

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

DISSERTATION

**Charakterisierung der antioxidativen Enzyme Rhodanese
und Superoxiddismutase 1 bei chronischer
Niereninsuffizienz**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Katharina Krueger

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. M. Tepel
2. Prof. Dr. med. M. van der Giet
3. Priv.-Doz. Dr. med. B. Henning

Datum der Promotion: 18.11.2011

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungen	1
2. Abstract	2
3. Einleitung	4
4. Zielstellung	5
5. Methoden	6
5.1. Patienten und Untersuchungsmaterial	6
5.2. 2D-Gelelektrophorese und MS/MS-Massenspektrometrie	6
5.3. Proteinexpression - SDS-PAGE, Western Blot und In-Cell Western Assay	6
5.4. Genexpression - Real-time PCR	7
5.5. Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies	7
5.6. Statistik	8
6. Ergebnisse	8
6.1. Charakterisierung der Rhodanese in Monozyten	8
6.1.1. Quantitative Bestimmung von Rhodanese auf Protein- und mRNA-Ebene	8
6.1.2. Rhodaneseexpression und mitochondriale ROS-Bildung	9
6.1.3. Rhodaneseexpression und Mortalität bei Dialysepatienten	9
6.2. Charakterisierung der SOD1 in Monozyten	10
6.2.1. Voruntersuchungen	10
6.2.2. Quantitative Bestimmung von SOD1 auf Protein- und mRNA-Ebene	10
6.2.3. Wirkung von Tempol (SOD-Mimetikum) auf die Bildung von ROS	11
7. Diskussion	12
7.1. Rhodaneseexpression bei chronischer Niereninsuffizienz	12
7.2. SOD1-Expression bei chronischer Niereninsuffizienz	14
8. Zusammenfassung	17
9. Literaturverzeichnis	18
10. Anteilserklärung	22
11. Publikationen, ausgewählt	24
12. Lebenslauf	50
13. Publikationsliste, komplett	53
14. Selbständigkeitserklärung	55
15. Danksagung	56

1. Abkürzungen

CKD	<i>engl.</i> chronic kidney disease, chronische Niereninsuffizienz
Cu	Kupfer
DNA	<i>engl.</i> desoxyribonuclear acid, Desoxyribonukleinsäure
FeS-Zentren	Eisen-Schwefel-Zentren
HD	<i>engl.</i> hemodialysis, dialysepflichtige Patienten
RT-PCR	<i>engl.</i> Real-Time polymerase chain reaction, Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
mRNA	<i>engl.</i> messenger ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
ROS	<i>engl.</i> reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies
SDS	<i>engl.</i> sodiumdodecylsulfate, Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	<i>engl.</i> SDS-Polyacrylamide gelelectrophoresis, SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SOD1	Superoxiddismutase 1
2DE	2-dimensionale Elektrophorese
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Hsp	Hitzeschockproteine
pI	isoelektrischer Punkt
Zn	Zink

Charakterisierung der antioxidativen Enzyme Rhodanese und Superoxiddismutase 1 bei chronischer Niereninsuffizienz

Katharina Krueger

2. Abstract

Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (CKD), einschließlich dialysepflichtiger Patienten (HD), weisen im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen ein deutlich höheres Vorkommen kardiovaskulärer Erkrankungen auf. Diese stellen die Haupttodesursache bei CKD- und HD-Patienten dar. Zugleich besteht ein Zusammenhang zwischen der chronischen Niereninsuffizienz und erhöhtem oxidativen Stress.

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurden in Monozyten die antioxidativ wirkenden Proteine Rhodanese und Superoxiddismutase 1 (SOD1) in Monozyten von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz untersucht. Die mRNA-Expression wurde mit quantitativer Real-Time PCR, die Proteinexpression wurde mit Immunoblotting und quantitativem In-Cell Western Assay bestimmt. Die Produktion reaktiver Sauerstoffradikale wurden mittels Fluoreszenz-Spektrophotometrie untersucht.

Die Expressionsstudie zur Rhodanese zeigte bei dialysepflichtigen Patienten eine signifikant geringere mRNA- und Proteinexpression im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen. Zudem wiesen dialysepflichtige Patienten eine deutlich höhere Produktion an reaktiven Sauerstoffspezies auf. Es konnte gezeigt werden, dass eine verminderte Rhodanese-Proteinexpression mit erhöhter mitochondrialer Superoxidproduktion korreliert. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass HD-Patienten mit geringer Rhodaneseexpression eine höhere Mortalitätsrate haben als Patienten mit hoher Expression an Rhodanese.

Für die SOD1-Untersuchung wurden zunächst von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und gesunden Kontrollpersonen zweidimensionale SDS-Gele analysiert. Diese zeigten unterschiedliche Proteinmuster bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und gesunden Kontrollpersonen. Mittels MS/MS-Massenspektrometrie konnte SOD1 identifiziert werden. Durch Immunfärbung der SOD1 konnten Unterschiede in der Expression zwischen den Gruppen quantifiziert werden. Die Proteinexpression war in HD-Patienten im Vergleich zu Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und gesunden Kontrollpersonen signifikant verringert. Dagegen war die SOD1-Genexpression in HD-Patienten signifikant erhöht, verglichen mit Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und gesunden Kontrollpersonen. Des Weiteren ergab

die Immunfärbung der zweidimensionalen SDS-Gele für die SOD1 verschiedene Spots, was auf Vorliegen unterschiedlicher SOD1 Proteinspezies schließen lässt.

Im Rahmen einer weiteren Untersuchung konnte die Bedeutung der SOD1 innerhalb der antioxidativen Abwehr dargelegt werden. Setzt man Monozyten einer erhöhten Glucosekonzentration aus, steigt die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies signifikant an. Setzt man das SOD1-Mimetikum Tempol zu, wird diese Zunahme blockiert. Diese Untersuchung ergab Hinweise auf die Bedeutung der SOD1 bei Patienten mit Diabetes mellitus und diabetischer Nephropathie.

3. Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die Hauptursache für Morbidität und Mortalität bei chronischer Niereninsuffizienz (*engl.* chronic kidney disease, CKD) [1,2]. Etwa 50% der Todesfälle bei CKD-Patienten, einschließlich dialysepflichtiger Patienten (*engl.* hemodialysis, HD) sind auf kardiovaskuläre Ereignisse zurückzuführen [3,4]. Neben den klassischen Risikofaktoren wie Diabetes mellitus und Bluthochdruck [5,6] werden Entzündungsreaktionen und oxidativer Stress zunehmend mitverantwortlich gemacht [4]. Der Begriff „Oxidativer Stress“ beschreibt das Ungleichgewicht zwischen reaktiven Sauerstoffspezies (*engl.* reactive oxygen species, ROS) und antioxidativ wirkenden Substanzen, zugunsten der Oxidantien, infolge zunehmender ROS oder fehlender Antioxidantien. ROS können zu Schäden und Modifikationen an DNA, Proteinen und Membranlipiden führen [7,8].

ROS werden vornehmlich innerhalb des mitochondrialen Elektronentransports über die Multienzymkomplexe I-IV gebildet. Etwa 1-2 % des Sauerstoffs werden nicht vollständig reduziert und in freie Radikale umgewandelt [9]. Das antioxidative Protein Rhodanese, auch Thiosulfat-Sulfurtransferase genannt, ist ein mitochondriales Enzym, das den Transfer eines Schwefelatoms vom Donor auf einen thiophilen Akzeptor katalysiert [10]. Rhodanese ist teilweise in der innermitochondrialen Membran verankert und ist Bestandteil eines Multiproteinkomplexes, der Eisen-Schwefel-Zentren (FeS-Zentren) ausbilden kann [11]. Dieser Rhodanese-Multiproteinkomplex könnte die oxidative Phosphorylierung regulieren. Rhodanese enthält vier Sulfhydrylgruppen, die den Transfer von Schwefelatomen auf die FeS-enthaltenen Multienzymkomplexe I-III der Elektronentransportkette bewirken. Eine reduzierte Proteinexpression könnte zu einer verminderten Regulation dieser FeS-Proteine führen und die Zunahme an ROS zur Folge haben [12-14]. Rhodanese kann zudem als Thioredoxinoxidase wirken und auf diesem Wege an der Beseitigung von ROS beteiligt sein [10]. Außerdem ist Rhodanese für die Entgiftung von Cyaniden verantwortlich [15].

Neben dem mitochondrialen Ursprung, können ROS durch den respiratorischen Burst seitens Makrophagen und Monozyten entstehen [5]. Ihre physiologische Funktion ist die Abwehr von Pathogenen mittels Ausschüttung reaktiver Sauerstoffradikale wie den Superoxiden (O_2^-), Hydroxylradikalen (OH^\cdot) sowie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Stickstoffmonoxid (NO) [16]. Unter physiologischen Konditionen werden ROS von körpereigenen antioxidativen Enzymen beseitigt. Dazu zählen unter anderem Superoxiddismutase (Dismutation von O_2^- zu H_2O_2), Katalase und Glutathionperoxidase

(Reduktion H_2O_2 zu H_2O). Die zytosolische Superoxiddismutase (SOD1) trägt in ihrem katalytischen Zentrum die Redoxmetalle Cu und Zn, welche die Dismutation vom Superoxidanion zu H_2O_2 ermöglichen. Die Familie der SOD ist in erster Linie für die Abwehr der ROS verantwortlich, denn die hoch reaktiven Superoxide stellen die Primärstufe für weitere Radikale und oxidativ wirkende Komponenten dar [17,18].

Monozyten sind für die Untersuchung der Zusammenhänge zwischen oxidativem Stress und Entzündungsvorgängen als Risikofaktor der kardiovaskulären Morbidität bei CKD-Patienten sehr interessant. Sie setzen selbst innerhalb der Immunabwehr ROS frei. Monozyten sind auf diese Weise an der Entstehung arteriosklerotischer Plaques beteiligt und führen zu einem Anstieg an Arterioskleroseerkrankungen bei chronischer Niereninsuffizienz [19-21].

4. Zielstellung

Das gemeinsame Ziel der Untersuchungen von Rhodanese und Superoxiddismutase 1 bei chronischer Niereninsuffizienz bestand darin, die Gen- und Proteinexpression bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz, einschließlich hemodialysepflichtiger Patienten zu charakterisieren und mit gesunden Kontrollpersonen zu vergleichen.

Des Weiteren sollte gezeigt werden, inwieweit Veränderungen der Rhodanese- bzw. SOD1-Expression mit der mitochondrialen bzw. intrazellulären ROS-Produktion in Zusammenhang stehen und ob diese Veränderungen zu einer Erhöhung der Mortalitätsrate beitragen.

5. Methoden

5.1. Patienten und Untersuchungsmaterial

Für die Charakterisierung der Gen- und Proteinexpression beider Proteine wurden Hämodialysepatienten (HD), Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (CKD) und gesunde Kontrollpersonen untersucht und gegenübergestellt.

Aus Blutproben der Probanden wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation und unter Verwendung superparamagnetischer Partikel Monozyten isoliert.

Die Untersuchungsreihen sind durch die zuständige Ethikkommission der Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin geprüft und genehmigt worden. Eine schriftliche Zustimmung aller Patienten lag vor.

5.2. 2D-Gelelektrophorese und MS/MS-Massenspektrometrie

Die zu untersuchenden Zellsuspensionen wurden pelletiert, in Lysepuffer homogenisiert und anschließend abzentrifugiert. Der Proteingehalt im Überstand wurde nach der Bradfordmethode bestimmt. In der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2DE) wurden zunächst während der isoelektrischen Fokussierung (erste Dimension) die Gesamtproteine der Zelllysate gemäß ihrer isoelektrischen Punkte im elektrischen Feld aufgetrennt. In der sich anschließenden SDS-PAGE (zweite Dimension) erfolgte dann die Auftrennung der Proteine ihrer Größe nach. Das Anfärben der Gele mit Silber zeigte die für die 2DE typischen Proteinmuster. Ausgewählte Proteinspots konnten ausgeschnitten und tryptisch gespalten werden. Die so erhaltenen Peptidfragmente wurden mit der MS/MS-Massenspektrometrie untersucht und unter anderem SOD1 mittels Mascot-Datenbanksuche identifiziert. In der Publikation 2 ist die zweidimensionale Gelelektrophorese, einschließlich erster und zweiter Dimension und die MS/MS-Massenspektrometrie detailliert beschrieben.

5.3. Proteinexpression - SDS-PAGE, Western Blot und In-Cell Western Assay

Die Spezifität der verwendeten primären Antikörper wurde zunächst in einer SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot nachgewiesen (siehe dazu Publikationen 1 und 2). Für die Quantifizierung der Proteinexpressionen von Rhodanese und SOD1 in den Patientenproben wurde der In-Cell Western Assay angewendet. Er beruht auf demselben Nachweisprinzip wie der konventionelle Western Blot, jedoch direkt in der Zelle.

Nach Permeabilisierung der Zellen und Absättigen unspezifischer Bindungsstellen wurden die Proben mit den primären und den fluoreszenzfarbstoffgekoppelten sekundären Antikörpern inkubiert. Um die Patientenproben miteinander vergleichen zu können, wurden parallel neben Rhodanese oder SOD1 auch die Referenzproteine GAPDH oder β -Actin untersucht. Die jeweils verwendeten primären und sekundären Antikörper sind in den Publikationen 1 und 2 aufgelistet. Ungebundene Antikörper wurden über mehrere Waschschriffe entfernt. Anschließend konnten zu untersuchendes Protein und Referenzprotein parallel bei Emissionswellenlängen von 700 nm und 800 nm und Excitationswellenlängen von 680 nm und 780 nm mit dem Odyssey infrared imaging System (LI-COR Biosciences, Lincoln, USA) vermessen werden. Die Proteinexpression wurde aus den gemessenen Fluoreszenzintensitäten als Quotient aus zu untersuchendem Protein und Referenzprotein ermittelt.

5.4. Genexpression - Real-Time PCR

Mit Hilfe kommerzieller Kits wurde aus den Zellsuspensionen RNA isoliert, diese anschließend transkribiert und in der Real-Time PCR amplifiziert. Die verwendeten Primer und PCR-Bedingungen sind in den Publikationen 1 und 2 aufgelistet.

Die quantitative Real-Time PCR wurde mit dem LightCycler 2.0 (Roche® Diagnostics, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Die Genexpression berechnete sich aus dem Quotienten von untersuchtem Protein und Referenzprotein unter Berücksichtigung der Effizienzkorrektur und Normierung auf einen Kalibrator (nach Roche®).

5.5. Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies

Der Nachweis intrazellulärer ROS erfolgte mit 2', 7'-Dichlorodihydrofluoresceindiazetat (H₂DCF-DA). Die Messung der mitochondrialen ROS wurde mittels MitoSOX™ Red mitochondrial superoxide indicator (Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland) bestimmt. Die Oxidation des jeweiligen Farbstoffes durch ROS bzw. Superoxide führt zu einem messbaren Fluoreszenzprodukt, dessen Fluoreszenz proportional der Menge an ROS bzw. Superoxiden ist. Details können in den Publikationen 1 und 3 nachgelesen werden.

5.6. Statistik

Bei der deskriptiven Statistik sind die Daten als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Der Datenvergleich zwischen zwei Gruppen wurde mit dem Mann-Whitney-Test durchgeführt. Der Vergleich der Daten bei mehr als zwei Gruppen erfolgte mittels Varianzanalyse (Analysis of Variance, ANOVA) mit Bonferronis multiple comparison post-hoc Test. Alle durchgeführten Tests waren zweiseitig. Als statistisch signifikant wurde im zweiseitigen Test eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ definiert. Die Überlebenszeitanalysen wurden nach der Kaplan-Meier-Methode erstellt und statistisch mit dem logrank (Mantel-Cox)-Test ausgewertet. Um Zusammenhänge zwischen verschiedenen Daten zu beschreiben, wurde die lineare Regressionsanalyse verwendet. Sowohl Auswertung als auch die graphische Darstellung der Daten wurde mit Hilfe des statistischen Computerprogramms GraphPad PRISM 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) durchgeführt.

6. Ergebnisse

6.1. Charakterisierung der Rhodanese in Monozyten

6.1.1. Quantitative Bestimmung von Rhodanese auf Protein- und mRNA-Ebene

Für die Rhodanese-Proteinexpressionsstudie wurde eine Gruppe dialysepflichtiger Patienten mit einer aus gesunden Kontrollpersonen bestehenden Gruppe verglichen.

Die Proteinexpression der Rhodanese, normalisiert auf die Expression des Referenzproteins GAPDH, ist in Dialysepatienten signifikant geringer als in gesunden Kontrollpersonen ($0,39 \pm 0,01$; $n=37$ vs. $0,43 \pm 0,02$; $n=21$; $p < 0,05$ für Mann-Whitney-Test, Abb.1A).

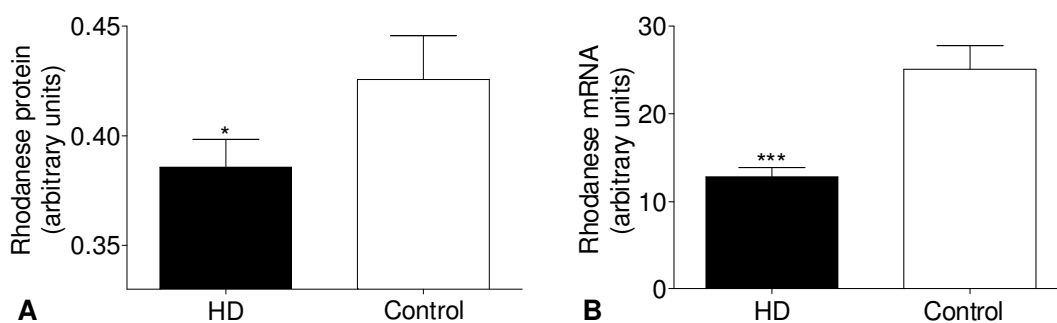


Abb.1A. Rhodanese-Proteinexpression in Monozyten, normalisiert auf die Proteinexpression von GAPDH. Dialysepflichtige Patienten (HD, schwarze Säule, $n=37$) und gesunde Kontrollpersonen (Control, weiße Säule, $n=21$). * $p < 0,05$ für Mann-Whitney-Test. **1B.** Darstellung Rhodanese-Genexpression in Monozyten, normalisiert auf die Genexpression von GAPDH. Dialysepflichtige Patienten (HD, schwarze Säule, $n=62$) und gesunde Kontrollpersonen (Control, weiße Säule, $n=40$). *** $p < 0,0001$ für Mann-Whitney-Test.

Für die Genexpressionsanalyse wurde die mRNA-Expression von Rhodanese, unter Berücksichtigung der Effizienzkorrektur und Normierung auf einen Kalibrator auf die Expression des Referenzgens GAPDH normalisiert. Dialysepflichtige Patienten zeigten eine signifikant niedrigere mRNA-Expression der Rhodanese als gesunde Kontrollpersonen ($12,77 \pm 1,06$; $n=62$ vs. $25,11 \pm 2,69$; $n=40$; $p < 0,001$ für Mann-Whitney-Test, Abb.1B).

6.1.2. Rhodaneseexpression und mitochondriale ROS-Bildung

Aufgrund der Annahme, dass eine verminderte Rhodaneseexpression mit erhöhtem oxidativen Stress bei dialysepflichtigen Patienten assoziiert, wurde die Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen in den Mitochondrien mittels Fluoreszenz-Spektrophotometrie bestimmt. Parallel wurde die Rhodaneseexpression untersucht. Es konnte eine signifikante Korrelation zwischen der mitochondrialen Superoxidproduktion und der Rhodaneseexpression bei HD-Patienten gezeigt werden ($n=20$, $r^2=0,36$, $p < 0,01$, Abb.2A).

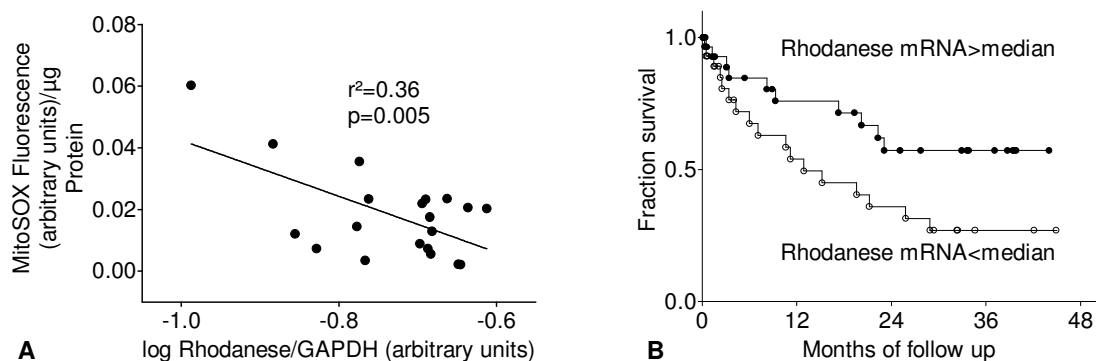


Abb.2A. Mitochondriale Superoxidproduktion (normalisiert auf den Proteingehalt der Probe) und Rhodaneseexpression in Monozyten (normalisiert auf die GAPDH-Proteinexpression). $n=20$, $r^2=0,36$, Linearregression. **2B.** Dialysepatienten wurden gemäß ihrer Rhodanese-mRNA-Expression in zwei Teilgruppen, Rhodaneseexpression größer als der Median der Gesamtgruppe (gefüllte Kreise) und Rhodaneseexpression kleiner als der Median (offene Kreise) aufgeteilt. * $p < 0,05$ für logrank (Mantel-Cox)-Test.

6.1.3. Rhodaneseexpression und Mortalität bei Dialysepatienten

Für die Überlebenszeitanalysen wurden die dialysepflichtigen Patienten entsprechend ihrer Rhodaneseexpression in die beiden Gruppen „<Median“ und „>Median“ eingeteilt. Der Vergleich beider Überlebenszeitkurven ergab eine Hazard-Ratio von 2,22 (95 % Konfidenzintervall: 1,04-10,45), die das Risikoverhältnis zwischen den beiden Patientengruppen angibt. Das Mortalitätsrisiko in Dialysepatienten mit geringer Rhodaneseexpression ist um den Faktor 2,22 erhöht, verglichen mit HD-Patienten mit hohem Expressionsniveau. Es konnte gezeigt werden, dass die Überlebenszeit-

wahrscheinlichkeit in der Patientengruppe mit geringer Expression signifikant verringert ist ($p < 0,05$ für Mantel-Cox-Test, Abb.2B).

6.2. Charakterisierung der SOD1 in Monozyten

6.2.1. Voruntersuchungen

Unter Verwendung von zweidimensionaler Gelelektrophorese (2DE) und Silberfärbung wurden im Vorfeld Proteinmuster von HD-Patienten, Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und gesunden Kontrollpersonen erstellt, die sich in den Farbintensitäten einzelner Proteine unterschieden. Unter anderem konnte eines mit Hilfe der MS/MS-Massenspektrometrie als SOD1 identifiziert werden. Ferner konnte SOD1 im Immunoblot innerhalb dieses Proteinmusters nachgewiesen werden. Nachfolgend sind für Probanden aller drei Gruppen 2DE-Gele geblottet und SOD1 im Immunoblot bestimmt worden. Die Immunfärbung der SOD1 zeigte für alle Proben ein ähnliches Muster von 6 Spots, deren Intensitäten ausgemessen wurden (Abb.3A). Da Spot 2 jeweils die höchste Immunfluoreszenz aufwies, wurde dieser zwischen den drei Gruppen verglichen (Abb.3B). Die Kontrollgruppe (2373 ± 731 , $n=3$) zeigte eine signifikant höhere SOD1-Proteinexpression als Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (1307 ± 177 , $n=6$) und dialysepflichtige Patienten (645 ± 231 , $n=3$, $p < 0.0001$ für ANOVA).

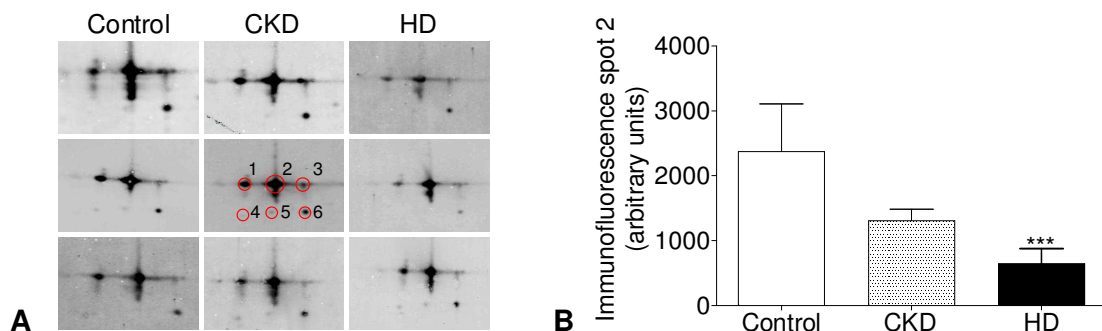


Abb.3A. SOD1-Immunfärbung der Membranen der geblotteten 2DE-Gele von dialysepflichtigen Patienten (HD), Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (CKD) und gesunden Kontrollpersonen (Control). Die Immunfärbung der SOD1 zeigt in allen Ansätzen ein Proteinmuster von 6 Spots (rot eingekreist) **3B.** Immunofluoreszenz des Spot 2 in arbitrary units für HD-Patienten (schwarze Säule, $n=3$), CKD-Patienten (graue Säule, $n=6$) und gesunde Kontrollpersonen (Control, weiße Säule, $n=3$). *** $p < 0,0001$ für ANOVA.

6.2.2. Quantitative Bestimmung von SOD1 auf Protein- und mRNA-Ebene

Zur Validierung der in den Voruntersuchungen erhaltenen Ergebnisse wurden weitere HD-Patienten, Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und gesunde Kontrollpersonen im In-Cell Western Assay hinsichtlich ihrer SOD1-Proteinexpression

quantitativ untersucht. Dazu wurde die Proteinexpression von SOD1 auf die Expression des Referenzproteins β -Actin normalisiert. SOD1 ist von dialysepflichtigen Patienten ($27,2 \pm 2,8$; $n=56$) signifikant weniger exprimiert worden, verglichen mit Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ($34,3 \pm 2,8$; $n=148$) und gesunden Kontrollpersonen ($48,0 \pm 8,6$; $n=20$; $p < 0,05$ für ANOVA; Abb.4A).

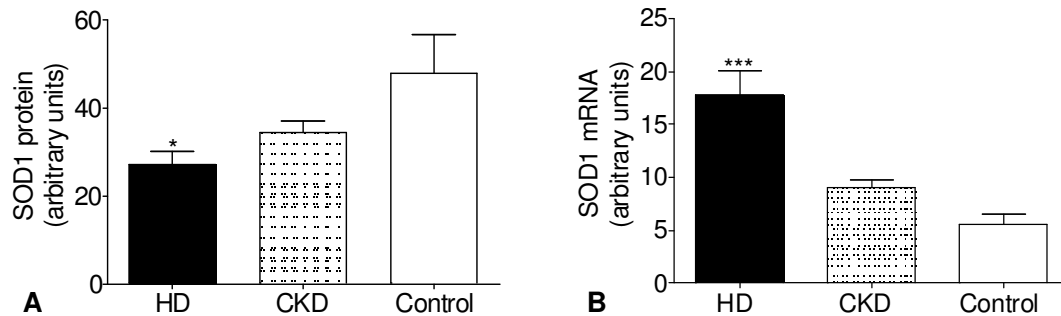


Abb.4A. SOD1-Proteinexpression in Monozyten, normalisiert auf die Proteinexpression von β -Actin. Dialysepflichtige Patienten (HD, schwarze Säule, $n=56$), Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (CKD, graue Säule, $n=148$) und gesunde Kontrollpersonen (Control, weiße Säule, $n=20$). * $p < 0,05$ für ANOVA. **4B.** SOD1-Genexpression in Monozyten, normalisiert auf die Genexpression von β -Actin. Dialysepflichtige Patienten (HD, schwarze Säule, $n=60$), Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (CKD, graue Säule, $n=133$) und gesunde Kontrollpersonen (Control, weiße Säule, $n=19$). *** $p < 0,0001$ für ANOVA.

Die Untersuchungen zur SOD1-Genexpression wurden mittels quantitativer Real-Time PCR durchgeführt. Die SOD1-mRNA-Expression wurde auf die Genexpression der Referenz β -Actin, unter Berücksichtigung der Effizienzkorrektur und Normierung auf einen Kalibrator normalisiert.

Die SOD1-Genexpression in Monozyten ist in dialysepflichtigen Patienten ($17,8 \pm 2,3$; $n=60$) signifikant höher als bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ($9,0 \pm 0,7$; $n=133$) und Kontrollpersonen ($5,5 \pm 1,0$; $n=19$; $p < 0.0001$ für ANOVA; Abb.4B).

6.2.3. Wirkung von Tempol (SOD-Mimetikum) auf die Bildung von ROS

Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz weisen erhöhten oxidativen Stress infolge einer übermäßigen Produktion von ROS oder einer verminderten antioxidativen Abwehr auf. Die Bedeutsamkeit der SOD innerhalb der Antioxidantien liegt in der Beseitigung der primären ROS, den Superoxidanionen.

Im Rahmen einer Studie zu oxidativem Stress bei Hyperglykämie, einer typischen Komorbidität bei niereninsuffizienten Patienten, wurde die Bedeutung der SOD aufgezeigt. Monozyten wurden einer erhöhten Glucosekonzentration ausgesetzt (30 mM Glucose, HG) und als Kontrollversuch unter physiologischen Bedingungen (5,6 mM

Glucose, Control) inkubiert. Die Produktion von ROS in den Zellen wurde jeweils zum Zeitpunkt Null und nach 90 Minuten Inkubation mittels Fluoreszenz-Spektrophotometrie gemessen (Abb.5). Während unter physiologischen Konditionen nach 90 minütiger Inkubation keine Zunahme an ROS im Vergleich zur Nullpunktmessung zu verzeichnen war, stieg die Bildung von ROS bei erhöhter Glucosekonzentration im Vergleich zur Kontrolle fast um das Doppelte an (von $1,01 \pm 0,01$ auf $1,84 \pm 0,17$, $p < 0,01$). Werden dagegen Monozyten mit $100 \mu\text{M}$ Tempol vorinkubiert, was einer Erhöhung an SOD-Aktivität entspricht, und sie anschließend einer erhöhten Glucosekonzentration ausgesetzt, gibt es nach 90 Minuten keinen signifikanten Anstieg an ROS im Vergleich zur Kontrolle ($0,78 \pm 0,07$ vs. $1,01 \pm 0,01$, n.s.).

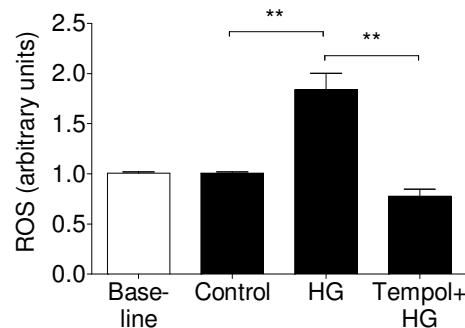


Abb.5. Intrazelluläre ROS-Produktion in Monozyten. Messung zum Zeitpunkt Null (weiße Säule) und die Messung nach 90 min Inkubation (schwarze Säulen) mit 5,6 mM Glucose (physiologisch, Control), mit 30 mM Glucose (hyperglykämisch, HG) und Prä-Inkubation mit $100 \mu\text{M}$ Tempol (TMP+HG). ** $p < 0,01$ für Mann-Whitney-Test.

7. Diskussion

7.1. Rhodaneseexpression bei chronischer Niereninsuffizienz

Die in den Mitochondrien lokalisierte Rhodanese, auch als Thiosulfat-Sulfurtransferase bezeichnet, katalysiert den Transfer von Schwefelatomen. Eine ihrer Funktionen liegt daher in der Entgiftung von Cyaniden, indem sie ein Schwefelatom vom Thiosulfat auf Cyanid transferiert, wobei das weniger toxische Thiocyanat entsteht [15]. Rhodanese ist beteiligt an der Bildung von Eisen-Schwefel-Proteinen und gilt als Schwefeldonator für Glutathion und Thioredoxin [10,22].

In der hier vorliegenden Arbeit wurden Dialysepatienten hinsichtlich ihrer Rhodaneseexpression untersucht. Sowohl die mRNA- als auch die Proteinexpression von Rhodanese sind in diesen Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen stark vermindert. Im Rahmen einer Muskelatrophie-Studie an Mäusen untersuchten Lecker und Kollegen unter anderem sieben mitochondriale, zum Elektronentransport gehörende Proteine bei Urämie. In allen Fällen konnte eine Down-Regulation der mRNA-Expression

nachgewiesen werden [23]. Auch Rhodanese ist Bestandteil der mitochondrialen Elektronentransportkette und wurde unter urämischen Bedingungen (Niereninsuffizienz) untersucht. Auch hier ist eine Abnahme der mRNA-Expression gezeigt worden.

Über Expressionsstudien zur Rhodanese in humanen Zellen sowie deren Regulationsmechanismen liegen keine vergleichbaren Forschungsergebnisse vor.

Studien an Bakterienstämmen haben gezeigt, dass die Expression des Rhodanese-Homologen einem Regulationsmechanismus zur Peroxidabwehr unterliegt, der durch oxidativen Stress induziert wird [24]. Untersuchungen an Hefen und humanen Zellen weisen darauf hin, dass ROS die Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren in den Mitochondrien und somit auch die Regulation mitochondrialer Proteine beeinflusst [25,26].

Eine Verminderung der Rhodaneseexpression auf Proteinebene ist einerseits die Folge der in der vorliegenden Arbeit festgestellten verringerten Genexpression. Zusätzlich können urämiebedingte Risikofaktoren dazu beitragen. Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz zeigen nachweislich erhöhten oxidativen Stress. Die Oxidation von Rhodanese durch ROS hat strukturelle und funktionelle Auswirkungen, die letztlich zu Konformationsänderungen und Proteininaktivierung führen. In vitro können diese Effekte durch die Zugabe von Kaliumcyanid (KCN) potenziert werden, indem intramolekulare Disulfidbrücken ausgebildet werden, die zu strukturellen Änderungen im Protein führen können [27,28]. In dialysepflichtigen Patienten ist die Cyanidkonzentration signifikant erhöht [29], die folglich zu vermehrter Proteindegradation führen kann. Des Weiteren konnte in vitro gezeigt werden, dass eine Reaktivierung der Rhodanese über Chaperone (Hitzeschockproteine, Hsp) erreicht wird. Diese verhindern eine irreversible Inaktivierung und Aggregation des Enzyms und ermöglichen die korrekte Faltung des Proteins in seine native Struktur [30]. Verschiedene Forschungsgruppen stellten unter anderem eine verminderte Hsp72-Stressantwort in Monozyten bei chronischer Niereninsuffizienz fest [31-33]. Ein Defizit dieser Proteine könnte zu einer unzureichenden Faltung der Rhodanese in seine aktive Form und folglich vermehrt zu Proteinaggregationen führen. Beide Gegebenheiten könnten zur verminderten Proteinexpression beitragen.

Desweiteren ist Rhodanese beteiligt an der Bereitstellung der FeS-Zentren für Enzyme des mitochondrialen Elektronentransports und könnte dadurch auf dessen Regulation Einfluss nehmen. Eine Reduktion der Rhodaneseexpression kann eine verminderte Verfügbarkeit der FeS-Zentren und infolgedessen eine verringerte Ausbildung der FeS-

Proteine (Komplex I und III) in der Elektronentransportkette bewirken. Die Folge ist eine Anhäufung an zu transportierenden Elektronen, welche die Bildung von Superoxiden verstärkt. Zudem kann Rhodanese als Thioredoxin-Oxidase wirken, indem sie die direkte Oxidation von reduziertem Thioredoxin durch ROS katalysiert [10]. Auch hier hätte eine verringerte Proteinexpression eine Anreicherung von ROS zur Folge.

Die vorliegende Untersuchung der mitochondrialen ROS und zugleich der Proteinexpression bei Dialysepatienten hat gezeigt, dass eine verminderte Rhodaneseexpression mit einem Anstieg mitochondrialer ROS korreliert.

Die Überlebenszeitanalyse bei dialysepflichtigen Patienten ergab, dass Patienten mit geringer Rhodaneseexpression eine verkürzte Überlebenszeit aufwiesen. Versuche an bakteriellen Rhodanese-Null-Mutanten zeigen deutlich, wie essentiell Rhodanese für den Schutz vor oxidativen Ereignissen ist [24].

Eine massive Produktion an mitochondrialer ROS, zum Beispiel infolge verminderter Rhodaneseexpression führt zu Schäden an Proteinen und Nukleinsäuren, die zum einen zu Defekten der oxidativen Phosphorylierung und folglich zu Zellverlust und Zelltod führen können [34] und zum anderen mit Alterungsprozessen und kardiovaskulären Erkrankungen in Verbindung gebracht werden.

7.2. SOD1-Expression bei chronischer Niereninsuffizienz

Die Familie der SOD katalysiert die Umwandlung der Superoxidanionen, aus denen weitere freie Radikale entstehen können. Daher wird der SOD in der antioxidativen Abwehr freier Sauerstoffradikale eine große Bedeutung beigemessen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte dies veranschaulicht werden. Setzt man Monozyten einer erhöhten Glucosekonzentration aus, steigt der oxidative Stress infolge zunehmender ROS in den Zellen an. Eine Vorinkubation der Zellen mit dem SOD-Mimetikum Tempol verhindert diese ROS-Zunahme, indem es wie die SOD selbst Superoxidanionen abfängt. Diabetes mellitus-Patienten zeigen nachweislich erhöhten oxidativen Stress auf. Zugleich wird Diabetes mellitus als bedeutender klassischer Risikofaktor für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen bei chronischer Niereninsuffizienz angesehen [35].

Die hier vorgelegte Untersuchungsreihe zur SOD1 zeigte eine deutliche Abnahme der Proteinexpression in niereninsuffizienten und dialysepflichtigen Patienten, im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen. Erste Analysen von SOD1-Proteinspots auf 2DE-Gelen zeigten sowohl für dialysepflichtige als auch für chronisch niereninsuffiziente Patienten

ohne Nierenersatztherapie eine Reduktion des Proteins. Die Tatsache, dass die Proteinexpression in beiden Gruppen vermindert ist, lässt vermuten, dass dieser Effekt eher auf eine beeinträchtigte Nierenfunktion als auf die Dialysebehandlung zurückzuführen ist.

Des Weiteren konnten durch Anwendung der 2DE-Technik verschiedene Proteinspezies der SOD1 in humanen Monozyten identifiziert werden. Die Immunfärbung der Membranen mit einem spezifischen SOD1-Antikörper ergab ein Muster, bestehend aus 6 immunoreaktiven Spots (Spots 1-6). Ein ähnliches Proteinmuster konnten Choi und Kollegen für ihre Untersuchungen an humanem Hirngewebe zeigen [36]. Die Proteinspots 1-3 der hier vorliegenden Befunde lassen sich dem Muster von Choi et al. (Spots pI 5.7-6.3) zuordnen. Die Spots 4-6 scheinen ähnliche isoelektrische Punkte (pI) zu haben, wie die Spots 1-3, nur weisen sie je ein kleineres Molekulargewicht auf. Ferner konnte Choi eine SOD1-Proteinspezies mit einem pI von 5.0 nachweisen, die sich in der vorliegenden Untersuchung in Monozyten unter Verwendung der ausgewählten Antikörper nicht detektieren ließ. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass in Monozyten weitere Proteinspezies der SOD1 existent sind.

Die Proteinmuster zwischen den untersuchten Gruppen waren im wesentlichen identisch. Für weitere Untersuchungen sollten Methoden der Proteinfractionierung und Proteinanreicherung Anwendung finden, um post-translationale Modifikationen am Protein SOD1 zu identifizieren [37].

Aufgrund ihrer Bedeutung in der antioxidativen Abwehr, kann die Abnahme der SOD1-Proteinexpression erhebliche Folgen haben. Der Tempol-Versuch zeigt im Umkehrschluss, dass bei verminderter SOD1-Expression die Produktion an ROS in Monozyten ansteigt. Durch ein geschwächtes antioxidatives Abwehrsystem entsteht oxidativer Stress, der mit Arteriosklerose und kardiovaskulärer Mortalität bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz in Verbindung steht [5,38]. Die Gruppen um Yilmaz und Zwolinska konnten in dieser Patientengruppe verminderte SOD1-Aktivitäten in roten Blutzellen nachweisen [6,39]. Didion und Kollegen konnten zeigen, dass eine normale SOD1-Expression endotheliale Funktionen vor oxidativem Stress schützt und ein Mangel an SOD1 in heterozygoten CuZnSOD(+/-)-Mäusen zu einem Anstieg an Superoxiden in den Blutgefäßen und verstärkt zu vaskulärer Dysfunktion führt [40]. Die Lebensspanne SOD1-defizienter CuZnSOD(-/-)-Mäuse ist wesentlich verkürzt [41]. Proteine und deren unterschiedliche Proteinspezies können in ihrer Expression durch ein breites Spektrum an Mechanismen reguliert werden [42,43]. Dazu zählen unter

anderem transkriptionale Regulation und Regulation der mRNA-Stabilität, translationale Regulation und Proteindegradation sowie die funktionelle Regulation via post-translationale proteolytische Prozesse und kovalente Modifikationen und Protein-Protein-Interaktionen [43].

Die Untersuchung der SOD1-Genexpression in der vorliegenden Arbeit zeigt, dass die mRNA-Expression in chronisch niereninsuffizienten und dialysepflichtigen Patienten gegenüber Kontrollpersonen erhöht ist. Park konnte in seiner Arbeit zeigen, dass die Transkription humaner SOD1 über Response-Elemente reguliert wird und diese durch oxidativen Stress aktiviert werden [44]. Da erhöhter oxidativer Stress in HD- und CKD-Patienten sehr gut dokumentiert ist, lässt sich die Zunahme des Transkriptionsniveaus für SOD1 in nierengeschädigten Patienten dadurch begründen [4].

Obwohl die Genexpression in beiden Gruppen erhöht ist, zeigen beide eine deutliche Verminderung der Proteinexpression, infolge verringerter Proteintranslation oder erhöhter Proteindegradation. Die Kombination aus gesteigerter Geneexpression und verringerter Proteinexpression konnten auch andere Gruppen für die post-transkriptionale Regulation unterschiedlichster Proteine belegen [45-47].

In der chronischen Niereninsuffizienz tragen die Faktoren Urämie und oxidativer Stress erheblich zur erhöhten Proteindegradation bei. Bei Alzheimer- und Parkinson-Erkrankungen wurden oxidative Modifikationen durch Carbonylierung am SOD1-Protein nachgewiesen [36]. Die Urämietoxine Glyoxal und Methylglyoxal sind in der Lage, SOD1 durch Glucosylierungen zu modifizieren [48-50]. Urämie lässt sich unter anderem durch erhöhte Proteinglycosylierungen charakterisieren, die in Proteinaggregation und Abnahme der Proteinmenge resultieren.

Aufgrund der Bedeutung der SOD-Familie in der antioxidativen Abwehr von reaktiven Sauerstoffspezies, wurde die SOD1-Expression in chronisch nierenkranken Patienten untersucht. Die Proteinexpression ist in dieser Patientengruppe im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen stark vermindert, was eine verstärkte Produktion an ROS zur Folge hat und somit zu erhöhtem oxidativen Stress beiträgt.

8. Zusammenfassung

Die vorliegenden Untersuchungen an Rhodanese und SOD1 haben gezeigt, dass bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz, einschließlich Dialysepatienten, Veränderungen in der Expression von antioxidativen Proteinen auftreten. Sowohl Rhodanese als auch SOD1 werden in Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz signifikant weniger exprimiert, was eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Oxidantien und Antioxidantien zugunsten der oxidativen Enzyme bewirkt. Die Expressionsanalyse der Rhodanese hat anschaulich gezeigt, dass eine Abnahme der Expression mit der Zunahme an ROS sowie verkürzter Lebenszeit der Patienten korreliert.

Die hier vorgelegten 2DE-Untersuchungen der SOD1 geben Hinweise auf das Vorkommen mehrerer Proteinspezies der SOD1, die durch post-translationale Modifikationen entstanden sein können.

Die bisherigen Ergebnisse dienen als Grundlage für weitere Untersuchungsreihen, die letztlich zu einem besseren Verständnis für die Entstehung des oxidativen Stress bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz führen sollen.

9. Literaturverzeichnis

- [1] Axelsson J. Obesity in Chronic Kidney Disease: Good or Bad? *Blood Purif* 2008;26:23-29.
- [2] Galle J. Oxidative stress in chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2005;15:69-80.
- [3] Locatelli F, Marcelli D, Conte F, et al. Cardiovascular disease in chronic renal failure: The challenge continues. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:69–80.
- [4] Himmelfarb J, Stenvinkel P, Ikizler TA, Hakim RM. The elephant in uremia: Oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney Int* 2002;62:1524-1538.
- [5] Locatelli F, Canaud B, Eckardt KU, Stenvinkel P, Wanner C, Zocalli C. Oxidative stress in end-stage renal disease: An emerging threat to patient outcome. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:1272-1280.
- [6] Yilmaz MI, Saglam M, Caglar K, et al. The Determinants of Endothelial Dysfunction in CKD: Oxidative Stress and Asymmetric Dimethylarginine. *Am J Kidney Dis* 2005;47:42-50.
- [7] Canaud B, Cristol JP, Morena M, Leray-Moragues H, Bosc JY. Imbalance of Oxidants and Antioxidants in Haemodialysis Patients. *Blood Purif* 1999;17:99-106.
- [8] Grönenc A, Atak Y, Orman M, Simsek B: Lipid Peroxidation an Antioxidant Systems in Hemodialyzed Patients. *Dialysis & Transplantation* 2002;31:2:88-96.
- [9] Papa S, Guerrieri F, Capitanio N. A possible role of slips in cytochrome C oxidase in the antioxygen defense system of the cell. *Biosci Rep* 1997;17:23-31.
- [10] Nandi DL, Horowitz PM, Westley J. Rhodanese as a thioredoxin oxidase. *Int J Biochem Cell Biol* 2000;32:465-73.
- [11] Bonomi F, Pagani S, Cerletti P, Canella C. Rhodanese-mediated sulfurtransferase to succinate dehydrogenase. *Eur J Biochem* 1977;72:17-24.
- [12] Abdrakhmanova A, Dobrynin K, Zwicker K, Kerscher S, Brandt U. Functional sulfurtransferase is associated with mitochondrial complex I from *Yarrowia lipolytica*, but is not required for assembly of its iron-sulfur clusters. *FEBS Lett* 2005;579:6781-5.
- [13] Nishino T, Usami C, Tsushima K. Reversible interconversion between sulfo and desulfo xanthine oxidase in a system containing rhodanese, thiosulfate and sulfhydryl reagent. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:1826-9.

- [14] Sanz A, Caro P, Ibanez J, Gomez J, Gredilla R, Barja G. Dietary restriction at old age lowers mitochondrial oxygen radical production and leak at complex I and oxidative DNA damage in rat brain. *J Bioenerg Biomembr* 2005;37:83-90.
- [15] Cipollone R, Ascenzi P, Tomao P, Imperi F, Visca P. Enzymatic detoxification of cyanide: clues from *Pseudomonas aeruginosa* rhodanese. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2008;15:199-211.
- [16] Babior BM: Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. *Blood* 1984;64:959-966.
- [17] Matés JM, Pérez-Goméz C, De Castro IN: Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clinical Biochemistry* 1999;32:8:595-603.
- [18] Vaziri ND, Dicus M, Ho ND, Boroujerdi-Rad L, Sindhu RK: Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency. *Kidney International* 2003;63:179-185.
- [19] Merino A, Nogueras S, Buendía P et al. Microinflammation and endothelial damage in hemodialysis. *Contrib Nephrol* 2008;161:83-88.
- [20] Watanabe T, Yasunari K, Nakamura M, Maeda K. Carotid artery intima-media thickness and reactive oxygen species formation by monocytes in hypertensive patients. *J Human Hypertens* 2006;20:336-340.
- [21] Quehenberger O. Molecular mechanisms regulating monocyte recruitment in atherosclerosis. *J Lipid Res* 2005;46:1582-1590.
- [22] Kessler D. Enzymatic activation of sulfur for incorporation into biomolecules in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 2006;30:825–840.
- [23] Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, et al. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J* 2004;18:39-51.
- [24] Cereda A, Carpen A, Picariello G, Tedeschi G, Pagani S. The lack of rhodanese RhdA affects the sensitivity of *Azotobacter vinelandii* to oxidative events. *Biochem J* 2009;418:135-43.
- [25] Rigoulet M, Yoboue ED, Devin A. Mitochondrial ROS Generation and Its Regulation: Mechanisms Involved in H₂O₂ Signaling. *Antioxidants & Redox Signaling* 2011;14:3:459-468.
- [26] Chevtzoff C, Yoboue ED, Galinier et al. L, Reactive Oxygen Species-mediated Regulation of Mitochondrial Biogenesis in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 2009;285:3:1733-1742.

-
- [27] Horowitz PM, Butler M, McClure GD. Reducing sugars can induce the oxidative inactivation of rhodanese. *J Biol Chem* 1992;267:23596-600.
- [28] Weng L, Henrikson RL, Westley J. Active site cysteinyl and arginyl residues of Rhodanese: A novel formation of disulfide bonds in the active site promoted by phenylglyoxal. *J Biol Chem* 1978;253:22:8109-8119.
- [29] Hasuike Y, Nakanishi T, Moriguchi R, et al. Accumulation of cyanide and thiocyanate in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:1474–9.
- [30] Melkani GC, Zardeneta G, Mendoza JA. GroEL interacts transiently with oxidatively inactivated rhodanese facilitating its reactivation. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;294:893-9.
- [31] Crowe AV, McArdle A, McArdle F, et al. Markers of oxidative stress in the skeletal muscle of patients on haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22:1177-83.
- [32] Marzec L, Zdrojewski Z, Liberek T, Chmielewski M, Witkowski JM, Rutkowski B. Expression of Hsp72 protein in chronic kidney disease patients. *Scand J Urol Nephrol* 2009; 43:400-408.
- [33] Reuter S, Bangen P, Edemir B, et al. The HSP72 stress response of monocytes from patients on haemodialysis is impaired. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:2838-2846.
- [34] Papa S, Skulachev VP. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Molecular and Cellular Biochemistry* 1997;174:305-319.
- [35] Dominiczak MH. Obesity, glucose intolerance and diabetes and their links to cardiovascular disease. Implications for laboratory medicine. *Clin Chem Lab Med.* 2003;41:1266-78.
- [36] Choi J, Rees HD, Weintraub ST, Levey AI, Chin LS, Li L. Oxidative modifications and aggregation of Cu/Zn superoxide dismutase associated with Alzheimer's and Parkinson's diseases. *J Biol Chem* 2005;280:11648-11655.
- [37] Zhao Y, Jensen ON. Modification-specific proteomics: Strategies for characterization of post-translational modifications using enrichment techniques. *Proteomics* 2009;9:4632-4641.
- [38] Roberts MA, Hare DL, Ratnaik S, Ierino FL. Cardiovascular biomarkers in CKD: pathophysiology and implications for clinical management of cardiac disease. *Am J Kidney Dis* 2006;48:341-360.

- [39] Zwolinska D, Grzeszczak W, Szczepanska M, Kilis-Pstrusinska K, Szprynger K. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in children on maintenance dialysis. *Pediatr Nephrol* 2006;21:705-710.
- [40] Didion SP, Kinzenbaw DA, Schrader LI, Faraci FM. Heterozygous CuZn superoxide dismutase deficiency produces a vascular phenotype with aging. *Hypertension* 2006;48:1072-1079.
- [41] Elchuri S, Oberley TD, Qi W, et al. CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene* 2005;24:367-380.
- [42] Jungblut PR, Holzhütter HG, Apweiler R, Schlüter H. The speciation of the proteome. *Chem Cent J*. 2008;2:16.
- [43] Knepper MA. Proteomics and the kidney. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:1398-1408.
- [44] Park EY, Rho HM. The transcriptional activation of the human copper/zinc superoxide dismutase gene by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin through two different regulator sites, the antioxidant responsive element and xenobiotic responsive element. *Mol Cell Biochem* 2002;240:47-55.
- [45] Monteleone G, Del Vecchio Blanco G, Monteleone I, et al., Post-transcriptional regulation of Smad7 in the gut of patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2005;129:1420-1429.
- [46] Santibanez JF, Letamendia A, Perez-Barriocanal F, et al. Endoglin increases eNOS expression by modulating Smad2 protein levels and Smad2-dependent TGF-beta signaling. *J Cell Physiol* 2007;210:456-468.
- [47] Tan R, Zhang J, Tan X, Zhang X, Yang J, Liu Y. Downregulation of SnoN expression in obstructive nephropathy is mediated by an enhanced ubiquitin-dependent degradation. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:2781-2791.
- [48] Jabeen R, Mohammad AA, Elefano EC, Petersen JR, Saleemuddin M. Antibodies and Fab fragments protect Cu,Zn-SOD against methylglyoxal-induced inactivation. *Biochim Biophys Acta* 2006;1760:1167-1174.
- [49] Jabeen R, Saleemuddin M, Petersen J, Mohammad A. Inactivation and modification of superoxide dismutase by glyoxal: prevention by antibodies. *Biochimie* 2007;89:311-318.
- [50] Vanholder R, Baurmeister U, Brunet P, Cohen G, Glorieux G, Jankowski J; European Uremic Toxin Work Group. A bench to bedside view of uremic toxins. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19:863-870.

10. Anteilserklärung

Frau **Katharina Krueger** hat ihre experimentelle, kumulative Doktorarbeit mit dem Thema

„Charakterisierung der antioxidativen Enzyme Rhodanese und SOD1 bei chronischer Niereninsuffizienz“

angefertigt. Grundlage für die kumulative Promotion sind folgende 3 Publikationen:

Publikation 1

Krueger K, Koch K, Jühling A, Tepel M, Scholze A. Low expression of thiosulfate sulfurtransferase (rhodanese) predicts mortality in hemodialysis patients. Clin Biochem 2010;43:95-101.

Impact factor 2.072

In dieser Arbeit wird die Expression von Rhodanese in Monozyten von Hämodialysepatienten und gesunden Kontrollpersonen mit Real-Time PCR und quantitativem In-Cell Western Assay verglichen. Frau Krueger hat die Bedingungen für beide Untersuchungsmethoden etabliert und die Studie durchgeführt. Weiterhin hat sie die Messung reaktiver Sauerstoffradikale mittels Fluoreszenz-Spektrophotometrie etabliert und durchgeführt. Sie konnte zeigen, dass Hämodialysepatienten eine Verminderung der Rhodanese-Transkripte, eine Verminderung der Rhodanese-Proteinexpression und eine Steigerung der reaktiven Sauerstoffradikale aufweisen. Überlebenszeit-Analysen ergaben, dass Hämodialysepatienten mit niedrigen Rhodanese-Transkripten eine gesteigerte Mortalität zeigen.

Der Anteil von Frau Krueger an dieser Arbeit ist mit mindestens 90% einzustufen.

Publikation 2

Scholze A., **Krueger K**, Diedrich M, Räth C, Torges A, Jankowski J, Maier A, Thilo F, Zidek W, Tepel M. Superoxide dismutase type 1 in monocytes of chronic kidney disease patients. Amino acids 2011;41(2):427-38

Impact factor 3.877

Diese Arbeit beschreibt die Veränderungen der Expression der Superoxiddismutase Typ 1 bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und gesunden Kontrollpersonen. Die Untersuchungen umfassten unter anderem die zweidimensionale Gelelektrophorese und Massenspektrometrie, Immunoblots, den quantitativen In-Cell

Western Assay und Real-Time PCR. Frau Krueger hat mitgewirkt bei der Vorbereitung und Durchführung der 2D-Gelelektrophorese sowie der MS/MS-Massenspektrometrie. Sie hat die Untersuchungen mittels Immunoblot etabliert und durchgeführt. Darüber hinaus hat sie die Bedingungen für PCR und In-Cell Western Assay etabliert und die Studie mit durchgeführt. Der Anteil von Frau Krueger an dieser Arbeit liegt bei 40%.

Publikation 3

Wuensch T, Thilo F, **Krueger K**, Scholze A, Ristow M, Tepel M. High glucose-induced oxidative stress increases transient receptor potential (TRP) channel expression in human monocytes. *Diabetes* 2010;59:844-849.

Impact factor 8.398

Diese Arbeit beschreibt die Veränderungen von Transient Receptor Potential Kanälen in Monozyten durch hohe Konzentrationen von Glucose, wie sie z.B. bei Diabetes mellitus auftreten. Durch die Veränderungen an den Kanälen erklärt sich möglicherweise eine gesteigerte Aktivität der Monozyten bei diesen Patienten, was schließlich zur gesteigerten Atherosklerose führt. Frau Krueger hat die Untersuchung der TRP-Kanäle mittels Western Blot und Immunfärbung durchgeführt. Zudem hat sie an Messungen freier Sauerstoffspezies sowie an Messungen intrazellulärer Kalziumkonzentrationen in Monozyten mittels Fluoreszenzfarbstoffen mitgewirkt. Der Anteil von Frau Krueger an dieser Arbeit ist mit 40% einzustufen.

Frau Krueger ist an weiteren Publikationen beteiligt, indem sie weitere molekular-biologische und proteinbiochemische Untersuchungen etabliert und durchgeführt hat. Sie hat in der Zellkultur mitgewirkt und hat beispielsweise Transfektionsversuche mit siRNA durchgeführt.

Unterschrift

11. Publikationen, ausgewählt

S. 25-31

Krueger K, Koch K, Jühling A, Tepel M, Scholze A. Low expression of thiosulfate sulfurtransferase (rhodanese) predicts mortality in hemodialysis patients. Clin Biochem 2010;43:95-101.

S. 32-43

Scholze A., Krueger K, Diedrich M, Räth C, Torges A, Jankowski J, Maier A, Thilo F, Zidek W, Tepel M. Superoxide dismutase type 1 in monocytes of chronic kidney disease patients. Amino acids 2011;41(2):427-38.

S. 44-49

Wuensch T, Thilo F, Krueger K, Scholze A, Ristow M, Tepel M. High glucose-induced oxidative stress increases transient receptor potential (TRP) channel expression in human monocytes. Diabetes 2010;59:844-849.

12. Lebenslauf

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

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

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

13. Publikationsliste, komplett

- [1] Liu D, Scholze A, Zhu Z, et al. Transient receptor potential channels in essential hypertension. *J Hypertens.* 2006; 24(6):1105-14.
- [2] Thilo F, Baumunk D, Krause H, et al. Transient receptor potential canonical type 3 channels and blood pressure in humans. *J Hypertens.* 2009; 27(6):1217-23.
- [3] Krueger K, Koch K, Jühling A, Tepel M, Scholze A. Low expression of thiosulfate sulfurtransferase (rhodanese) predicts mortality in hemodialysis patients. *Clin Biochem.* 2010; 43(1-2):95-101.
- [4] Wünsch T, Thilo F, Krueger K, Scholze A, Ristow M, Tepel M. High glucose-induced oxidative stress increases transient receptor potential (TRP) channel expression in human monocytes. *Diabetes* 2010;59:844-849.
- [5] Scholze A, Krueger K, Diedrich M, et al. Superoxide dismutase type 1 in monocytes of chronic kidney disease patients. *Amino acids* 2011;41(2):427-438.
- [6] Liu Y, Krueger K, Hovsepian A, Tepel M, Thilo F. Calcium-dependent expression of transient receptor potential canonical type 3 channels in patients with chronic kidney disease. (eingereicht).

Poster, Abstracts

- [1] Greese K, Krueger K, Suvd-Erdenne S, Tepel M, Scholze A: Mitochondrial superoxide dismutase expression in patients with end stage renal failure (Abstract)
36. Kongress der Gesellschaft für Nephrologie und 38. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für Klinische Nephrologie
Saarbrücken, 17.-20. Sept. 2005.
- [2] Krueger K, Greese K, Suvd-Erdenne S, Tepel M, Scholze A: Glutathion peroxidase and superoxide dismutase expression in patients on long term hemodialysis treatment (Abstract)
36. Kongress der Gesellschaft für Nephrologie und 38. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für Klinische Nephrologie
Saarbrücken, 17.-20. Sept. 2005.

- [3] Liu D, Zhu Z, Krueger K, Thilo F, Burkert A, Zidek W, Tepel M: Increased canonical transient receptor potential channel type 3 (TRPC3) in patients with essential hypertension
35. Rostocker Gespräch über kardiovaskuläre Funktion und Hypertonie
Rostock, 10. Juni 2006.
- [4] Krueger K, Koch K, Juehling A, Scholze A, Tepel M: Reduced rhodanese expression in patients with chronic kidney disease (Abstract)
World Congress of Nephrology
46th Congress of European Renal Association, European Dialysis Transplant Association,
20th Congress of International Society of Nephrology
Milan, Italy, May 22-26, 2009.
- [5] Krueger K, Koch K, Juehling A, Scholze A, Tepel M: Reduced rhodanese expression in patients with chronic kidney disease
1. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie
Göttingen, 26.-29. Sept. 2009.
- [6] Thilo F, Baumunk D, Loddenkemper C, Krueger K, Zidek W, Tepel M:
Transient receptor potential canonical type 3 channels and blood pressure in humans
33. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Hochdruckliga
Lübeck, 19.-21. Nov. 2009.

14. Selbständigkeitserklärung

„Ich, Katharina Krueger, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Charakterisierung der antioxidativen Enzyme Rhodanese und Superoxiddismutase 1 bei chronischer Niereninsuffizienz* 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

15. Danksagung

Großen Dank allen Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Martin Tepel und Frau Dr. med. Alexandra Scholze, die mir die Möglichkeit gaben, in ihrer Arbeitsgruppe mein Promotionsvorhaben zu realisieren. Danke für die umfangreiche wissenschaftliche Betreuung, für die aufschlussreichen Diskussionen und Geduld.

Großer Dank an Herrn Prof. Dr. rer. nat. Joachim Jankowski und Frau Dr. rer. nat. Vera Jankowski für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe. Ohne sie und ihrem hilfsbereiten Team hätte ich meine Untersuchungen nicht beenden können.

Ich danke allen Doktoranden/innen, die mich auf meinem Weg zur Promotion im Laboralltag begleitet haben. Ihr habt zu einer sehr angenehmen Arbeitsatmosphäre beigetragen. Danke.

Ich danke meinen Eltern und Geschwistern. Ich konnte mich jederzeit auf ihre Unterstützung verlassen. Sie bestärkten mich in meinem Vorhaben, eine Promotion anzustreben.

Zuletzt gilt mein Dank meiner Familie. Ich danke meinem Mann, der mich durch alle Höhen und Tiefen der letzten Jahre begleitet hat. Ich danke ihm dafür, dass er mich stets bestärkt hat, in dem was ich tue. Großen Dank an meine Kinder Lena und Jonas. Sie haben für den nötigen Ausgleich gesorgt.