

ALBUMINURIE UND NIERENSCHÄDIGUNG – HYPOTHESEN ZUR KAUSALITÄT

EINLEITUNG

Im Laufe der letzten zwei Jahrzehnte hat in Hinblick auf die Rolle der Proteinurie bei der Progression einer Nierenerkrankung ein Paradigmenwechsel stattgefunden. Über ein weites Spektrum von glomerulären und nicht-glomerulären Erkrankungen hinweg (insbesondere diejenigen, die durch tubulointerstitielle Fibrose charakterisiert sind) hat sich gezeigt, dass das Ausmaß der Proteinurie mit dem Risiko für eine Progression zur terminalen Nierenerkrankung korreliert ist. Ursprünglich ging man bei der Proteinurie lediglich von einem Marker für die Schwere der glomerulären Schädigung aus. Neuere Befunde legen jedoch nahe, dass die Proteinurie – und insbesondere die Albuminurie – selbst die tubuläre Schädigung fördern, mit interstitieller Entzündung und eventueller Fibrose.

Während verschiedene Mechanismen erforscht wurden, um zu erklären, wie die Albuminurie eine Schädigung der Niere verursacht, steht eine direkte kausale Verbindung – auch in Tiermodellen – immer noch aus. Um dieses Thema noch komplizierter zu machen, weisen neuere In-vitro-Daten darauf hin, dass Albumin die Apoptose behindern und das Überleben von primären Kulturen von proximalen Tubulus-Epithelzellen bei Mäusen (MPT-Zellen) sowie Makrophagen fördern kann. Diese Ergebnisse machen ein anscheinendes Paradoxon deutlich: Wie kann Albumin einerseits als ein potentieller Überlebensfaktor für Tubulus-Epithelzellen in Kulturen fungieren und gleichzeitig deren Schädigung *in vivo* vermitteln? Wir werden versuchen, diese offensichtlich widersprüchlichen Befunden in diesem kurzen Beitrag in Einklang zu bringen.

HEMMUNG DER APOPTOSE DURCH ALBUMIN: TRÄGERFUNKTION FÜR NICHT- ZYTOKINE ÜBERLEBENSFAKTOREN

Albumin ist ein zirkulierendes Plasmaprotein mit einer Größe von 69 kDa und einer

Vielzahl von Homöostase-Funktionen. Dazu zählt die Aufrechterhaltung des onkotischen Druckes, die Pufferfunktion für die Säure-Basen-Veränderungen und der Transport zahlreicher bioaktiver Substanzen zu und aus den Geweben. Unter den vielen Molekülen, die von Albumin transportiert werden, finden sich freie Fettsäuren, Phospholipide wie Lysophosphatsäure (LPA), Prostaglandine, Schwermetalle sowie Hormone auf Steroidbasis und Vitamine.

Kürzlich konnten wir zeigen, dass die albumin-gebundene LPA ein wichtiger Serum-Überlebensfaktor für primäre Kulturen von MPT-Zellen und peritoneale Makrophagen darstellt. Bei der LPA handelt es sich um das kleinste und strukturell einfachste aller Glycerophospholipide, und sie wird im Serum in Konzentrationen von 2-20 $\mu\text{mol/l}$ gefunden. Nahezu alle Serum-LPA liegen eng an Albumin gebunden in einer biologisch aktiven Form vor. LPA ist ein extrem wirksamer Inhibitor der Apoptose. Sowohl für MPT-Zellen als auch für Makrophagen entspricht der Schutz durch LPA vor einer Apoptose dem Schutz, wie er mit 10% Serum- oder konventionellen Überlebensfaktoren wie EGF (epidermal growth factor) oder M-CSF (macrophage colony stimulating factor) gesehen wird. Einen signifikanten Einfluss auf das Überleben kann man mit niedrigen LPA-Konzentrationen von 6 $\mu\text{mol/l}$ in MPT-Zellen und 50 nmol/l in Makrophagen beobachten. Die Überlebensaktivität von LPA hängt ab von der Aktivierung der Lipidkinase Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K). Zu den Flussabwärts-Mediatoren der PI3K gehören Akt und pp70s6k. Letztere Kinase spielt eine wichtige Rolle in der Proliferation und ist das hochspezifische Ziel des Immunsuppressivums Rapamycin. Da es sich bei fast allen bis heute identifizierten Überlebensfaktoren um Proteine und steroidbasierte Lipide handelt, stellt die LPA folglich eine neue Klasse von Zellüberlebensfaktoren dar.

Auf zwei zusätzliche Punkte muss aufmerksam gemacht werden. Erstens ist LPA auch ein wichtiger proliferativer Faktor für die MPT-Zellen. Die Stimulierung der Prolifera-

tion erfolgt bereits in niedrigen Konzentrationen von 3 $\mu\text{mol/l}$ und ist erwartungsgemäß weitgehend durch pp70s6k vermittelt. Zweitens wäre es möglich, dass die LPA nicht der einzige nicht-zytokine Überlebensfaktor ist, der von Albumin transportiert wird. Andere Phospholipide wie die Phosphatidsäure sind ebenso in der Lage, die Apoptose zu hemmen. Darüber hinaus haben wir kürzlich herausgefunden, dass albumingebundene ungesättigte (nicht aber gesättigte) Fettsäuren, einschließlich Linol- und Ölsäuren, wirksame Überlebensfaktoren für Zellen in Kultur sind.

HEMMUNG DER APOPTOSE DURCH ALBUMIN: ABRÄUMEN VON REAKTIVEN OXYGENSPEZIES

Bei unseren Studien zu LPA haben wir beobachtet, dass zu 99,95% von Lipiden befreites Albumin allein, das frei von LPA oder anderen Lipiden ist, für sich in der Lage ist, die Apoptose von MPT-Zellen und Peritoneal-Makrophagen zu hemmen. Diese lipidunabhängige Überlebensaktivität von Albumin beruht anscheinend auf der Fähigkeit von Albumin, als ein Antioxidans zu wirken. Viele Plasmaproteine können als Antioxidantien fungieren, indem sie als „Opfergruben“ für Angriffe von reaktiven Oxygenspezies (ROS) dienen, entweder direkt durch Oxidation von Aminosäuren-Nebenketten oder indirekt durch Reaktion mit Lipidspezies und Radikalen, die aus der Peroxidation von Zellmembran-Lipiden hervorgehen. Die Aminosäuren Zystein, Histidin, Methionin, Tyrosin und Tryptophan reagieren besonders empfindlich auf einen direkten oxidativen Angriff, wohingegen Lysin am empfindlichsten ist für Angriffe durch Malonyldialdehyd, einem der Hauptprodukte der Lipidperoxidation. Albumin und andere Plasmaproteine wie Ceruloplasmin und Transferrin schützen ebenfalls vor oxidativer Schädigung, indem sie an die Fe^{+2} und Cu^{+2} binden und auf diesem Wege der Entstehung der Hydroxylradikale $\text{OH}\cdot$ über die Fenton-Reaktion vorbeugen.

Unter den Plasmaproteinen nimmt Albumin eine Sonderstellung ein, indem es allein eine freie Sulfhydryl-Gruppe (bei Cys-34) besitzt; aus diesem Grund ist es ein besonders wirksamer „Abräumer“ (scavenger) von ROS. Das alleinige Hinzufügen von Albumin, das von Lipiden befreit wurde (dBSA), hemmt bei Fehlen jeglicher anderer Überlebensfaktoren die Apoptose und fördert das Überleben von MPT-Zellen und Makrophagen.

Einen signifikanten Effekt auf das Überleben mittels dBSA kann man bei geringen Konzentrationen von 0,5 mg/ml (7,25 $\mu\text{mol/l}$) oder ungefähr 1% der Albuminkonzentration im Serum beobachten. Wichtig ist darauf hinzuweisen, dass dBSA keine Aktivierung von PI3K bewirkt, was darauf schließen lässt, dass die Überlebensaktivität hier über einen anderen Mechanismus als bei den meisten Zytokinen erfolgt. Auf der Grundlage der folgenden Befunde legten wir nahe, dass dBSA die Apoptose durch Abräumen von ROS hemmt. Erstens wird die Apoptose der MPT-Zellen und Makrophagen nach Entzug der Überlebensfaktoren von einer Anhäufung von ROS begleitet, ein Effekt, der von dBSA gehemmt werden kann. Zweitens kommt es während des Schutzes vor Apoptose zu einer progressiven Abnahme im freien Sulfhydryl-Gehalt von dBSA, die mit dem Abräumen von ROS in Einklang steht. Drittens führt die Peroxidation von dBSA mit H_2O_2 oder chemische Blockade von freien Sulfhydryl-Gruppen durch Carboxyamidation zur fast vollständigen Beseitigung der Überlebensaktivität von dBSA. Zudem schützt dBSA sowohl MPT-Zellen als auch Makrophagen umfassend vor Zelltod während Kontakt mit Xanthin/Xanthinoxidase, ein gut etabliertes Modell der oxidativen Schädigung. Durch Peroxidation von dBSA wurde ihre Fähigkeit, den Tod von Zellen bei Kontakt mit Xanthin/Xanthinoxidase zu verhindern, aufgehoben.

STRUKTURELLE VERÄNDERUNGEN VON ALBUMIN: OXIDATIV UND NICHT-OXIDATIV

Über die letzten zwei Jahrzehnte hinweg konnte das Wissen um oxidative und nicht-oxidative strukturelle Veränderungen von Proteinen in der molekularen Pathogenese des Alterungsprozesses und von Erkrankungen, wie beispielsweise Diabetes, Atherosklerose und akute und chronische Entzündungen, immer mehr erweitert werden. Albumin und andere zirkulierende Plasmaproteine können eine Vielzahl von strukturellen Veränderungen durch Wechselwirkung ihrer Aminosäuren-Nebengruppen mit verschiedenen reaktiven Spezies erfahren. Wie oben besprochen, kann beispielsweise eine Vielzahl von ROS und oxidativen freien Radikalen direkt mit Aminosäuren-Nebenketten von Albumin reagieren, um ein Assortiment von oxidativ modifizierten Albuminformen zu erzeugen. Darüber hinaus könnte Albumin indirekt über Oxidation

durch Reaktion mit verschiedenen Karbonyl-Zwischenprodukten verändert werden, um die sogenannten Karbonylstress-Endprodukte zu bilden. Hoch reaktive Karbonyl-Zwischenprodukte entstehen durch die nicht-enzymatische Autooxidation von Kohlenhydraten, Lipiden und Aminosäuren. Sobald sie entstanden sind, können sie mit Proteinen reagieren und deren Struktur wesentlich verändern. AGEs (advanced glycation end-products) und ALEs (advanced lipoxidation end-products) sind Beispiele für Karbonylstress-Endprodukte, die entstanden sind aus der Wechselwirkung von Albumin mit Karbonylkomponenten, abgeleitet von Kohlenhydraten bzw. Lipiden.

Bei den Kohlenhydraten reagieren Karbonylkomponenten wie Glyoxal, Methylglyoxal und Glycoaldehyd mit freien Aminogruppen auf Albumin oder anderen Proteinen und bilden folglich reversible Addukte, die Schiff-Basen genannt werden. Im Laufe der Zeit erfahren diese reversiblen Addukte eine Reihe von chemischen Umgestaltungen und werden zu weniger reversiblen frühen Glykationsprodukten vom Amadori-Typ. Auch wenn Amadori-Produkte immer noch chemisch reversibel sind, ist ihre Reaktionskinetik extrem langsam – ein Gleichgewicht zu erhalten, erstreckt sich hier über Wochen – und so können die Amadori-Produkte für fast alle Zwecke als irreversibel betrachtet werden. Ein Beispiel für Amadori-Produkte ist das Hämoglobin A_{1c}, das zur Überwachung eines durchschnittlichen Blutglukosespiegels verwendet wird. Amadori-Produkte erfahren möglicherweise eine weitere Reihe von chemischen Umgestaltungen, um irreversible Produkte, die als AGE bezeichnet werden, zu erzeugen. Beispiele für AGE sind Pentosidin, Pyrralin und N-(Carboxymethyl)lysin (CML). Die Bildung von AGE wird durch Oxidation vorangetrieben, ein Prozess, der als Glykoxidation benannt wurde.

Fettsäuren, die an Albumin oder andere Proteine gebunden sind, können ebenfalls eine Autooxidation erfahren und erzeugen somit reaktive Karbonylkomponenten. Die Neigung zu Autooxidation ist proportional zur Anzahl von Kohlen-Doppelbindungen, so dass mehrfach ungesättigte Fettsäuren die wichtigste Quelle von Lipid-Karbonylkomponenten darstellen. Sobald die Lipid-Hydroperoxide entstanden sind, können diese zerfallen und hochreaktive Aldehyde bilden, wie Malondialdehyd (MDA) und 4-Hydroxynonenal (HNE), die dann mit vorhandenen Lysinresten auf Albumin oder anderen Proteinen reagieren können, um als

ALE bezeichnete MDA- und HNE-Lipidadukte zu erzeugen.

Aminosäuren sind eine zusätzliche Quelle für Karbonyl-Zwischenprodukte. Autooxidation von Serin, Threonin und den Hydroxyaminosäuren Hydroxyprolin und Hydroxylysin lässt die Karbonyl-Zwischenprodukte Glykoaldehyd und Akrolein entstehen. Die Reaktion von Glykoaldehyd mit Lysinresten auf Albumin und anderen Proteinen führt zur Bildung des Karbonylstress-Endproduktes CML. Da CML ebenso durch die Reaktion von Kohlenhydrat-abgeleiteten Karbonyl-Zwischenprodukten entsteht, wird CML als ein AGE eingestuft. Es ist hier zu erwähnen, dass CML im Serum zu über 90% an Albumin gebunden ist.

STRUKTURELL MODIFIZIERTES ALBUMIN ALS ENTZÜNDUNGSSIGNALISIERENDE ZWISCHENPRODUKTE

Es wurde für Endprodukte sowohl von oxidativem Stress als auch von Karbonylstress gezeigt, dass sie die Entzündungskaskaden über ihre Wechselwirkung mit Scavenger-Rezeptoren auf Makrophagen auslösen. Der Einbezug von RAGE (Rezeptoren für advanced glycation end-products) auf Makrophagen durch AGE-modifiziertes β 2-Mikroglobulin führt zu all den nachstehenden Vorgängen: Makrophagen-Aktivierung; Freisetzung von Zytokinen wie Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), Plättchen-abgeleiteter Wachstumsfaktor (PDGF) und transformierendem Wachstumsfaktor- β (TGF- β); Freisetzung von Chemokinen mit nachfolgender Rekrutierung von Makrophagen und anderer Entzündungszellen; Produktion und Freisetzung von Proteasen, einschließlich Matrix-Metalloproteinasen; Entstehung von ROS. Die RAGE-vermittelte Aktivierung von Makrophagen fördert nicht nur Oxidant-Stress, sondern ist auch teilweise von ihm abhängig. Im Fall von AGE-modifiziertem β 2-Mikroglobulin kommt es als wichtige Konsequenz aus der RAGE-vermittelten Makrophagen-Aktivierung zum entzündungsbedingten Abbau von β 2-Mikroglobulin zu Zwischenprodukten, die in die dialyseassoziierte Amyloidose involviert sind.

Die Expression von RAGE wurde auf renalen Tubulus-Epithelzellen und Mesangialzellen bei Patienten mit diabetischer Nephropathie und einer Vielzahl von anderen Nierenerkrankungen nachgewiesen. Die Mitwirkung von Mesangialzellen-RAGE führt zur Hochregulierung einer Anzahl von Stressreakti-

onsgenen, einschließlich dem nuclear factor kappa B (NF- κ B), peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR- γ) und Hämoxigenase. Darüber hinaus wurde für AGE gezeigt, dass sie die Mesangialzellen-Synthese von Fibronectin und Typ-IV-Kollagen stimulieren. Angesichts dieser Beobachtungen wäre es möglich, dass strukturell verändertes Albumin, das durch die Passage durch einen entzündeten Glomerulus und/oder während prolongierter Reise durch die systemische Zirkulation erzeugt wurde, an RAGE von mesangialen und tubulären Zellen binden könnte und hiermit eine Freisetzung von Entzündungsmediatoren, eine Schädigung der Tubuluszellen der Niere sowie eine Fibrogenese eingeleitet würden.

HYPOTHESE

In der Mehrzahl von proteinurischen Zuständen umfasst das Albumin die größte im Urin auffindbare Proteinfraction. Entlang des proximalen Tubulus gelegene Epithelzellen reabsorbieren gefiltertes Albumin durch rezeptorvermittelte Endozytose (z. Bsp. über Megalin). Es kommt zur Albuminurie, wenn die gefilterte Albuminmenge die tubuläre Reabsorptionskapazität übersteigt. Daraus folgt, dass das Albumin im Urin eine Unterschätzung der tatsächlichen Albuminmenge darstellt, der die tubulären Epithelzellen ausgesetzt sind. Auch unter normalen Bedingungen, d.h. wenn der Koeffizient der glomerulären Filtration für Albumin ziemlich niedrig ist, erreicht die tägliche gefilterte Albuminmenge einen durchschnittlichen Wert von 1-2 g, wovon aber überhaupt nichts im Urin erscheint. Es reabsorbieren also die tubulären Epithelzellen sogar bei gesunden Personen eine signifikante Menge an Albumin. Dies lässt vermuten, dass das Albumin eine Rolle in der normalen tubulären Homöostase spielen könnte.

Wir kehren jetzt zu der Frage zurück, die zu Beginn dieses Beitrages gestellt wurde. Wie kann Albumin als wichtiger Überlebensfaktor fungieren, um die Lebensfähigkeit von renalen tubulären Epithelzellen in Kultur zu verlängern, und aber gleichzeitig eine tubulointerstitielle Schädigung *in vivo* fördern? Unsere Hypothese geht dahin, dass die Antwort im Gleichgewicht von günstigen vs. potentiell schädigenden Faktoren liegt, die von Albumin transportiert werden, sowie in den vielzähligen strukturellen Änderungen, auf die Albumin anspricht. Unter normalen physiologischen Bedingungen könnte Albumin zur tubulären Zell-Homöostase beitra-

gen, über seine anti-oxidante Aktivität und über Zufuhr von LPA und anderen vermutlich nicht-zytokinen Wachstumsfaktoren. In pathologischen Zuständen wie bei der Glomerulonephritis, bei der aus verschiedenen Gründen das Albumin einem erhöhten oxidativen Stress ausgesetzt sein könnte, könnte das Albumin demgegenüber als eine Art „Trojanisches Pferd“ fungieren, indem es oxidierte Lipide und auch reaktive Carbonylgruppen in Form von AGE und ALE transportiert. Entsprechend diesem Modell würde das Öffnen der Tore von Troja durch Rezeptoren vermittelt werden, wie z. Bsp. Megalin oder RAGE und andere Scavenger-Rezeptoren, die unveränderte bzw. veränderte Formen von Albumin binden. Es würde dann durch eine Vielzahl von Mechanismen zu einer Schädigung von renalen tubulären Epithelzellen kommen: oxidativer Schaden durch Reaktion mit oxidierten Phospholipiden und Fettsäuren, die an Albumin gebunden sind; strukturelle Veränderung von Zellmembranproteinen und -lipiden durch Reaktion mit Carbonylgruppen von modifiziertem Albumin wie AGE und ALE; RAGE-vermittelte Aktivierung von Makrophagen und anderen Zellen mit Freisetzung von proinflammatorischen Chemokinen und Zytokinen. Oxidierte Lipoproteine und andere oxidierte Lipide, die ebenfalls in den Tubulusraum eindringen, könnten Urinalbumin weiter oxidieren und seine potentielle Toxizität erhöhen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass wir, auch wenn die derzeitigen Forschungsergebnisse eher eine kausale Rolle für Urinalbumin bei tubulointerstieller Entzündung, Fibrose und der Progression des Nierenversagens nahe legen, der Meinung sind, dass ein plausiblerer „Missetäter“ in einem strukturell veränderten Albumin zu sehen ist, das zusammen mit seinen gebundenen Untereinheiten durch oxidativen und Carbonylstress chemisch verändert wurde.

Literatur beim Verlag.

JERROLD S. LEVINE, M.D.
Nephrology Section
The University of Chicago
5481 South Maryland Avenue
MC5100, S-506
Chicago, IL 60637
USA