündiger Dialyse erhöhte sich der Anteil des albumingebundenen Indoxylsulfats sowohl bei nierengesunden Probanden als auch bei chronisch-niereninsuffizienten Patienten. Nach einer Dialysezeit von 96 Stunden war kein weiterer Anstieg des proteingebundenen Anteils von Indoxylsulfat an Albumin chronisch-niereninsuffizienter Patienten zu bestimmen. Der Unterschied der Bindungskapazitäten zwischen den Gruppen blieb somit bestehen (Abbildung 2b).



**Abbildung 2:** a) Bindungskapazität von Albumin, isoliert aus Plasma von nierengesunden Probanden (KTRL) und chronisch-niereninsuffizienter Patienten (CKD) für den Liganden Indoxylsulfat; \* $P < 0,05$ . b) Effekt einer 48- bzw. 96-stündigen Dialyse gegen 1 M NaCl-Lösung auf die Bindungskapazität von Albumin nierengesunder Probanden (KTRL) und chronisch-niereninsuffizienter Patienten (CKD) für den Liganden Indoxylsulfat; \* $P < 0,05$ .

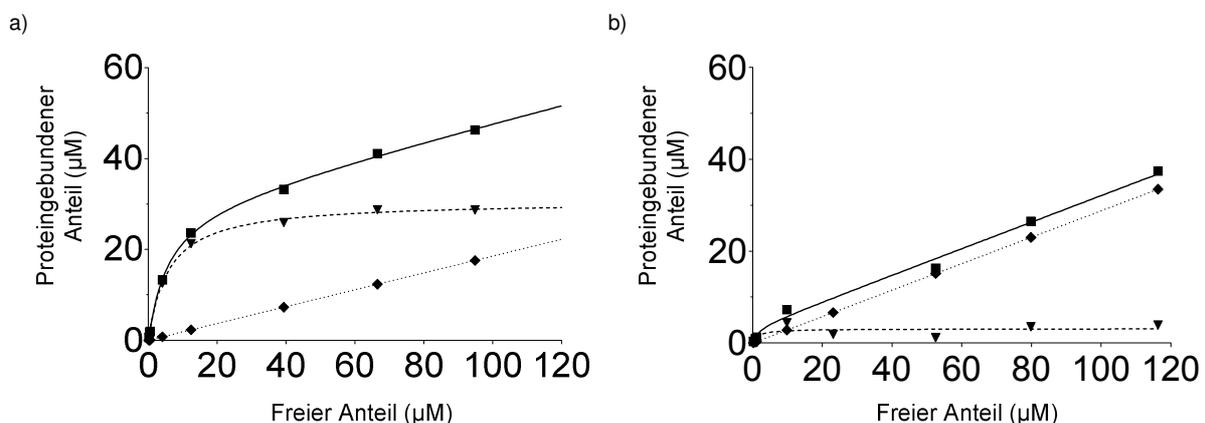
Zur Verifizierung der Hypothese, dass Guanidinylierungen ursächlich für die verminderte Bindungsfähigkeit des Albumins chronisch-niereninsuffizienter Patienten sind, wurde unmodifiziertes Albumin *in-vitro*-guanidinyliert, anschließend massenspektrometrisch analysiert und die Bindungskapazitäten für Indoxylsulfat ermittelt. Durch die *in-vitro*-Modifikation der Lysine wurde ein Guanidinylierungsmuster in der Aminosäuresequenz erzeugt, das Ähnlichkeiten mit dem des Albumins chronisch-niereninsuffizienter Patienten aufwies.

In Abhängigkeit von der Dauer der *in-vitro*-Modifizierungsreaktion wurde eine Abnahme der Bindung von Indoxylsulfat an Albumin detektiert (Abbildung 3a), die auch auf die Bindung weiterer physiologisch relevanter Substanzen übertragbar war. Die Bindungskapazität der unter gleichen Bedingungen getesteten essentiellen Aminosäure Tryptophan verringerte sich von 20 auf 4 %.



**Abbildung 3:** a) Abnahme der Bindungskapazität von Albumin für Indoxylsulfat in Abhängigkeit von der Dauer der *in-vitro*-Modifikation; \*  $P < 0,01$ ; \*\*  $P < 0,005$  versus 0 h. b) Dissoziationskonstante  $K_D$  und maximale Anzahl der Bindungsstellen  $B_{max}$  von Albumin, isoliert aus Plasma nierengesunder Probanden (KTRL) und chronisch-niereninsuffizienter Patienten (CKD) für Indoxylsulfat; \*  $P < 0,05$ .

Zur quantitativen Beschreibung der Bindungseigenschaften von Albumin für Indoxylsulfat wurden Bindungskurven ermittelt, die den proteingebundenen Anteil von Indoxylsulfat in Abhängigkeit vom freien Anteil konzentrationsabhängig darstellten. Der Kurvenverlauf der gesamten Bindung des Albumins nierengesunder Probanden zeigte spezifische Bindung im niedrigen Konzentrationsbereich des Liganden Indoxylsulfat mit langsamen Übergang zu unspezifischer Bindung bei Indoxylsulfatkonzentrationen  $> \sim 20 \mu\text{M}$ . Im Vergleich dazu war die gesamte Bindung von Indoxylsulfat an Albumin chronisch-niereninsuffizienter Patienten und an *in-vitro*-guanidinyliertem Albumin stark verringert und es wurde nur geringe spezifische Bindung und hauptsächlich unspezifische Bindung beobachtet (Abbildung 4). Dies zeigte sich ebenfalls in der maximalen Anzahl der Bindungsstellen  $B_{max}$ , die nach *in-vitro*-Guanidinylierung des Albumins abnahm ( $17,52 \pm 0,75 \mu\text{M}$  vs.  $6,28 \pm 1,42 \mu\text{M}$ ).  $B_{max}$  des Albumins, isoliert aus Plasma nierengesunder Probanden, wies einen höheren Wert als das Albumin chronisch-niereninsuffizienter Patienten auf ( $27,45 \pm 3,97 \mu\text{M}$  vs.  $8,58 \pm 3,18 \mu\text{M}$ , Abbildung 3b).



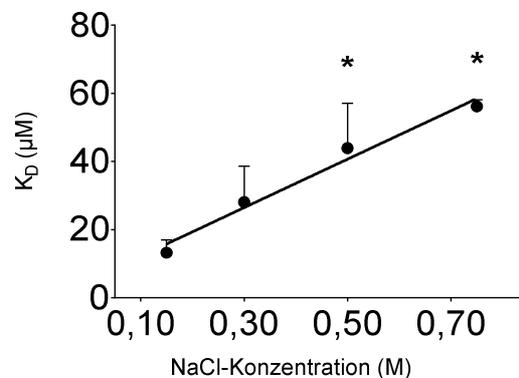
**Abbildung 4:** Gesamte (■), spezifische (▼) und unspezifische (◆) Bindung von Indoxylsulfat an Albumin nierengesunder Probanden (a) und chronisch-niereninsuffizienter Patienten (b)

### 3.2. Publikation 2: *Bindungsaffinität und -kapazität des Urämietoxins Indoxylsulfat in Plasma*

Um eine bessere Entfernung albumingebundener und daher nicht dialysemembrangängiger Urämietoxine durch modifizierte Dialyse-Techniken zu erreichen, wurden im Rahmen dieser Arbeit Methoden entwickelt, die auf eine Schwächung der Proteinbindung und Verringerung der Bindungskapazität im Plasma abzielten.

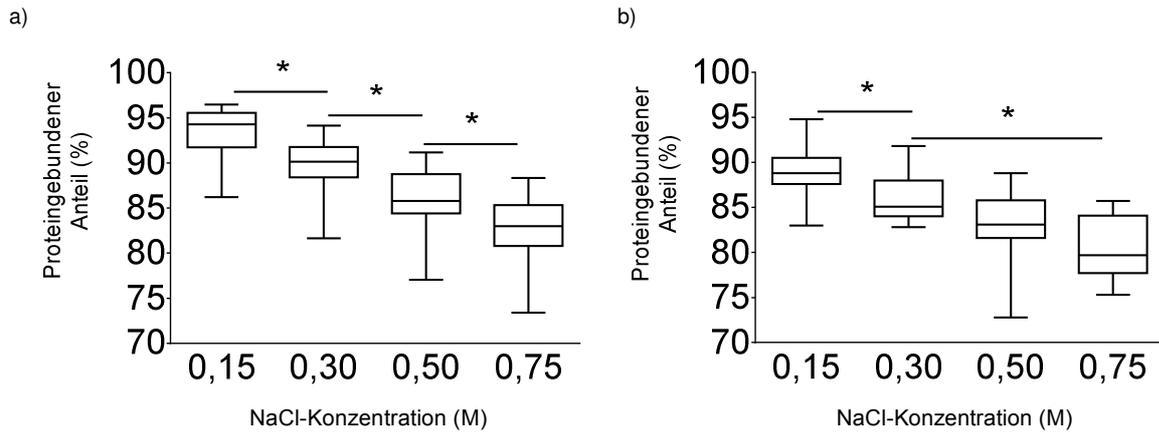
In *in-vitro*-Ansätzen wurde sowohl der Einfluss einer erhöhten Ionenstärke (durch eine gesteigerte NaCl-Konzentration) und einer erhöhten Temperatur, als auch der Effekt einer Plasmaverdünnung mittels PBS auf die Proteinbindung von Indoxylsulfat im Plasma nierengesunder Probanden und chronisch niereninsuffizienter Patienten verglichen.

Durch eine Erhöhung der Ionenstärke durch Steigerung der NaCl-Konzentration verringerte sich die Bindungsaffinität von Albumin zu Indoxylsulfat. Die Dissoziationskonstante  $K_D$  stieg linear in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration im Plasma nierengesunder Probanden an (Abbildung 5), das mit einer geringeren Proteinbindung assoziiert werden konnte (Abbildung 6a).



**Abbildung 5:** Effekt einer ansteigenden Ionenstärke auf die Dissoziationskonstante  $K_D$  von Indoxylsulfat im Plasma nierengesunder Probanden; \*  $P < 0,05$  vs. 0,15 M NaCl.

Bei Verwendung von Plasma chronisch-niereninsuffizienter Patienten konnte dieser Effekt ebenfalls nachgehalten werden. Die Bindungskapazität für Indoxylsulfat im Plasma chronisch-niereninsuffizienter Patienten sank von  $89 \pm 3$  % auf  $81 \pm 3$  % bei Anhebung der NaCl-Konzentration von 0,15 auf 0,75 M (Abbildung 6b). Im Vergleich zum Plasma chronisch-niereninsuffizienter Patienten lag bei einer NaCl-Konzentration von 0,15 M und 0,30 M der proteingebundene Anteil von Indoxylsulfat im Plasma nierengesunder Probanden 4 % höher.



**Abbildung 6:** Effekt einer erhöhten NaCl-Konzentration auf die Bindung von Indoxylsulfat im Plasma nierengesunder Probanden (n=18) (a) und chronisch-niereninsuffizienter Patienten (n=15) (b); \*  $P < 0,05$ . Box-Plot-Darstellung des Medians, minimalen und maximalen Wertes des proteingebundenen Anteils.

Eine Temperaturerhöhung von 25 °C auf 37 °C verringerte den proteingebundenen Anteil von Indoxylsulfat im Plasma (bei NaCl 0,15 M:  $90 \pm 2 \%$  vs.  $86 \pm 1 \%$ ,  $P < 0,05$ ; bei NaCl 0,61 M:  $83 \pm 2 \%$  vs.  $77 \pm 2 \%$ ,  $P < 0,01$ ).

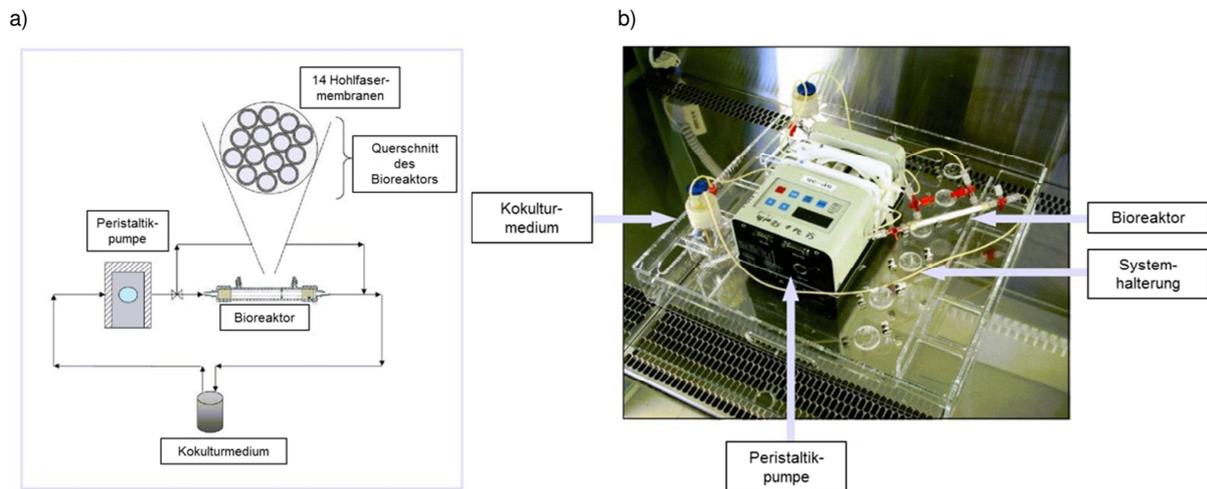
Tabelle 1 zeigt die Dissoziationskonstante  $K_D$  und den proteingebundenen Anteil an Indoxylsulfat in Abhängigkeit der Plasmaverdünnung und Ionenstärke. Während eine Verdünnung des Plasmas  $K_D$  nicht veränderte, wurde der proteingebundene Anteil an Indoxylsulfat jedoch verringert (Tabelle 1). Dieser Effekt war in Kombination mit einer erhöhten Ionenstärke additiv.

**Tabelle 1:** Dissoziationskonstante  $K_D$  und proteingebundener Anteil von Indoxylsulfat in 1:2 und 1:10 verdünntem Plasma. <sup>(a)</sup>  $P < 0,05$  vs. 1:2 Verdünnung; <sup>(b)</sup>  $P < 0,05$  vs. 0,15 M NaCl

| NaCl [M] | Verdünnung | $K_D$ [ $\mu$ M] | Proteingebundener Anteil [%] |
|----------|------------|------------------|------------------------------|
| 0,15     | 1:2        | $13,4 \pm 3,6$   | $95 \pm 2$                   |
| 0,50     | 1:2        | $40,1 \pm 18,4$  | $88 \pm 4$ <sup>(b)</sup>    |
| 0,15     | 1:10       | $8,9 \pm 2,7$    | $86 \pm 3$ <sup>(a)</sup>    |
| 0,50     | 1:10       | $44,7 \pm 18,3$  | $73 \pm 6$ <sup>(a,b)</sup>  |

### 3.3. Publikation 3: *Entwicklung einer künstlichen Arterie als in-vitro-Perfusionsmodell zur Detektion des Einflusses gefäßschädigender Faktoren*

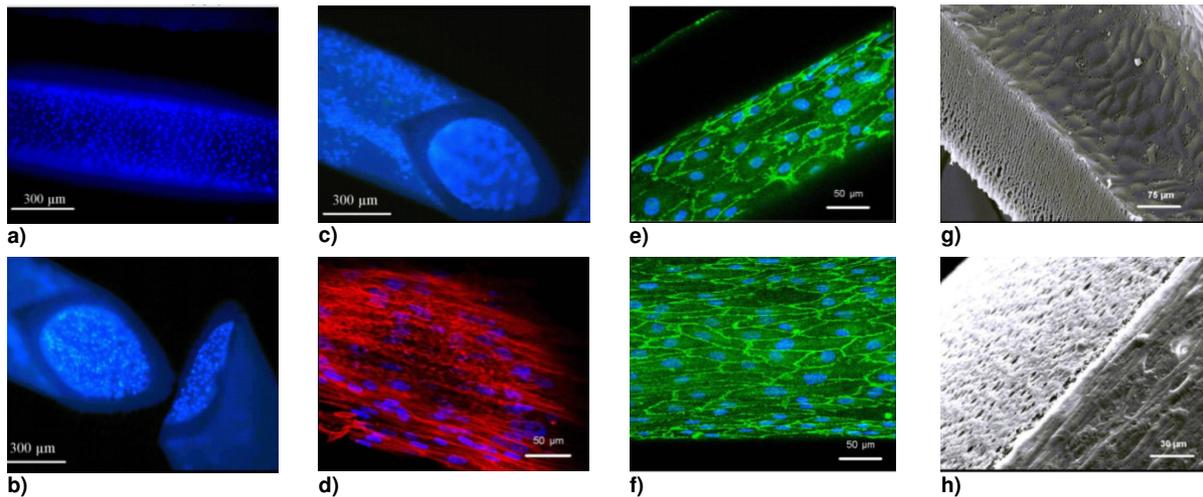
Um physiologische und pathophysiologische Fragestellungen im Bereich der Gefäßphysiologie bearbeiten zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit das *in-vitro*-Modell einer künstlichen Arterie entwickelt. Das resultierende Modell ist in Abbildung 7 dargestellt.



**Abbildung 7:** a) Schema des *in-vitro*-Modells der künstlichen Arterie, bestehend aus einem Reservoir mit Kokulturmilieu, einer Peristaltikpumpe und des Bioreaktors  
 b) Fotografie des Modells und des Bioreaktors, bestehend aus einem Polycarbonat-Gehäuse mit 14 parallel angeordneten Hohlfasermembranen aus Polypropylen

Es wurden Parameter zur Besiedlung (Zellzahl, Coatingstrategie, Besiedlungsstrategie, Adhäsionszeit, Flussgeschwindigkeit) und zum Nachweis der Zellen auf der Hohlfaser (Fixierung, Zellkernfärbung, Präparation der Hohlfasern) optimiert. Anschließend konnte eine Kokultivierung in Konfluenz (Abb. 8a-f) mit primären Endothelzellen auf der Innenseite und primären glatten Muskelzellen auf der Außenseite der Hohlfasern im Bioreaktor sowohl bei geringem ( $0,1 \text{ N/m}^2$ ) als auch bei hohem ( $3 \text{ N/m}^2$ ) Scherstress über einen Zeitraum von bis zu fünf Tagen etabliert werden.

Bei hohem Scherstress ( $3 \text{ N/m}^2$ ) richteten sich die Endothelzellen entsprechend der Flussrichtung aus (Abbildung 8f).



**Abbildung 8:** a) Zellkernfärbung von Endothelzellen nach Kultivierung ( $0,1 \text{ N/m}^2$ , 24 Stunden) in der Hohl-faser (Vergrößerung 1:100)  
 b+c) Querschnitt einer Hohl-faser der Kokultur ( $0,1 \text{ N/m}^2$ , 5 Tage) von Endothel- und Muskelzellen nach Zellkernfärbung mit Fokus auf Endothelzellen (b) bzw. Muskelzellen (c) (Vergrößerung 1:100)  
 d) Konfokalmikroskopische Immunlokalisation von  $\alpha$ -Smooth-muscle-actin in Muskelzellen in Kokultur ( $3 \text{ N/m}^2$ , 5 Tage, Vergrößerung 1:400)  
 e+f) Konfokalmikroskopische Immunlokalisation von Cadherin-5 in Endothelzellen in Kokultur unter geringem ( $0,1 \text{ N/m}^2$ , Abb. e) und hohem ( $3 \text{ N/m}^2$ , Abb. f) Scherstress über 5 Tage (Vergrößerung 1:400)  
 g+h) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Endothelzellen mit typischem morphologischem Erscheinungsbild (Kopfsteinpflaster-Muster, Vergrößerung 1:500) auf der Hohl-faserinnenseite (g) und glatten Muskelzellen mit typisch spindelförmiger Struktur auf der Außenseite einer Hohl-faser (h) (Vergrößerung 1:400)

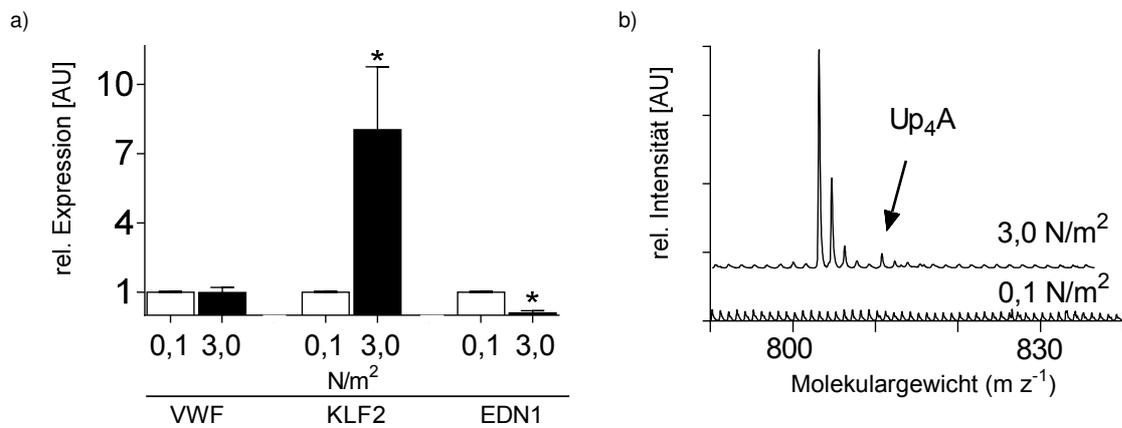
Durch Quantifizierung der Expression zelltypischer Proteine und durch den Nachweis eines endothelzellspezifisch sezernierten Mediators wurde das Modell validiert.

Die RNA wurde aus den Endothel- und Muskelzellen isoliert und Genexpressionsanalysen mittels semiquantitativer Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion durchgeführt. Zur Charakterisierung der Endothelzellfunktion wurde die basale Expression des von-Willebrand-Faktors bestimmt. Der von-Willebrand-Faktor ist Trägerprotein des Gerinnungsfaktors VIII und verhindert dessen proteolytischen Abbau. Zusätzlich bewirkt er die Adhäsion aktivierter Thrombozyten an das Endothel<sup>22</sup>. Im Modell der künstlichen Arterie konnte eine Expression des von-Willebrand-Faktors sowohl bei niedrigen als auch bei hohen Scherstressbedingungen nachgewiesen werden (Abbildung 9a).

Endothelzellen reagieren auf Scherstress mit vermehrter bzw. verminderter Expression von Genen wie z.B. des Krüppel-like-Faktors 2 oder Endothelin-1. Der Krüppel-like-Faktor 2 ist ein Transkriptionsfaktor, der endotheliale Entzündungsprozesse steuert. Endothelin-1 fungiert als hochpotenter Vasokonstriktor. Im Gegensatz zu geringen Scherstressbedingungen ( $0,1 \text{ N/m}^2$ ) konnte bei hohen Scherstressbedingungen ( $3 \text{ N/m}^2$ ) über einen Zeitraum von fünf Tagen eine

vermehrte Expression des Krüppel-like-Faktors 2 und eine verminderte Expression von Endothelin-1 nachgewiesen werden (Abbildung 9a).

Zusätzlich wurden Medienüberstände aus Mono- und Kokulturen mittels MALDI-Massenspektrometrie auf die Freisetzung von Uridin-Adenosin-Tetraphosphat untersucht. Uridin-Adenosin-Tetraphosphat ist ein Dinukleosidpolyphosphat, das nach mechanischer Stimulation von Endothelzellen freigesetzt wird und vasokonstriktiv wirkt<sup>23</sup>. Bei hohem Scherstress ( $3,0 \text{ N/m}^2$ ) konnte im Vergleich zu geringem Scherstress ( $0,1 \text{ N/m}^2$ ) die Sezernierung von Uridin-Adenosin-Tetraphosphat nachgewiesen werden (Abbildung 9b).



**Abbildung 9:** a) Expression des von-Willebrand-Faktors (VWF), des Krüppel-like-Faktors 2 (KLF2) und Endothelin-1 (EDN1) in Endothelzellen in Kokultur unter geringem ( $0,1 \text{ N/m}^2$ ) und hohem ( $3 \text{ N/m}^2$ ) Scherstress über 5 Tage  
 b) Sezernierung von Uridin-Adenosin-Tetraphosphat (Up<sub>4</sub>A) aus Endothelzellen in Monokultur nach Stimulation durch hohen ( $3 \text{ N/m}^2$ ) Scherstress

#### 4 Diskussion

Im ersten Teil der Dissertation wurde Albumin chronisch-niereninsuffizienter Patienten und nierengesunder Probanden massenspektrometrisch bezüglich posttranslationaler Modifikationen analysiert. Im Gegensatz zu Nierengesunden war Albumin chronisch-niereninsuffizienter Patienten an mehreren Positionen in der Polypeptidkette guanidinyliert. Daher wurde der Einfluss der Guanidinylierungen des Albumins auf die Bindung repräsentativer hydrophober Metabolite untersucht. Diese Experimente dienten zur Klärung der offenen Frage, warum die Bindungskapazität von hydrophober Liganden an Albumin bei chronisch-niereninsuffizienten Patienten verringert ist<sup>24-28</sup>. Hierzu werden in der Literatur verschiedene Hypothesen postuliert:

1. Unterschiede in den Albumin- und Ligandenkonzentrationen bei *in-vitro*-Ansätzen oder im Plasma chronisch-niereninsuffizienter Patienten und nierengesunder Probanden resultieren in unterschiedlichen Bindungskapazitäten und damit in einer unzureichenden Vergleichbarkeit der Daten zwischen den Vergleichsgruppen<sup>5,29,30</sup>.
2. Die Akkumulation endogener, um die Bindungsstelle konkurrierender Liganden im Plasma chronisch-niereninsuffizienter Patienten führt zur Sättigung der Bindungsstelle und reduziert die Bindungskapazität<sup>31,32</sup>.
3. Durch strukturelle Veränderungen in der Bindungsstelle oder Konformationsänderungen des Albumins durch außerhalb der Bindungsstelle lokalisierte Modifikationen<sup>33</sup> kann der Ligand nicht mehr spezifisch binden. Konformationsänderungen können z.B. durch posttranslationale Modifikationen wie Oxidation, Glykosylierung und Carbamylierung entstehen<sup>5,6</sup>.

Indem Albumin aus dem Plasma nierengesunder Probanden und chronisch-niereninsuffizienter Patienten isoliert wurde, konnte das Albumin in den vorliegenden Bindungsstudien in gleichen Konzentrationen eingesetzt und mit jeweils identischen Indoxylsulfatkonzentrationen inkubiert werden. Somit konnten Unterschiede bzgl. der Albumin- und Ligandenkonzentrationen zwischen den Vergleichsgruppen vermieden und damit als eine potentielle Ursache für die verringerte Bindungskapazität bei chronisch-niereninsuffizienten Patienten ausgeschlossen werden (Hypothese 1).

Durch Erhöhung der Ionenstärke während einer 48-stündigen Dialyse gegen 1 M NaCl-Lösung wurden Liganden aus der Bindungsstelle des Albumins chronisch-niereninsuffizienter Patienten und nierengesunder Probanden vollständig entfernt.

Die Bindungskapazität des Albumins chronisch-niereninsuffizienter Patienten blieb auch nach vollständiger Entleerung der Bindungsstellen für Indoxylsulfat verringert. Damit konnte eine kompetitive Bindung mehrerer Liganden um die Bindungsstelle als Ursache der verringerten Kapazität ausgeschlossen werden (Hypothese 2).

Die endogene, posttranslationale Guanidinylierung des Albumins chronisch-niereninsuffizienter Patienten wurde durch eine *in-vitro*-Guanidinylierung von unmodifiziertem Albumin, isoliert aus dem Serum nierengesunder Probanden, simuliert. Das derart *in-vitro*-modifizierte Albumin führte zu vergleichbaren Änderungen in den Intensitäten des Massenspektrums wie beim Albumin chronisch-niereninsuffizienter Patienten. Das *in-vitro*-modifizierte Albumin zeigte ebenfalls eine verringerte Bindungskapazität für Indoxylsulfat in Abhängigkeit von der Dauer der *in-vitro*-Modifikation. Weiterhin war die Bindungskurve des *in-vitro*-modifizierten Albumins mit der Bindungskurve des Albumins chronisch-niereninsuffizienter Patienten vergleichbar.

Lysin-Aminosäuren des Albumins chronisch-niereninsuffizienter Patienten und des *in-vitro*-modifizierten Albumins waren in den Positionen 249, 468, 548, 565 und 588 der Polypeptidkette guanidinyliert. Demnach trägt mindestens eine dieser Modifikationen zur Verringerung der Bindungskapazität von Indoxylsulfat an Albumin bei. Die dreidimensionale Struktur von Albumin ist für die Bindung von Liganden essentiell<sup>33</sup>. Jedoch ist keines der modifizierten Lysine Teil der Sudlow-Bindungsstelle II<sup>34</sup>, an der Indoxylsulfat bindet<sup>4</sup>. Daher führt die Guanidinylierung an einer oder mehreren der genannten Positionen zur Konformationsänderung des Albumins und beeinflusst dadurch indirekt die Bindungsstelle (Allosterie). Infolgedessen kann Indoxylsulfat nicht mehr spezifisch an die Sudlow-Bindungsstelle II binden. Eine ähnliche Hypothese wurde in der Vergangenheit bereits für oxidiertes Albumin postuliert<sup>33</sup>.

Somit konnte diese Studie zeigen, dass Guanidinylierungen des Albumins chronisch-niereninsuffizienter Patienten eine direkte Wirkung auf die Bindungskapazität von hydrophoben Metaboliten wie Indoxylsulfat und Tryptophan haben. Da nur das Albumin chronisch-niereninsuffizienter Patienten, aber nicht das Albumin nierengesunder Probanden modifiziert war, könnte außerdem guanidinyliertes Albumin als Biomarker der chronischen-Niereninsuffizienz dienen.

Indoxylsulfat liegt im Plasma hauptsächlich (~90 %, <sup>35</sup>) proteingebunden vor. Indem bei chronisch niereninsuffizienten Patienten (Stadium 5) nur der freie Anteil durch Hämodialyse entfernt werden kann, findet eine Akkumulation im Plasma statt<sup>14</sup>. Da hydrophobe Urämietoxine, wie z.B. Indoxylsulfat, mit erhöhter Morbidität und Mortalität chronisch-niereninsuffizienter Patienten assoziiert sind<sup>15-17</sup>, wird eine gesteigerte Entfernung dieser Moleküle aus dem Plasma angestrebt. Im zweiten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurde daher eine Methode entwickelt, die den freien Anteil hydrophober Urämietoxine im Plasma erhöht, um ihn einer verbesserten Entfernung während der Dialyse zugänglich zu machen. In *in-vitro*-Experimenten wurde der Einfluss einer erhöhten Ionenstärke durch Anhebung der NaCl-Konzentration im Plasma, einer Plasmaverdünnung sowie der Effekt einer Temperaturerhöhung auf die Proteinbindung von Indoxylsulfat im Plasma nierengesunder Probanden und chronisch niereninsuffizienter Patienten untersucht. Eine Erhöhung der Ionenstärke im Plasma resultierte in einem linearen Anstieg der Dissoziationskonstante  $K_D$  für Indoxylsulfat. Parallel sank der proteingebundene Anteil von Indoxylsulfat. Dieses Ergebnis stimmte mit früheren Studien überein<sup>36,37</sup>. Diese zeigten ebenfalls, dass durch eine Erhöhung der Ionenstärke mit 0,30 M NaCl-Lösung die Bindungsaffinität von Liganden wie p-Cresol, p-Cresylsulfat und Naproxen an Albumin erniedrigt wird. Es wird vermutet, dass es durch die erhöhte Ionenstärke zu Änderungen elektrostatischer Wechselwirkungen innerhalb der Bindungsstelle des Albumins oder an kritischen Bereichen außerhalb der Bindungsstelle kommt und daher Liganden nicht mehr so effektiv gebunden werden können.

Bei einer NaCl-Konzentration von 0,15 M und 0,30 M war im Plasma der chronisch-niereninsuffizienten Patienten 4 % weniger Indoxylsulfat gebunden als im Plasma der nierengesunden Probanden. Dies kann z.B. auf oben beschriebene Guanidinylierungen am Albumin mit der damit assoziierten verringerten spezifischen Bindung von Indoxylsulfat an Albumin<sup>38</sup> zurückgeführt werden.

Verdünnung des Plasmas führte ebenfalls zur Verringerung des proteingebundenen Anteils von Indoxylsulfat im Plasma. Dieser Effekt war additiv zur Erhöhung der Ionenstärke und kann durch die Abnahme der Anzahl der Bindungsstellen  $B_{max}$  im Plasma durch die Verdünnung erklärt werden. Klinische und experimentelle Studien stützen diese Beobachtung<sup>30,39</sup>. Dieser Effekt unterstreicht die Notwendigkeit, bei einem Vergleich der Bindungskapazitäten von Plasmen aus verschiedenen

Experimenten oder auch klinischen Studien die vorliegenden Proteinkonzentrationen und Plasmaverdünnungen zu berücksichtigen.

Eine Erhöhung der Temperatur von 25 °C auf 37 °C führte zu einer Verringerung des proteingebundenen Anteils von Indoxylsulfat im Plasma. Diese Beobachtung bestätigt Untersuchungen von Viaene et al.<sup>40</sup> und Bergé-Lefranc et al.<sup>41</sup>. Sie hatten berichtet, dass eine höhere Temperatur die Affinität von humanem Albumin für p-Cresol und p-Cresylsulfat verringert, ohne dass sich die Proteinstruktur ändert. Auf Grund der Durchführung unserer Studie bei Raumtemperatur kann geschlossen werden, dass die Bindungskapazität und -affinität von Indoxylsulfat im Plasma in den vorliegenden Versuchsreihen geringfügig überbewertet wurde. Damit wäre der Einfluss einer erhöhten Ionenstärke und die damit verbundenen Freisetzung hydrophober Urämietoxine während der klinischen Dialyse (37 °C) größer als in den entsprechenden Versuchsreihen beobachtet.

Zusammengefasst führt sowohl eine Verdünnung des Plasmas als auch eine Erhöhung von Ionenstärke und Temperatur zu einer Erhöhung des freien Anteils hydrophober Urämietoxine im Plasma und sollte damit zu einer verbesserten Entfernung der Substanzen während der Dialyse beitragen. Eine derart verstärkte Entfernung von proteingebundenen Toxinen im Rahmen der klinischen Dialysesituation wäre möglicherweise mit einer geringeren Morbidität und Mortalität chronisch-dialysepflichtiger Patienten verbunden.

Um Interaktionen und metabolische Funktionen von Mediatoren, gefäßschädigenden Urämietoxinen, wie Indoxylsulfat<sup>18</sup>, oder auch posttranslational modifiziertem Albumin auf das kardiovaskuläre System aufklären zu können, konnte im dritten Abschnitt der Dissertation ein *in-vitro*-Perfusionsmodell einer künstlichen Arterie etabliert und die Funktionalität des Modells der künstlichen Arterie mittels Assays validiert werden.

Der Bioreaktor der künstlichen Arterie erlaubt sowohl unter geringen (0,1 N/m<sup>2</sup>) als auch hohen Scherstressbedingungen (3 N/m<sup>2</sup>) eine Kokultivierung von Endothelzellen und vaskulären glatten Muskelzellen und somit eine Interaktion relevanter Zelltypen des Gefäßsystems. Damit grenzt es sich von den Arbeiten von Takei et al.<sup>42</sup>, Ballermann et al.<sup>43</sup> und Ucuşian et al.<sup>44</sup> ab, die zur Simulation der *in-vivo*-Situation kleiner Blutgefäße nur Endothelzellen in Monokultur eingesetzt hatten.

Redmond et al.<sup>45</sup> beschrieb ein *in-vitro*-Kokultur-Modell ähnlich dem der künstlichen Arterie. Diesem Ansatz mangelte es jedoch an der funktionellen Validierung des

Modells (biomechanisches Verhalten, Nachweis der Sekretion endothelialer Mediatoren, Immunfluoreszenzfärbung endothelzell- bzw. muskelspezifischer Proteine, Zellkernfärbung und mRNA-Expressionsanalyse). Auch beruhte das Modell von Redmond auf Endothel- und Muskelzellen tierischen Ursprungs, wohingegen die künstliche Arterie aus humanen primären Zellen aufgebaut wurde.

Es ist beschrieben, dass Endothelzellen unter hohen Scherstressbedingungen kontinuierlich, aber nicht vermehrt, VWF-mRNA exprimieren<sup>46</sup>. Der Krüppel-like-Faktor 2 wird dagegen durch Scherstress vermehrt *in-vivo* und *in-vitro* exprimiert<sup>47</sup>, wohingegen die mRNA Expression von Endothelin-1 unter hohen Scherstressbedingungen vermindert wird<sup>48</sup>. Diese Befunde konnten auch in dem entwickelten Kokulturmodell über einen Kultivierungszeitraum von fünf Tagen nachgewiesen werden. Darauf basierend wäre es in Zukunft vereinfacht möglich, Langzeiteffekte über mehr als fünf Tage zu untersuchen oder pulsatilem Scherstress zu simulieren.

Die künstliche Arterie mit den in dieser Studie verwendeten Assays und Endpunktanalysen stellt damit ein solides, validiertes *in-vitro*-Modell zur Testung von Mediatoren bzw. pathophysiologischen Metaboliten und deren Auswirkungen auf das vaskuläre System dar. Damit kann zukünftig die Anzahl von Tierexperimenten zu vaskulären Erkrankungen gemäß dem 3R-Prinzip von Russel und Burch<sup>(74)</sup> verringert werden. Des Weiteren können auch Signalwege untersucht werden, um Erkenntnisse im Zusammenhang mit medikamentösen Interventionen bei vaskulären Erkrankungen im Allgemeinen und bei chronisch-niereninsuffizienten Patienten zu erlangen.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Mills KT, Xu Y, Zhang W, Bundy JD, Chen CS, Kelly TN, Chen J, He J. A systematic analysis of worldwide population-based data on the global burden of chronic kidney disease in 2010. *Kidney Int* 2015;doi: 10.1038/ki.2015.230.
2. Liabeuf S, Drüeke TB, Massy ZA. Protein-bound uremic toxins: New insight from clinical studies. *Toxins* 2011;3:911–919.
3. Fanali G, di Masi A, Trezza V, Marino M, Fasano M, Ascenzi P. Human serum albumin: from bench to bedside. *Mol Aspects Med* 2012;33:209–290.
4. Sakai T, Takadate A, Otagiri M. Characterization of binding site of uremic toxins on human serum albumin. *Biol Pharm Bull* 1995;18:1755–1761.
5. Meijers BK, Bammens B, Verbeke K, Evenepoel P. A review of albumin binding in CKD. *Am J Kidney* 2008;Dis 51:839–850
6. Otagiri M. A molecular functional study on the interactions of drugs with plasma proteins. *Drug Metab Pharmacokinet* 2005;20:309–323.
7. Sun YM, Su Y, Li J, Wang LF. Recent advances in understanding the biochemical and molecular mechanism of diabetic nephropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;433:359–361.
8. Mangalmurti NS, Friedman JL, Wang LC, Stolz D, Muthukumaran G, Siegel DL, Schmidt AM, Lee JS, Albelda SM. The receptor for advanced glycation end products mediates lung endothelial activation by RBCs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012;304:L250–L263.
9. Prakash M, Phani NM, Kavya R, Supriya M. Paraoxonase: its antiatherogenic role in chronic renal failure. *Indian J Nephrol* 2010;20:9–14.
10. Hollyfield JG, Bonilha VL, Rayborn ME, Yang X, Shadrach KG, Lu L, Ufret RL, Salomon RG, Perez VL. Oxidative damage-induced inflammation initiates age-related macular degeneration. *Nat Med* 2008;14:194–198.
11. Zager RA, Johnson AC, Lund S, Hanson S. Acute renal failure: determinants and characteristics of the injury-induced hyperinflammatory response. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;291:F546–F556.
12. Wang Z, Nicholls SJ, Rodriguez ER, Kummu O, Horkko S, Barnard J, Reynolds WF, Topol EJ, DiDonato JA, Hazen SL. Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis. *Nat Med* 2007;13:1176–1184.
13. Gaikwad AB, Sayyed SG, Lichtnekert J, Tikoo K, Anders HJ. Renal failure increases cardiac histone h3 acetylation, dimethylation, and phosphorylation and the induction of cardiomyopathy-related genes in type 2 diabetes. *Am J Pathol* 2010;176:1079–1083.

14. Vanholder, R, de Smet R, Glorieux G, Argilès A, Baurmeister U, Brunet P, Clark W, Cohen G, de Deyn PP, Deppisch R, Descamps-Latscha B, Henle T, Jörres A, Lemke HD, Massy ZA, Passlick-Deetjen J, Rodriguez M, Stegmayr B, Stenvinkel P, Tetta C, Wanner C, Zidek W; European Uremic Toxin Work Group (EUTox). Review on uremic toxins: Classification, concentration and interindividual variability. *Kidney Int* 2003;63:1934–1943.
15. Barreto FC, Barreto DV, Liabeuf S, Meert N, Glorieux G, Temmar M, Choukroun G, Vanholder R, Massy ZA. Serum indoxyl sulfate is associated with vascular disease and mortality in chronic kidney disease patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;4:1551–1558.
16. Niwa T, Nomura T, Sugiyama S, Miyazaki T, Tsukushi S, Tsutsui S. The protein metabolite hypothesis, a model for the progression of renal failure: An oral adsorbent lowers indoxyl sulfate levels in undialyzed uremic patients. *Kidney Int Suppl* 1997;62:S23–S28.
17. Wu IW, Hsu KH, Lee CC, Sun CY, Hsu HJ, Tsai CJ, Tsen CY, Wang YC, Lin CY, Wu MS. p-Cresyl sulphate and indoxyl sulphate predict progression of chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26:938–947.
18. Yu M, Kim YJ, Kang DH. Indoxyl sulfate-induced endothelial dysfunction in patients with chronic kidney disease via an induction of oxidative stress. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011;6:30-39
19. Kimmel J. Guanidination of proteins. *Methods Enzymol* 1967;11:584–589.
20. Morawietz H, Talanow R, Szibor M, Rueckschloss U, Schubert A, Bartling B, Darmer D, Holtz J. Regulation of the endothelin system by shear stress in human endothelial cells. *J Physiol* 2000;525:761-770.
21. Janke D, Jankowski J, Rüth M, Buschmann I, Lemke HD, Jacobi D, Knaus P, Spindler E, Zidek W, Lehmann K, Jankowski V. The "artificial artery" as in vitro perfusion model. *PLoS One* 2013;8:e57227.
22. Sadler JE. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem* 1998;67:395–424.
23. Jankowski V, Tölle M, Vanholder R, Schönfelder G, van der Giet M, Henning L, Schlüter H, Paul M, Zidek W, Jankowski J. Identification of uridine adenosine tetraphosphate (Up4A) as an endothelium-derived vasoconstrictive factor. *Nature Medicine* 2005;11:223-227
24. Lim PS, Cheng YM, Yang SM. Impairments of the biological properties of serum albumin in patients on haemodialysis. *Nephrology* 2007;12:18–24.
25. Macconi D, Chiabrando C, Schiarea S, Aiello S, Cassis L, Gagliardini E, Noris M, Buelli S, Zoja C, Corna D, Mele C, Fanelli R, Remuzzi G, Benigni A. Proteasomal processing of albumin by renal dendritic cells generates antigenic peptides. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:123–130.

26. Cessac AL, Perichon M, Schaefferbeke J, Bakala H. Age-related changes in albumin binding by renal brush-border membrane vesicles. *Mech Ageing Dev* 1993;70:139–148.
27. Watanabe H, Noguchi T, Miyamoto Y, Kadowaki D, Kotani S, Nakajima M, Miyamura S, Ishima Y, Otagiri M, Maruyama T. Interaction between two sulfate conjugated uremic toxins, p-cresyl sulfate and indoxyl sulfate, during binding with human serum albumin. *Drug Metab Dispos* 2012;40:1423–1428.
28. Gulyassy PF, Depner TA. Impaired binding of drugs and endogenous ligands in renal diseases. *Am J Kidney Dis* 1983;2:578-601.
29. Marsche G, Frank S, Hrzenjak A, Holzer M, Dirnberger S, Wadsack C, Scharnagl H, Stojakovic T, Heinemann A, Oettl, K. Plasma-advanced oxidation protein products are potent high-density lipoprotein receptor antagonists in vivo. *Circ Res* 2009;104:750–757.
30. Sakai T, Yamasaki K, Sako T, Kragh-Hansen U, Suenaga A, Otagiri M. Interaction mechanism between indoxyl sulfate, a typical uremic toxin bound to site II, and ligands bound to site I of human serum albumin. *Pharm Res* 2001;18:520–524.
31. Klammt S, Wojak HJ, Mitzner A, Koball S, Rychly J, Reisinger EC, Mitzner S. Albumin-bindingcapacity (ABiC) is reduced in patients with chronic kidney disease along with an accumulation of protein-bound uraemic toxins. *Nephrol Dial Transplant* 2012;27:2377–2383.
32. Lorenzo Sellares V, Torregrosa V. Changes in mineral metabolism in stage 3, 4, and 5 chronic kidney disease (not on dialysis). *Nefrologia* 2008;28(Suppl 3):67–78
33. Oettl K, Stauber RE. Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. *Br J Pharmacol* 2007;151:580–590.
34. Sudlow G, Birkett DJ, Wade DN. The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol Pharmacol* 1975;11:824-32.
35. Meijers BK, Claes K, Bammens B, de Loo H, Viaene L, Verbeke K, Kuypers D, Vanrenterghem Y, Evenepoel P. p-Cresol and cardiovascular risk in mild-to-moderate kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010; 5:1182-1189.
36. Dou L, Bertrand E, Cerini C, Faure V, Sampol J, Vanholder R, Berland Y, Brunet P. The uremic solutes p-cresol and indoxyl sulfate inhibit endothelial proliferation and wound repair. *Kidney Int* 2004;65:442–451.
37. Banerjee, T.; Singh, S.K.; Kishore, N. Binding of naproxen and amitriptyline to bovine serum albumin: Biophysical aspects. *J Phys Chem B* 2006;110: 24147–24156.

38. R uth M, Lemke HD, Preisinger C, Krieter DH, Theelen W, Gajjala P, Devine E, Zidek W, Jankowski V, Jankowski J. Guanidylations of albumin decreased binding capacity of hydrophobic metabolites. *Acta Physiol (Oxf)*. 2015;215:13-23
39. Weisiger RA, Ostrow JD, Koehler RK, Webster CC, Mukerjee P, Pascolo L, Tiribelli C. Affinity of human serum albumin for bilirubin varies with albumin concentration and buffer composition. *J Biol Chem* 2001;276:29953–29960.
40. Viaene L, Annaert P, de Loor H, Poesen R, Evenepoel P, Meijers B. Albumin is the main plasma binding protein for indoxyl sulfate and p-cresyl sulfate. *Biopharm Drug Dispos* 2013;34:165–175.
41. Berg -Lefranc D, Chaspoul F, Calaf R, Charpiot P, Brunet P, Gallice P. Binding of p-cresylsulfate and p-cresol to human serum albumin studied by microcalorimetry. *J Phys Chem B* 2010;114:1661–1665.
42. Takei T, Sakai S, Ono T, Ijima H, Kawakami K. Fabrication of endothelialized tube in collagen gel as starting point for self-developing capillary-like network to construct three-dimensional organs in vitro. *Biotechnol Bioeng* 2006;95:1–7.
43. Ballermann BJ, Ott MJ. Adhesion and differentiation of endothelial cells by exposure to chronic shear stress: a vascular graft model. *Blood Purif* 2007;13:125–134.
44. Ucuzian AA, Greisler HP. In vitro models of angiogenesis. *World J Surg* 2007;31:654–663.
45. Redmond EM, Cahill PA, Sitzmann JV. Perfused transcapillary smooth muscle and endothelial cell co-culture—a novel in vitro model. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1995;31:601–609.
46. Galbusera M, Zoja C, Donadelli R, Paris S, Morigi M, Benigni A, Figliuzzi M, Remuzzi G, Remuzzi A. Fluid shear stress modulates von Willebrand factor release from human vascular endothelium. *Blood* 1997;90:1558–1564.
47. Dekker RJ, van Soest S, Fontijn RD, Salamanca S, de Groot PG, VanBavel E, Pannekoek H, Horrevoets AJ. Prolonged fluid shear stress induces a distinct set of endothelial cell genes, most specifically lung Kruppel-like factor (KLF2). *Blood* 2002;100:1689–1698.
48. Malek A, Izumo S. Physiological fluid shear stress causes downregulation of endothelin-1 mRNA in bovine aortic endothelium. *Am J Physiol* 1992;263:C389–396.

## **Eidesstattliche Versicherung**

„Ich, Marieke RÜth, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Hydrophobe Metabolite der Urämie: Proteinaffinität, Quantifizierung und methodische Ansätze zur Untersuchung vaskulärer Effekte“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

\_\_\_\_\_  
Unterschrift

## **Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen**

Marieke RÜth hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

### **Publikation 1:**

**RÜth M**, Lemke HD, Preisinger C, Krieter D, Theelen W, Gajjala P, Devine E, Zidek W, Jankowski V, *Jankowski J.*, Guanidinylation of albumin decreased binding capacity of hydrophobic metabolites, Acta Physiol., 2015

Beitrag im Einzelnen: Planung der Experimente (50 %), Durchführung der Experimente (60 %), Auswertung der experimentellen Daten (50 %), Verfassen der Publikation (40 %)

**Publikation 2:**

Devine E, Krieter DH, **Rüth M**, *Jankowski J*, Lemke HD., Binding affinity and capacity for the uremic toxin indoxyl sulfate. *Toxins.*, 2014

Beitrag im Einzelnen: Durchführung der Experimente (25 %), Datenprozessierung (25 %), Überarbeitung des Manuskripts (35 %)

**Publikation 3:**

Janke D, *Jankowski J*, **Rüth M**, Buschmann I, Lemke HD, Jacobi D, Knaus P, Spindler E, Zidek W, Lehmann K, Jankowski V., The "artificial artery" as in vitro perfusion model., *PLoS One.* 2013

Beitrag im Einzelnen: Planung der Experimente (40 %), Durchführung der Experimente (50 %), Auswertung der experimentellen Daten (40 %), Verfassen der Publikation (20 %)

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

---

## Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

### 1. Guanidinylation of albumin decreased binding capacity of hydrophobic metabolites

Rüth M<sup>1)2)</sup>, Lemke HD<sup>1</sup>, Preisinger C<sup>3</sup>, Krieter D<sup>1</sup>, Theelen W<sup>4</sup>, Gajjala P<sup>4</sup>, Devine E<sup>1</sup>, Zidek W<sup>2</sup>, Jankowski V<sup>4</sup>, *Jankowski J.*, Acta Physiol (Oxf)., 2015

<sup>1</sup>eXcorLab, Industrie-Center-Obernburg, Obernburg, Germany

<sup>2</sup>Charité-Universitätsmedizin Berlin, Medizinische Klinik IV (CBF), Berlin, Germany

<sup>3</sup>Proteomics Facility, Interdisciplinary Center for Clinical Research (IZKF) Aachen, Medical Faculty, RWTH Aachen University, Aachen, Germany

<sup>4</sup>Institute of Molecular Cardiovascular Research, Medical Faculty, RWTH Aachen University, Aachen, Germany

**IF: 4,38** (im Jahr der Veröffentlichung 2014/15; Quelle: <http://www.journal-database.com/journal/acta-physiologica.html>)

### 2. Binding affinity and capacity for the uremic toxin indoxyl sulfate

Devine E<sup>1</sup>, Krieter DH<sup>2</sup>, Rüth M<sup>1</sup>, *Jankowski J.*, Lemke HD<sup>1</sup>.Toxins., 2014

<sup>1</sup>eXcorLab GmbH, Industrie Center Obernburg, Obernburg, Germany

<sup>2</sup>University Hospital Würzburg, Department of Medicine, Division of Nephrology, Würzburg, Germany

<sup>3</sup>Medizinische Klinik IV, Campus Benjamin Franklin, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Germany

**IF: 2,94** (im Jahr der Veröffentlichung 2014; Quelle: <http://www.journal-database.com/journal/acta-physiologica.html>)

### 3. The "artificial artery" as in vitro perfusion model

Janke D<sup>1</sup>, *Jankowski J.*, Rüth M<sup>2,3</sup>, Buschmann I<sup>4</sup>, Lemke HD<sup>3</sup>, Jacobi D<sup>1</sup>, Knaus P<sup>5</sup>, Spindler E<sup>3</sup>, Zidek W<sup>2</sup>, Lehmann K<sup>1</sup>, Jankowski V<sup>2</sup>. PLoS One. 2013

<sup>1</sup>Charité - Universitätsmedizin Berlin, Julius Wolff Institute and Berlin-Brandenburg Center for Regenerative Therapies (CVK), Berlin, Germany

<sup>2</sup>Charité - Universitätsmedizin Berlin, Medizinische Klinik IV (CBF), Berlin, Germany.

<sup>3</sup>eXcorlab GmbH, Industrie Center Obernburg, Obernburg, Germany

<sup>4</sup>Charité - Universitätsmedizin Berlin, Center for Cardiovascular Research (CCM), Berlin, Germany

<sup>5</sup>Institute for Chemistry and Biochemistry, FU Berlin, Berlin, Germany

**IF: 3,53** (im Jahr der Veröffentlichung 2013; Quelle: <http://www.journal-database.com/journal/plos-one.html>)

In der elektronischen Version wird aus urheberrechtlichen Gründen auf die Originalpublikationen verwiesen.

Publikation 1:

Rüth M, Lemke HD, Preisinger C, Krieter DH, Theelen W, Gajjala P, Devine E, Zidek W, Jankowski V, Jankowski J. *Guanidinylation of albumin decreased binding capacity of hydrophobic metabolites*. Acta Physiol (Oxf). 2015;215:13-23

<http://dx.doi.org/10.1111/apha.12518>

Publikation 2:

Devine E, Krieter DH, Rüth M, Jankowski J, Lemke HD. *Binding affinity and capacity for the uremic toxin indoxyl sulfate*. Toxins (Basel). 2014;6:416-429

<http://dx.doi.org/10.3390/toxins6020416>

Publikation 3

Janke D, Jankowski J, Rüth M, Buschmann I, Lemke HD, Jacobi D, Knaus P, Spindler E, Zidek W, Lehmann K, Jankowski V. *The „artificial artery“ as an in vitro perfusion model*. PLoS One. 2013;8; e57227

<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0057227>

**Lebenslauf:**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



## Publikationsliste:

### Originalarbeiten:

- im Review:

Krieter DH, Devine E, Körner T, **Rüth M**, Wanner C, Lemke HD, *Jankowski J*. Hemodiafiltration at increased plasma ionic strength for improved protein-bound toxin removal.

- **Rüth M**, Lemke HD, Preisinger C, Krieter DH, Theelen W, Gajjala P, Devine E, Zidek W, Jankowski V, *Jankowski J*  
Guanidylations of albumin decreased binding capacity of hydrophobic metabolites.  
*Acta Physiol (Oxf)*. 2015;215:13-23

- Devine E, Krieter DH, **Rüth M**, *Jankowski J*, Lemke HD.  
Binding affinity and capacity for the uremic toxin indoxyl sulfate.  
*Toxins (Basel)*. 2014;6:416-429

- Janke D, *Jankowski J*, **Rüth M**, Buschmann I, Lemke HD, Jacobi D, Knaus P, Spindler E, Zidek W, Lehmann K, Jankowski V.  
The „artificial artery“ as an in vitro perfusion model.  
*PLoS One*. 2013;8; e57227

### Patent:

- EP 14165189.3: angemeldet  
Titel: Diagnosis of Chronic Kidney Disease by Quantitative Analysis of Post-Translational Modifications of Plasma Proteins.  
Erfinder: **Rüth M**, Horst-Dieter Lemke, Vera Jankowski, *Joachim Jankowski*

### Abstracts:

- Krieter DH, Körner T, Devine E, **Rüth M**, *Jankowski J*, Wanner C, Lemke HD  
Modified ionic strength hemodiafiltration, a novel dialysis technique for increased protein bound toxin removal  
ASN Kidney Week 2014, Philadelphia, USA

- **Rüth M**, Janke D, Jankowski V, *Jankowski J*, Lemke HD  
The artificial artery as an in vitro co-culture model of human primary endothelial and smooth muscle cells  
BIOART Mid-Term Review meeting 2014, Cetraro, Italien
- Krieter, Körner T, Devine E, **Rüth M**, *Jankowski J*, Wanner C, Lemke HD  
Pilot trial on ionic strength hemodiafiltration, a novel technique for increased protein bound toxin removal  
ERA-EDTA Kongress 2014, Amsterdam, Niederlande
- *Jankowski J*, Janke D, **Rüth M**, Lemke HD, Jankowski V  
The artificial artery as an in vitro perfusion model  
ERA-EDTA Kongress 2014, Amsterdam, Niederlande
- Hasse K, Schneider C, Korbi H, Meixner C, Bonn F, **Rüth M**, K. Zeilinger, T. Bold, H. Lemke, T. Kunert  
Innovative Hohlfasermembranen für die optimierte Behandlung von chronischen Wunden und Verbrennungen  
BMBF Symposium Medi-Wing 2014, Nürnberg, Deutschland

**Poster:**

- Strusi V, **Rüth M**, Lemke HD, Krieter DH, Sauvant C  
A 3D in vitro functional model of hepatogenic differentiation  
Bioart Meeting 2015, Twente, Belgien
- Krieter DH, Körner T, Devine E, **Rüth M**, *Jankowski J*, Wanner C, Lemke HD  
Modified ionic strength hemodiafiltration, a novel dialysis technique for increased protein bound toxin removal  
ASN Kidney Week 2014, Philadelphia, USA
- Hasse K, Schneider C, Korbi H, Meixner C, Bonn F, **Rüth M**, Zeilinger K, Bold T, Lemke HD, Kunert-Latus T  
Funktionale Einwegsysteme für die Medizin und Bioproduktion – BioDisposables: Einsatz innovativer Hohlfasermembranen für das Wundmanagement der nächsten Generation (EInHorn)  
BMBF Symposium Medi-Wing 2014, Nürnberg, Deutschland

- Krieter DH, Körner T, Devine E, **Rüth M**, *Jankowski J*, Wanner C, Lemke HD  
Pilot Trial on Ionic Strength Hemodiafiltration, a Novel Dialysis Technique for Increased Protein Bound Toxin Removal  
ERA-EDTA Kongress 2014, Amsterdam, Niederlande
- **Rüth M**, Devine E, Lemke HD  
Nanosilberpartikel – Ex vivo Charakterisierung von Nanosilberpartikeln in Wechselwirkung mit biologischen Systemen  
NanoCare Clusterreffen 2013, Dechema, Frankfurt/Main, Deutschland
- Devine E, **Rüth M**, Lemke HD  
Nanosilberpartikel – Ex vivo Charakterisierung von Nanosilberpartikeln in Wechselwirkung mit biologischen Systemen,  
NanoCare Clusterreffen 2012, Dechema, Frankfurt/Main, Deutschland
- Devine E, **Rüth M**, Lemke HD  
Nanosilberpartikel – Ex vivo Charakterisierung von Nanosilberpartikeln in Wechselwirkung mit biologischen Systemen  
NanoCare Clusterreffen 2011, Dechema, Frankfurt/Main, Deutschland
- Janke D, *Jankowski J*, Lemke HD, Jacobi D, Pfitzner J, **Rüth M**, Jankowski V, Spindler E, Buschmann I, Lehmann K.  
Development of a perfusion bioreactor: “Artificial Artery”.  
Evaluierung des “Center for Cardiovascular Research”. Charité- Campus Mitte 2010, Berlin, Deutschland

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt:

- Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Joachim Jankowski, bisher an der Charité Universitätsmedizin Berlin, nun am Universitätsklinikum RWTH Aachen tätig, für seine Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung, seine Hilfestellung, seine Ratschläge und Korrektur der vorliegenden Dissertationsschrift.
- Herrn Dr. Horst-Dieter Lemke, der mir nicht nur die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit gegeben und mich vielseitig bei der Bearbeitung dieses Forschungsthemas unterstützt hat, sondern mich auch im Hinblick auf meine fachliche, berufliche und persönliche Weiterentwicklung stets gefördert hat.
- Frau Dr. Vera Jankowski für die sehr gute Zusammenarbeit, nicht nur in diesem Projekt, für ihre Motivierung und ihren Zuspruch.
- Herrn Dr. Detlef Krieter, Herrn Dr. Christoph Sauvant und Herrn Dr. Ernst Spindler für die jederzeit offenen Türen, Hilfestellungen und für die Korrektur der Arbeit.
- allen Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeitern der eXcorLab GmbH für die sehr gute Arbeitsatmosphäre und stete Hilfsbereitschaft, insbesondere Frau Karin Merget für ihre Anteilnahme, Motivation und Aufmunterungen.
- Steffen, für seine Unterstützung, seine Geduld und sein Verständnis bei der Anfertigung dieser Arbeit.
- meiner Familie für die uneingeschränkte und vielseitige Unterstützung.