
**Aus der Klinik für Nephrologie und Rheumatologie
(Prof. Dr. med. G. A. Müller)
im Zentrum Innere Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen**

**Untersuchung der Proteinmusteränderungen renaler Fibroblasten nach
TGF β -1-Behandlung**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

**der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen**

**vorgelegt
von Souad Bazra
aus
Frankfurt am Main**

Göttingen 2013

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. H. Dihazi

II. Berichterstatter/in: PD Dr. rer. nat. K. Jung

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. M. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 11.03.2014

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	VI
TABELLENVERZEICHNIS	VIII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	IX
1. EINLEITUNG.....	1
1.1. Anatomie und Funktion der Niere.....	1
1.2. Chronische Niereninsuffizienz	2
1.2.1. Definition und Stadien der chronischen Niereninsuffizienz	2
1.2.2. Folgeschäden der chronischen Niereninsuffizienz	3
1.3. Nierenfibrose	4
1.3.1. Definition der Nierenfibrose.....	4
1.3.2. Epidemiologie und Ätiologie der Nierenfibrose.....	5
1.3.3. Pathogenese der Nierenfibrose	7
1.4. Extrazelluläre Matrix der Niere	10
1.5. TGF β	11
1.5.1. TGF β -Rezeptoren	12
1.5.2. TGF β -Signal-Kaskade.....	12
1.6. Fibroblasten	13
1.7. Myofibroblasten.....	15
1.8. Was versteht man unter Proteomik?	17
1.9. Ziel der Dissertation	18
2. MATERIAL UND METHODEN.....	19
2.1. Material	19
2.1.1. Chemikalien	19
2.1.2. Geräte	23
2.1.3. Verbrauchsmaterial.....	24
2.1.4. Wissenschaftliche Software.....	25
2.1.5. Biologisches Material	25

2.2. Methoden	26
2.2.1. Zellkultur	26
2.2.2. Trypsinisierung der Zellen	26
2.2.3. TGF β -1-Behandlung der Zelle.....	26
2.2.4. Gewinnung des Zellextraktes	27
2.2.5. Proteinanreicherung mittels Acetonfällung	27
2.2.6. Proteinbestimmung nach Bradford.....	28
2.2.7. Isoelektrische Fokussierung.....	29
2.2.8. SDS-Polyacrylamidgel	30
2.3. Gelfärbemethoden	31
2.3.1. Flamingo [®] -Färbung	32
2.3.2. Kolloidale Coomassiefärbung	32
2.4. Digitalisierung der Gele	32
2.5. Statistische Auswertung der Gele	33
2.6. Massenspektrometrie	33
2.6.1. Ionenerzeugung mit MALDI.....	33
2.6.2. Ionentrennung mit dem TOF-Analysator	34
2.6.3. Ionentrennung mit dem Quadrupol-Analysator	35
2.6.4. Sequenzierung der Peptide.....	36
2.6.5. Enzymatischer Verdau der Proteine im SDS-Polyacrylamidgel.....	36
2.6.6. Entsalzen der Proteinproben	37
2.6.7. Auftragen der Proben auf MS-Probenträger	38
2.6.8. Massenspektrometrische Analyse des Proteinverdaus	38
2.6.9. Proteinidentifizierung durch die Zuordnung von Peptidmassenmuster.....	38
2.7. Western-Blot-Analysen	40
2.7.1. Auswertung der Western-Blot-Analysen	43
2.8. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung und Immunfluoreszenzmikroskopie	44
3. ERGEBNISSE	45
3.1. Lichtmikroskopische Veränderungen nach TGF β -1-Behandlung.....	45
3.2. Vergleichende Analyse der Proteinmuster der TK173- und TK173-TGF β -1-Zellen	46
3.2.1. Etablierung zweidimensionaler Proteinprofile von TK173 und TK173-TGF β -1	48
3.3. Proteinidentifizierung mittels Massenspektrometrie.....	50
3.4. Differenziell exprimierte Proteine unter TGF β -1-Behandlung	56

3.5.	TGFβ-1-induzierte Zelltransformation ist zeitabhängig.....	63
3.6.	Bestätigung der Ergebnisse durch Immunfluoreszenzfärbung	65
4.	DISKUSSION	67
4.1.	Grenzen der zweidimensionalen Gelelektrophorese und der Massenspektrometrie	67
4.2.	Eine vergleichende Proteomanalyse nach TGFβ-1-Behandlung.....	68
4.3.	Rolle von TGFβ-1 im Rahmen der Fibroseentstehung in der Niere	70
4.4.	Differenziell exprimierte Proteine	72
4.4.1.	Hochregulierung der Strukturproteine und ihre Rolle in der TGFβ-1-induzierten Zelltransformation.....	72
4.4.1.1.	Vimentin	72
4.4.1.2.	Fibronektin.....	73
4.4.1.3.	Desmin	74
4.4.2.	Hochregulierung der ER-Stress-Proteine und ihre Rolle in der TGFβ-1-induzierten Zelltransformation.....	74
4.4.2.1.	GRP78.....	74
4.4.2.2.	Calreticulin.....	76
4.4.2.3.	Protein-Disulfid-Isomerase	78
4.5.	Fibroblasten-Induktion und ihre Rolle für die Fibroseentstehung in der Niere	79
5.	ZUSAMMENFASSUNG	83
6.	ANHANG: Abbildung 22-24, Tabelle 11	85
7.	LITERATURVERZEICHNIS	89

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Anteil der diabetischen und vaskulären Nephropathie nach Altersgruppen aufgeteilt	7
Abbildung 2: Schematische Darstellung über die Phasen der Nierenfibrose.....	9
Abbildung 3: Dreidimensionale schematische Darstellung von TGF β	11
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Smad-Signalkaskade von TGF β	13
Abbildung 5: Übersicht über die Aufgaben der Fibroblasten.....	14
Abbildung 6: Übersicht über die Aufgaben der Myofibroblasten	16
Abbildung 7: Schematische Darstellung des tryptischen Verdaus und der anschließenden <i>peptid mass fingerprint</i> -Analyse eines Proteins mittels MALDI-TOF-MS	35
Abbildung 8: Auflistung der Massen, die im Rahmen einer Analyse mit der Swiss-Prot-Proteindatenbank für PRDX-1 abgeglichen werden konnten.....	39
Abbildung 9: Die Wahrscheinlichkeit des korrekten Datenbankabgleichs: Der MOWSE-Score für PRXD-1.....	39
Abbildung 10: Schematische Darstellung des Aufbaus und der Detektion eines Western-Blots.....	42
Abbildung 11: TK173-Zellen (A) und TK173-TGF β -1-Zellen (B): Lichtmikroskopische (400 x vergrößert) Aufnahmen	45
Abbildung 12: Wirkung von TGF β -1 auf das TK173-Proteom. Dargestellt ist ein Beispiel des sogenannten <i>image warpings</i>	47
Abbildung 13: Zweidimensionale Gelelektrophorese des Proteinextrakts aus TK173 (A,B) und TK173-TGF β -1 (C).....	50
Abbildung 14: Repräsentatives Beispiel einer massenspektrometrischen Analyse von Vimentin	51
Abbildung 15 A-C: Vergrößerte Gelausschnitte ausgewählter differenziell exprimierter Proteine vor und nach TGF β -1-Behandlung.....	60

Abbildung 16: Einteilung der differenziell überexprimierten Proteine nach ihrer Funktion anhand der Swiss-Prot-Proteindatenbank.	61
Abbildung 17: Proteinnetzwerk zur Darstellung der Interaktionen zwischen den überexprimierten Proteinen aus den Hauptgruppen Strukturproteine, ER-Stress und oxidativer Stress	62
Abbildung 18: Western-Blot-Analysen für ausgewählte Fibrosemarker in Abhängigkeit der Inkubationsdauer mit TGF β -1	63
Abbildung 19: Western-Blot-Analysen für ausgewählte ER-Stress-Proteine, die nach TGF β -1-Behandlung überexprimiert wurden.	64
Abbildung 20: Immunfluoreszenzfärbung der Fibrosemarker	66
Abbildung 21: Schematische Darstellung über die TGF β -1-Wirkung auf die renalen Fibroblasten.....	69
Abbildung 22: Zweidimensionale Gelelektrophorese vom Zellextrakt der TK173-TGF β -1-Zellen	85
Abbildung 23: Zweidimensionale Gelelektrophorese vom Zellextrakt der TK173-Zellen.....	86
Abbildung 24: Zweidimensionale Gelelektrophorese vom Zellextrakt der TK173-Zellen	87

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Schweregrad der Niereninsuffizienz nach glomerulärer Filtrationsrate	3
Tabelle 2: Chronische Nierenersatztherapie in Deutschland von 1995 bis 2006	6
Tabelle 3: Pipettierschema für die Proteinbestimmung	29
Tabelle 4: Fokussierungsprogramm IPG-Streifen 11 cm	30
Tabelle 5: Standardsuchparameter des Datenbankabgleichs.	40
Tabelle 6: Zusammensetzung der Trenngelösungen pH 8,8.	41
Tabelle 7: Zusammensetzung des 4 %igen Sammelgels pH 6,8.....	41
Tabelle 8: Verwendete Antikörper	43
Tabelle 9: Tabellarische Darstellung der gesamten identifizierten Proteine vor und nach TGF β -1-Behandlung der TK173-Zellen	52
Tabelle 10: 49 differenziell überexprimierte Proteine in den TK173-Zellen nach TGF β -1-Behandlung.....	57
Tabelle 11: 13 differenziell unterexprimierte Proteine in den TK173-Zellen nach TGF β -1-Behandlung.....	88

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACN	Acetonitril
ACTA	alpha smooth muscle actin
ad	auf
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ATF6	activating transcription factor 6
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin/ bovine serum albumin
ca.	circa
CALC	Calreticulin
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylamino]-propansulfat
2D-PAGE	Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Da	Dalton
DAPI	Diamidinophenylindol
ddH ₂ O	Deionisiertes destilliertes Wasser
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DMEM	dulbecco's modified eagle medium
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF2 α	eucaryotic initiation factor 2 α
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transformation
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERP57	Endoplasmatisches Retikulum-Protein 57
ERP72	Endoplasmatisches Retikulum-Protein 72
etc.	et cetera
EZM	Extrazelluläre Matrix
FABP	fatty acid binding protein
FGF	fibroblast growth factor
FIN	Fibronectin
GADPH	Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
GAP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GRP78	Glukose-reguliertes Protein 78
GRP94	Glukose-reguliertes Protein 94
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HSP	Hitze-Schock-Proteine
IEF	Isoelektrische Fokussierung
Ig	Immunglobulin
IL-1,-4,-6	Interleukin-1, -4, -6
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
IRE1	inositol requiring enzyme 1
kDa	Kilodalton
LTBP	latent TGF β binding protein
m	Massenzahl

MALDI	matrix assisted laser desorption ionization/Matrix-unterstützende-Laser-Desorption-Ionisation
min	Minuten
Mio.	Million
M	Mol
mM	Milimol
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
nm	Nanometer
PBS	phosphate buffered saline
PDGF	platelet derived growth factor
PDI	protein disulfid isomerase
PERK	protein kinase like endoplasmatic reticulum kinase
pI	isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ppm	parts per million
PRDX	Peroxiridin
Q-TOF	Quadrupol-Time of flight
SD	Standardabweichung
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Smad	small mothers against decapentaplegic
SOD	Superoxid Dismutase
s. u.	siehe unten
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TGF β -1	transforming growth factor beta-1
TK173	Nicht-fibrotische Nierenfibroblasten
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
TOF	Time of flight
TPI	Triosephosphatisomerase
TRI	TGF β -Rezeptor I
TRII	TGF β -Rezeptor II
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u. a.	unter anderem
UPR	unfolded protein response
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
VIM	Vimentin
Vol	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
z	Ladungszahl
z. B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1. Anatomie und Funktion der Niere

Die Niere ist ein paarig angelegtes, retroperitoneal gelegenes Organ. Durchschnittlich wiegt eine humane Niere zwischen 120-170 g (Klinke et al. 2005). Am Nierenhilum treten die Ureteren, die Arteriae renales sowie die Venae renales heraus. Die Nieren werden mit 25 % des Herzzeitvolumens durchblutet. Dies entspricht in etwa 1,2 l/min. Die Schnittfläche durch die Niere zeigt die Aufteilung des Parenchyms in Rinde und Mark (Klinke et al. 2005). Im Rindenparenchym befinden sich die Glomerula, die jeweils gemeinsam mit dem dazugehörenden Tubulus die kleinste funktionelle Einheit der Niere darstellen: das Nephron. Im Glomerulum findet die erste Filtration des Blutes statt, so dass der Primärharn entsteht. Bis zu 150 l Primärharn pro Tag werden filtriert. Dadurch werden hauptsächlich Makromoleküle über 5-10 kDa, negativ geladene Stoffe sowie zelluläre Bestandteile des Plasmas zurückgehalten (Klinke et al. 2005). Der so entstandene Primärharn gelangt in das Tubulussystem, welches aus einem proximalen Abschnitt, der Henle-Schleife und einem distalen Abschnitt besteht. Im proximalen Tubulus wird ein großer Teil des Natriums und des Wassers resorbiert. Zusätzlich werden Glukose und Aminosäuren vollständig resorbiert (Klinke et al. 2005). In der Henle-Schleife erfolgt die Harnkonzentration mit Hilfe der Natrium-Resorption und dem Aufbau eines osmotischen Gradienten mit Hilfe des sogenannten Gegenstromprinzips. Das Gegenstromprinzip in der Henle-Schleife wird dadurch ermöglicht, dass der dicke aufsteigende Abschnitt für Wasser undurchlässig ist. Durch aktive Transportprozesse wird Natrium resorbiert, wodurch der Harn in diesem Abschnitt hypoton und das umgebende Interstitium hyperton wird. Der dünne absteigende Teil der Henle-Schleife ist dagegen für Wasser permeabel, so dass das Wasser entlang des Konzentrationsgradienten in das Interstitium gelangt. Dadurch wird der Harn schrittweise konzentriert. Im distalen Tubulus und im Sammelrohr findet die endgültige Zusammensetzung des auszuscheidenden Harns statt (Klinke et al. 2005). Über diese verschiedenen Absorptions- und Resorptionsmechanismen in den verschiedenen Nephronabschnitten ist die Niere in der Lage, den Wasser- und Salzhaushalt zu regulieren. Über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System erfolgt die Regulation des Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushalts. Renin wird in den

juxtaglomerulären Zellen synthetisiert und spaltet das in der Leber produzierte Angiotensinogen in Angiotensin I. Durch das, in den pulmonalen Endothelzellen gebildete, *angiotensin converting enzyme* entsteht Angiotensin II, welches zur Vasokonstriktion und zur vermehrten Aldosteron-Ausschüttung führt. Aldosteron wiederum löst eine gesteigerte Natrium-Rückresorption im distalen Tubulus aus. Über die Resorption des filtrierten Bicarbonats ist u. a. die Regulation des Säure-Basen-Haushalts möglich (Klinke et al. 2005).

Zusätzlich ist die Niere für die Elimination von harnstoffpflichtigen Substanzen verantwortlich, welche im Rahmen des Stoffwechsels entstehen und sie verfügt über endokrine Funktionen wie die Erythropoetin- und Calcitriolproduktion. Erythropoetin gelangt in das Knochenmark und fördert die Erythropoese über Bindung an spezifische Rezeptoren der Erythroblasten. Im distalen Tubulus gelangt das einfach hydroxylierte Vitamin D₃ und wird in seine metabolisch aktive Form hydroxyliert, um die Calciumhomöostase zu regulieren (Klinke et al. 2005).

1.2. Chronische Niereninsuffizienz

1.2.1. Definition und Stadien der chronischen Niereninsuffizienz

Bei irreversibler Verminderung der glomerulären, tubulären und endokrinen Funktionen beider Nieren, unabhängig von der zugrunde liegenden Erkrankung, spricht man von der chronischen Niereninsuffizienz. Zu den häufigsten Erkrankungen, die zu einer chronischen Niereninsuffizienz führen, zählen die diabetische Nephropathie, die Glomerulonephritiden, die tubulointerstitielle Erkrankungen und die vaskuläre Nephropathie (Herold 2011).

Nach der *national kidney foundation* wird die chronische Niereninsuffizienz wie folgt definiert (Nkf 2002):

1. Nierenschaden während mehr als drei Monaten mit oder ohne Funktionseinschränkung (erniedrigte glomeruläre Filtrationsrate), welcher mit histopathologischen Veränderungen oder mit den Folgen des Nierenschadens einhergeht (z. B. Proteinurie/Albuminurie, Hämaturie, etc.).
2. Glomeruläre Filtrationsrate $< 60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ während mehr als drei Monaten mit oder ohne Nachweis eines Nierenschadens.

Die Stadien der chronischen Niereninsuffizienz orientieren sich nach der glomerulären Filtrationsrate. Diese wird mittels der Formel nach MDRD (*modification of diet in renal disease*) abgeschätzt (Levey et al. 1999). In der MDRD-Formel fließen neben dem Serum-Kreatinin noch das Geschlecht, die ethnische Zugehörigkeit sowie das Alter mit ein. Der Normbereich liegt bei etwa 125 ml/min/1,73 m². In Tabelle 1 sind die verschiedenen Stadien der chronischen Niereninsuffizienz anhand der geschätzten GFR aufgelistet (Levey et al. 2003). Diese Einteilung erlaubt es, Aussagen über die Prognose und die Therapieoptionen zu machen.

Tabelle 1: Schweregrad der Niereninsuffizienz nach glomerulärer Filtrationsrate (Levey et al. 2003). Eine chronische Niereninsuffizienz liegt vor, wenn die GFR < 60 ml/min/1,73 m² oder andere Nierenschädigungen für mindestens drei Monate vorliegen.

Stadium	GFR [ml/min/1,73 m ²]	Erklärung
I	> 90	Nierenschädigung mit normaler oder erhöhter GFR
II	60- 89	Nierenschädigung mit geringgradig verminderter GFR
III	30- 59	Moderat verminderter GFR
IV	15- 29	Schwer eingeschränkte GFR
V	< 15 oder Nierenersatztherapie	Terminales Nierenversagen

1.2.2. Folgeschäden der chronischen Niereninsuffizienz

Im Rahmen der chronischen Niereninsuffizienz kommt es zu einer Reihe von progredienten Veränderungen, die mit einem fortschreitenden Funktionsverlust der Niere einhergehen. Es kommt zu Intoxikationen mit harnpflichtigen Substanzen aufgrund ihrer reduzierten renalen Elimination. Zusammengefasst werden diese Komplikationen unter dem Begriff „Urämie“. Neben den in der Klinik gängigen Retentionsparametern, wie Kreatinin und Harnstoff sowie Elektrolyte, wie Kalium und Phosphat, werden auch immunologische und endokrin aktive Proteine retentiert (Girndt 2012). Zu den Komplikationen zählt man atherosklerotische Veränderungen wie die koronare Herzerkrankung und die periphere arterielle Verschlusskrankheit.

Das erklärt weshalb die chronische Niereninsuffizienz als eine der stärksten kardiovaskulären Risikofaktoren gilt. In der Mehrheit der Fälle versterben die Patienten an kardiovaskulären Komplikationen (Go et al. 2004). Die Patienten entwickeln eine renale Anämie, die zum einen auf einen Erythropoetin-Mangel und zum anderen auf die verkürzte Lebensdauer der Erythrozyten sowie Veränderungen der Plasmazusammensetzung zurückzuführen ist (Nangaku und Eckardt 2006). Dabei beruht die verkürzte Lebensdauer der Erythrozyten auf okkulten gastrointestinalen Blutverlusten, die mit einem Eisenmangel einhergehen. Bei fortgeschrittener Niereninsuffizienz kommt es weiter zur Störung des Mineralhaushalts. Durch die zunehmende Phosphatretention wird die Knochenmineralisierung gestört, da Phosphat mit dem ionisierten Calcium Komplexe bildet. Hierdurch kommt es zur Hypokalzämie, die letztlich über das Parathormon aus der Nebenschilddrüse zur Entkalkung des Knochens führt (Wahl und Wolf 2012). Die Calcium-Phosphat-Komplexe präzipitieren in Organen und Gefäßen, wodurch die atherosklerotischen Veränderungen verstärkt werden (Hruska et al. 2008). Häufig entwickeln niereninsuffiziente Patienten neurologische Komplikationen, aufgrund der - meistens über Jahre anhaltenden - urämischen Stoffwechsellage. Beispiele hierfür sind die periphere Polyneuropathie, Myoklonien und das Restless-Legs-Syndrom. Durch die Zerstörung der Nephrone im Rahmen der chronischen Niereninsuffizienz steigt der Filtrationsdruck auf die restlichen Nephrone, wodurch es zur Entwicklung eines arteriellen Hypertonus oder zur Verschlechterung eines vorbestehenden arteriellen Hypertonus kommt (Herold 2011; Kücükköylü und Rump 2012). Es zeigt sich insgesamt eine Heterogenität an Komplikationen, die durch reziproke Interaktionen zu weiterer Kompromittierung der Nierenfunktion und zu einer Progression der multifaktoriellen Komplikationen führen.

1.3. Nierenfibrose

1.3.1. Definition der Nierenfibrose

Bei der Nierenfibrose handelt es sich um eine abnorme Akkumulation der extrazellulären Matrix in der Niere (Lopez-Hernandez und Lopez-Novoa 2012). Es kommt zu einer Verschiebung des Verhältnisses von Matrixdeposition und Matrixresorption zu Gunsten der Matrixdeposition. Sie stellt eine gemeinsame

Endstrecke verschiedener Nierenerkrankungen dar. Unabhängig von der zugrunde liegenden Erkrankung, kommt es zu einer Destruktion der mikroskopisch-anatomischen Architektur der Niere, einhergehend mit einer reduzierten oder fehlenden Regenerationsfähigkeit. Es entwickelt sich eine pathologische Bindegewebsvermehrung, die durch die Trias Glomerulosklerose, interstitielle Fibrose sowie Atrophie des Tubulussystems gekennzeichnet ist (Remuzzi und Bertani 1998; Brenner 2002). Klinisch führen diese mikroskopisch-anatomischen Veränderungen zum Funktionsverlust der Niere (Liu Y. 2006) und führen unbehandelt zur terminalen Niereninsuffizienz mit Hämodialyse-Pflichtigkeit oder Nierentransplantation (Remuzzi et al. 2006).

1.3.2. Epidemiologie und Ätiologie der Nierenfibrose

In den letzten Jahren ist es zu einer kontinuierlichen Zunahme von Dauerdialysepatienten in Deutschland gekommen. Entsprechend den zuletzt vom deutschen Nephrologieregister veröffentlichten Daten wurden im Jahr 2006 66508 Patienten mit der Dauerdialyse behandelt. Dies entspricht einer Erhöhung der Patientenzahl um fast 5 % im Vergleich zum Vorjahr 2005. Im Jahr 2006 haben 17548 Patienten die Nierenersatztherapie begonnen. Die Anzahl der neu aufgenommenen Patienten stieg im Vergleich zum Vorjahr um 4,6 % (Tabelle 2). Es ist somit von 1997 bis 2006 im Durchschnitt ein jährlicher Zuwachs der Prävalenz der Patienten in chronischer Nierenersatztherapie (CNE) von 4,4 % und ein Anstieg der Inzidenz von 5,1 % zu verzeichnen.

Tabelle 2: Chronische Nierenersatztherapie in Deutschland von 1995 bis 2006 aus dem Jahresbericht 2006/2007 der Nierenersatztherapie in Deutschland vom Bundesverband der Niere (Frei und Schober-Halstenberg 2007).

	2006	2005	2004	2003	2002	2001	2000	1995
Summe aller Patienten in CNE	91718	87151	82305	78281	75777	75672	71513	54656
Prävalenz (pro Mio. Einwohner)	1114	1057	998	949	918	919	870	674
Gesamtzahl der Dialysepatienten	66508	63427	60992	58579	56881	57188	52596	41350
Neuaufnahme in CNE	17548	16766	16027	15360	14358	15148	14370	11731
Inzidenz (pro Mio. Einwohner)	213	203	194	186	174	184	175	145

Hinsichtlich der Ätiologie der Nierenfibrose werden hauptsächlich drei Formen unterschieden: Nierenschädigung durch arterielle Hypertonie, durch Diabetes mellitus und durch Glomerulonephritiden. Betrachtet man nur die Dialysepatienten, so führte laut dem zuletzt veröffentlichten Bericht des deutschen Nephrologieregisters *QuasiNiere* der Diabetes mellitus mit 28 % deutlich vor den Glomerulonephritiden mit 19 % zum endgültigen Nierenversagen (Frei und Schober-Halstenberg 2007). In Abbildung 1 ist der Anteil der diabetischen und vaskulären Nephropathie, nach Altersgruppen aufgeteilt, dargestellt, ebenfalls aus dem Jahresbericht 2006/2007 der Nierenersatztherapie in Deutschland vom Bundesverband der Niere (Frei und Schober-Halstenberg). Es zeigt sich, dass mehr als 40 % der über 60jährigen Patienten Diabetiker sind, während eine vaskuläre Genese bei den über 80jährigen Patienten ca. 40 % ausmacht. Diese primären Erkrankungen können zu einer progressiven Nierenfibrose führen und somit schließlich zum Verlust der Nierenfunktion beitragen (Remuzzi und Bertani 1998; Brenner 2002; Hudson et al. 2003).

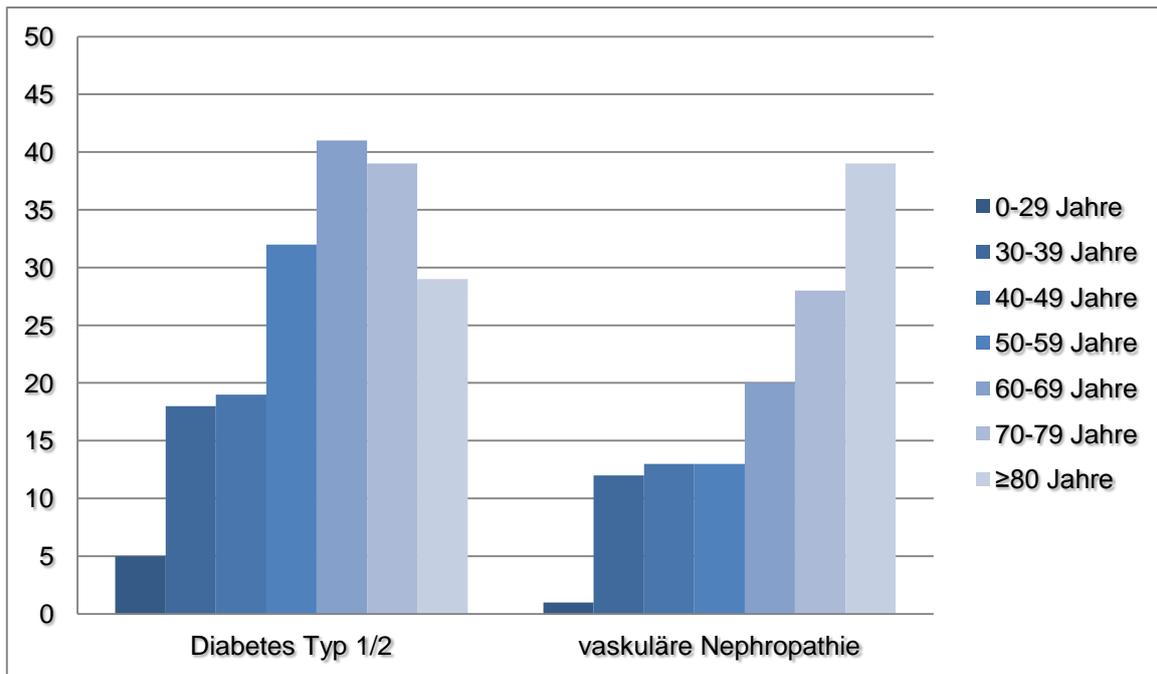


Abbildung 1: Anteil der diabetischen und vaskulären Nephropathie nach Altersgruppen aufgeteilt aus dem Jahresbericht 2006/2007 der Nierenersatztherapie in Deutschland vom Bundesverband der Niere (Frei und Schober-Halstenberg 2007). Mehr als 40 % der über 60jährigen mit CNE sind Diabetiker. Ca. 40 % aller CNE-Patienten im Alter über 80 Jahre haben eine vaskuläre Genese.

Zu Beginn des Jahres 2013 wurden Daten einer nationalen Datenerfassung ausgewertet. Hierbei nahmen 90 % der deutschen Dialysezentren teil. Die Erfassung der Daten erfolgte über ein elektronisches Datenbanksystem. Im Gegensatz zu *QuasiNiere* wurden hierbei nicht nur Dialysepatienten einbezogen, sondern auch Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Stadium 2-3. Hierbei zeigt sich die arterielle Hypertonie mit 47 % als Hauptursache für die chronische Niereninsuffizienz (Kleophas et al. 2013). Gefolgt wird die arterielle Hypertonie vom Diabetes mellitus mit ca. 26 %.

1.3.3. Pathogenese der Nierenfibrose

Die Nierenfibrose stellt einen gemeinsamen Endpunkt von verschiedenen chronischen Nierenerkrankungen dar, unabhängig von der zugrunde liegenden Erkrankung. Im Allgemeinen wird die Fibrose als „pathologische Wundheilung“ oder „gestörtes Remodelling“ beschrieben (Kolb et al. 2001). Ein wesentlicher pathogenetischer Faktor der Fibroseentstehung ist ein Ungleichgewicht auf interzellulärer Ebene zwischen proinflammatorischen (z. B. TNF- α , IL-1, IL-6) und

profibrotischen Zytokinen wie TGF β -1 oder PDGF (Kunkel et al. 1995; Remick 1995). Als Folge kommt es zu einer massiven Synthese der extrazellulären Matrix sowie zu deren Ablagerung und zu einer gesteigerten Transformation der Fibroblasten und Proliferation der Myofibroblasten (Desmouliere 1995; Verrecchia und Mauviel 2002). Die Fibroseentstehung lässt sich allgemein in drei Phasen einteilen (Abbildung 2), ähnlich den Phasen der Wundheilung (Nagaoka et al. 2000; Strutz und Zeisberg 2006):

1. Die Phase der Induktion: Mononukleäre Zellen infiltrieren die geschädigte Umgebung. Dabei werden die Zellen (Makrophagen, Monozyten und Lymphozyten) mittels Chemokinen angelockt. Diese synthetisieren ihrerseits ebenfalls Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren.
2. Die Phase der Inflammation: Hier kommt es zur Aktivierung der residenten Fibroblasten. Diese Aktivierung geht mit einer gesteigerten Syntheseaktivität der extrazellulären Matrix einher.
3. Die postinflammatorische Phase: Trotz fehlendem Stimulus ist die Matrixsynthese fortschreitend. Das Gleichgewicht zwischen Matrixaufbau und -abbau ist gestört. Dies führt zu einer fortschreitenden Zerstörung der Mikroarchitektur des Organs und geht letztlich mit einem Organversagen einher. Im Gegensatz dazu kommt es im Rahmen der Wundheilung nach der Inflammation zur Resolution.

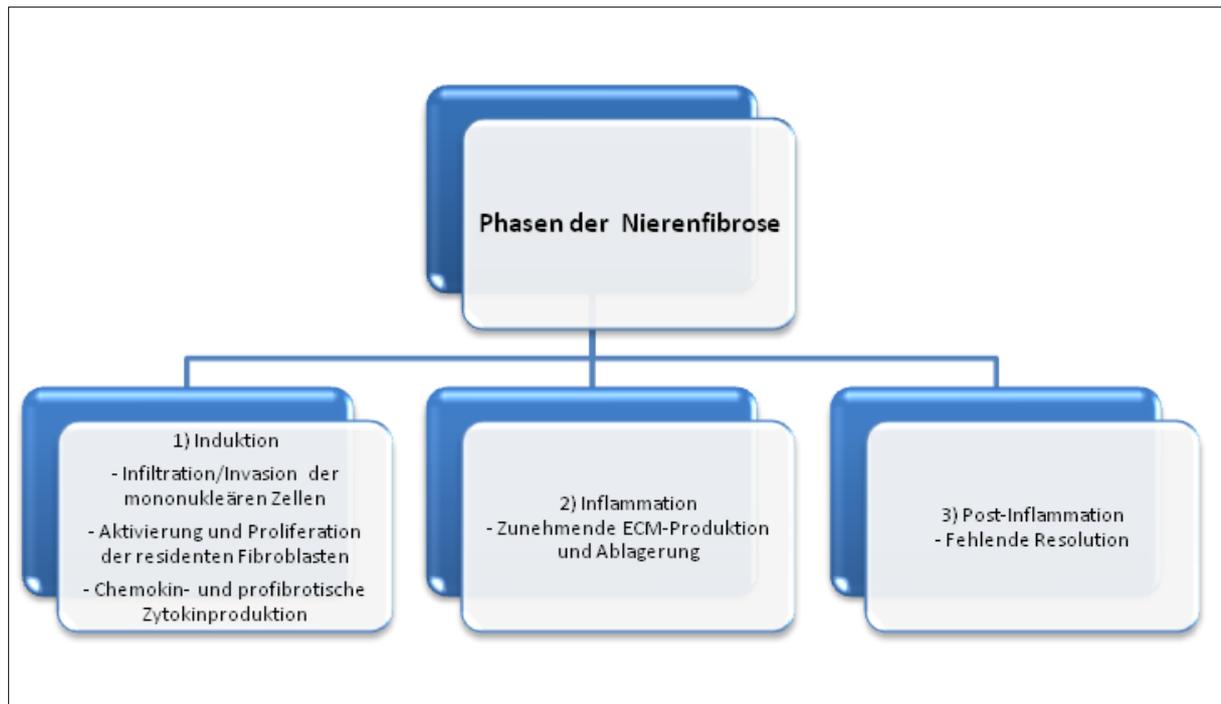


Abbildung 2: Schematische Darstellung über die Phasen der Nierenfibrose (Strutz und Zeisberg 2006).

Histopathologisch unterscheidet man bei der Nierenfibrose die Glomerulosklerose, die tubulointerstitielle Fibrose sowie die vaskuläre Sklerose.

Diese histopathologische Unterteilung erlaubt, die chronischen tubulointerstitiellen Erkrankungen in zwei Erscheinungsformen einzuteilen:

- Primär tubulointerstitielle Erkrankungen
- Primär glomeruläre/vaskuläre Erkrankungen, die sekundär mit einer Schädigung des Tubulointerstitiums einhergehen

Solange die Grunderkrankung noch besteht, kommt es zu einem progredienten fibrotischen Umbau der Niere, welcher das Tubulointerstitium, das Glomerulum und das Gefäßsystem gleichermaßen betrifft.

In der Klinik ist die tubulointerstitielle Fibrose insofern von hoher Relevanz, als ihr Ausmaß eine hohe Signifikanz für die Progression der Niereninsuffizienz aufweist. Der Verlust der renalen Funktion hängt mehrheitlich vom Grad der tubulointerstitiellen Vernarbung als von der glomerulären bzw. vaskulären Beteiligung

ab (Bohle et al. 1990; Nath 1992; Bohle et al. 1994). So lässt sich in den diagnostischen Nierenbiopsien über das Ausmaß des tubulointerstitiellen Schadens eine Aussage über die Prognose der Nierenfunktion machen (Bohle et al. 1994). Auf zellulärer Ebene ist besonders die Myofibroblasteninfiltration eng mit dem Schweregrad der tubulointerstitiellen Nierenfibrose und somit mit der Progression der Niereninsuffizienz korreliert (Qi et al. 2006). Histomorphologisch kommt es zu einer Verdickung der tubulären Basalmembran und zu einer Atrophie des Tubulussystems und damit zu einer Dilatation des Tubuluslumens. Des Weiteren kommt es zu einer interstitiellen Infiltration von immunkompetenten Zellen, wie Makrophagen oder T-Zellen, zur Aktivierung der interstitiellen Nierenfibroblasten sowie zur exzessiven Produktion und Ablagerung der extrazellulären Matrix. So führen letztlich chronische Nierenerkrankungen über die tubulointerstitielle Nierenfibrose als gemeinsamer Nenner in die terminale Niereninsuffizienz.

1.4. Extrazelluläre Matrix der Niere

Die extrazelluläre Matrix stellt ein Netzwerk dar, in welchem die Zellen eingebettet sind. Definiert ist die extrazelluläre Matrix als die Gesamtheit der Makromoleküle, die interzellulär lokalisiert sind (Kalluri 2003). Sie besteht hauptsächlich aus fibrillären Proteinelementen (Kollagen, Elastin), aus einer Grundsubstanz aus Glykosaminoglykanen und Proteoglykanen sowie aus Glykoproteinen (Fibronectin, Laminin). Durch ein komplexes Zusammenspiel dieser verschiedenen Elemente werden sowohl die statischen als auch die funktionellen Aufgaben der extrazellulären Matrix wahrgenommen. Die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix gibt dem jeweiligen Gewebe nicht nur die nötige Stabilität, sondern bildet ebenfalls ein Netzwerk, in dem sich zelluläre Elemente verankern können. Es handelt sich um ein dynamisches Netzwerk, welches Einfluss auf die Zellkommunikation, die Zelladhäsion und die Zellmigration hat (Slater 1996; Eckes et al. 1999). Die extrazelluläre Matrix ist aktiv an zellulären Differenzierungen, Gewebeentwicklung oder Remodelling im Zusammenhang mit der Fibroseentstehung und Wundheilung involviert (Slater 1996; Eckes et al. 1999; Schultz und Wysocki 2009). Im Zusammenhang mit der Nierenfibrose werden der extrazellulären Matrix neben den stabilisierenden auch modulierende Effekte über Matrixmoleküle, Zytokine,

Wachstumsfaktoren und Matrix-Metalloproteasen zugeschriebenen (Okada und Kalluri 2005; Qi et al. 2006).

1.5. TGF β

Bereits in früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass TGF β zu den wichtigsten profibrotischen Zytokinen gehört. So steigert es die Synthese und reduziert den Abbau der extrazellulären Matrix (Alvarez et al. 1992). Eine erhöhte TGF β -1-Expression konnte sowohl im Tiermodell als auch bei Menschen mit Glomerulonephritis oder diabetischen Nephropathie nachgewiesen werden (Kaneto et al. 1993; Yamamoto et al. 1993; Yamamoto et al. 1994).

TGF β ist ein ubiquitär vorkommendes pleiotropes Zytokin mit einer Größe von etwa 25 kDa, das als Dimer auftritt, verbunden über Disulfidbrücken, wie in Abbildung 3 dargestellt (Hinck et al. 1996). Es ist in die Entwicklung und Differenzierung von verschiedensten Geweben involviert (Tsakas und Goumenos 2006). Man unterscheidet 3 Isoformen (TGF β -1, -2, -3), die von Säugetieren exprimiert werden (Massague 1990). Dabei wird TGF β -1 vornehmlich im Endothel, in hämatopoetischen Zellen sowie in Bindegewebezellen produziert. TGF β -2 wird vornehmlich in epithelialen Zellen und in Neuronen exprimiert. TGF β -3 wird dagegen hauptsächlich in mesenchymalen Zellen exprimiert.

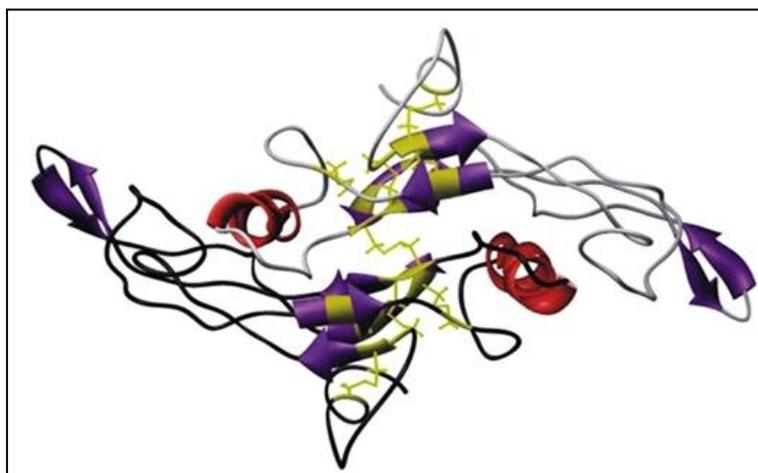


Abbildung 3: Dreidimensionale schematische Darstellung von TGF β (Hinck et al. 1996).

TGF β -1 wird in einer inaktiven Form sezerniert. Durch proteolytische Prozesse kommt es zu einer Abspaltung des *latency associated protein*, welches durch das *latent TGF β binding protein* (LTBP) an TGF β -1 gebunden wird (Letterio und Roberts 1997; Lasky und Brody 2000). Nach seiner Aktivierung können multiple Proteine an TGF β -1 binden und somit dessen Wirkung modifizieren. Fibronectin ist ein Protein, das an TGF β -1 binden kann, um dessen Aktivität zu erhöhen (Fava und McClure 1987; Yamaguchi et al. 1990). Decorin und Biglycan zum Beispiel können dagegen die Aktivität von TGF β -1 hemmen (Yamaguchi et al. 1990; Xu T. et al. 1998). Zu den biologischen Funktionen von TGF β -1 gehören unter anderem die Induktion der Zelldifferenzierung, die Stimulation der Synthese der extrazellulären Matrix, die Inhibition der Zellproliferation sowie die Suppression der Immunantwort.

1.5.1. TGF β -Rezeptoren

Es gibt drei Typen von TGF β -Rezeptoren, welche letztlich für die intrazelluläre Signalvermittlung zuständig sind. Der TGF β -Rezeptor I (TR I) und der TGF β -Rezeptor II (TR II) sind für die intrazelluläre Signalvermittlung zuständig, während der TGF β -Rezeptor III (TR III) über keine Signaltransduktionseigenschaften verfügt. TR I und TR II sind beides transmembranäre Rezeptoren mit Serin-Threonin-Kinase-Aktivität (Massague 1998).

1.5.2. TGF β -Signal-Kaskade

Der Signalweg von TGF β in Richtung Zellkern wird hauptsächlich durch die Phosphorylierung von zytoplasmatischen Mediatoren, die zur Familie der Smads (*small mothers against decapentaplegic*) gehören, gewährleistet (Massague und Wotton 2000).

TR I phosphoryliert nach seiner Aktivierung Smad 2 und Smad 3, die sogenannten Rezeptor-assoziierten Smads (R-Smad). Diese phosphorylierten Smads formen nun ihrerseits mit Smad 4 einen heteromeren Komplex, welcher in dieser Form in der Lage ist, in den Zellkern zu wandern. An dieser Stelle kann der heteromere Komplex an die DNS binden, um als Transkriptionsfaktor zu fungieren (Abbildung 4). Nach der Transkription der Zielgene, löst sich der Komplex wieder von der DNS und wird durch Proteosomen abgebaut (Massague 1998). Im Gegensatz zu den aktivierenden Smads gibt es die inhibitorischen Smads, wie Smad 6 oder Smad 7. Smad 6 und Smad 7 konkurrieren hierbei mit den R-Smads um den aktivierten TR I. Durch die

Bindung an TR I können die R-Smads nicht mehr phosphoryliert werden. Schließlich werden Proteasen aktiviert, die zum Abbau des Rezeptors TR I führen (Shi und Massague 2003). Somit verhindern Smad 6 und Smad 7 die Phosphorylierung der R-Smads sowie die Translokation des R-Smad/Smad 4-Komplexes in den Zellkern (Imamura et al. 1997; Nakao et al. 1997).

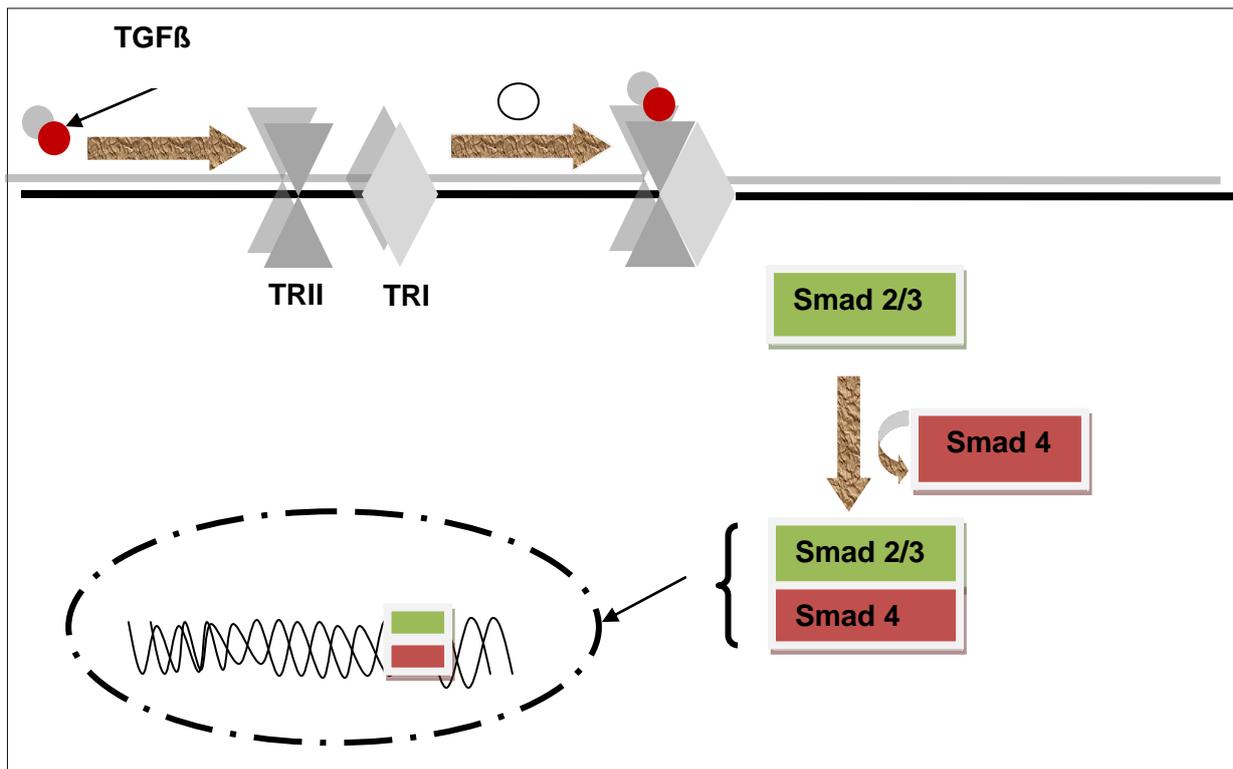


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Smad-Signalkaskade von TGFβ (modifiziert nach Massague und Wotton 2000). TGFβ bildet mit dem TR II und dem TR I ein heteromeres Komplex, welches die Smad-Kaskade aktiviert. Die Smads ihrerseits bilden ebenfalls durch Phosphorylierung Komplexe, die in der Lage sind als Transkriptionsfaktoren zu fungieren.

1.6. Fibroblasten

Bei den interstitiellen Zellen der Niere handelt es sich um eine heterogene Zellpopulation, bestehend unter anderem aus Fibroblasten, dendritischen Zellen und Makrophagen (Alvarez et al. 1992; Müller et al. 1995). In der gesunden Niere stellen sie nur einen geringen Anteil der Zellpopulation dar (Kaissling et al. 1996). Unter physiologischen Bedingungen handelt es sich bei den Fibroblasten um ortsständige, spindelförmige Bindegewebszellen mesenchymaler Herkunft (Strutz und Müller 2006). Fibroblasten aus gesundem Nierengewebe und aus fibrotischen Nieren

weisen hinsichtlich ihrer Fähigkeit zu proliferieren und Matrix zu synthetisieren Unterschiede auf (Strutz et al. 2001). So konnten Müller und Rodemann zeigen, dass der relative Fibroblastenanteil in einer fibrotischen Niere bei 46 % lag, während bei einer gesunden Niere der Anteil bei 7 % lag (Müller und Rodemann 1991). Die Fibroblasten spielen eine essenzielle Rolle in der Synthese der Interzellularsubstanz sowie im Aufbau der extrazellulären Matrix. Dies hängt vor allem mit ihrer Lokalisation, dem Gewebe sowie dem Grad der Aktivierung zusammen (Rodemann und Müller 1991; Rodemann et al. 1991; Müller et al. 1995). So sind Fibroblasten aus fibrotischem Gewebe durch eine gesteigerte Syntheseaktivität und durch eine gesteigerte Proliferationsfähigkeit gekennzeichnet (Müller und Rodemann 1991). Sie sind eingebettet in der Matrix zwischen den Fasern, welche sie selber produziert haben (Kalluri und Zeisberg 2006). Zu den Fasern gehören unter anderem Fibronectin, Kollagen Typ I, III und V (Rodemann und Müller 1991; Tomasek et al. 2002).

Die Fibroblasten spielen ebenfalls eine große Rolle in der Degradation der extrazellulären Matrix durch die Synthese der Matrix-Metalloproteinasen, die für den enzymatischen Abbau von Peptiden verantwortlich sind (Eddy 1996).

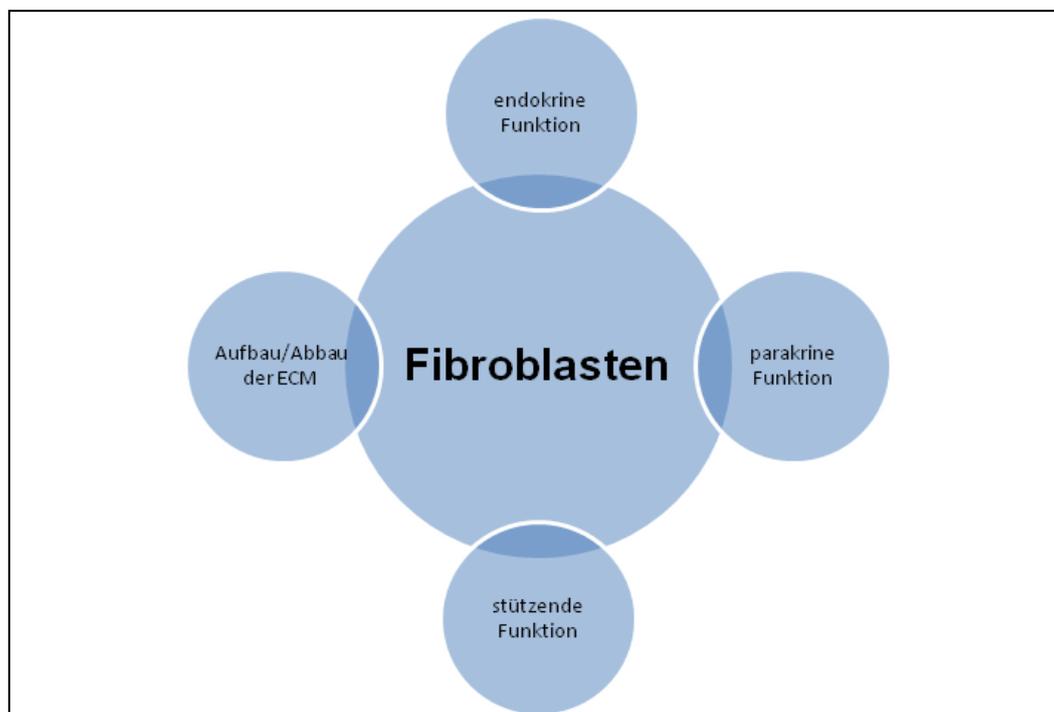


Abbildung 5: Übersicht über die Aufgaben der Fibroblasten (Müller und Rodemann 1991; Maxwell et al. 1993; Eddy 1996; Kalluri und Zeisberg 2006).

Somit sind die Fibroblasten wichtige Zellen für den Erhalt des Gewebes und der Gewebearchitektur. Zusätzlich verfügen sie über endokrine Funktionen wie die Erythropoetinsekretion für den Erhalt der Hämatopoese (Maxwell et al. 1993). In Abbildung 5 ist eine Übersicht über die Aufgaben der Fibroblasten dargestellt.

1.7. Myofibroblasten

Physiologischerweise kommen Myofibroblasten beispielsweise im Uterus vor, wo sie zu viszeraler Kontraktion führen (Schurch et al. 1998). Erstmals wurden sie im Granulationsgewebe im Rahmen der Wundheilung beschrieben (Majno et al. 1971; Gabbiani 2003). Es handelt sich um kontraktile, terminal entdifferenzierte Zellen. Myofibroblasten können verschiedene extrazelluläre Proteine produzieren, die als Marker für eine Fibrose genutzt werden. Komplett ausdifferenzierte Myofibroblasten exprimieren unter anderem ACTA, welches gebündelt mit sogenannten Stress-Fasern entlang der Zellachse angeordnet wird (Darby et al. 1990). Die Expression von ACTA ermöglicht ihnen letztlich ihre kontraktilen Eigenschaften (Majno et al. 1971; Tomasek et al. 2002). Die ACTA-Menge hängt dabei direkt von der Myofibroblasten-Konzentration ab. In der gesunden Niere kann nur ein kleiner Teil von ACTA-positiven Zellen detektiert werden. Dabei handelt es sich in den meisten Fällen um vaskuläre glatte Muskelzellen (Hinz et al. 2001). Funktionell und morphologisch gesehen scheinen die Zellen einen Mischtyp aus einer glatten Muskelzelle und einem Fibroblasten darzustellen. Histomorphologisch sind sie durch ihre Spindelform, einem leicht eosinophilem Zytoplasma sowie einem Zellkern mit einzelnen Nukleoli gekennzeichnet. Sie weisen unregelmäßige Zellausläufer auf, die über Gap-Junctions mit anderen Zellen in Verbindung stehen (Luo et al. 2006). Sie produzieren Kollagen – im Besonderen Typ I und Typ III, Fibronectin und Laminin. Immunhistochemisch sind die Myofibroblasten positiv für Vimentin und ACTA (Tomasek et al. 2002; Kaissling und Le Hir 2008). Die Myofibroblasten sind jedoch nicht nur durch eine gesteigerte EZM-Synthese gekennzeichnet, sondern produzieren ebenfalls EZM-abbauende Enzyme und Wachstumsfaktoren. Über die Synthese von Zytokinen, wie zum Beispiel Interleukin-1, und Chemokinen, sind sie in der Lage modulierend in die Immunantwort einzugreifen (Strieter et al. 1989; Hinz et al. 2007). Die Myofibroblasten sind widerstandsfähiger und unterliegen nicht in dem gleichen Ausmaß der Apoptose wie es unter physiologischen Bedingungen der Fall

ist. Lin et al. konnten zeigen, dass im Interstitium einer fibrotischen Niere mehr als 80 % der Myofibroblasten Kollagen produzieren (Lin et al. 2008).

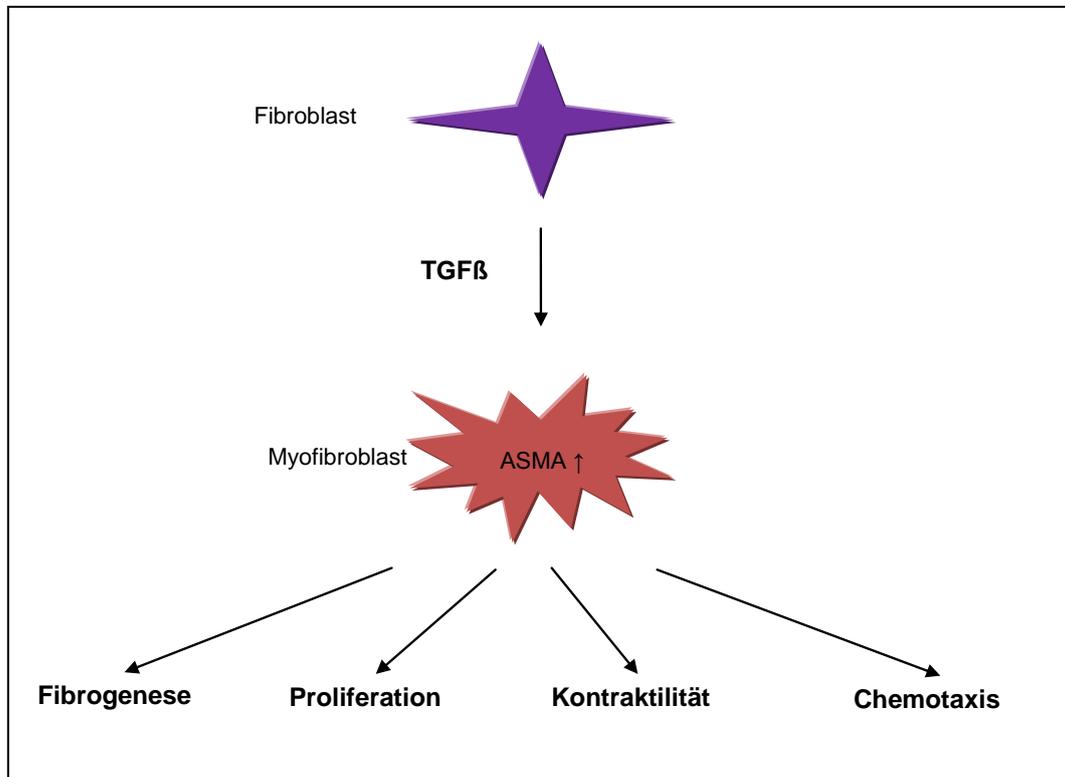


Abbildung 6: Übersicht über die Aufgaben der Myofibroblasten (modifiziert nach Tomasek et al. 2002).

Im Rahmen der Wundheilung kommt es nicht zuletzt wegen der Kontraktilität der Myofibroblasten zum Verschluss der offenen Wundfläche. Durch die exzessive Produktion und Ablagerung der extrazellulären Matrix entstehen schließlich Gewebekontraktionen, welche mit einem Funktionsverlust des Organs einhergehen (Tomasek et al. 2002; Hinz et al. 2007). In Abbildung 6 ist eine Übersicht über die Aufgaben und Funktionen der Myofibroblasten dargestellt (modifiziert nach Tomasek et al. 2002).

1.8. Was versteht man unter Proteomik?

Die Proteomik leitet sich vom Wort „Proteom“ ab und beschreibt die Erforschung desselben (Wasinger et al. 1995). Ein „Proteom“ beschreibt die Gesamtheit aller Proteine einer Zelle unter definierten Bedingungen und zu einem definiertem Zeitpunkt (Wilkins et al. 1996b). Somit beschreibt es die Gesamtheit der translatierten Proteine eines biologischen Systems zu einem bestimmten Zeitpunkt. Im Gegensatz zum Genom ist das Proteom nicht statisch sondern dynamisch, und kann sich sowohl qualitativ als auch quantitativ in Abhängigkeit von bestimmten Faktoren in seiner Zusammensetzung verändern. Eine Raupe und der aus ihr entstehende Schmetterling enthalten beide das gleiche Genom. Dennoch unterscheiden sie sich beide in ihrem Phänotyp aufgrund eines unterschiedlichen Proteoms.

Die Proteomik erlaubt es, eine Aussage hinsichtlich der Häufigkeit von posttranslationalen Modifikationen zu machen, sowie hinsichtlich der Korrelation zwischen Krankheitsbildern und Umweltfaktoren und Protein-Protein-Interaktionen (Westermeier und Scheibe 2008). Die Proteinforschung komplementiert somit die Genomforschung. Die Proteinbiosynthese ist ein sehr dynamisches Feld. Die Zelle reagiert durch die Synthese ihrer Proteine auf Einflüsse, denen sie ständig ausgesetzt ist.

Die Methoden der Proteomik sind derzeit die einzigen verfügbaren Methoden, um die gesamte Proteinmenge, die von einem Genom zu einem bestimmten Zeitpunkt exprimiert wird auf direktem Weg zu untersuchen. Sie ermöglichen die Identifizierung und die Auftrennung komplexer Proteingemische aus unterschiedlichsten Geweben und Organismen, und machen Proteine der gezielten Untersuchung zugänglich (Hanash et al. 2003).

Die proteomischen Methoden werden immer häufiger eingesetzt, um ablaufende Stoffwechselprozesse erfassen zu können und um molekulare Ursachen für Krankheitsentstehung wie Tumorentwicklung oder Chemoresistenz besser verstehen zu können (Anderson und Anderson 1998).

1.9. Ziel der Dissertation

Ziel dieser Arbeit ist es, anhand des Zellmodells aus etablierten immortalisierten Nierenfibroblasten aus gesunden Spendernieren, die Mechanismen der Fibroblasten-Induktion nach TGF β -1-Behandlung darzustellen, um Proteinmusteränderungen im Rahmen der Fibroseentstehung zu analysieren. Hierbei wurde ein von Müller und Rodemann etabliertes Zellmodell genutzt (Müller und Rodemann 1991), um die Veränderungen der Proteinmuster nach TGF β -1-Behandlung darzustellen. Folgende Zielsetzungen wurden an dieser Arbeit gestellt:

- Die Effekte der TGF β -1-Behandlung auf die Proteinexpression der humanen Fibroblasten (TK173)
- Die Identifizierung von Schlüsselproteinen nach TGF β -1-Behandlung, die in der Zellinduktion eine Rolle spielen
- Die Erörterung von Signalwegen, die im Zusammenhang mit der Fibroseentstehung eine wichtige Rolle spielen
- Potenzieller Nutzen für die Entwicklung therapeutischer Ansätze zur Verhinderung des Progresses von fibrotischen Umbauprozessen oder gar zur Reversibilität von fibrotischen Umbauprozessen

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Acetonitril	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Aceton	Merck, Darmstadt
30 % Acrylamid/ Bisacrylamid	Bio-Rad; München
Ameisensäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumbicarbonat (Ambic)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampholyte 3/10	Bio-Rad, München
Bradford-Reagens	Bio-Rad, München
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Butanol	Merck, Darmstadt
CHAPS	Merck, Darmstadt
DAPI	Vector Lab, Lössrasch
2,5-Dihydroxybenzoesäure-Matrix	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMEM Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, Steinheim
ECL-Reagenz Western Lighting [®] Plus	Perkin Elmer, Waltham
EDTA	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Fetales Kälberserum	Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamin 200 mM (100 x)	PAA Laboratorien, Pasching, Austria
Glycin	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Iodacetamid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magermilchpulver	Merk, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Mineralöl	Bio-Rad, München
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt

Material und Methoden

Phosphate buffered saline	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin (100 x)	PAA Laboratorien, Pasching, Austria
Phenylmethylsulfonylfluorid	Fluka, Seelze
Ponceau S Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Precision Plus Protein Standards	Bio-Rad, München
Roti-Blue	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Sodiumdodecylsulfat	Fluka, Steinheim
Streptomycin (100 x)	PAA Laboratorien, Pasching, Austria
N,N,N',N'-Tetramethylethylethylendamin	Invitrogen, Karlsruhe
Thiourea	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trifluoressigsäure(TFA)	Merck, Darmstadt
Tween 20	Merck, Darmstadt
Urea	Sigma-Aldrich, Steinheim
Western Lighting [®] Enhanced Luminal Reagent	Perkin Elmer Inc, Boston, USA
Western Lighting [®] Oxidant Reagent	Perkin Elmer Inc, Boston, USA

Enzyme

Trypsin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
---------	-----------------------------

Wachstumsfaktor

TGF β -1, humanes	R&D-Systems, Wiesbaden
-------------------------	------------------------

Antikörper und Antiseren

Anti-ACTA2 (Maus)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Anti-ERP57 (Kaninchen)	Stressgen Bioreagents, Victoria, Kanada
Anti-ERP72 (Kaninchen)	Stressgen Bioreagents, Victoria, Kanada
Anti-Fibronektin (Maus)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Anti-GRP78 (Kaninchen)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Anti-GRP94 (Kaninchen)	Stressgen Bioreagents, Victoria, Kanada
Anti-Mouse-IgG	Amersham Bioscience, USA
Anti-Rabbit-IgG	Amersham Bioscience, USA
Anti-Vimentin (Maus)	Dako, Hamburg

Lösungen

Ampholyte-Stammlösung	Bio-Lyte® pH 3-10, Bio-Rad, München Bio-Lyte® pH 5-8, Bio-Rad, München
BSA-Standard	1 mg/ml in Milli-Q
Extraktionslösung	60 % (v/v) ACN 0,1 % (v/v) TFA in H ₂ O
Fixierlösung	40 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Essigsäure
PBS	8,0 g/l Natriumchlorid (NaCl) 0,2 g/l Kaliumchlorid (KCL) 1,44 g/l Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) 0,24 g/l Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)
Standard-Kultur-Medium	DMEM 10 % (v/v) FCS 1 % (v/v) L-Glutamin 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin
1,5 M Tris-HCL pH 8,8	181,71 g/l Tris-HCL mit Salzsäure auf pH 8,8 einstellen
0,5 M Tris-HCL pH 6,8	60,57 g/l Tris-HCL mit Salzsäure auf pH 6,8 einstellen

Puffer

Bradford-Lösung (5 x)	Bio-Rad, München
Equilibrierungspuffer I	6 M Urea 0,375 M Tris-HCl 2 % (w/v) SDS, pH 8,8 20 % (w/v) Glycerin 2 % (w/v) DTT 0,001 % Bromophenolblau
Equilibrierungspuffer II	6 M Urea 0,375 M Tris-HCl 2 % (w/v) SDS, pH 8,8

	20 % (v/v) Glycerin
	2,5 % (v/v) IAA
	0,001 % Bromophenolblau
Lysepuffer	9,5 M Urea
	2 % (w/v) CHAPS
	1 % (w/v) DTT
	2 % (v/v) Ampholyte
MOPS-Puffer (20 x)	Bio-Rad, München
Probenpuffer (4 x)	4,3 ml ddH ₂ O
	2,5 ml 0,5 M Tris/HCL, pH 6,8
	5 ml Glycerin
	8 ml 10 % SDS
	200 µl Bromophenolblau
Transferpuffer (5 x)	25 mM Tris-HCl
	186 mM Glycin
	20 % (v/v) Methanol
	20 mM Tris-HCl
	150 mM NaCl
Tris-Glycin Electrophoresepuffer (5 x)	125 mM Tris
	1,25 M Glycin
	0,5 % (w/v) SDS
Rehydratationspuffer	6 M Urea
	2 % (w/v) CHAPS
	25 mM DTT
	0,2 % Ampholyte
	0,001 % Bromophenolblau
Trypsinpuffer	2 mM CaCl ₂
	10 mM NH ₄ HCO ₃
<u>Marker</u>	
Marker für Western-Blot	Precision Plus Protein, Kaleidoscope Standard von Bio-Rad, München
Marker für Elektrophorese	Page Ruler™ Unstained Protein Ladder von Fermentas Vilnius

Färbemethoden

Coomasie-Färbelösung	40 % (v/v) Methanol 40 % (v/v) H ₂ O 20 % (v/v) Roti-Blue
Flamingo [®]	Bio-Rad, München

2.1.2. Geräte

Elektrophoresekammer 13 x 11 cm	Criterion [®]	Bio-Rad, München
Elektrophoresekammer 8 x 7 cm	Mini-Protean [®]	Bio-Rad, München
Entwickler	Konica SRX-101 A	Taiwan
Fokussiersystem	Protean IEF Cell	Bio-Rad, München
Gelkammer		Bio-Rad, München
Geltrockner		Bio-Rad, München
Immunfluoreszenz Mikroskop	Zeiss Axiophot	Carl Zeiss, Jena
Inkubator	3548	Forma Scientific Inc, Ohio, USA
Laminar Air Flow	BSB 4A	Gelaire Flow Laboratories, Italien
Laserscanner	FLA 5100	Fuji, Europa
MALDI-TOF- Massenspektrometer	Voyager-DE STR	Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA
pH-Meter	Basic pH Meter pB-11	Sartorius, Göttingen
Photometer	Lambda 25	Perkin Elmar, Waltham
Q-TOF- Massenspektrometer	Ultima Global	Micromass, Manchester, UK
Schüttler	Duomax 1030	Heidolph Instruments, Schwabach
Spannungsquellen	Power-Pack 1000 Power Supply PS3002 2301 Macrodrive 1	Bio-Rad, München Gibco, Karlsruhe LBB, Uppsala
Speed Vakuum	SVC 10 CH	Savant, Holbrook, NY, USA
Sterilwerkbank	Typ CA/R	Clean Air, Woerden

Vortexer	REAX Top 2000	Heidolph Instruments, Schwabach
Waage	Universal	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Bandelin	Sonorex, Berlin
Western-Blotsystem	X Cell II™ Blot Module	Bio-Rad, München
Zentrifuge	Sigma 3-18K	Sigma, Osterode
Zentrifuge	Sigma 1-15PK	Sigma, Osterode
Zentrifuge	Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg

2.1.3. Verbrauchsmaterial

Einmal-Küvetten	Halb-Mikroküvetten	Sarstedt, Nürnberg
Eppendorf- Reaktionsgefäße	500, 1500, 2000 µl	Eppendorf, Hamburg
Fertiggele Criterion®	10 % Bis-Tris IPG 12 % Bis-Tris IPG 4-12 % Bis-Tris Gradientengele	Bio-Rad, München
Filterpapier		Bio-Rad, München
Gelfärbeschalen	14,3 x 10 cm	Roth, Karlsruhe
Handschuhe	Peha Soft	Hartmann
IPG-Streifen	Ready Strip™ 11 cm, pH 3-10 11 cm, pH 5-8	Bio-Rad, München
Nitrocellulosemembran		Amersham Biosciences, UK
Pipetten-Spitzen	10, 20, 100, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsröhrchen	15 bzw. 50 ml	Sarstedt, Nürnberg
Röntgenfilm		Konica, Hohenbrunn
Sterile Filter		Sarstedt, Nürnberg
Zellkulturflasche	BD Falcon™ 75 cm ²	BD, Heidelberg

2.1.4. Wissenschaftliche Software

Adobe Photoshop	Adobe Systems GmbH
Analysis Doku® Software	Soft Imaging Systems, Leinfelden, Germany
Data Explorer Voyager V5.0	MALDI-TOF Datenanalyse; Applied Biosystems, Laguna Beach, USA
Delta 2D Version 3.4	Decodon AG, Greifswald
Image J	Bildbearbeitung; http://rsbweb.nih.gov
Mascot	Proteindatenbank; http://www.matrixscience.com
Microsoft Excel	Microsoft Deutschland GmbH
Multi Analyst Version 1.1	Densitometrieanalyse; Bio-Rad, München
Swiss-Prot	Proteindatenbank; http://www.expasy.org/uniprot/
String 9.0	Bioinformatik-Datenbank: http://string-db.org/

2.1.5. Biologisches Material

Müller und Rodemann gelang es, zwei unterschiedliche Zelllinien als *in vitro*-Zellmodell zu etablieren. Dabei wurden nicht-fibrotische Nierenfibroblasten (TK173) aus gesunden Spendernieren und fibrotische Nierenfibroblasten (TK188) aus Biopsien von Nieren mit Glomerulonephritiden und tubulinterstitieller Fibrose gewonnen (Müller und Rodemann 1991; Rodemann et al. 1991). Beide Zelllinien wurden immortalisiert, wodurch die Zelllinien zu einem kontinuierlichen Anzüchten fähig waren. Die Immortalisierung erfolgte durch die Transfektion eines viralen Onkogens, das sogenannte große T-Antigen des SV-40 (Simian-Virus, ein Affenvirus). Ihre morphologischen und biochemischen Fähigkeiten behielten die Zellen bei (Müller et al. 1995). Dieses *in vitro*-Zellmodell ermöglichte unserer Arbeitsgruppe sowie vielen anderen Arbeitsgruppen mehrfach die Pathomechanismen und Progression der Nierenfibrose zu untersuchen (Strutz et al. 2001; Strutz et al. 2002; Lam et al. 2004; Dihazi et al. 2011; Eltoweissy et al. 2011). Für die vorliegende Arbeit wurden die nicht-fibrotischen interstitiellen Nierenfibroblasten (TK173) genutzt.

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

Hierbei wurden die Zellen als Monolayer in *dulbecco's modified eagle medium* (DMEM) mit einer Glucosekonzentration von 4,5 g/l unter Zusatz von 10 % fötalen Kälberserum (FCS) sowie von 1 % (v/v) 200 mM Glutaminlösung und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin kultiviert. Die Zellen wurden routinemäßig in 75 cm² Kulturflaschen bei 37 °C, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit sowie 5 % CO₂ im Brutschrank (3548, Forma Scientific Inc, Ohio, USA) angelegt. Alle 48 Stunden erfolgte unter sterilen Bedingungen ein Wechsel des Kulturmediums (Laminar-flow Technologie). Zuvor wurden die Zellen lichtmikroskopisch (ID 03, Zeiss, Göttingen) hinsichtlich der Zelldichte und eventueller Verunreinigungen bzw. Infektionen beurteilt. Im Anschluss wurden die Gewebekulturflaschen mit 5 ml PBS gespült, um nicht adhärente sowie abgestorbene Zellen zu entfernen.

2.2.2. Trypsinisierung der Zellen

Um einer unkontrollierten Apoptose entgegenzuwirken, durfte es zu keiner hohen Zelldichte in den Kulturflaschen kommen, so dass die Zellen in regelmäßigen Zeitabständen passagiert wurden. Hierfür wurden die Zellen, nach Entfernung des verbrauchten Kulturmediums, mit 10 ml PBS gewaschen und schließlich mit 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert. Nach etwa zwei bis drei Minuten wurden die Zellen durch Abklopfen vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Durch Zugabe von 10 ml Zellkulturmedium, konnte die Reaktion der Trypsinisierung gestoppt werden. Im Anschluss wurde die Zellsuspension auf zwei neue Zellkulturflaschen verteilt.

2.2.3. TGFβ-1-Behandlung der Zelle

Um die Pathomechanismen der TGFβ-1-assoziierten Fibroseentstehung besser zu verstehen, wurden drei biologische Replikate bestehend aus je einer Zellkultur einmal mit und einmal ohne TGFβ-1-Behandlung durchgeführt. Aus je einem biologischen Replikat erfolgten drei experimentelle Replikate, um die Reproduzierbarkeit zu gewährleisten.

Die TK173-Zellen wurden hierfür nach dem Waschen mit PBS zunächst für 24 Stunden in serumfreien DMEM kultiviert. Im Anschluss daran wurde 7,5 ng/ml humanes TGFβ-1 in 10 ml serumfreien DMEM für 48, 72, 96 Stunden hinzugefügt.

Für die Western-Blot-Analysen wurden die TK-173-Zellen für bis zu zwei Wochen mit TGF β -1 inkubiert. Hierfür wurde das Medium alle 27 Stunden mit TGF β -1 gewechselt.

2.2.4. Gewinnung des Zellextraktes

Wenn die Zellen in den Kulturflaschen die gewünschte Zelldichte erreicht hatten, wurden die adhären wachsenden Zellen durch Abschaben vom Boden der Zellkulturflaschen entnommen. Im Anschluss wurden die Kulturflaschen zweimal gründlich mit PBS-Puffer gespült und in Zentrifugenröhrchen gesammelt. Zwischen den Waschschrinen fand eine Zentrifugation mit 1200 Umdrehungen/min bei 4 °C für 5 min statt (Sigma 3-18K, Sigma, Osterode). Anschließend wurde dem Zellpellet zwischen 50 und 100 μ l Lysepuffer (9,5 M Urea, CHAPS 2 % (w/v), Ampholyte 2 % (w/v), DTT 1 % (w/v) (frisch hinzugegeben), 10 nM PMSF (frisch hinzugegeben)) hinzugefügt und bis zur vollständigen Klärung mit intermittierender Durchmischung auf Eis gelegt (ca. 30 min). Nach vollständiger Klärung erfolgte eine zweimalige Abzentrifugation des Zelllysats mit je 15000 Umdrehungen/min bei 4 °C für je 30 min (Biofuge 15R, Heraeus Sepatech, Berlin). Schließlich konnte der Überstand in Aliquots bei -20 °C bis zur Benutzung aufbewahrt werden.

2.2.5. Proteinanreicherung mittels Acetonfällung

Um den Salzgehalt der Proteine zu reduzieren sowie die Proben zu konzentrieren, erfolgte eine Proteinfällung. Die Löslichkeit eines Proteins in einem hydrophilen Milieu hängt von den Seitenketten der Aminosäuren jenes Proteins ab. So sind hydrophile Reste in Wasser gut löslich, während hydrophobe Reste in Wasser schlecht löslich sind.

Aceton ist chemisch das einfachste Keton. Es ist farblos und in Wasser gut lösbar. In Wasser gelöst stört Aceton die Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und Wasser, wodurch die Hydratisierung der Proteine abnimmt. Dadurch werden die polaren Seitenketten freigelegt, die dann miteinander interagieren und schließlich ausfällen können.

Bei der Acetonfällung wurden die Proben im Verhältnis 1:3 mit eiskaltem Aceton vermischt und bei -20 °C über Nacht inkubiert. Im anschließenden Schritt wurden die Proteinproben für 20 min bei 4 °C mit 14000 Umdrehungen/min (Biofuge 15R, Heraeus Sepatech, Berlin) zentrifugiert.

Nach der Sedimentation wurde der Überstand verworfen und das Proteinpellet zweimalig mit eiskaltem Aceton gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur für etwa 30 min luftgetrocknet. Abschließend erfolgte die Aufnahme des Pellets in Rehydratationspuffer (8 M Urea, CHAPS 1 % (w/v), Ampholyte 0,2 % (v/v) (frisch hinzugegeben), 15 mM DTT (frisch hinzugegeben)). Nach Auflösung im Rehydratationspuffer erfolgte die Proteinbestimmung nach Bradford wie im Folgenden beschrieben (Bradford 1976).

2.2.6. Proteinbestimmung nach Bradford

Bei der Proteinbestimmung nach Bradford wird sich zunutze gemacht, dass es durch die Bindung des Triphenylmethanfarbstoffs *Coomassie Brilliant Blue G-250* an Proteine zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums kommt (Bradford 1976). Durch diese Komplexbildung verschiebt sich das Absorptionsspektrum von 465 nm auf 595 nm.

Je mehr Proteine eine Probe enthält, um so mehr wird von dem Farbstoff gebunden. Mittels der zunehmenden Absorption des Protein-Coomassie-Gemisches und einer Referenzlösung bekannter Konzentration kann man eine Eichkurve erstellen. Für die Referenzlösung wurde eine BSA-Stammlösung (1 mg/ml) als Standard verwendet. Um eine Kalibrierkurve zu erhalten, wurden eine Standard- und eine Kontrollreihe mit verschiedenen Konzentrationen nach einem Pipettierschema (Tabelle 3) erstellt. Nach 10 min Inkubationsdauer bei Raumtemperatur konnten die optischen Dichten mit dem Photometer Lambda (Perkin-Elmer & Co GmbH, Stuttgart) gemessen werden.

Anhand der Verdünnung der Probe, dem Probenvolumen und dem Leerwert des Probenpuffers errechnete sich schließlich durch die Eichkurve die Proteinkonzentration der jeweiligen Proteinprobe.

Tabelle 3: Pipettierschema für die Proteinbestimmung (Bradford 1976).

BSA-Stammlösung (1 mg/ml) (µl)	H ₂ O (µl)	Bradford-Reagenz (µl)
0	800	200
2	798	200
4	796	200
6	794	200
8	792	200
10	790	200

2.2.7. Isoelektrische Fokussierung

Bei der isoelektrischen Fokussierung, der sogenannten ersten Dimension der zweidimensionalen Gelelektrophorese (O'farrell 1975), werden die Proteine einer Probe nach ihrem isoelektrischen Punkt getrennt. Die Auftrennung wird durch die verschiedenen Aminosäure-Residuen, die über verschiedene Ladungen verfügen, ermöglicht. Bei pH-Werten oberhalb des isoelektrischen Punktes ist das Protein negativ geladen und wandert zur Anode, unterhalb trägt es eine positive Ladung und wandert zur Kathode. Am sogenannten isoelektrischen Punkt haben die Proteine im pH-Gradienten eine Nettoladung von Null und sind damit im elektrischen Feld keinen Spannungen mehr ausgesetzt. Man spricht hierbei von der isoelektrischen Fokussierung, da jedes Protein an seinem spezifischen isoelektrischen Punkt im elektrischen Spannungsfeld fokussiert wird.

In dem hier benutzten System, erfolgte die Trennung über einen immobilisierten pH-Gradienten aus Acrylamidmatrix. Dabei wird der pH-Gradient durch amphotere Substanzen erzeugt, die kovalent an die Gelmatrix gebunden sind. Diese Gelmatrix wird im getrockneten und gefrorenen Zustand geliefert (IPG-Streifen).

Das zu fokussierende Proteingemisch mit 150 µg (pH 3-10) bzw. 200 µg (pH 5-8) Proteingehalt wurde auf ein Endvolumen von 185 µl gebracht. Diesem Proteingemisch wurden noch 5 µl Bromophenolblau zur Visualisierung der Proteinwanderung im Gelstreifen hinzugegeben. Die Proteinproben wurden direkt in die Fokussierungskammer (Protean IEF Cell, Bio-Rad, München) appliziert. Anschließend fügte man einen 11 cm langen IPG-Streifen mit einem pH-Bereich von 3-10 oder 5-8 (Bio-Rad, München) hinzu, welcher das Proteingemisch letztlich

resorbierte. Nach etwa 60 min wurde der IPG-Streifen mit Mineralöl beschichtet, um ihn vor Austrocknung zu schützen. Für eine passive Gelrehydratation wurde der Streifen über Nacht für mindestens 12 Stunden bei 20 °C in der Fokussierungskammer mit der Proteinprobe inkubiert. Die isoelektrische Fokussierung mit Protean IEF Cell (Bio-Rad, München) wurde dann am Folgetag bei 20 °C mit unterschiedlichen Spannungen durchgeführt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Fokussierungsprogramm IPG-Streifen 11 cm.

Schritt	Volt	Zeit	Funktion
1	500 V	1 h	Proteineintritt
2	1000 V	1 h	Proteineintritt
3	8000 V	4 h	Fokussierung

Nach erfolgreicher isoelektrischer Fokussierung wurde der Streifen aus der Fokussierkammer entnommen und vom Öl befreit. Anschließend wurde der Streifen für jeweils 20 min mit Equilibrierpuffer I (6 M Urea, Glycerol 30 % (w/v), SDS 2 % (w/v), 0,05 M Tris-HCl pH 6,8, 50 µl Bromphenolblaulösung (Bromphenolblau 0,25 % (w/v), 1,5 M Tris-HCl pH 8,8) und 100 mg DTT) und Equilibrierpuffer II (6 M Urea, Glycerol 30 % (w/v), SDS 2 % (w/v), 0,05 M Tris-HCl pH 6,8, 50 µl Bromphenolblaulösung (Bromphenolblau 0,25 % (w/v), 1,5 M Tris-HCl pH 8,8) und 400 mg IAA) inkubiert, um die Proteinprobe auf dem IPG-Streifen für die SDS-PAGE vorzubereiten. Während der Inkubation mit DTT kommt es zu einer Reduktion der Cysteinreste der Proteinproben. Im zweiten Equilibrierschritt kommt es mittels IAA zur Carbamidomethylierung. Dies ist erforderlich, damit sich reduzierte Disulfidbrücken während der zweiten Dimension (SDS-PAGE) nicht wieder verbinden.

2.2.8. SDS-Polyacrylamidgel

Die SDS-PAGE, die sogenannte zweite Dimension der zweidimensionalen Gelelektrophorese, ist eine Methode, die zur Auftrennung von Proteinen führt. Die Auftrennung erfolgt dabei in einem elektrischen Feld in Abhängigkeit von der Proteingröße. Diese Methode wurde in modifizierter Weise nach Laemmli (Laemmli

1970) durchgeführt. Die Detergente Natriumdodecylsulfat (SDS) führt zu einer Denaturierung der Tertiärstruktur sowie zu einer Markierung der Ladung eines Proteins. Dies gewährleistet, dass die Proteine im elektrischen Feld ausschließlich ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Des Weiteren unterbindet SDS Protein-Protein-Wechselwirkungen. Die denaturierten Proteinproben wurden zur Auftrennung auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen, an welchem eine Spannung angelegt war. Die fertig equilibrierten Gelstreifen wurden vorsichtig zwischen den Platten auf das SDS-Polyacrylamidgel (Criterion XT Bis-Tris, Bio-Rad, München) aufgesetzt. Die gesamte Gelkassette wurde anschließend in die Elektrophoresekammer (Protean II XL Cell, Bio-Rad, München) mit zentralem Kühlblock platziert und mit einfach konzentriertem Elektrophoresepuffer (5 x konzentrierter Elektrophoresepuffer: Tris 15 g, Glycerin 72 g, SDS 5 g, auf 1 l H₂O aufgefüllt) aufgefüllt. In dem elektrischen Feld wandern kleine Proteine schnell durch das Acrylamid-Gel, während größere Proteine länger brauchen.

In dieser Arbeit wurde mit Fertiggelen der Firma Bio-Rad gearbeitet, den sogenannten Criterion XT Bis-Tris. Je nach molekularer Größe der zu trennenden Proteine, wählt man zwischen 10 %, 12 % oder 4-12 %ige Fertiggele. Die Criterion XT-Gelsysteme sind etwa 13 x 8 cm groß und 1 mm dick. Ihre Laufzeit beträgt in etwa eine Stunde bei konstanten 200 Volt.

Zum Molekulargewichtsabgleich standen zwei Marker zur Verfügung. Mit dem Marker 2 konnten alle Banden mittels Flamingo[®]-Färbung (s. u.) sichtbar gemacht werden, während man den Marker 1 (Precision Plus Protein Standards) vornehmlich für Western Blots aufgrund der vorgefärbten Banden nutzte.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele aus den Glasplatten herausgelöst und gefärbt.

2.3. Gelfärbemethoden

Proteine auf Polyacrylamidgelen können mit unterschiedlichen Färbemethoden visualisiert werden.

2.3.1. Flamingo®-Färbung

Bei der Flamingo®-Färbung handelt es sich um eine fluoreszenzbasierte Proteinfärbungsmethode der Firma Bio-Rad. Die genaue Zusammensetzung des Produktes ist nicht erhältlich.

Das Protokoll der Färbung ist vergleichbar mit der Coomassiefärbung. Nach dem Gellauf wurde das Gel für mindestens zwei Stunden fixiert (40 % Ethanol, 10 % Essigsäure) und anschließend für mindestens drei Stunden mit der Färbelösung inkubiert. Weitere Waschschritte waren nicht erforderlich. Die Gele ließen sich anschließend mit der 473 nm oder der 532 nm Laserlinie mit dem Fuji FLA-5100 Fluoreszenz-Laserscanner (Fujifilm, Düsseldorf) digitalisieren.

2.3.2. Kolloidale Coomassiefärbung

Coomasie-Brilliant-Blau ist ein Triphenylmethanfarbstoff. Die Nachweisgrenze für Proteine liegt zwischen 50-100 ng. Dabei wurden die Gele nach einem modifiziertem Protokoll nach Neuhoff et al. (Neuhoff et al. 1988) gefärbt.

Bei der kolloidalen Coomasiefärbung kommt es zu elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen zwischen der Sulfonat-Gruppe der Coomasiefärbung und den positiv geladenen Aminosäure-Residuen.

Nach dem Gellauf wurde das Gel für mindestens zwei Stunden in Fixierlösung (40 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure) fixiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation über Nacht in Coomasie-Brilliant-Blau ((20 % (v/v) Roti-Blue, 40 % (v/v) Methanol, 40 % (v/v) ddH₂O). Im Anschluss wurden die Gele mehrmals mit 20 % (v/v) Ethanol und 5 % (v/v) Essigsäure entfärbt. Die Coomasiefärbung kam hauptsächlich nach der Färbung der Gele mit Flamingo® zum Einsatz.

2.4. Digitalisierung der Gele

Mittels des Fuji FLA-5100 Fluoreszenz-Laserscanners erfolgte die Digitalisierung der Gele. Hierbei handelt es sich um ein modular aufgebautes System, das mit vier Laserlinien (473 nm, 532 nm, 635 nm, 650 nm) und zwei Detektoren versehen ist. Die Empfindlichkeit des Systems wird über die Spannung (250-1000 V) der zwei Photomultiplier variiert. Dabei richtet sich die Einstellung der Spannung nach der Intensität der Gele. Um ein gutes Signal- zu Rauschverhältnis (S/N-Ratio) zu bekommen, ist die Spannung so gering wie nötig zu wählen. In den Experimenten

reichte eine Spannung von 400-500 V für beide Kanäle aus, um eine gute Intensität zu erreichen. Für Criterion-Gele wurde eine Auflösung von 50 $\mu\text{m}/\text{Pixel}$ in 16-bit Farbtiefe gescannt. Für qualitative Analysen wurde das TIF-Format gewählt

2.5. Statistische Auswertung der Gele

Zur quantitativen Auswertung der Gele wurde die Software Delta 2D der Decodon AG in der Version 3.4 verwendet. Dabei waren nur Gele zulässig, die keine digitale Nachbearbeitung erfahren haben. Lediglich die Operationen Spiegeln, Beschneiden und Drehen um 90°, 180° und 270° waren zulässig.

Es wurden zunächst die Spots eines Gels mit Spots eines anderen Gels durch sogenanntes *image warping* miteinander verbunden. So ließ sich ein Fusionsgel erstellen, welches sämtliche Spots und Intensitäten der Einzelgele besaß (Abbildung 12).

Für die Darstellung der Regulationsunterschiede und ihrer statistischen Signifikanz wurde für jedes Spot das relative Verhältnis der normierten Intensität, die Standardabweichung und der t-Test berechnet. Ein Protein galt als signifikant in seiner Expression reguliert, wenn der errechnete Quotient aus dem Vergleich Probe zu Kontrolle einen Wert von 2 für eine Hochregulierung, oder einen Wert von 0,5 für eine Herunterregulierung bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit (p -Wert) von $p < 0,05$ aufwies.

2.6. Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ermöglicht es, Ionen zu produzieren und diese im Hochvakuum nach ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z) zu trennen. Dabei besteht das Massenspektrometer aus einer Ionenquelle, einem Massenanalysator sowie einem Ionendetektor (Shevchenko et al. 1996). Als Ergebnis erhält man ein Massenspektrum, in dem die m/z -Werte der Ionen gegen ihre relative Häufigkeit aufgetragen sind.

2.6.1. Ionenerzeugung mit MALDI

Die *matrix assisted laser desorption ionization* (MALDI) wurde in den 1980er (Karas und Hillenkamp 1988) entwickelt. Es gilt als besonders schonendes Verfahren zur Ionisation, da intakte Molekülionen entstehen. Bei MALDI werden Proteine auf einen

Probenträger in Kristalle von UV-absorbierenden Molekülen eingebaut. Proteine werden durch diese UV-absorbierenden Moleküle mit Protonen beladen. Dadurch erhalten die Proteine positive Ladungen. Die absorbierenden Moleküle, welche in dieser Arbeit genutzt wurden, sind 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB). Nach dem Auftragen auf den Probenträger kondensierte DHB, kristallisierte sich mit den zu analysierenden Proteinproben aus und vermischte sich zu einem sauren Milieu.

Der Identifizierungsvorgang lässt sich in vier Teilschritte unterteilen:

1. Verdau durch Trypsin
2. Kokristallisation von DHB und der Proteinprobe
3. Ionisierung durch Laserbeschuss der Proteinprobe
4. Peakdetektion und Datenbankabgleich

Im eigentlichen Ionisierungsprozess werden die Kristallkomplexes, aus der zu analysierende Proteinprobe und DHB, in eine Vakuumkammer des Massenspektrometers gelegt, um mit einem UV-Laser-Puls bestrahlt zu werden. Dies führt letztlich dazu, dass die Proteinionen explosionsartig freigesetzt werden. Es kommt zur Desorption und gleichzeitig zur Ionisation der Proben, so dass ein- bis zweifach protonierte Ionen entstehen (Abbildung 7).

2.6.2. Ionentrennung mit dem TOF-Analysator

Vor Eintritt in den Analysator werden die Ionen in einem elektrischen Feld beschleunigt. Das Feld führt letztlich dazu, dass die Ionen in einer bestimmten Zeit eine definierte Geschwindigkeit erreichen, die von Masse und Ladung beziehungsweise vom Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z) abhängt. Mit dieser Geschwindigkeit, einschließlich der Anfangsgeschwindigkeit, fliegen die Ionen durch einen Schlitz in ein feldfreies und ca. zwei Meter langes Vakuum-Flugrohr, dem sogenannten Flugzeitanalysator oder *time of flight* (TOF). Da das Rohr feldfrei ist, werden die Ionen nicht länger beschleunigt, sondern fliegen mit der erreichten Geschwindigkeit weiter bis sie auf den Detektor treffen (Abbildung 7). Durch die unterschiedlichen Geschwindigkeiten der Ionen erreichen sie den Detektor zu verschiedenen Zeiten. Diese Zeiten werden schließlich gemessen. Die Flugzeit ist proportional zur Wurzel des Masse-zu-Ladung-Verhältnisses. Mithilfe eines Photomultipliers werden die Proteine anschließend detektiert (Rehm H. 2010). So

ergibt sich für ein Protein ein charakteristisches Spektrum, dass mit einer Datenbank abgeglichen werden kann.

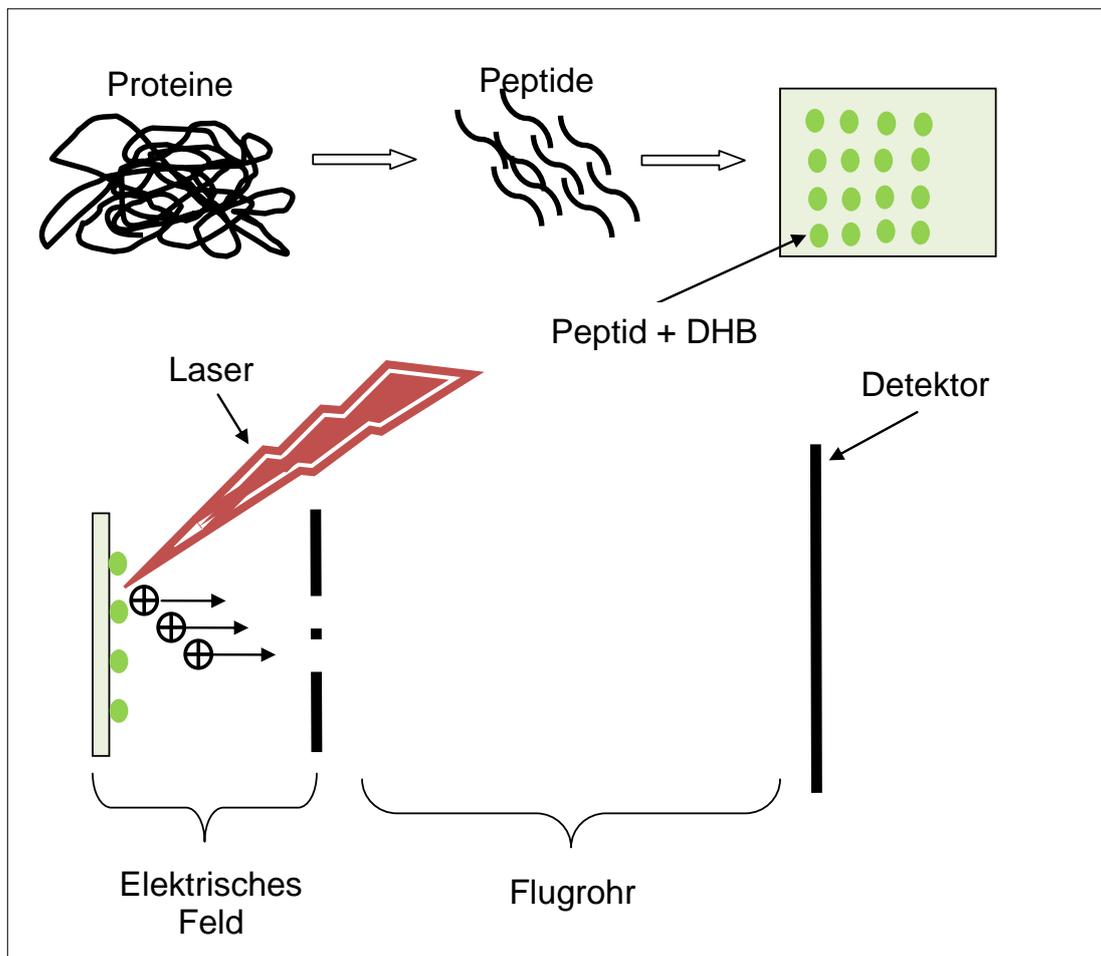


Abbildung 7: Schematische Darstellung des tryptischen Verdauens und der anschließenden *peptid mass fingerprint*-Analyse eines Proteins mittels MALDI-TOF-MS (modifiziert nach Rehm 2010).

2.6.3. Ionentrennung mit dem Quadrupol-Analysator

Beim Quadrupol-Massenspektrometer werden die entstandenen Ionen durch ein Feld aus vier Metallstäben beschleunigt. Durch das Anschließen eines oszillierenden elektrischen Feldes an das Spektrometer entsteht ein Massenfilter, der zu einem bestimmten Zeitpunkt nur für Ionen mit einem bestimmten Masse-zu-Ladungs-Verhältnis durchlässig ist.

2.6.4. Sequenzierung der Peptide

Durch das Hintereinanderschalten von mehreren Massenanalysatoren wird die Sequenzierung der Proteine ermöglicht. Die Proteinidentifizierung in dieser Arbeit erfolgte mit MALDI-TOF und Q-TOF. In einer Q-TOF-Massenspektrometrie erfolgte die Kombination aus einem Quadrupol- mit einem TOF-Massenanalysator.

Die Analyse der stark und mittel angefärbten Spots erfolgte mit dem MALDI-TOF-Massenspektrometer. Die Analyse der schwach angefärbten Spots erfolgte dagegen mittels Q-TOF-Massenspektrometer. Dabei wurden folgende Kriterien für die Wahl der Einstellung gewählt:

- MALDI-TOF:
 - Mindestens 30 % Sequenzabdeckung
 - +/- 50 ppm als erlaubte Massentoleranz eines einfach protonierten monoisoptischen Peptides ($[M+H]^+$)
- Q-TOF:
 - Mindestens zwei übereinstimmende Peptidsequenzen
 - +/- 100 ppm als erlaubte Massentoleranz eines mehrfach protonierten Peptides ($[M+H]^{n+}$)

2.6.5. Enzymatischer Verdau der Proteine im SDS-Polyacrylamidgel

Um die Proteine aus den zweidimensionalen Gelen identifizieren zu können, mussten sie zunächst punktuell aus dem Gel herausgeschnitten werden. Zu diesem Zweck wurde eine Hohnadel, der sogenannte Spotpicker, mit einem Durchmesser von 2 mm benutzt. Mit Hilfe dieser Hohnadel wurden die Proteinspots aus dem Gel gestochen und anschließend tryptisch verdaut. Es wurden fast ausschließlich Proteinspots aus Gelen bearbeitet, die mit kolloidalem Coomassie angefärbt waren. Bei dieser Methodik war insbesondere darauf zu achten, dass es zu keiner Kontamination mit Keratin kommt. Grob lässt sich der Verdau in vier Schritte einteilen:

1. Entfärbung
2. Entwässern
3. Verdau
4. Extraktion

Im ersten Schritt wurden die herausgeschnittenen Gelstückchen je nach Verunreinigung mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen. Im nächsten Schritt (Entfärbung) wurde 50 % (v/v) Acetonitril für etwa 15 min hinzugefügt. Danach tauschte man 50 %iges (v/v) Acetonitril gegen 100 %iges (v/v) Acetonitril aus, worin die Proben bis zur Farblosigkeit verweilten. Im Anschluss daran (Entwässern) wurde den Proben noch 100 mM Ammoniumbicarbonat hinzugefügt. Im weiteren Verlauf wurde erneut 100 % (v/v) Acetonitril hinzugegeben. Nach etwa 15 min der Inkubation wurde das Lösungsmittel verworfen und die Proben wurden in der *speed vacuum*-Zentrifuge (SVC 10 CH, Savant, Holbrook, NY, USA) getrocknet. Im anschließenden Schritt (Verdau) wurden die Proteine mit Trypsinpuffer (Verdaupuffer (1 M Calciumchlorid 5 µl, 1 M Ammoniumbicarbonat 25 µl, H₂O 970 µl) 100 µl, 0,1 µg/µl-konzentrierte Trypsinstammlösung 12,5 µl) für 45 min auf Eis inkubiert. Dabei spaltete Trypsin enzymatisch jeweils nach den Aminosäuren Arginin und Lysin. Nach dieser Inkubation wurde der Trypsinpuffer entfernt, und den Proben wurde Verdaupuffer ohne Trypsin für weitere 12 Stunden bei 37 °C hinzugefügt. Im abschließenden Schritt wurde den Proben 2 % (v/v) TFA hinzugegeben, um die Reaktion des Spaltens zu stoppen. Für die Extraktion der Peptide wurden die Proben zunächst mit 0,1 % TFA versetzt und für etwa 30 min im Ultraschallbad (Bandelin, Sonorex, Berlin) inkubiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Zunächst mit 30 % (v/v) Acetonitril in 0,1 % TFA und schließlich mit 60 % (v/v) Acetonitril in 0,1 % TFA.

Nach dem Trocknen konnte man die Proben entweder direkt für die Messung vorbereiten oder bis zum Gebrauch bei -20 °C aufbewahren.

2.6.6. Entsalzen der Proteinproben

Um Salze aus den Proben entfernen zu können, wurden *ZipTip*-Säulen (Millipore, Billerica, USA) benutzt. Die Entsalzung erfolgte nach einem Protokoll des Herstellers. Die Elution wurde mit 50 % (v/v) Acetonitril und 50 % (v/v) 0,1 % TFA durchgeführt. Anschließend wurden die Proben mit der *speed vacuum*-Zentrifuge (SVC 10 CH, Savant, Holbrook, NY, USA) getrocknet. Für die Analyse mit dem MALDI-TOF-Massenspektrometer (Voyager DE-STR, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) wurden die Proben in 0,1 %igem TFA gelöst. Für die Analysen mit Q-TOF-Ultima-Massenspektrometer (Ultima Global, Micromass, Manchester, UK) wurden die Proben in 0,1 %iger Ameisensäure gelöst.

2.6.7. Auftragen der Proben auf MS-Probenträger

Hierbei wurden je 1 µl des Peptidextrakts mit 1 µl der DHB-Lösung (20 µg/µl Matrix, 0,1 %igem TFA, 30 % ACN) auf einem MALDI-Target aus Edelstahl pipettiert und vermischt. Dies führte letztlich zur Überführung der gespaltenen Peptide aus dem soliden Aggregatzustand in die Gasphase. Nach dem Auftragen der beiden Komponenten, verflüchtigte sich das Lösungsmittel und die Matrix kristallisierte sich mit den zu analysierenden Molekülen aus. Die Messung wurden mittels MALDI-TOF-Massenspektrometer (Voyager DE-STR, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) durchgeführt.

2.6.8. Massenspektrometrische Analyse des Proteinverdaus

Die Messung der verdauten und gespotteten Peptide erfolgte am Voyage-DE-STR-Massenspektrometer der Firma Applied Biosystems mit einem Stickstofflaser (337 nm) mit etwa 50 Laserschüssen und einer Beschleunigungsspannung von etwa 20 kV. Zudem wurde im *delayed reflector*-Modus gearbeitet, da dies ein erhöhtes Auflösungsvermögen gewährleistete.

Um eine genaue Messung gewährleisten zu können, erfolgte vor jeder Messung eine Kalibrierung. Somit wurden die erhaltenen Spektren mit dem bekannten Spektrum der Kalibrierungsprobe in Relation gesetzt. Die Kalibrierung der Messungen erfolgte mittels des Sequazyme™ *peptide mass standards kit* (Applied Biosystems), das eine Mischung hochreiner Peptide mit bekannten Massen enthielt. Die monoisotopischen Massen $(M+nH)^+$ waren wie folgt: des-Arg¹-Bradykinin (904,4681 m/z), Angiotensin I (1296,6853 m/z), Glu¹-Fibrinopeptid B (1672,9175 m/z), Neurotensin (1672,9175 m/z), ACTH (clip 1-17) (2093,0867 m/z) und ACTH (clip 18-390) (2465,1989 m/z).

2.6.9. Proteinidentifizierung durch die Zuordnung von Peptidmassenmuster

Durch den tryptischen Verdau des zu analysierenden Proteins ergab sich ein spezifisches Massenspektrum, welches ein charakteristisches Fingerabdruck darstellte.

Um ein Protein anhand seines Massen-Fingerprints zu identifizieren, wurden die Spektren mit einer Proteindatenbank (Swiss-Prot) abgeglichen. Die Massen in den Datenbanken wurden durch eine theoretische Spaltung mit Trypsin errechnet. Als Beispiel sind in Abbildung 8 die Massen für PRDX-1 aufgelistet.

PRDX1 HUMAN							
Mass: 22324		Score: 131		Expect: 1.5e-09		Queries matched: 12	
Peroxiredoxin-1 - Homo sapiens (Human)							
Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
751.5510	750.5437	750.3912	0.1525	63 -	68	1	R.AEEFKK.L
819.5970	818.5897	818.4134	0.1763	152 -	158	0	R.SVDETLR.L
894.6220	893.6147	893.4243	0.1904	121 -	128	0	K.ADEGISFR.G
920.6760	919.6687	919.5015	0.1672	129 -	136	0	R.GLFIIDDK.G
980.7080	979.7007	979.5239	0.1768	8 -	16	0	K.IGHAPAPFK.A
1107.8110	1106.8037	1106.5972	0.2066	111 -	120	0	R.TIAQDYGVLK.A
1180.7680	1179.7607	1179.5594	0.2013	17 -	27	0	K.ATAVMPDGGQFK.D + Oxidation (M)
1196.8420	1195.8347	1195.6237	0.2110	159 -	168	0	R.LVQAFQFTDK.H
1211.9080	1210.9007	1210.6670	0.2337	141 -	151	0	R.QITVNDLPVGR.S
1360.0760	1359.0687	1358.7922	0.2765	129 -	140	1	R.GLFIIDDKGILR.Q
1639.0850	1638.0777	1637.8447	0.2330	94 -	109	0	K.QGGLGPMNIPLVSDPK.R + Oxidation (M)
1795.2200	1794.2127	1793.9458	0.2669	94 -	110	1	K.QGGLGPMNIPLVSDPKR.T + Oxidation (M)

Abbildung 8: Auflistung der Massen, die im Rahmen einer Analyse mit der Swiss-Prot-Proteindatenbank für PRDX-1 abgeglichen werden konnten.

Mithilfe des Suchprogramms *mascot* (<http://www.matrixscience.com/>) wurde die Datenbank nach passenden Peptid-Fingerprints durchsucht und anschließend ein Score, der sogenannte MOWSE-Score, für die Signifikanz der Übereinstimmung vergeben (Abbildung 9).

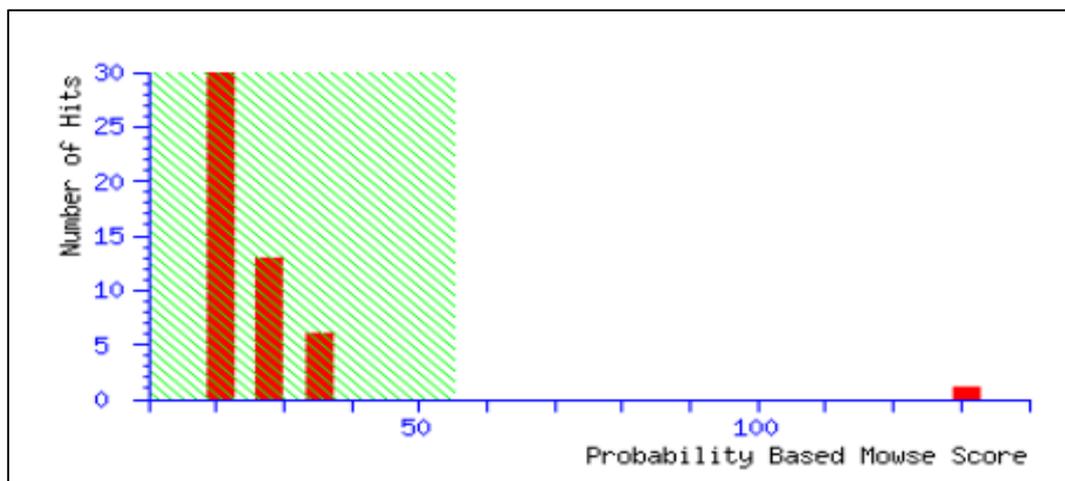


Abbildung 9: Die Wahrscheinlichkeit des korrekten Datenbankabgleichs: Der MOWSE-Score für PRDX-1.

Die Standardsuchparameter des Datenbankabgleichs mit der Swiss-Prot -Datenbank sind in der Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Standardsuchparameter des Datenbankabgleichs.

Feld	Variable
Spezies	Human
Enzym	Trypsin
Toleranz	+/- 0,2 kDa
Ladungszahl	1+
MOWSE Signifikanzgrenze	55
Maximale Anzahl verpasster Trypsinspaltstellen	1
Irrtumswahrscheinlichkeit	0,05
Erlaubte Modifikation	Oxidation von Methionin, Veränderungen an Cysteinresten

2.7. Western-Blot-Analysen

Zur Bestätigung der Ergebnisse der zweidimensionalen Gelelektrophorese wurden Western-Blot-Analysen, anhand eines modifizierten Protokolls nach Towbin durchgeführt (Towbin et al. 1992). Beim Western-Blot kommt es zum Transfer der aufgetrennten Proteine von einer Gelmatrix auf eine Trägermembran. In diesem Fall fand der Transfer von der SDS-PAGE auf eine Nitrocellulose-Membran durch ein angelegtes elektrisches Feld statt.

Für die SDS-PAGE wurden Mini-Gele in zwei Polymerisationsschritten angefertigt, bestehend aus einem Trenngel (10 %, 12 %, 15 %) sowie aus einem 4 %igem Sammelgel. Zur Verbesserung der Bandenschärfe diente das Sammelgel, das über dem Trenngel gegossen wurde, sobald es fest wurde. Das Sammelgel wurde mit Probenaschen versehen, indem ein Probenkamm eingeführt und nach dessen Erstarren entfernt wurde. In Tabelle 6 und 7 sind die Zusammensetzungen des Trenngels (10 %, 12 %, 15 %) und des Sammelgels dargestellt.

Tabelle 6: Zusammensetzung der Trenngelösungen pH 8,8.

	10 %	12 %	15 %
ddH ₂ O	10 ml	10,2 ml	7,2 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	6,25 ml	7,5 ml	7,5 ml
SDS 10 % (w/v)	250 µl	0,15 ml	0,15 ml
Acrylamid 30 % (w/v)	8,25 ml	12 ml	15 ml
Entgasen für 5-10 min			
APS 10 % (w/v)	125 µl	0,15 ml	0,15 ml
TEMED	12 µl	0,02 ml	0,02 ml

Tabelle 7: Zusammensetzung des 4 %igen Sammelgels pH 6,8.

Sammelgel	
ddH ₂ O	15 ml
1,5 M Tris-HCl pH 6,8	6,3 ml
Acrylamid	3,3 ml
SDS 10 % (w/v)	250 µl
APS 10 % (w/v)	125 µl
TEMED	25 µl

Für die Analyse wurden 60 µg Proteinprobe verwendet und mit Probenpuffer auf 20 µl verdünnt. Im Anschluss wurden die Proben bei 97 °C für 10 min denaturiert, um schließlich gelelektrophoretisch aufgetrennt zu werden (Laufprogramm: 200 V für ca. 1 h). Auf das Gel wurde eine Nitrocellulose-Membran (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) gelegt, welche zuvor für 15 min mit einfach konzentriertem Transferpuffer (fünffach konzentrierter Transferpuffer: 950 mM Glycerin, 125 mM Tris, SDS 0,05 % (w/v), Methanol 2 % (v/v), auf 1L H₂O aufgefüllt) equilibriert wurde. Gel und Membran wurden zwischen zwei Filterpapiere und zwei Schwämmen gelegt, die mit einfach konzentriertem Transferpuffer gesättigt waren. Das entstandene Konstrukt aus Gel, Membran, Filterpapier und Schwämmen wurde in die Blottingapparatur (XCell II™ Blot Module, Bio-Rad, München) montiert, mit einfach konzentriertem Transferpuffer vollständig aufgefüllt und bei 30 V und 4 °C über Nacht geblottet (Abbildung 10).

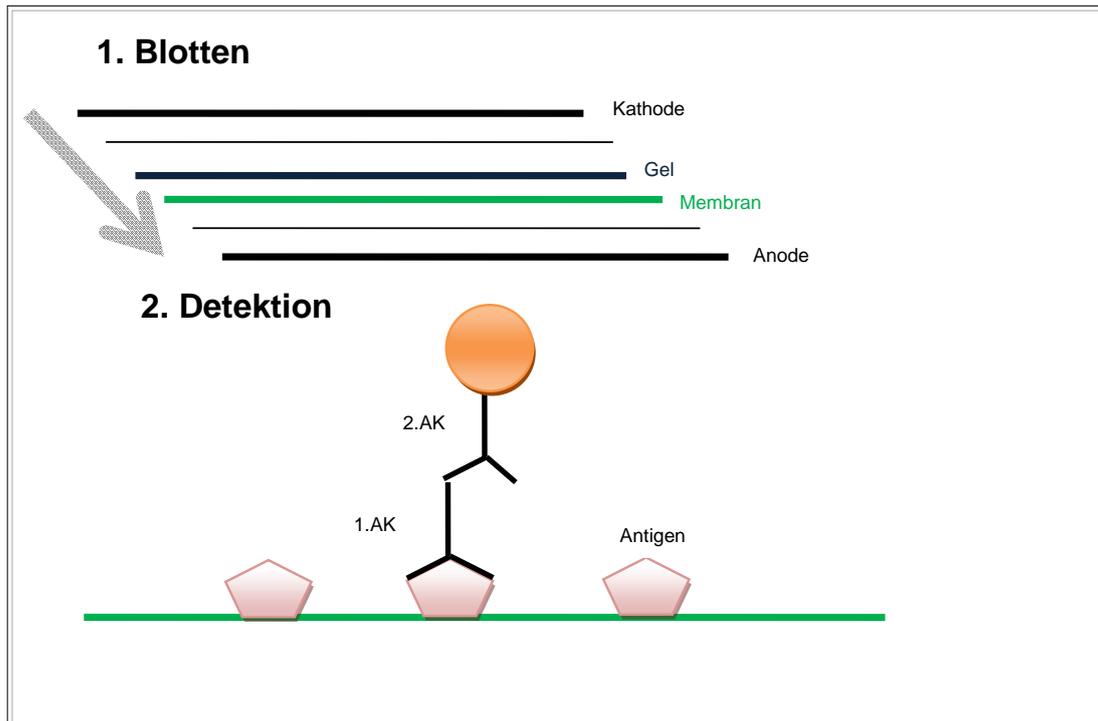


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Aufbaus und der Detektion eines Western-Blots (modifiziert nach Towbin et al. 1992).

Nach dem Transfer wurde die Membran bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Um den Erfolg des Blottens beurteilen zu können, wurde die Membran mit Ponceau S (0,2 % Ponceau-S in 3 %igem TCA) gefärbt. Im Anschluss wurden die unspezifischen Bindungsstellen für Antikörper blockiert, indem die Membranen für 2 h bei 25 °C mit Blockpuffer (Magermilchpulver 5 % (w/v) in Waschpuffer pH 7,4) behandelt wurden. Im weiteren Verlauf erfolgte die Inkubation mit einem spezifischen Primär-Antikörper (1. AK) über Nacht im Kühlraum bei 4 °C unter leichtem Schütteln.

Tabelle 8: Verwendete Antikörper.

1. Antikörper	Lösung	2. Antikörper	Lösung
Anti-Vimentin	1:5000	Anti-mouse	1:1500
Anti-Fibronectin	1:2500	Anti-rabbit	1:10000
Anti-ERP57	1:1500		
Anti-ERP72	1:1000		
Anti-GRP94	1:1000		
Anti-GRP78	1:2000		
Anti-Calreticulin	1:2500		
Anti-Desmin	1:2000		
Anti-ACTA2	1:2000		

Nicht gebundene Antikörper wurden anschließend durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer entfernt (3 x 15 min). Danach erfolgte die Inkubation mit einem Sekundär-Antikörper (2. AK) für etwa 1 Stunde. In Tabelle 8 sind die im Rahmen dieser Arbeit genutzten Primär- und Sekundär-Antikörper aufgelistet. Beim Sekundär-Antikörper handelt es sich um einen peroxidasegekoppelten Antikörper, der spezifisch an das F_c-Teil des ersten Antikörpers bindet. Die Peroxidase katalysiert die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form, dessen Lumineszenz (Chemilumineszenz) detektiert werden kann (Abbildung 10). Durch Zugabe des durch H₂O₂-aktivierten ECL-Reagenzes (Perkin Elmer, Waltham) kam es zu einer Umsetzung des enthaltenen Luminols unter Freisetzung von Wasser und Licht (Chemoluminescence). In der Dunkelkammer wurde ein Röntgenfilm (Kodak, Hohenbrunn) auf die Membran gelegt und nach verschiedenen Expositionszeiten in der Entwicklungsmachine (Konica SRX-101 A, Taipei City, Taiwan) visualisiert.

2.7.1. Auswertung der Western-Blot-Analysen

Die Auswertung der Proteinexpression wurde mit dem Programm Multi-Analyst von Bio-Rad Version 1.1 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) ermittelt. Die Analyse erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

2.8. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung und Immunfluoreszenz-mikroskopie

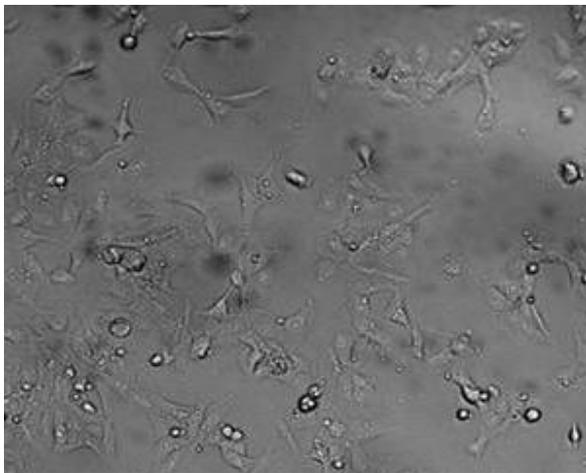
Es wurden dafür zunächst die TK173- und die TK173-TGF β -1-Zellen in 8-Well-Platten über Nacht kultiviert. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimalig mit PBS-Puffer gewaschen. Danach erfolgte die Fixierung der Zellen für 15 min unter Raumtemperatur mit 4 % Paraformaldehyd in PBS-Puffer. Hiernach erfolgte die Permeabilisierung mit 0,1 %igen Triton X-100 in PBS-Puffer für 30 Sekunden. Anschließend fand eine Inkubation mit 1 %iger BSA-Lösung in PBS-Puffer für eine Stunde zum Blocken statt, um eine unspezifische Antikörper-Bindung zu verhindern. Über Nacht wurden die Zellen mit dem primären Antikörper behandelt. Als sekundärer Antikörper wurde Alexa Fluor 488-konjugierte anti-mouse-AK oder anti-rabbit-AK mit einer Inkubationsdauer von einer Stunde im Dunkeln genutzt. Danach wurden die ungebundenen Antikörper dreimal mit PBS-Puffer abgewaschen. Abschließend wurden die Proben mit dem Fluoreszenzfarbstoff Diamidinophenylindol (DAPI) in PBS-Puffer für 5 min gefärbt. Am Immunfluoreszenz-Mikroskop (Axiophot, Zeiss, Göttingen) wurden die Proben mit der AnalySIS-Software (Soft Imaging Systems, Leinfelden) ausgewertet, um die Proteinexpression innerhalb der Zelle darzustellen.

3. Ergebnisse

3.1. Lichtmikroskopische Veränderungen nach TGF β -1-Behandlung

Die Zellen wurden anfangs so angelegt, dass ein ungestörtes Wachstum gewährleistet werden konnte und um die Apoptose-Induktion so gering wie möglich zu halten. Die lichtmikroskopische Analyse der Anfangskultur zeigte die Zellen vereinzelt auf den Kulturflaschen verteilt, wie in Abbildung 11A dargestellt.

A TK173



B TK173 + TGF β -1



Abbildung 11: TK173-Zellen (A) und TK173-TGF β -1-Zellen (B): Lichtmikroskopische (400 x vergrößert) Aufnahmen von TK173 im serumfreien DMEM und nach 72 h TGF β -1-Behandlung.

Die TK173-Zellen wurden mit 7,5 ng/ml TGF β -1 für 48, 72, 96 Stunden sowie für zwei Wochen inkubiert. Die TGF β -1-Zellstimulation führte zu phänotypischen Veränderungen, die sich lichtmikroskopisch nach 24 Stunden darstellen ließen. Nach 72 Stunden war ein Monolayer mit 80-90 % Konfluenz der adhärent wachsenden Zellen sichtbar (Abbildung 11B). Neben den phänotypischen Veränderungen konnte man beobachten, dass die mit TGF β -1 behandelten Zellen schneller proliferierten als die Kontrollzellen.

3.2. Vergleichende Analyse der Proteinmuster der TK173- und TK173-TGF β -1-Zellen

Die morphologischen Veränderungen der TK173-Zellen unter TGF β -1-Behandlung waren phänotypisch deutlich. Für eine vergleichende Analyse der Proteinmusteränderungen der TK173- und der TK173-TGF β -1-Zellen, die die Fibroblasten-Induktion begleiten, wurde zunächst Zellextrakt aus beiden Zellansätzen präpariert und durch die zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt. Für die erste Dimension wurde ein pH-Bereich von 3-10 oder von 5-8, für eine verbesserte Auflösung der Proteinspots, ausgewählt. Es wurden jeweils 150 μ g (pH 3-10) bzw. 200 μ g (pH 5-8) Proteinprobe genutzt, um auch jene Proteine zu visualisieren, die in relativ geringer Menge vorlagen.

Für die zweite Dimension wurde ein Molekulargewicht-Bereich von 10 bis 250 kDa ausgewählt. Die zweidimensionalen Gele der behandelten und nicht-behandelten TK173-Zelllinie wurden mit Hilfe der Delta 2D-Software Version 3.4 (Decodon GmbH) ausgewertet. Hierdurch konnten jeweils mehr als 2000 Spots bei einem eingestellten Filterlimit von 20000 Pixel auf beiden Gelen (TK173 und TK173-TGF β -1) detektiert werden. Dieser eingestellte Filter gewährleistete die Eliminierung von Artefakten oder anderen Störelementen. Durch *image warping* ist Delta 2D in der Lage die Laufunterschiede zwischen den zweidimensionalen Gelen der TK173- und TK173-TGF β -1-Zellen auszugleichen. Dies ermöglicht letztlich eine Übereinstimmung der Proteinspots und die Entstehung eines Fusionsgels.

In Abbildung 12 sind zwei gewarpte Gelbilder zu sehen. Das erste Gel ist orange und stellt das Gesamtzelllysate der TK173-Zellen dar. Das zweite Gel ist blau und stellt das Gesamtzelllysate der mit TGF β -1 behandelten TK173-Zellen dar. Die identischen Proteinspots sind in dem gewarpten Bild an gleicher Stelle schwarz dargestellt. Die blauen Spots stellen die überexprimierten Proteine nach TGF β -1-Behandlung dar, während die orangenen Spots die runterregulierten Proteine nach TGF β -1-Behandlung darstellen.

Die Gele zeigten hinsichtlich der Proteinspots Ähnlichkeiten genauso wie Unterschiede. Die meisten Proteine wanderten in den pH-Bereich 5-8 sowie in den MW-Bereich 20-80 kDa. Die überexprimierten Proteine zeigten sich hauptsächlich in dem MW-Bereich 20-80 kDa, wohingegen sich die runterregulierten Proteine eher im sauren pH-Bereich und im MW-Bereich 30-100 kDa zeigten.

Für die Identifizierung wurden besonders die Proteinspots untersucht, die nach der Behandlung mit TGF β -1 Unterschiede hinsichtlich ihrer Intensität aufwiesen.

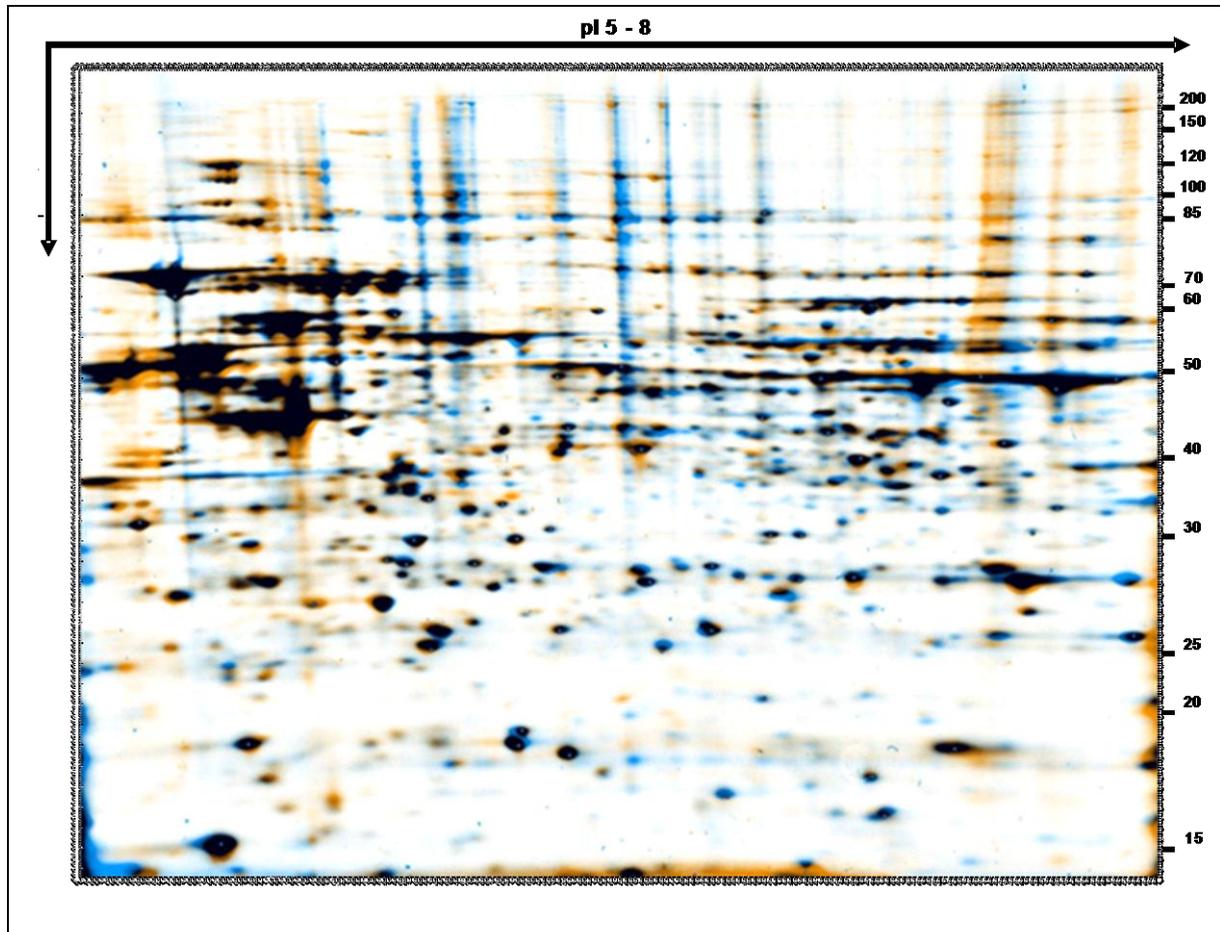
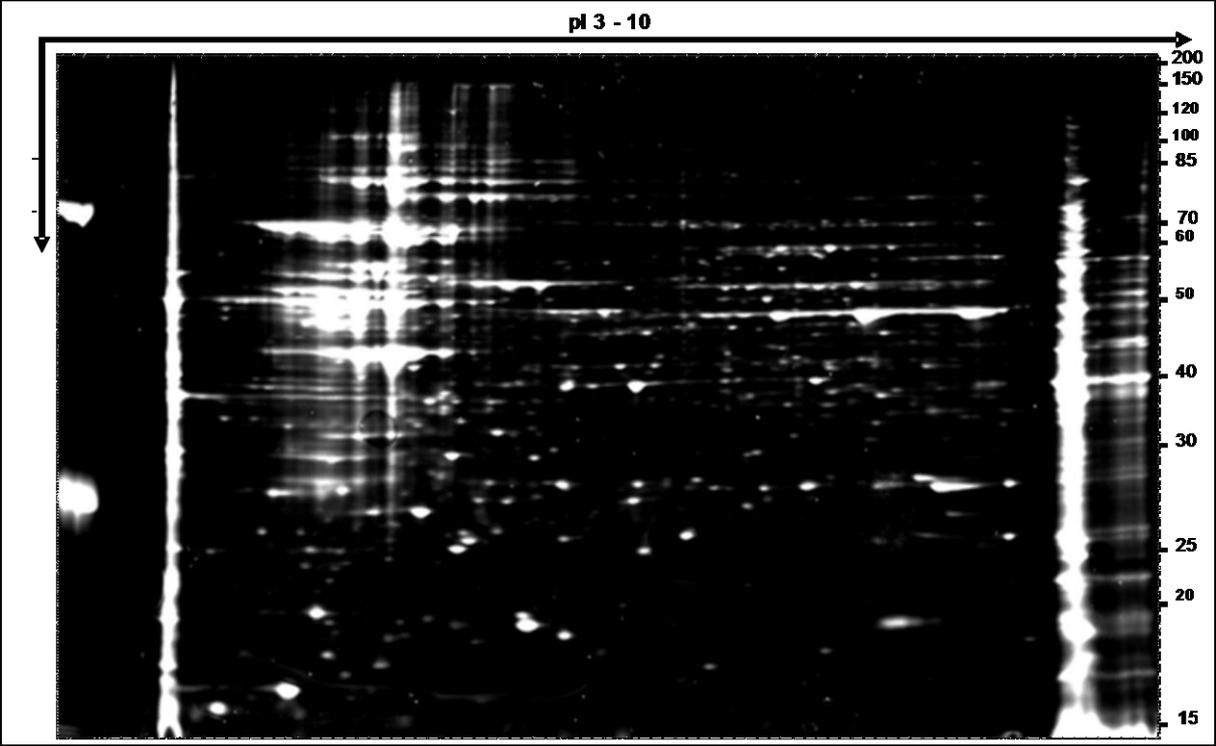


Abbildung 12: Wirkung von TGF β -1 auf das TK173-Proteom. Dargestellt ist ein Beispiel des sogenannten *image warping*: Gelb: TK173, Blau: TK173 nach TGF β -1-Behandlung. Nach der dritten Passage wurden die Zellen in Lysepuffer lysiert. 200 μ g Protein wurden auf einem IPG-Streifen pH 5-8 (Bio-Rad) fokussiert und auf einem Criterion 12 % Bis-Tris-Gel (Bio-Rad) aufgetrennt. Zur Visualisierung wurde das jeweilige Gel fixiert und mit Flamingo[®] (Bio-Rad) gefärbt.

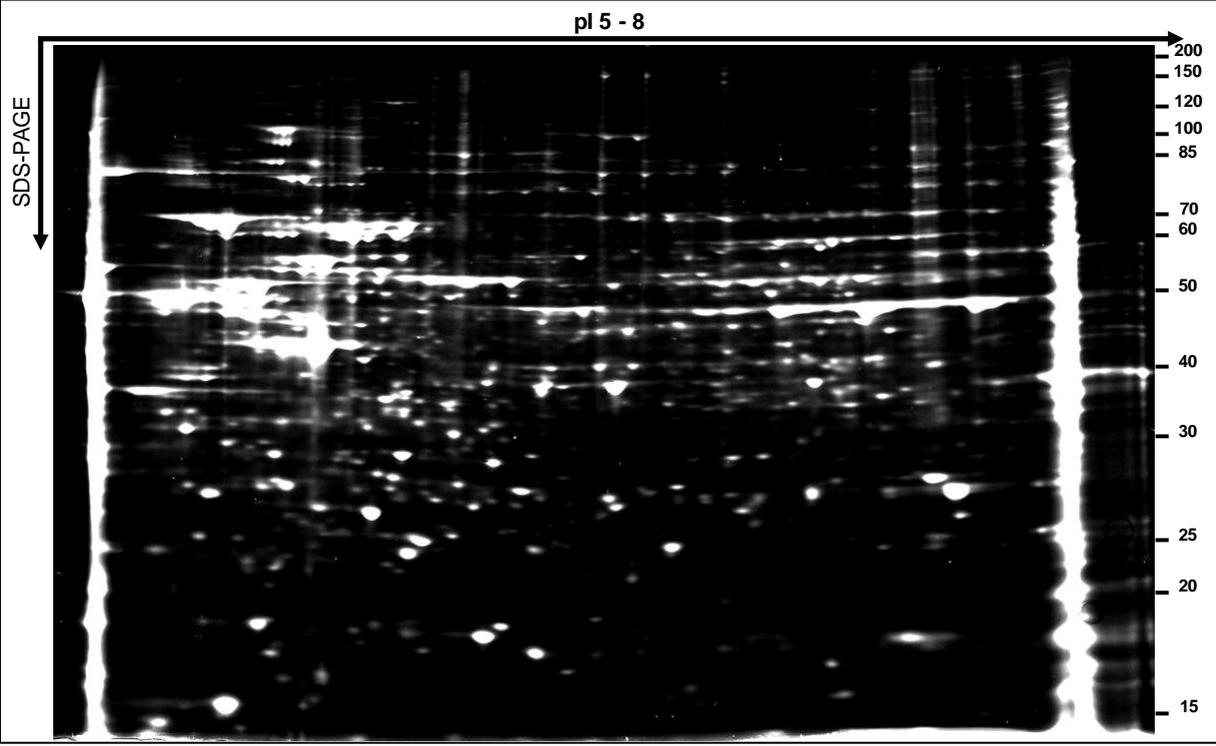
3.2.1. Etablierung zweidimensionaler Proteinprofile von TK173 und TK173-TGF β -1

Es wurden jeweils drei unabhängige Versuchsansätze zur Gewährleistung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und zur Minimierung von Artefakten durchgeführt. Nach Extraktion der Proteinproben, wie in Kapitel 2.2.4. beschrieben, wurden davon jeweils 150 μ g bzw. 200 μ g für die Auftrennung der Proteine mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese genutzt, indem zweidimensionale Gelkarten angefertigt wurden. In den Abbildungen 13 A-C sind repräsentative zweidimensionale Gele für TK173 im pH-Bereich 3-10 und 5-8 sowie für TK173-TGF β -1 im pH-Bereich 5-8 dargestellt. In den Abbildungen 22-24 im Anhang sind repräsentative zweidimensionale Gele für die unbehandelte Zelllinie TK173 im pH-Bereich 5-8 und 3-10 sowie für die behandelte Zelllinie TK173-TGF β -1 im pH-Bereich 3-10 dargestellt.

A TK173 (150 µg)



B TK173 (200 µg)



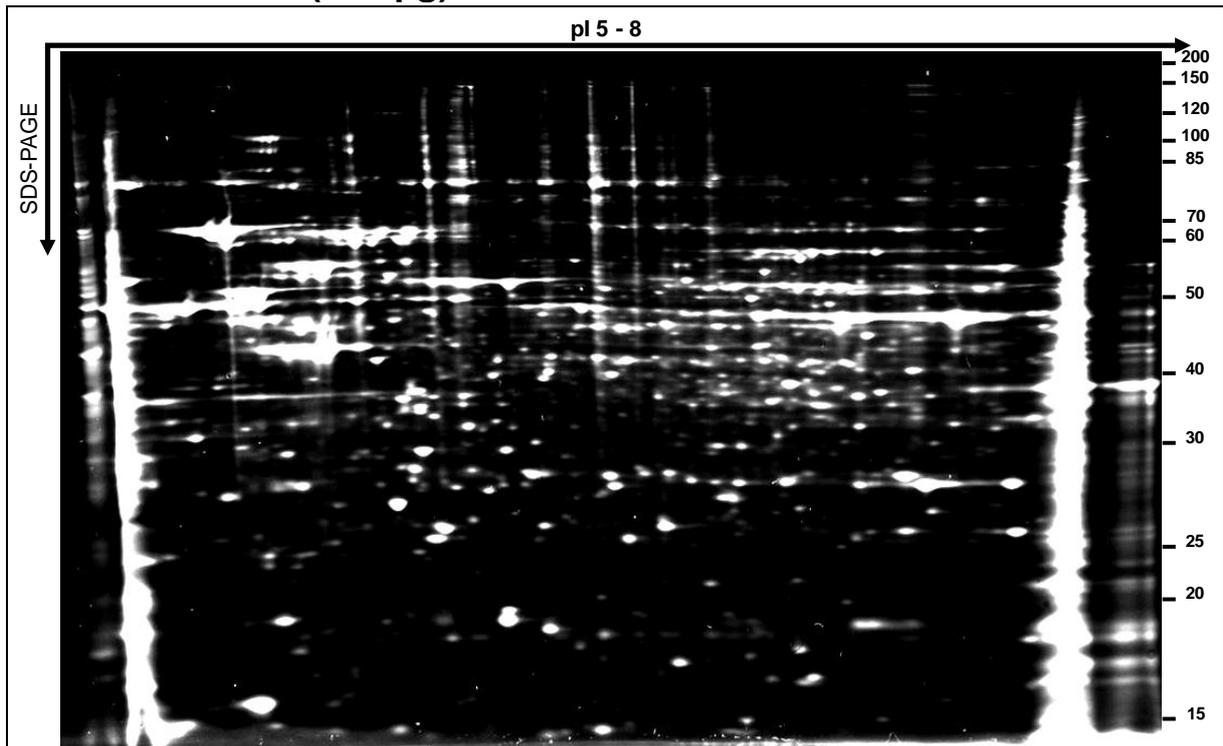
C TK173-TGF β -1 (200 μ g)

Abbildung 13: Zweidimensionale Gelelektrophorese des Proteinextrakts aus TK173 (A,B) und TK173-TGF β -1 (C). Nach der dritten Passage wurden die Zellen in Lysepuffer lysiert. 150 μ g bzw. 200 μ g Proteinprobe wurde auf einem IPG-Streifen pH 3-10 bzw. 5-8 (Bio-Rad) fokussiert und auf einem Criterion 12 % Bis-Tris-Gel (Bio-Rad) aufgetrennt. Zur Visualisierung wurde das jeweilige Gel fixiert und mit Flamingo[®] (Bio-Rad) gefärbt. Man erkennt visuell quantitative wie auch qualitative Unterschiede nach TGF β -1-Behandlung.

3.3. Proteinidentifizierung mittels Massenspektrometrie

Aus den zweidimensionalen Gelkarten wurden, wie im Kapitel 2.6.5. beschrieben, die Spots von Interesse manuell exzidiert, enzymatisch mit Trypsin verdaut und für die massenspektrometrische Analyse vorbereitet. Durch den enzymatischen Verdau der Proteine mit Trypsin entsteht für jedes Protein ein spezifisches Muster an Peptidfragmente. Mittels MALDI-TOF-MS wurde ein Massenfingerprint erstellt und mittels Q-TOF-Ultima die Peptidsequenz entschlüsselt. In Abbildung 14 ist ein repräsentatives Beispiel einer massenspektrometrischen Analyse von Vimentin dargestellt. Abschließend erfolgte über die Swiss-Prot -Datenbank die Identifizierung der Proteine. Hierbei wurden insgesamt 114 Proteine (Tabelle 9) identifiziert. Die Suchergebnisse basieren auf den MOWSE-Score-Algorithmus (Perkins et al. 1999). Neben dem Proteinname sind in der Tabelle 9 auch das Molekulargewicht und der MOWSE-Score angegeben.

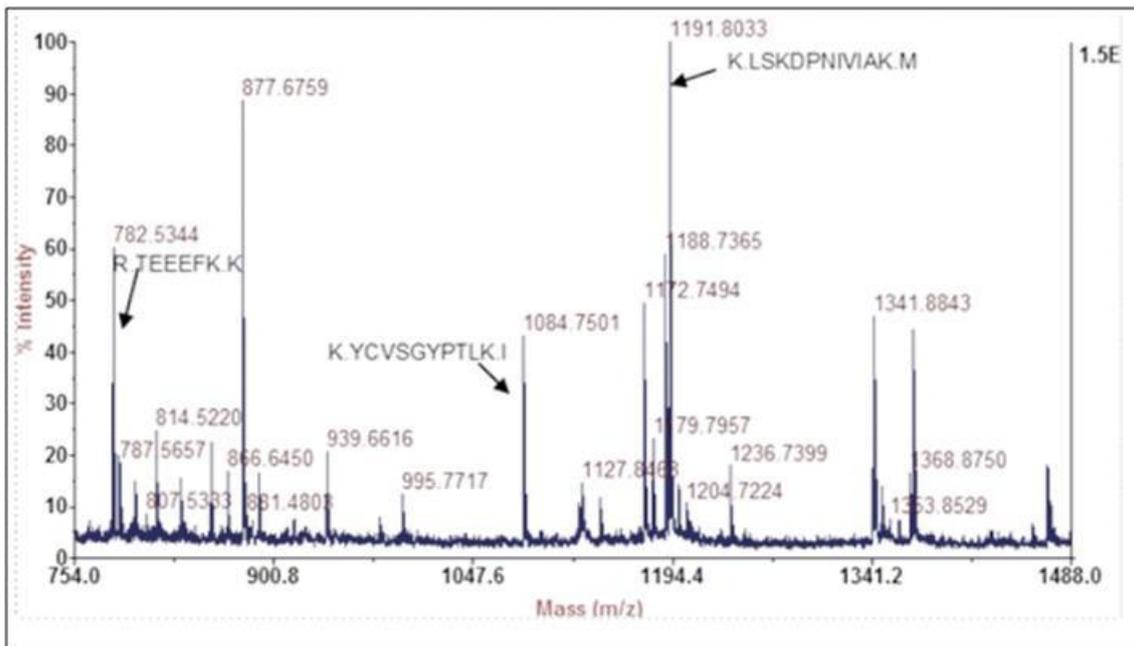


Abbildung 14: Repräsentatives Beispiel einer massenspektrometrischen Analyse von Vimentin. Für Vimentin ergeben die Massen der Peptide ein spezifisches Spektrum, das durch den Vergleich mit einer Proteindatenbank identifiziert werden konnte.

Tabelle 9: Tabellarische Darstellung der gesamten identifizierten Proteine vor und nach TGF β -1-Behandlung der TK173-Zellen mittels MALDI-TOF-MS und Proteinidentifizierung über Datenbankvergleich.

Nr.	Proteinname	Gename	Swiss-Prot-Acc.-Nr.	Molekulargewicht	PMF	MS/MS Score
1	Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase	ACP1	P24666	18031		103
2	Actin, aortic smooth muscle	ACTA2	P62736	42009		152
3	Actin, cytoplasmic 1	ACTB	P60709	41710		117
4	Actin, cytoplasmic 1	ACTB	P60709	41710		349
5	Actin, cytoplasmic 1	ACTB	P60709	41710	79	106
6	Actin, cytoplasmic 2	ACTG1	P63261	41766	73	145
7	Actin, cytoplasmic 2	ACTG1	P63261	41766	93	89
8	Actin, cytoplasmic 2	ACTG1	P63261	41766	125	175
9	Actin, cytoplasmic 2	ACTG1	P63261	41766		214
10	Actin, cytoplasmic 2	ACTG1	P63261	41766	67	
11	Alpha-actinin-1	ACTN1	P12814	102993	109	
12	Alpha-actinin-1	ACTN1	P12814	102993		63
13	Alpha-actinin-1	ACTN1	P12814	102993		70
14	Alpha-actinin-1	ACTN1	P12814	102993		110
15	Alpha-actinin-1	ACTN1	P12814	102993		92
16	BAG family molecular chaperone regulator 2	BAG2	Q95816	23757		60
17	UPF0568 protein C14orf166	C14orf166	Q9Y224	28068	81	
18	Caldesmon	CALD1	Q05682	93194		173
19	Calreticulin	CALR	P27797	48142		210
20	Caprin-1	CAPRIN1	Q14444	78318		122
21	Chloride intracellular channel protein 1	CLIC1	O00299	26906	112	
22	Chloride intracellular channel protein 1	CLIC1	O00299	26906		98
23	Calponin-2	CNN2	Q99439	33675		70
24	CNN2 protein	CNN2	Q6FHE4	33709	151	
25	Collagen alpha-1(I) chain	COL1A1	P02452	138941		93
26	Collagen alpha-1(I) chain	COL1A1	P02452	138941		185
27	Collagen alpha-1(I) chain	COL1A1	P02452	138941		251
28	Collagen alpha-1(I) chain	COL1A1	P02452	138941		150
29	Collagen alpha-1(I) chain	COL1A1	P02452	138941		213
30	Cystatin-B	CSTB	P04080	11133		92
31	Desmin	DES	P17661	53536		132
32	Eukaryotic translation initiation factor 1	EIF1	P41567	12725		78
33	Endoplasmic reticulum resident protein 29	ERP29	P30040	28993		95
34	Protein disulfide-isomerase	ERP57	P30101	56747	101	
35	Protein disulfide-isomerase	ERP57	P30101	56747		151

Ergebnisse

36	Protein disulfide-isomerase	ERP57	P30101	56747		213
37	Protein disulfide-isomerase A4	ERP72	P13667	72932		165
38	Fatty acid-binding protein, epidermal	FABP5	Q01469	15164		78
39	Fibronectin	FN1	P02751	262442		115
40	Fibronectin	FN1	P02751	262442		157
41	Fibronectin	FN1	P02751	262442		97
42	Fibronectin	FN1	P02751	262442		81
43	Fibronectin	FN1	P02751	262442		68
44	Fibronectin	FN1	P02751	262442		121
45	Fibronectin	FN1	P02751	262442		89
46	Fibronectin	FN1	P02751	262442		145
47	Fibronectin	FN1	P02751	262442		132
48	78 kDa glucose-regulated protein	GRP78	P11021	72288	61	151
49	78 kDa glucose-regulated protein	GRP78	P11021	72288	257	
50	Endoplasmin	GRP94	P14625	92411		87
51	Endoplasmin	GRP94	P14625	92411	145	151
52	Endoplasmin	GRP94	P14625	92411	108	
53	Endoplasmin	GRP94	P14625	92411		122
54	Endoplasmin	GRP94	P14625	92411		157
55	Endoplasmin	GRP94	P14625	92411		231
56	Endoplasmin	GRP94	P14625	92411	165	
57	Endoplasmin	GRP94	P14625	92411	110	
58	Endoplasmin	GRP94	P14625	92411	125	
59	Glutathione S-transferase P	GSTP1	P09211	23341		187
60	Histidine triad nucleotide-binding protein 1	HINT1	P49773	13793		45
61	Histone H2B type 1-B	HIST1H2BB	P33778	13942		209
62	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	HNRNPAB	Q99729	36225		125
63	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	HNRNPH1	P31943	49229		105
64	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3	HNRNPH3	P31942	36926		105
65	Heterogenous nuclear ribonuclear protein K	HNRNPK	P61978	50944		229
66	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like	HNRPDL	O14979	46438	89	
67	78 kDa glucose-regulated protein	HSPA5	P11021	72288		395
68	78 kDa glucose-regulated protein	HSPA5	P11021	72288		157
69	78 kDa glucose-regulated protein	HSPA5	P11021	72288	74	
70	Hypoxia up-regulated protein 1	HYOU1	Q61N67	111266		416
71	Inosine-5'-monophosphate	IMPDH2	P12268	55770		42

Ergebnisse

	dehydrogenase 2					
72	LIM and SH3 domain protein 1	LASP1	Q14847	29717		98
73	Galectin 1	LGALS1	P09382	14706		157
74	NADH dehydrogenase[ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	NDUFV2	P19404	27374		109
75	Protein DJ-1	PARK7	Q99497	19891		135
76	PEST proteolytic signal-containing nuclear protein	PCNP	Q8WW12	18913		72
77	PEST proteolytic signal-containing nuclear protein	PCNP	Q8WW12	18913		96
78	Protein disulfide-isomerase	PDI	P07237	57116		133
79	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	PKM2	P14618	57937		145
80	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA	P62937	18001	100	
81	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA	P62937	18001		123
82	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA	P62937	18001		111
83	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA	P62937	18001	125	
84	Peroxiredoxin-1	PRDX1	Q06830	22110		96
85	Peroxiredoxin-2	PRDX2	P32119	21892		158
86	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	PRDX3	P30048	27675		218
87	Peroxiredoxin-6	PRDX6	P30041	25035		215
88	Proteasome subunit beta type-6	PSMB6	P28072	25341		119
89	GTP-binding nuclear protein Ran	RAN	P62826	24423		92
90	RNA-binding protein 8A	RBM8A	Q9Y5S9	19877		151
91	40S ribosomal protein S12	RPS12	P25398	14515	88	
92	Splicing factor, arginine/serine-rich 1	SFRS1	Q07955	27728	96	
93	Splicing factor, arginine/serine-rich 1	SFRS1	Q07955	27728	56	
94	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	SOD1	P00441	15936		112
95	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	SOD2	P04179	24722		154
96	Tubulin-specific chaperone A	TBCA	O75347	12847		89
97	Triosphosphate isomerase	TPI1	P60174	26653		127
98	Tubulin alpha-1A chain	TUBA1A	Q71036	50104	100	
99	Tubulin alpha-1A chain	TUBA1A	Q71036	50104		121
100	Tubulin alpha-1C chain	TUBA1C	Q9BQE3	49863	138	

Ergebnisse

101	Tubulin alpha-1C chain	TUBA1C	Q9BQE3	49863		85
102	Tubulin alpha-1C chain	TUBA1C	Q9BQE3	49863	70	
103	Tubulin alpha-1C chain	TUBA1C	Q9BQE3	49863	198	
104	Tubulin alpha-1C chain	TUBA1C	Q9BQE3	49863	151	
105	Tubulin alpha-1C chain	TUBA1C	Q9BQE3	49863	165	
106	Tubulin alpha-1C chain	TUBA1C	Q9BQE3	49863	145	
107	Thioredoxin	TXN	P10599	11730		168
108	Thioredoxin	TXN	P10599	11730	112	
109	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	UBE2N	P61088	17127	141	
110	Vinculin	VCL	P18206	123799		98
111	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	VCP	P55072	89266		210
112	Vimentin	VIM	P08670	53619		340
113	Vimentin	VIM	P08670	53619		125
114	Vimentin	VIM	P08670	53619		235

3.4. Differenziell exprimierte Proteine unter TGF β -1-Behandlung

Um die proteomischen Veränderungen darzustellen, die während der Fibroblasten-Induktion durchlaufen werden, wurde die zweidimensionale Gelelektrophorese bei der mit TGF β -1 behandelten TK173-Zelllinie und zur Kontrolle bei der unbehandelten TK173-Zelllinie durchgeführt. Ziel war es, mehr Verständnis und Klarheit in die molekularen Pathomechanismen der Fibroseentstehung zu bringen. Insbesondere ging es um die Untersuchung der proteomischen Veränderungen, die die Zellinduktion durch den profibrotischen Faktor TGF β -1 begleiten.

Der Proteinmustervergleich der TK173- mit den TK173-TGF β -1-Zellen ergab 114 differenziell exprimierte Proteine ($p < 0,05$), wovon 49 überexprimiert waren. Hierbei handelt es sich um bekannte Fibrosemarker wie z. B. Vimentin und Kollagen I. Daneben konnten Proteine der ER-Stress-Antwort, wie z. B. GRP78 und ERP75, und Proteine der oxidativen Stress-Antwort, wie z. B. Peroxiredoxin-1 und Superoxid-Dismutase, identifiziert werden. In Tabelle 10 sind die nach TGF β -1-Behandlung überexprimierten Proteine wie auch die verschiedenen biologischen Funktionen der identifizierten Proteine nach der Swiss-Prot-Datenbank dargestellt. Der Tabelle 11 im Anhang sind die 13 differenziell unterexprimierten Proteine zu entnehmen.

In den Abbildungen 15 A-C sind die Expressionsunterschiede für ausgewählte Proteine mittels Delta 2D quantifiziert und mit Hilfe der SigmaPlot Version 11 (Systa Software Inc) graphisch dargestellt. Dabei sind die Proteinexpressionsintensitäten in Form von Balkendiagrammen dargestellt. Auf der y-Achse ist die relative Intensität der Proteinspots, während auf der x-Achse die verschiedenen Proteine, deren Expression durch die TGF β -1-Behandlung beeinflusst wurde, dargestellt sind. Jede Säule gibt dabei die mittlere Spotintensität +/- der Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchsansätzen an.

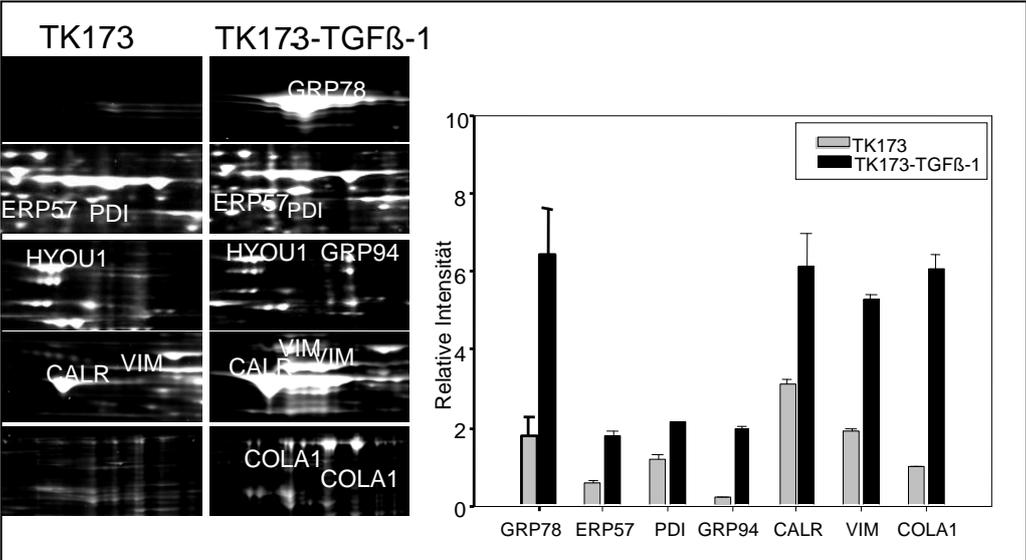
Tabelle 10: 49 differenziell überexprimierte Proteine in den TK173-Zellen nach TGFβ-1-Behandlung. Die TGFβ-1-Wirkung auf die TK173-Zellen wurde mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese analysiert. Hier sind die Proteine angegeben, die nach der TGFβ-1-Behandlung im Vergleich zur unbehandelten TK173-Zelllinie hochreguliert wurden. Angegeben sind die Gennamen sowie die biologischen Prozesse, in denen die Proteine involviert sind nach der Swiss-Prot-Datenbank.

Protein	Beschreibung	Kategorie/biologische Prozesse (Swiss-Prot)
ACTA2	Actin, aortic smooth muscle	Zellstruktur und Motilität
ACTB	Actin, cytoplasmic 1	Zellstruktur und Motilität
ACTG1	Actin, cytoplasmic 2	Zellstruktur und Motilität
ACTN1	Alpha-actinin-1	Ankerprotein für Aktin für interzelluläre Kontakte
BAG2	BAG family molecular chaperone regulator 2	Inhibiert die Chaperone-Funktion von HSP70/HSC70
C14orf166	Ester Hydrolase C14orf166 homolog	Reversible Spaltung von Ester
CALR	Calreticulin	ER-Stress-Antwort und UPR, Ca ⁺⁺ -bindendes Chaperone
CALD1	Caldesmon	Zytoskelett-assoziiertes Protein für die Kontraktion und Motilität
CAPRIN1	Caprin-1	Zellproliferation und Zellmigration
CNN2	Calponin-2	Zytoskelett-assoziiertes Protein, Zellwachstum
COL1A1	Collagen alpha 1	Extazelluläre Matrix Protein
DES	Desmin	Intermediärfilament
ERP29	Endoplasmic reticulum protein 29	ER-Stress-Antwort und UPR
ERP57	Endoplasmic reticulum protein 57	ER-Stress-Antwort und UPR
ERP72	Protein disulfide-isomerase A4	ER-Stress-Antwort und UPR
FABP5	Fatty acid-binding protein	Transmembran. Transportprot für Fettsäuren
FN1	Fibronectin	Zelladhäsion, Zellmotilität und Zellstruktur
GRP78	Glucose-regulated-protein 78 kDa	ER-Stress-Antwort und UPR
GRP94	Glucose-regulated-protein 94 kDa	ER-Stress-Antwort und UPR
GSTP1	Glutathione S-transferase P	Zelluläre Entgiftung
HIST1H2BB	Histone H2B type 1-B	Nukleinsäure-Synthese
HNRNPAB	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	Nukleinsäure-Synthese
HNRNPH1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1	Nukleinsäure-Synthese
HNRNPH3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3	Nukleinsäure-Synthese
HNRNPK	Heterogenous nuclear ribonuclear protein K	Nukleinsäure-Synthese
HNRPDL	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like	Nukleinsäure-Synthese
HYOU1	Hypoxia up-regulated protein 1	Oxidativer Stress, Redox-Reaktion der Zelle
LASP1	LIM and SH3 protein 1	Zytoskelett-assoziiertes Protein
LGALS1	Galectin 1	Zellproliferation, Zelldifferenzierung
PARK7	Parkinson disease protein 7	Oxidativer Stress. Redox-Reaktion der Zelle
PDI	proteindisulfide isomerase	ER-Stress-Antwort und UPR, Katalysiert die -S-S-Verbindungen in den Proteinen
PKM2	Pyruvate kinase isozymes M2	Glykolyse
PRXD1	Peroxiredoxin 1	Oxidativer Stress. Redox-Reaktion der Zelle
PRDX2	Peroxiredoxin-2	Oxidativer Stress. Redox-Reaktion der Zelle
PRDX3	Thioredoxin-dependent	Oxidativer Stress. Redox-Reaktion der Zelle

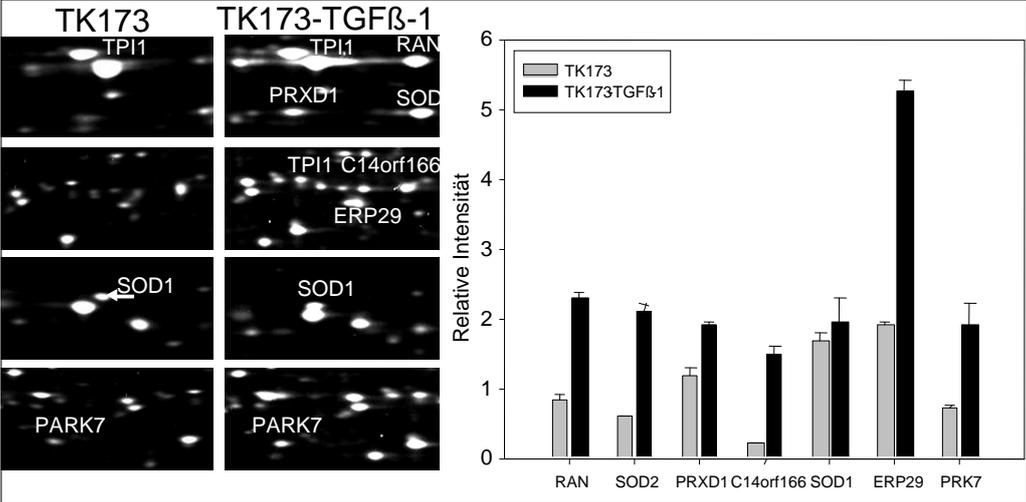
Ergebnisse

	peroxide reductase, mitochondrial	
PRDX6	Peroxiredoxin-6	Oxidativer Stress. Redox-Reaktion der Zelle
PSMB6	Proteasome subunit beta type-6	Intrazelluläre Signaltransduktion
RAN	GTP-binding nuclear protein Ran	Zellkommunikation, Signaltransduktion
RBM8A	RNA-binding protein 8A	RNA-Translokation
RPS12	ribosomal protein S12	Proteinmetabolismus
SOD1	Superoxide dismutase 1	Oxidativer Stress. Redox-Reaktion der Zelle
SOD2	Superoxide dismutase 2	Oxidativer Stress. Redox-Reaktion der Zelle
TPI1	Triosephosphate isomerase 1	Glykolyse
TUBA1A	Tubulin alpha-1A chain	Globuläre Proteine, bilden den Hauptbestandteil der Mikrotubuli
TUBA1C	Tubulin alpha-1C chain	Globuläre Proteine, bilden den Hauptbestandteil der Mikrotubuli
TXN	Thioredoxin	Oxidativer Stress. Redox-Reaktion der Zelle
VCL	Vinculin	Zelladhäsion
VCP	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	Zellteilung während Mitose
VIM	Vimentin	Intermediärfilament

A



B



C

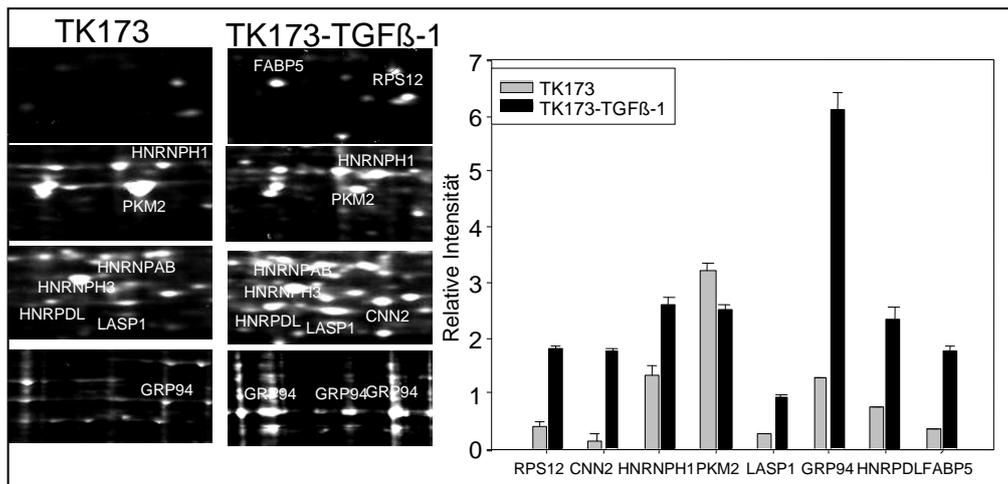


Abbildung 15 A-C: Vergrößerte Gelausschnitte ausgewählter differenziell exprimierter Proteine vor und nach TGFβ-1-Behandlung. Die Quantifizierung der Überexpression ist im Histogramm wiedergegeben. Die y-Achse zeigt dabei die relative Spotintensität und die x-Achse den Gennamen des Proteins. Dabei gibt jeder Balken den Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen an ($p < 0,05$) (Dihazi et al. 2013).

Um mehr Information über die biologischen Prozesse, die in der Fibroseentstehung und Progression involviert sind, zu bekommen, wurden die Informationen aus der DAVID Bioinformatics-Datenbank mit den Informationen aus der UniProt- und GenBank-Datenbank über mögliche Funktionen der Proteine kombiniert. Eine Auswertung der molekularen Funktionen der identifizierten Proteine, basierend auf der GeneOntology-Datenbank, ermöglichte die Klassifizierung der überexprimierten Proteine in fünf Kategorien, wobei die oben erwähnten Funktionsklassen (ER-Stress, oxidativer Stress und Strukturproteine) die Hauptgruppen ausmachten. In Abbildung 16 ist mittels eines Kreisdiagrammes der relative Anteil der jeweiligen Funktionsklasse gemessen an den gesamten überexprimierten Proteinen dargestellt.

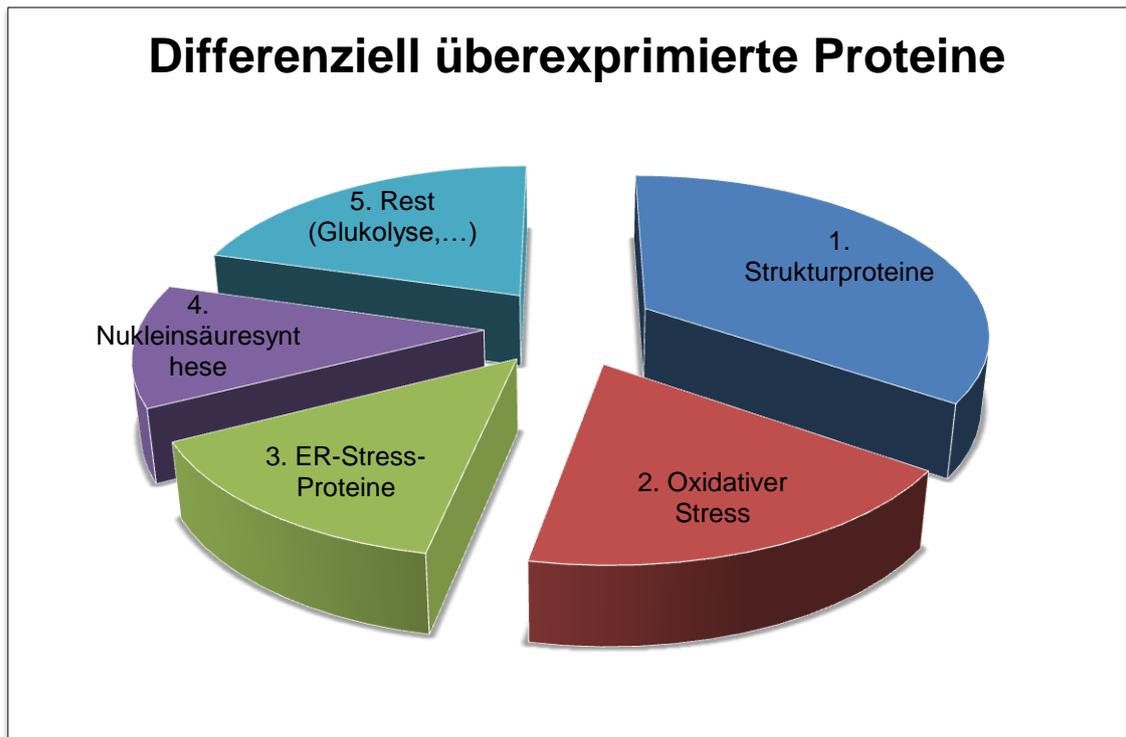


Abbildung 16: Einteilung der differenziell überexprimierten Proteine nach ihrer Funktion anhand der DAVID Bioinformatics-, der UniProt- und der GenBank-Datenbank.

Zur Visualisierung der direkten und indirekten Protein-Interaktionen und Signalwege im Rahmen der Fibroblasten-Transformation nach TGF β -1-Behandlung und somit im Rahmen der Fibroseentstehung, gibt es die Möglichkeit mittels der STRING Datenbank (*search tool for the retrieval of interacting genes/proteins*) die komplexen und dynamischen Zusammenspiele darzustellen (Abbildung 17). Das Ganze wird als ein Protein-Netzwerk dargestellt. Um eine Aussage über die verschiedenen Protein-Protein-Interaktionen machen zu können, werden verschiedene Algorithmen angewandt - basierend auf verschiedene Datenbanken. Gespeist wird die Datenbank durch ständiges manuelles Einpflegen der aktuellen Datenlage.

In Abbildung 17 sind die überexprimierten Proteine aus der Gruppe der ER-Stress-Antwort, des oxidativen Stresses sowie der Strukturproteine in Form eines Netzwerkes dargestellt. Es zeigen sich Interaktionen zwischen den Fibrosemarkern sowie den Proteinen der ER- und oxidativen Stress-Antwort.

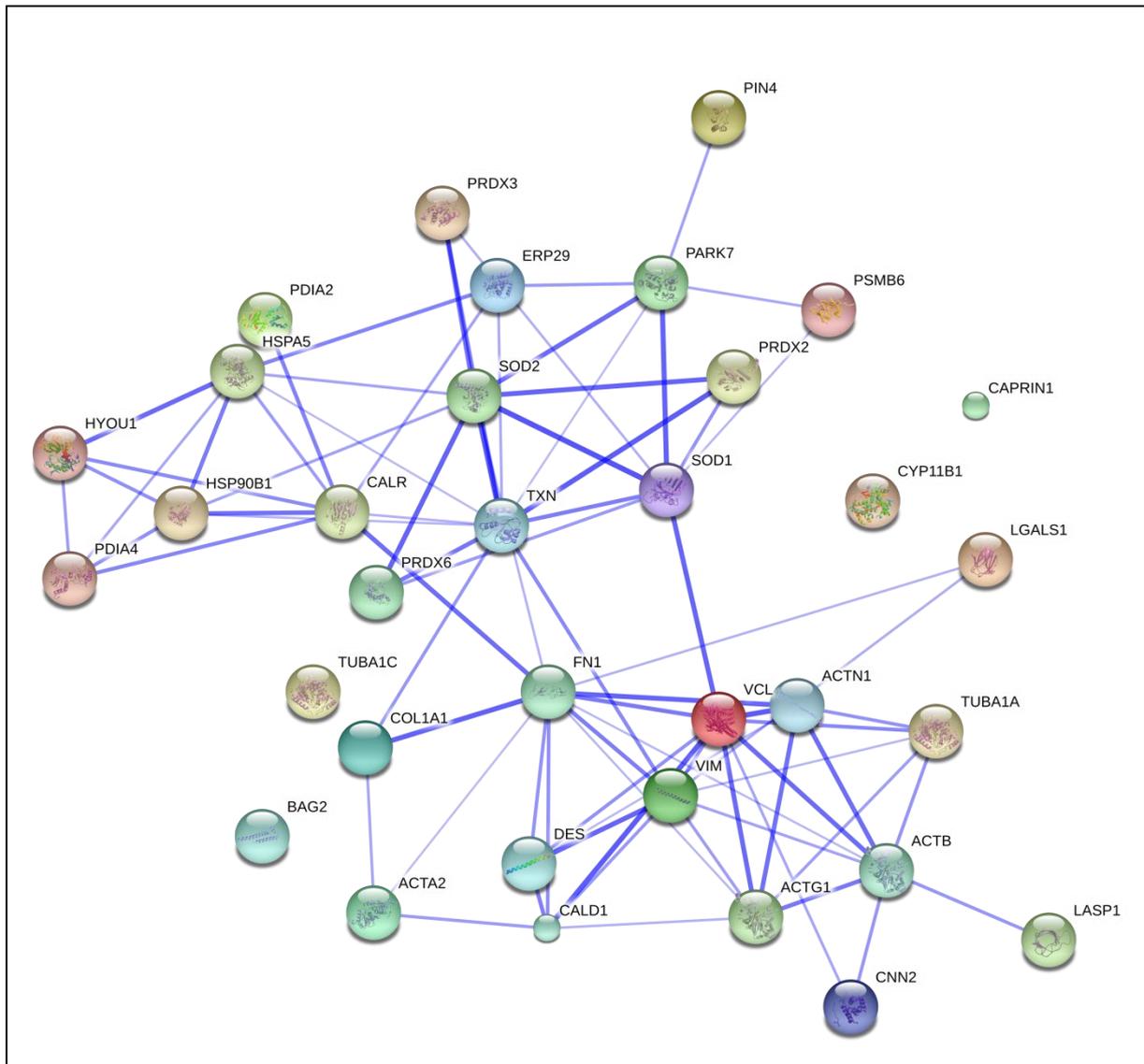


Abbildung 17: Proteinnetzwerk zur Darstellung der Interaktionen zwischen den überexprimierten Proteinen aus den Hauptgruppen Strukturproteine, ER-Stress und oxidativer Stress. Die Erstellung des Netzwerkes erfolgte mithilfe der String 9.0-Datenbank. Dabei gibt man die Gennamen der zu analysierenden Proteine ein. Je dicker die Verbindungslinie zwischen zwei Proteinen ist, umso enger ist die Interaktion. Es zeigt sich eine Interaktion zwischen den Proteinen der ER-Stress-Antwort, den Proteinen des oxidativen Stresses sowie den Strukturproteine.

3.5. TGF β -1-induzierte Zelltransformation ist zeitabhängig

Um den Einfluss des Zeitfaktors bei der TGF β -1 induzierten Zelltransformation besser zu untersuchen, wurden *in vitro*-Experimente mit unterschiedlichen Inkubationszeiten der TK173 mit TGF β -1 durchgeführt. Wie schon in den proteomischen Ergebnissen gezeigt wurde, führt die TGF β -1 Behandlung zur Überexpression der Fibrosemarker Fibronectin, Vimentin und Desmin. Es zeigte sich in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer eine quantitative Zunahme der Bandenintensität. (Abbildung 18).

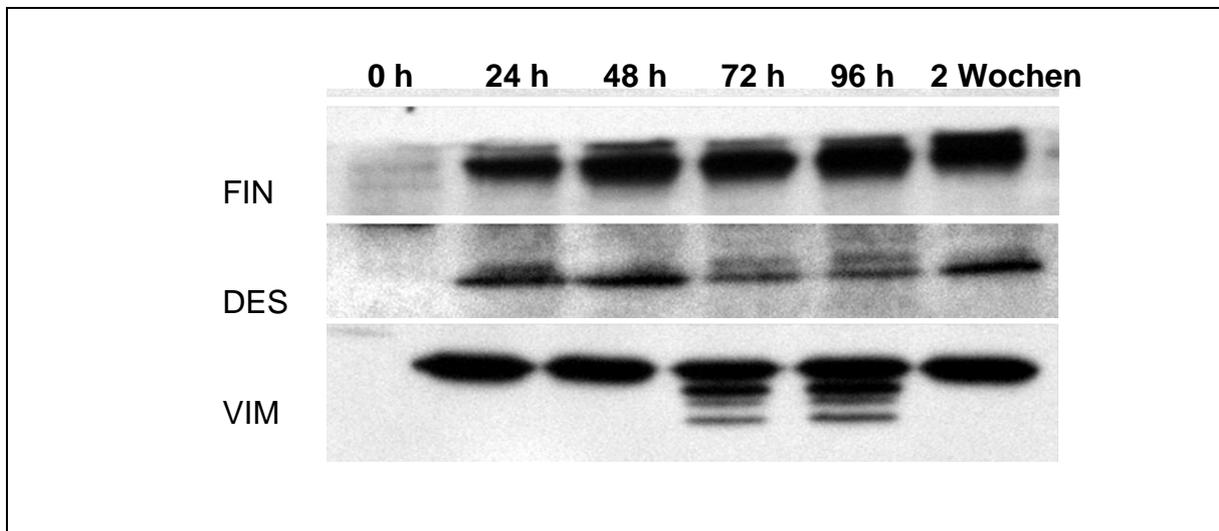


Abbildung 18: Western-Blot-Analysen für ausgewählte Fibrosemarker in Abhängigkeit der Inkubationsdauer mit TGF β -1 (0 h, 48 h, 72 h, 96 h, 2 Wochen). Die Expressionsunterschiede erfolgten für spezifische Antikörper gegen FIN, DES und VIM. Es zeigt sich in Abhängigkeit der TGF β -1-Inkubationsdauer eine zunehmende Expression (Dihazi et al. 2013).

Die ER-Stress-Proteine zeigten ebenfalls eine Überexpression nach TGF β -1-Behandlung. Insgesamt ergaben die Western-Blot-Analysen, dass die TGF β -1-Effekte von der Inkubationsdauer abhängig sind. So stieg die Proteinexpression, je länger die Zellen unter TGF β -1-Einfluss standen. Nach zweiwöchiger Inkubation mit TGF β -1 zeigte sich bei den ER-Stress-Proteinen in allen Fällen eine Runterregulation, während die Expression der Fibrosemarkern weiter anstieg (Abbildung 19).

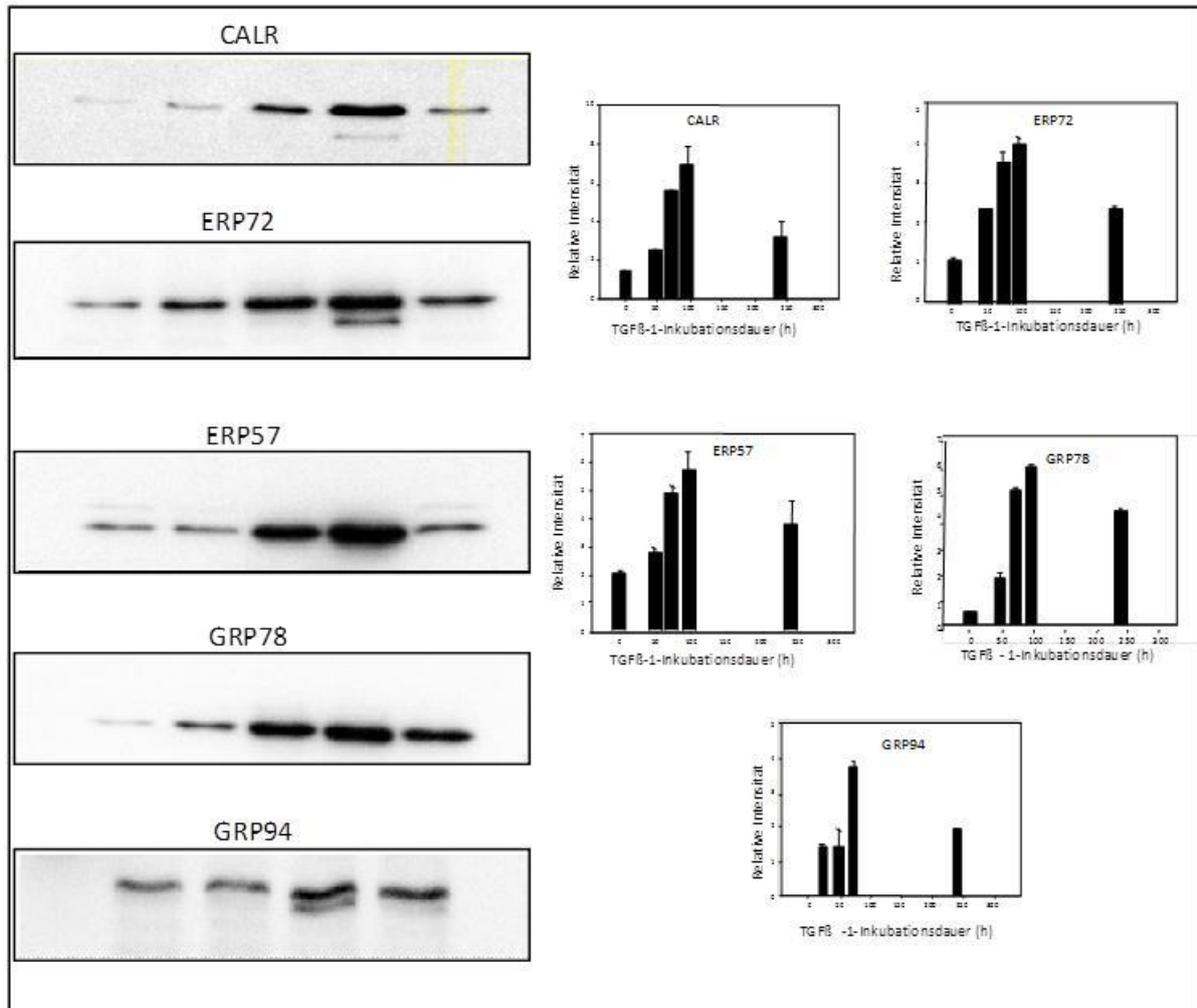
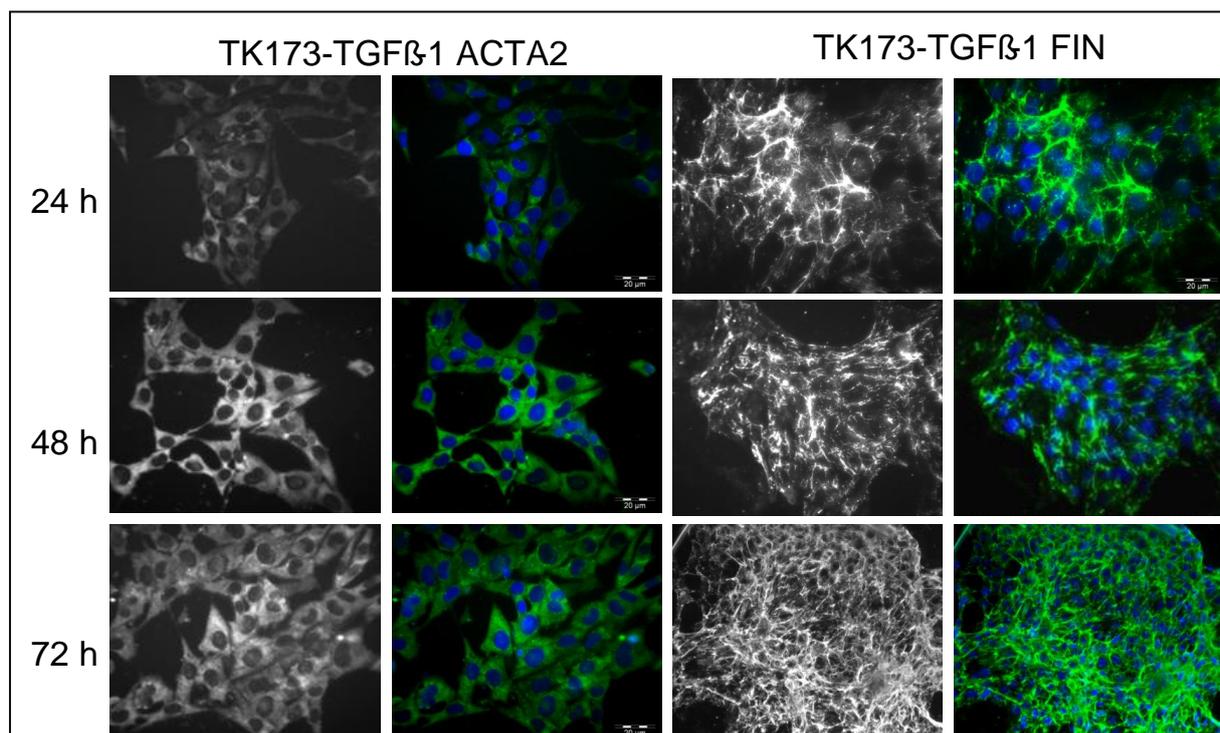


Abbildung 19: Western-Blot-Analysen für ausgewählte ER-Stress-Proteine, die nach TGFβ-1-Behandlung überexprimiert wurden. Expressionsunterschiede in Abhängigkeit der Inkubationsdauer mit TGFβ-1 (0 h, 48 h, 72 h, 96 h, 2 Wochen). Die Expressionsunterschiede erfolgten für spezifische Antikörper gegen CALR, ERP72, ERP57, GRP78, GRP94. Die Quantifizierung der Proteinexpression ist als Balkendiagramm wiedergegeben. Die y-Achse zeigt die relative Intensität der Banden, die x-Achse die Inkubationsdauer mit TGFβ-1. Jeder Balken gibt den Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen an ($p < 0,05$) (Dihazi et al. 2013).

Die Ergebnisse heben die Rolle der ER-Stress-Proteine in der TGFβ-1-Zellantwort und somit in der Entstehung und Progression der Fibrose hervor. Die ER-Stress-Induktion als Folge der TGFβ-1-Stimulation scheint einen wichtigen Aspekt der renalen Fibrose darzustellen.

3.6. Bestätigung der Ergebnisse durch Immunfluoreszenzfärbung

Mittels der Immunfluoreszenzfärbung erfolgte eine abschließende Bestätigung der Analysen der zweidimensionalen Gelelektrophorese und der Western-Blots. Hierfür wurden die mit und ohne TGF β -1 behandelten TK173-Zellen wie in Kapitel 2.8. beschrieben gefärbt und am Mikroskop (Axiophot, Zeiss, Göttingen) mit der Analysis-Software (Soft Imaging Systems, Leinfelden) ausgewertet (Abbildung 20). Als Negativkontrolle wurde für jeden Zellansatz auch eine Immunfluoreszenzfärbung ohne Erstantikörper durchgeführt. Hierbei zeigt sich ebenfalls als Bestätigung in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer eine Steigerung der Expression der Fibrosemarker (VIM, FIN, ACTA2).



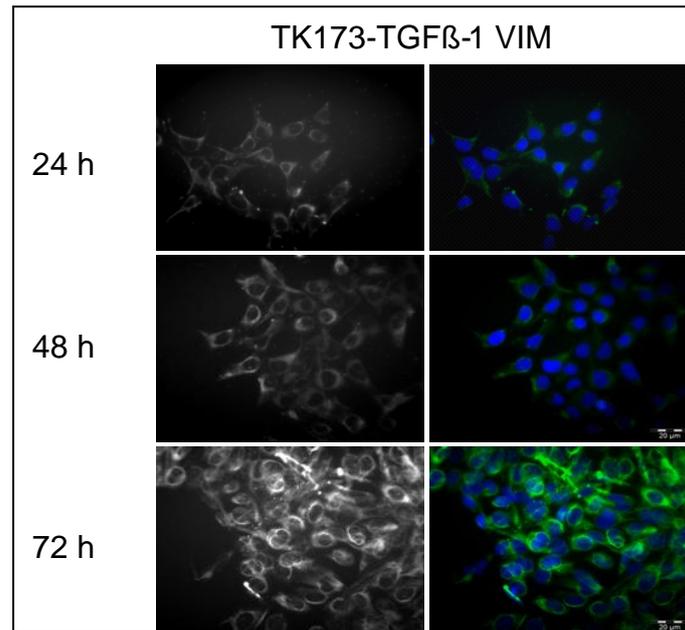


Abbildung 20: Immunfluoreszenzfärbung der Fibrosemarker (VIM, FIN, ACTA2): Es ist eine zunehmende Expression der Fibrosemarker in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer zu beobachten (Dihazi et al. 2013).

Die präsentierten Ergebnisse zeigen, dass auf zellulärer Ebene die TGFβ-1 induzierte Zelltransformation mit einer gesteigerten Synthese der ECM einhergeht, die zur Induktion der ER-Stressantwort führt. Ein Teil der in dieser Arbeit präsentierten Daten wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. Dihazi veröffentlicht (Dihazi et al 2013). Hierbei konnte die Gruppe zeigen, dass die ERP57 als Folge der TGFβ-1 Stimulation sekretiert wird und eine Schlüsselrolle in der Akkumulation der ECM spielt (Dihazi et al 2013).

4. Diskussion

4.1. Grenzen der zweidimensionalen Gelelektrophorese und der Massenspektrometrie

Proteomische Methoden ermöglichen es innerhalb relativ kurzer Zeit, eine große Menge an Proteinen zu identifizieren (durchschnittlich 2000 Proteine pro Gel) sowie deren Struktur und Funktion zu untersuchen. Zu den Schwächen der zweidimensionalen Gelelektrophorese zählt, dass seltene Proteine teilweise nicht nachweisbar sind oder gar durch intensivere Spots überlagert werden. Daneben gehen sehr große (MW > 200 kDa), sehr kleine (MW < 10 kDa), sehr saure (pH < 3) oder sehr basische (pH > 10) Proteine verloren, wie dies z. B. der Fall für Membranproteine oder regulatorische Proteine ist (Wilkins et al. 1996a; Rabilloud 2002). Ein weiteres Problem ist, dass mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese große Mengen an Proteine exprimiert werden. Damit steigt die Signifikanz einzelner Proteine aber auch die Wahrscheinlichkeit falsch-positive Proteine zu detektieren an. Dieses Phänomen wird als Problem des multiplen Testens bezeichnet (Diz et al. 2011). Somit sind Methoden nötig um falsch-positive Ergebnisse zu minimieren. Hierfür finden multiple Testkorrekturen Anwendung (Diz et al. 2011). Bei der vorliegenden Arbeit wurde bei der statistischen Analyse keine multiple Testkorrektur durchgeführt, so dass bei den 49 differenziell überexprimierte Proteinen von falsch-positiven Ergebnissen ausgegangen werden muss. Für die Proteine von Interesse wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch Validierungsversuche mittels Western-Blot und Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt.

Die Massenspektrometrie ermöglicht es, spezifische Fingerabdrücke für ein Proteinfragment durch die Messung von Massenspektren zu erstellen, die Rückschlüsse auf die Aminosäurezusammensetzung ermöglichen. Es zeigte sich hierbei, dass nicht alle verdauten Proteinspots identifiziert werden konnten. Dies ist zum einen auf Verunreinigungen der Proben, vor allem im Fall von seltenen Proteinen, und zum anderen darauf zurückzuführen, dass die Sensitivität der Massenspektrometrie zur Untersuchung von sehr kleinen und in sehr geringeren Mengen vorhandenen Proteine reduziert ist.

4.2. Eine vergleichende Proteomanalyse nach TGF β -1-Behandlung

Ziel dieser Arbeit war es, die Veränderungen des Proteoms nach TGF β -1-Behandlung der TK173-Zellen und somit während der Fibroblasten-Transformation im Rahmen der Entstehung der interstitiellen Nierenfibrose besser zu verstehen. Hierfür wurde die TK173-Zelllinie genutzt. Dabei handelt es sich um eine etablierte Zelllinie von immortalisierten Fibroblasten aus einer gesunden Spenderniere. Durch die Immortalisierung ähnelten die TK173-Zellen sowohl phänotypisch als auch funktionell den Zellen der Primärkultur (Müller et al. 1995), so dass diese Zellen ein geeignetes *in vitro*-Zellmodell zur Untersuchung der molekularen Pathomechanismen, die zur Fibroseentstehung führen, darstellten (Müller und Rodemann 1991).

Die Darstellung von Proteinmusteränderungen vor und nach TGF β -1-Behandlung der TK173-Zellen ermöglichte es, einen Überblick über die metabolischen Prozesse, die in der renalen Fibroseentstehung involviert sind, zu gewinnen (Abbildung 21).

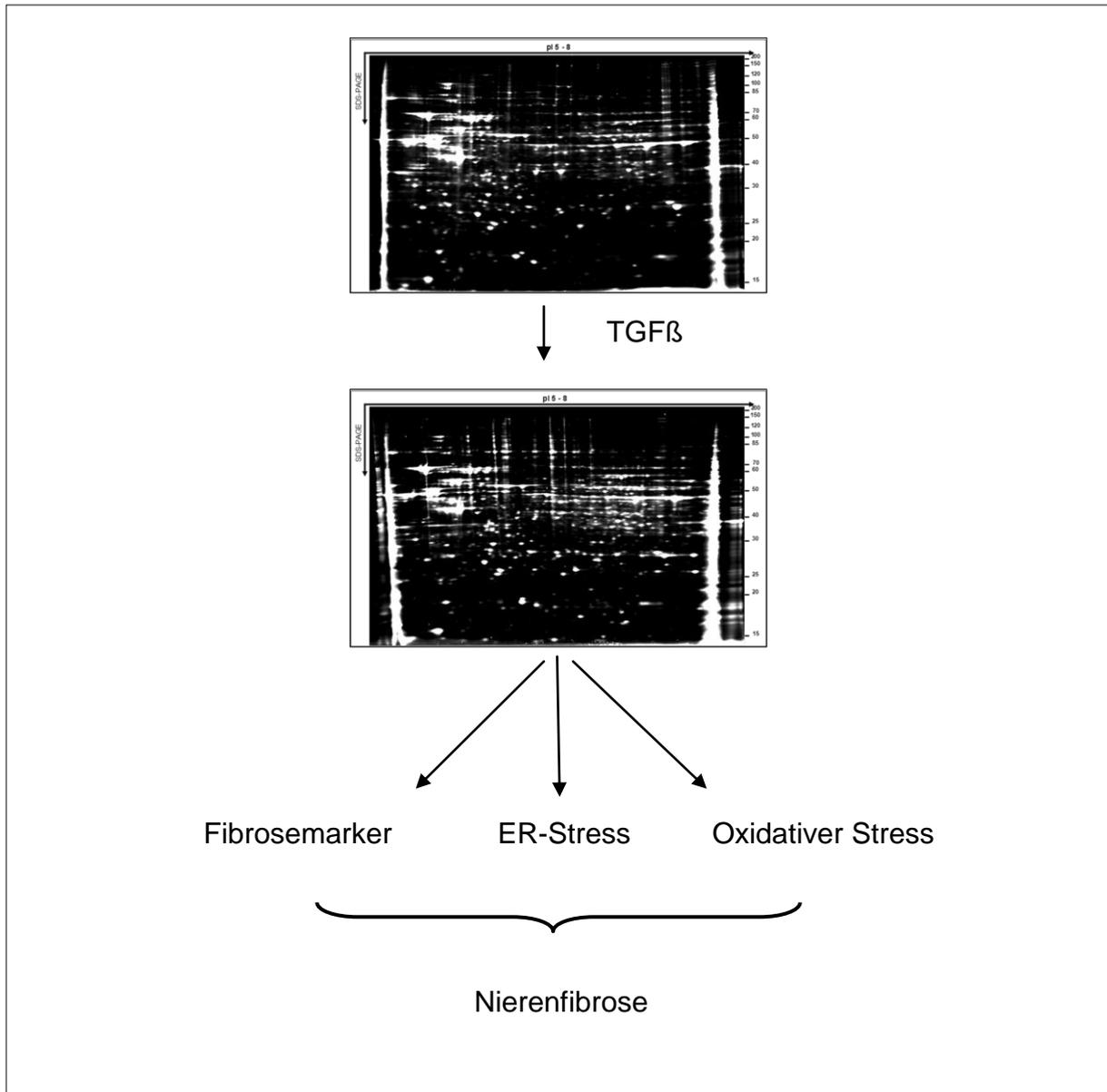


Abbildung 21: Schematische Darstellung über die TGFβ-1-Wirkung auf die renalen Fibroblasten. Dargestellt sind die zweidimensionalen Gelkarten vor und nach TGFβ-1-Behandlung. Mittels Massenspektrometrie zeigten sich hauptsächlich Fibrosemarker, Proteine des oxidativen Stresses und Proteine des ER-Stresses überexprimiert. Dies erlaubt, Rückschlüsse auf die Pathomechanismen, die im Zusammenhang mit Fibroseentstehung eine Rolle spielen, zu ziehen.

Die vergleichende Proteomanalyse ergab hierbei eine Vielzahl an Proteinen, die in unterschiedlichen biologischen Prozessen involviert sind. Die Mehrheit der überexprimierten Proteine konnte hauptsächlich drei Klassen zugeordnet werden: Strukturproteine (z. B. VIM, COL1A1), Proteine der ER-Stress-Antwort (z. B. GRP96,

Calreticulin) und Proteine der oxidativen Stressantwort (z. B. PRDX1, SOD). Bei der Fibrosierung im initialen Stadium handelt es sich um eine Antwort auf einen schädlichen Stimulus. Persistiert der Stimulus, so reagiert das Organ darauf, indem es widerstandsfähigeres Material synthetisiert. Ähnliche Ergebnisse sind im Rahmen des osmotischen Stresses bei Zellen aus dem aufsteigenden Schenkel der Henle-Schleife identifiziert worden. Hier zeigten sich die Proteine des Zytoskeletts, wie z. B. Vimentin, Zytokeratin, Tropomyosin 4 und Annexin I, II und III ebenfalls überexprimiert (Dihazi et al. 2005). In weiteren Untersuchungen wurden renale Fibroblasten osmolarem Stress ausgesetzt. Hierbei waren die ER-Stress-Proteine wie zum Beispiel ERP72 und Calreticulin ebenfalls deutlich überexprimiert (Dihazi et al. 2011). Die Fibrosemarker sowie die Proteine der ER-Stress-Antwort und der oxidativen Antwort zeigten sich nach TGF β -1-Behandlung hochreguliert, hinweisend für die molekularen Mechanismen, die während der Fibroblasten-Induktion und somit im Rahmen der Fibroseentstehung eine Rolle spielen.

4.3. Rolle von TGF β -1 im Rahmen der Fibroseentstehung in der Niere

TGF β -1 gilt bereits seit langem als Hauptmediator der Fibroseentstehung. Es findet sich in der fibrotischen Niere deutlich überexprimiert (Bottinger 2007). Es stimuliert auf zellulärer Ebene die gesteigerte Produktion der extrazellulären Matrix, die Zelltransformation und reduziert den Abbau der extrazellulären Matrix (Alvarez et al. 1992; Kopp et al. 1996; Grande und Lopez-Novoa 2009).

Neben den profibrotischen Effekten werden TGF β auch anti-inflammatorische Wirkungen zugesprochen. Versuche an TGF β -defizienten Mäusen ergaben eine massiv generalisierte inflammatorische Antwort, die zu einem frühzeitigen Sterben der Mäuse führte (Kulkarni et al. 1993). Verschiedenste Effekte von TGF β -1 auf renaler Ebene sind im Zusammenhang mit der Fibroseentstehung beschrieben worden. So ist bekannt, dass TGF β im Glomerulum zum Verlust der Podozyten, durch Apoptose, führt, welche für den Aufbau der glomerulären Basalmembran verantwortlich sind (Schiffer et al. 2001). Durch den Zelltod der Podozyten wird die Basalmembran porös, wodurch es zur Hyperfiltration der Basalmembran kommt. Die Hyperfiltration führt wiederum zur Glomerulosklerose. TGF β hat auch Effekte auf das Tubulussystem. Es führt zur Transformation der Tubuluszellen, zur gesteigerten EZM-Synthese sowie zur Inhibition des EZM-Abbaus (Eddy 1996).

Im Rahmen dieser Arbeit lassen sich Aussagen über die TGF β -1-Effekte auf die renalen Fibroblasten machen. Es zeigt sich auf proteomischer Ebene, dass es zu einer Zellinduktion kommt, welche den Fibroblasten Myofibroblasten-ähnliche Charakteristika vermittelt. Die Zellen sind hierdurch in der Lage ihre Syntheseaktivität zu steigern und große Mengen an Matrixkomponenten zu synthetisieren. Hierunter fallen auch typische Fibrosemarker, welche ihrerseits profibrotische Effekte haben.

Die gesteigerte Syntheseaktivität nach TGF β -1-Behandlung führt ab einem gewissen Punkt zur Störung der ER-Homöostase. Kommt es nämlich zum Überschreiten der Faltungskapazität des ERs, so aktiviert dies die ER-Stress-Antwort. Das erklärt somit die Überexpression der Proteine der ER-Stress-Antwort und die Interaktionen der Fibrosemarker mit den Proteinen der ER-Stress-Antwort (Abbildung 21). Daneben zeigt sich eine Überexpression der Proteine des oxidativen Stresses (z. B. SOD-Proteine, PRDX-Proteine) zum Schutz der Fibroblasten. Die Aktivierung des oxidativen Stresses zieht weitere profibrotische Effekte nach sich. Bereits in früheren Arbeiten wurde der oxidative Stress als profibrotischer Prozess beschrieben (Kawada et al. 1999).

Dihazi et al. konnten mittels proteomischer Methodik eine Überexpression an ER-Stress-Proteinen in Zellen aus fibrotischen Nieren zeigen (Dihazi et al. 2011). Chiang et al. zeigten anhand des Rattenmodells der unilateralen Ureterobstruktion einen Zusammenhang zwischen ER-Stress und Fibroseentstehung. Gleichzeitig wurde versucht, die Effekte des ER-Stresses zu antagonisieren bzw. zu schwächen. Mittels Candesartan zeigte sich eine schwächere Ausprägung der Fibrosierung (Chiang et al. 2011), so dass sich an dieser Stelle neue therapeutische Ansätze entwickeln lassen.

4.4. Differenziell exprimierte Proteine

4.4.1. Hochregulierung der Strukturproteine und ihre Rolle in der TGF β -1-induzierten Zelltransformation

4.4.1.1. Vimentin

Vimentin ist ein fibrilläres Protein, welches zu den sogenannten Intermediärfilamenten gehört. Vimentin ist der bekannteste Vertreter dieser Intermediärfilamente. Sie bilden mit den Mikrofilamenten sowie den Mikrotubuli das Zytoskelett. Das Zytoskelett ist für die Mechanik sowie für die Stabilität einer Zelle verantwortlich (Fuchs und Weber 1994; Fuchs und Cleveland 1998).

Vimentin ist ein 57 kDa schweres Protein, welches in Zellen mesenchymalen Ursprungs nachweisbar ist. Es interagiert mit den Zellorganellen, dem Zytoskelett sowie der Zellmembran. In der Niere findet es sich in Fibroblasten, Endothelzellen, Leukozyten, Mesangiumzellen sowie Stromazellen (Bachmann et al. 1983; Holthofer et al. 1984). In den Zellen des proximalen Tubulussystems dagegen lässt sich unter normalen Bedingungen kein Vimentin nachweisen. Unter pathologischen Bedingungen jedoch wird Vimentin auch in den proximalen Tubuluszellen exprimiert. So konnte Vimentin als Marker für die Entdifferenzierung der Epithelzellen identifiziert werden (Mendez et al. 2010).

In den Anfängen der Vimentin-Forschung wurde versucht, die Rolle und Funktion im Organismus zu verstehen. Indem man Vimentin-Knock-Out-Mäuse nutzte, zeigte sich zunächst kein phänotypisches Korrelat, welches man auf ein Vimentindefekt hätte zurückführen können. Auch eine kompensatorische Produktion von Intermediärfilamenten, um ein Fehlen von Vimentin auszugleichen, konnte nicht gezeigt werden, so dass man davon ausging, dass Vimentin unter normalen Bedingungen keine essenzielle Rolle ausübt (Colucci-Guyon et al. 1994) und man dem Intermediärfilament zunächst nur eine geringe Rolle in der Zellerhaltung zugestand. Im Verlauf wurden die Vimentin-Knock-Out-Mäuse in weiteren Experimenten Stress ausgesetzt. Jetzt wurde das Fehlen von Vimentin bemerkbar. So kam es unter anderem zu einer gestörten Wundheilung nach einer Hautverletzung. Es zeigte sich, dass Zellen ohne Vimentin eine geringere mechanische Stabilität, eine höhere Anfälligkeit gegenüber äußeren Einflüssen, eine

geringere Beweglichkeit sowie eine geringere Migrationsfähigkeit aufwiesen (Eckes et al. 1998; Eckes et al. 2000). Somit konnte für Vimentin eine entscheidende Rolle in der zellulären Stabilität nachgewiesen werden. Heute wird Vimentin weitaus mehr Aufgaben zugesprochen als die mechanische Stabilität. So übt es außerdem regulatorische Aufgaben auf zellulärer Ebene aus. Es interagiert mit verschiedenen Proteinen und ist so in verschiedene Signalwege der Zelle involviert (Ivaska et al. 2007). Liu T. et al. konnten zeigen, dass es in Endothelzellen, die hypoxischem Stress ausgesetzt wurden, zu einer Umorganisation von Vimentin kam. Dies führte letztlich zur Stabilisierung der Zelle in dem oxidativen Milieu (Liu T. et al. 2010).

Vimentin ist zwar kein spezifischer Marker für die interstitielle Nierenfibrose, aber es erlaubt durchaus eine Aussage über den Schweregrad des Remodellings und somit der Fibrosierung zu machen. Daneben scheint die Vimentin-Überexpression die TK173-Zellen nach der Behandlung mit TGF β -1 resistenter gegenüber dem ER-Stress zu machen und erlaubt somit der Zelle sich ihrem fibrotischen Milieu anzupassen.

4.4.1.2. Fibronectin

Fibronectin ist ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix. Es handelt sich um ein ca. 480 kDa schweres Glykoprotein. Es wird als Dimer sezerniert, die über zwei Disulfid-Brücken miteinander verbunden sind. Es wird eine plasmatische Form von einer zellulären Form unterschieden. Die zelluläre Form verfügt über diverse Aufgaben wie die Zelladhäsion, die Zellmigration, die Zellkommunikation und die Zelldifferenzierung (Hynes 1990). Über Bindungsdomänen ist es Fibronectin möglich, direkt diese Funktionen zu beeinflussen. Die plasmatische Form wird in den Hepatozyten synthetisiert und als Dimer in das Plasma sezerniert. Durch alternatives Splicing ist es möglich, aus einem Fibronectin-Gen mehrere Isoformen mit verschiedensten biologischen Funktionen zu erhalten.

In der gesunden Niere wird Fibronectin im Mesangium und in der Basalmembran des Glomerulums exprimiert. In der fibrotischen Niere ist die Fibronectin-Expression sowohl im Glomerulum als auch im Tubulointerstitium gesteigert (Hynes 1990; McDonald et al. 2003). Dabei scheint es zu einem Missverhältnis der verschiedenen Fibronectin-Isoformen zu kommen. Dieses Missverhältnis scheint profibrotisch zu wirken (Van Vliet et al. 2001). Fibronectin wirkt auch chemoattraktiv, so dass es

seinerseits ebenfalls zur Fibroblastenanziehung an den Ort des Geschehens führt (Gharaee-Kermani et al. 1996).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass es zu einem Anstieg der Fibronectin-Expression nach Behandlung der TK173-Zellen mit TGF β -1 kam. So scheint die Zelltransformation unter anderem mit einer gesteigerten Syntheseaktivität für Fibronectin einherzugehen. Dies wiederum potenziert den profibrotischen Prozess.

4.4.1.3. Desmin

Desmin ist ebenfalls ein Protein des Zytoskeletts. Es gehört den Intermediärfilamenten der Klasse III an und wird besonders in myogenen Zellen, wie skeletale und glatte Muskelzellen und Myozyten, exprimiert (Lazarides 1980). Neben ACTA und Vimentin gehört es zu den bekannten Markern der Myofibroblasten (Darby et al. 1990; Muchaneta-Kubara und El Nahas 1997). Die Überexpression von Desmin im Rahmen der Fibroblasten-Induktion ist in früheren Arbeiten bereits beschrieben worden (Muchaneta-Kubara und El Nahas 1997). Willis et al. zeigten in einem Zellmodell für die idiopathische Lungenfibrose nach TGF β -1-Behandlung der Alveolarzellen ebenfalls eine zunehmende Expression von Desmin neben ACTA und Vimentin (Willis et al. 2005). Somit scheint seine passagere Überexpression die Fibroblasten-Induktion zu begleiten. Ähnliches konnte Darby et al. im Zusammenhang mit der Wundheilung darstellen (Darby et al. 1990).

4.4.2. Hochregulierung der ER-Stress-Proteine und ihre Rolle in der TGF β -1-induzierten Zelltransformation

4.4.2.1. GRP78

GRP78 gehört zur Familie der sogenannten Hitze-Schock-Proteine, speziell der HSP 70-Familie. GRP78 gilt als Hauptregulator des Gleichgewichts im ER sowie der ER-Stress-Antwort. So überwacht es die Proteinfaltung und posttranslationellen Veränderungen, indem es mit den drei Hauptsensoren (PERK, ATF6, IRE1 α) der *unfolded protein response* interagiert. Dabei bindet es sich an die hydrophoben Anteile dieser Signaltransduktionsmoleküle. Im Rahmen der ER-Stress-Antwort kommt es unter anderem auch zu einer gesteigerten GRP78-Expression, um die Kapazität der Proteinfaltung zu steigern. GRP78 spielt auch in der frühen

Embryogenese eine essenzielle Rolle. So sind Mäuse ohne GRP78-Expression nicht überlebensfähig (Luo et al. 2006). Ji et al. konnten 2011 ebenfalls in einem Mausmodell zeigen, dass GRP78 für das Überleben der neugeborenen Mäuse essenziell war. In der adulten Leber führte ein GRP78-Verlust von mehr als 50 % zur Induktion einer Stressantwort. Es führte zu einer Funktionsstörung des ERs (Ji et al. 2011).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die durch TGF β -1 induzierte Zelltransformation die Expression von GRP78 erheblich steigert was auf eine wichtige Rolle des Proteins bei der renalen Fibrose hindeutet.

GRP78 reguliert auch den Calciumhaushalt und ist am kontrollierten Zelltod beteiligt. GRP78 ist nicht nur im ER lokalisiert, sondern auch außerhalb hiervon anzutreffen. Den Calciumhaushalt kontrolliert es über Calciumbindungsstellen, so dass es zu keinem Calciumverlust über der ER-Membran entlang des Konzentrationsgefälles kommen kann. Eine ATP-abhängige Pumpe transportiert Calcium gegen das Konzentrationsgefälle in das ER-Lumen zur Aufrechterhaltung der Homöostase. Neben der Calciumbindungskapazität kontrolliert GRP78 den Calciumhaushalt über den IP3R-Kanal (Inositol-1,4,5-triphosphat-Rezeptor). Hierbei handelt es sich um Calciumionen-Kanäle (SERCA), welche sich nach Bindung von Inositoltriphosphat öffnen, so dass die Calciumionen entlang des Konzentrationsgradienten in das Zytoplasma ausströmen können. Die Aufrechterhaltung der Calcium-Homöostase ist nicht nur für Signaltransduktionswege essenziell, sondern ist auch für die Proteinreifung wichtig. Eine erniedrigte Calciumkonzentration stört die korrekte Proteinfaltung (Wetmore und Hardman 1996).

Die GRP78-Expression ist in vielen Tumorerkrankungen erhöht. Eine hohe Korrelation ist in diesem Zusammenhang mit dem Grad der Tumorprogression und Metastasierung zu beobachten (Lee 2007). Eine gesteigerte Expression dieser Proteine nach TGF β -1-Behandlung erklärt, weshalb transformierte Fibroblasten widerstandsfähigere Zellen sind, da diese Chaperone letztlich zur Vermeidung des ER-Stresses führen, indem sie eine korrekte Proteinfaltung der gesteigerten Proteinsynthese und somit eine gesteigerten Synthese der extrazellulären Matrix und Proliferation gewährleisten. Es konnte gezeigt werden, dass eine reduzierte Expression von GRP78 zu einer Zunahme von falsch gefalteten Proteinen führt und somit eine Apoptose auslösen kann (Pyrko et al. 2007). Xu D. et al. zeigten in einem Rattenmodell, dass es im Rahmen der Fibroseentstehung initial zu einer gesteigerten

GRP78-Expression kommt, um die Zelle vor der Apoptose zu schützen (Xu D. et al. 2009). Somit lässt sich die gesteigerte Chaperon-Synthese nach TGF β 1-Behandlung dadurch erklären, dass die induzierten Fibroblasten versuchen, der gesteigerten Faltungsaktivität aufgrund der gesteigerten Syntheseaktivität gerecht zu werden.

4.4.2.2. Calreticulin

Hierbei handelt es sich um 46 kDa schweres Chaperon, welches intraluminal im ER vorzufinden ist (Michalak et al. 1999). An seinem aminoterminalen Ende trägt es die sogenannte KDEL-Sequenz. Diese besteht aus den vier Aminosäuren Lysin, Aspartat, Glutamat und Leucin, welche dafür sorgen, dass Calreticulin intraluminal bleibt. Erst nach Abspaltung der KDEL-Sequenz ist Calreticulin auch außerhalb des ERs anzutreffen.

Calreticulin fungiert als Chaperon. Das heißt, es bindet sich an unreife Glykoproteine, um zum einen eine fehlerhafte Modifikation, also Faltung, und zum anderen um eine fehlerhafte Aggregation dieser unreifen Proteine zu verhindern. Gleichzeitig überwacht es die richtigen Abläufe der Proteinfaltung.

Nach der Transkription gelangt die mRNA für die Translation an die Ribosomen (im Zytosol oder am ER). Hiernach erfolgen die post- oder cotranslationellen Veränderungen für die volle Wirksamkeit der Proteine. Dazu befinden sich im Lumen des ERs spezielle Enzyme und Chaperone, die diese posttranslationellen Faltungen überwachen und induzieren. Dazu zählen beispielsweise BiP/GRP78, Calreticulin, GRP94 und PDI (eine Thiol-Oxido-Reduktase) (Bedard et al. 2005). Calreticulin überwacht und lagert sich an unreife Glykoproteine (Hebert und Molinari 2007). Kommt es zu einer fehlerhaften Faltung, so werden die nicht-funktionsfähigen Proteine gespalten.

Calreticulin gilt ebenfalls als Hauptregulator der Calcium-Homöostase. Die Aufrechterhaltung des Calcium-Haushaltes ist essenziell für die meisten Signaltransduktionswege. Der Hauptanteil des Calciums ist intrazellulär im ER gespeichert. Hier besteht ein Konzentrationsgefälle. Es handelt sich um einen dynamischen Prozess, welcher ständigen Schwankungen, aufgrund von passivem Calciumverlust entlang des Konzentrationsgefälles, ausgesetzt ist. Die Aufrechterhaltung der intraluminalen Calciumkonzentration im ER ist jedoch essenziell für die ER-Funktion. So wird der Calciumverlust u. a. auch durch Calreticulin überwacht, indem es mit den transmembranären Calciumrezeptoren des

ERs interagiert. Hierbei handelt es sich um den Inositol-1,4,5,-trisphosphat-Rezeptor (IP3R) und um den Ryanodin-Rezeptor. Durch die Calcium-ATPase wird Calcium (SERCA) wieder aktiv in das ER-Lumen transportiert. Die Speicherung des Calciums sowie die Aufrechterhaltung der Calcium-Homöostase scheinen eine der wichtigsten Aufgaben zu sein. Zellen mit fehlender Calreticulin-Expression zeigen insbesondere hinsichtlich des Calcium-Haushaltes Störungen, welche letztlich mit einer geringeren Kapazität der Proteinfaltung und somit der Proteinreifung einher gehen (Molinari et al. 2004). Eine Calreticulin-Überexpression dagegen hat keinen Einfluss auf die Proteinreifung bzw. Proteinfaltung im ER. Es zeigen sich jedoch bei Calreticulin-Überexpression Veränderungen im Calcium-Haushalt. So steigt die intraluminale Calcium-Konzentration im ER an (Mery et al. 1996; Arnaudeau et al. 2002). Die Kontrolle des Calcium-Haushaltes gehört zu den Aufgaben von Calreticulin, die nicht durch andere luminaire Chaperone im ER kompensiert werden können (Arnaudeau et al. 2002).

Calreticulin fördert den Prozess der Wundheilung sowie den Prozess des Remodellings (Alexakis et al. 2006). Außerdem korreliert die Expression mit der Fibroseentstehung im Tiermodell wie auch im Zellkultur-Modell. In einer experimentellen Studie von Kypreou et al. wurden humane immortalisierte Tubuluszellen mit TGF β behandelt. Es zeigte sich eine signifikant höhere Calreticulin-Expression im Gegensatz zur Kontroll-Zelllinie, die nicht mit TGF β behandelt wurde. Dies konnte ebenfalls im Tiermodell der unilateralen Ureterobstruktion wie auch im Modell der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose gezeigt werden (Kypreou et al. 2008).

Calreticulin ist nicht nur im ER zu finden, sondern auch in anderen zellulären Kompartimenten, wie zum Beispiel im Zytoplasma. Das zytoplasmatische Calreticulin ist in der Integrin-vermittelten Kollagen-Adhäsion involviert. So kann es zum Remodelling der EZM führen. Daneben steigert Calreticulin die Synthese der EZM-Proteine und der Matrix-Metalloproteinasen (Elton et al. 2002). Die Calreticulin-Überexpression ist in vielen Prozessen beschrieben, wie zum Beispiel bei oxidativem Stress, Hypoxie, Fibrose und Wundheilung (Elton et al. 2002; McDonald et al. 2003). Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass Calreticulin in der Regulation der Matrixsynthese involviert ist. Van Duyn Graham et al. konnten zeigen, dass die Matrixsynthese, besonders die Kollagensynthese durch die Calciumkonzentration innerhalb des ERs sowie durch das Calreticulin reguliert wird (Van Duyn Graham et

al. 2010). Calreticulin bindet an Kollagen und ist auf mehreren Ebenen für die Kollagenexpression verantwortlich.

Baek et al. zeigten erstmals in einem Zellkultur-Modell für die idiopathische Lungenfibrose einen Zusammenhang zwischen der UPR und der Myofibroblastendifferenzierung (Baek et al. 2012). Dabei wurden Lungenfibroblasten mit TGF β behandelt. Anschließend wurde eine quantitative Bestimmung der Fibrosemarker sowie der ER-Stress-Proteine durchgeführt. Hierbei zeigte sich ein signifikanter Anstieg der ER-Stress-Proteine nach TGF β -1-Behandlung (GRP78, XBP-1 sowie ATF6). Zimmermann et al. konnten anhand von Calreticulin-defizienten Mäusen zeigen, dass Calreticulin ein wichtiger ER-Stress-Faktor ist in der TGF β -stimulierten EZM-Synthese im Rahmen der Fibroseentstehung. Die EZM-Synthese zeigte sich in Abwesenheit von Calreticulin deutlich runterreguliert trotz TGF β -Stimulation (Zimmerman et al. 2013). Es scheint, dass die Calreticulin-Überexpression nach TGF β -1-Behandlung der TK173-Zellen im Rahmen der Zelltransformation weitere profibrotische Effekte nach sich zieht, da es nicht nur zu einer gesteigerten Syntheseaktivität der EZM, sondern auch zur Veränderung der EZM-Zusammensetzung kommt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Überexpression von Calreticulin den Zusammenhang zwischen der ER-Stress-Antwort, der Zelltransformation und der Fibroseprogression zeigen.

4.4.2.3. Protein-Disulfid-Isomerase

Protein-Disulfid-Isomerase ist im Lumen des ERs lokalisiert und mengenmäßig weit vertreten. PDI ist eine Dithiol-Disulfid-Oxidoreductase. Es interagiert und kontrolliert andere intraluminale Chaperone im ER. Es katalysiert die Disulfid-Brückenbildung zwischen zwei Cystein-Resten innerhalb einer oder mehreren Peptidketten. Dabei handelt es sich um eine kovalente Bindung, die zur dreidimensionalen Faltung von unreifen Proteinen führt und somit zur Stabilität beiträgt (Wang 1998).

Mittlerweile sind 20 Vertreter der PDI-Familie bekannt. Sie unterscheiden sich hauptsächlich in der Länge ihrer Aminosäuresequenz und in der Anordnung der sogenannten Domänen. Gemeinsam ist den Mitgliedern eine in etwa 100 AS lange Sequenz, die sogenannte Thioredoxin-like Domäne. Die Primärstruktur besteht aus vier Domänen. Der zentrale Abschnitt, die b- und b'-Domäne, verfügt über keine katalysierenden Eigenschaften. Lange Zeit waren die Funktionen dieser Domänen unklar. Nun weiß man, dass dieser Bereich ein starres Netzwerk für die

Proteinbindung sowie für die Zusammenarbeit mit den Chaperonen darstellt. Die a- und a'-Domänen entsprechen der oben genannten Thioredoxin-like-Domäne, welche die Disulfid-Brückenbindung katalysiert (Appenzeller-Herzog und Ellgaard 2008). Dieser Bereich ist hoch konserviert, wohingegen die b- und b'-Domänen die größte Sequenzvariabilität aufweisen. Die b- und b'-Domänen verfügen ebenfalls über eine Thioredoxin-like Domäne, jedoch ohne katalysierende Funktionen (Alanen et al. 2003; Pirneskoski et al. 2004). PDI verfügt auch über Chaperone-Funktionen. Das heißt, es ist ebenfalls in der Lage unreife Proteine zu binden, um sie vor Fehlfaltungen und Aggregation zu schützen. In der Regulation des Calcium-Haushaltes ist PDI ebenfalls involviert, da es über Calcium-Bindungsstellen verfügt. Zur PDI-Familie gehören unter anderem ERP57 und ERP72, welche sich in dieser Arbeit ebenfalls nach der TGF β -1-Behandlung in den TK173-Zellen überexprimiert darstellten. Dieses deutet auf den gesteigerten Bedarf für die Katalyse der Disulfid-Brückenbindungen und somit für die gesteigerte EZM-Synthese der TK173-TGF β -1-Zelle zur Gewährleistung der ordentlichen Faltung und somit zur Gewährleistung der Funktionalität der Matrixkomponenten, wie z. B. für Fibronectin, hin.

4.5. Fibroblasten-Induktion und ihre Rolle für die Fibroseentstehung in der Niere

Die Rolle der Myofibroblasten im Rahmen der Nierenfibrose sowie im Rahmen der Fibroseentstehung wird heute im Allgemeinen kaum mehr angezweifelt. Dagegen herrscht noch große Unstimmigkeit hinsichtlich des Ursprungs der Myofibroblasten (Liu Y. 2004). Favorisiert werden vor allem Epithelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten, glatte Muskelzellen und mesenchymale Stammzellen. So konnte im Zusammenhang mit der Nierenfibrose, Lungenfibrose oder Leberfibrose bereits in mehreren Untersuchungen die sogenannte Epithelial-Mesenchymale oder auch die Endothelial-Mesenchymale Transformation beschrieben werden (Miettinen et al. 1994; Iwano et al. 2002; Rastaldi 2006). Lange Zeit war die dominierende Theorie bezüglich der Myofibroblasten-Entstehung die Epithelial-Mesenchymale Transformation. Hierbei wird angenommen, dass die Tubuluszellen im Rahmen der Fibroseentstehung oder nach einem Tubulusschaden ihre epithelialen Charakteristika (Phänotyp, Polarität, Epithel-Marker (E-Cadherin und Zytokeratin), Adhäsion) verlieren und sich mesenchymale Eigenschaften aneignen. So

exprimieren sie nach der Transformation unter anderem ACTA und Vimentin (Hay 1995; Rastaldi et al. 2002).

Yang et al. postulierten, dass auf zellulärer Ebene vier Schritte essenziell für die Transformation der Tubulusepithelien zu Fibroblasten sind (Yang und Liu 2001; Liu Y. 2004; Hinz et al. 2007):

1. Verlust der Adhäsionseigenschaften der Epithelzellen
2. ACTA-Expression
3. Schädigung der tubulären Basalmembran
4. Gesteigerte Zellmigration

Die Hypothese der EMT wurde erstmals 1995 beschrieben (Hay und Zuk 1995). So transformiert, sind die Zellen in der Lage, die Basalmembran zu durchbrechen, um in das peritubuläre Interstitium zu wandern. Hier wird im Anschluss die exzessive extrazelluläre Matrixsynthese initiiert (Bedard et al. 2005; Hebert und Molinari 2007; Dickhout et al. 2011). Picard et al. konnten jedoch anhand des etablierten Modell der unilateralen Ureterobstruktion an der Ratte zeigen, dass die Tubuluszellen zwar einen Teil ihrer charakteristischen Eigenschaft verlieren, jedoch nicht ausreichend genug, um in einen anderen Zelltyp transformiert zu werden (Picard et al. 2008). Picard et al. interessierten sich dabei besonders für die frühe Phase der Fibroseentstehung, da sich in diesem Stadium die Zellveränderungen besser darstellen lassen. Sie zeigten, dass bereits nach einem Tag Obstruktion, die Fibroblasten zunehmend die charakteristischen Eigenschaften der Myofibroblasten erlangen. Ein weiteres Charakteristikum der Myofibroblasten ist das kontraktile Zytoskelett. Es besteht aus ACTA und ermöglicht letztlich den Zellen sich fortzubewegen sowie zu kontrahieren (Desmouliere et al. 2005; Hinz et al. 2007). Hierbei handelt es sich um eine Aktin-Isoform, welche typischerweise in der glatten Muskulatur der Gefäßwände exprimiert wird. Es sind sechs Isoformen bekannt (Skalli et al. 1986). In der gesunden Niere ist ACTA nur in der Gefäßmuskulatur nachweisbar (Essawy et al. 1997). Es ermöglicht den Zellen zum Ort des Geschehens zu wandern, und es erklärt die Kontraktion des fibrotischen Gewebes. Weiter wird angenommen, dass Myofibroblasten aus Vorläuferzellen des Knochenmarks entstehen. Diese Vorläuferzellen infiltrieren dabei das verletzte

Gewebe und erlangen dann Myofibroblasten-Fähigkeiten. Dies gilt insbesondere für die perivaskulär lokalisierten Myofibroblasten (Iwano et al. 2002; Wada et al. 2007). Im Rahmen der Wundheilung wurde nach Schädigung des Gewebes eine Transformation der residenten Fibroblasten in Myofibroblasten beschrieben (Gabbiani 2003; Desmouliere et al. 2005). Dabei erlangen die Zellen Eigenschaften einer glatten Muskelzelle und exprimieren ACTA. Dies ermöglicht den Zellen zum Ort des Geschehens zu migrieren und die offenen Wunde zu verschließen. Die kontraktile Kraft, die hierbei entsteht, ist essenziell für das Verschließen einer offenen Wunde. Nach erfolgreicher Wundheilung werden die Myofibroblasten über Apoptose entfernt. In der „gestörten“ Wundheilung sind die Myofibroblasten nachweisbar. Damit wird auch die exzessive Synthese und Ablagerung der Matrix erklärt (Kozlov et al. 2010). Im Rahmen der Fibroseentstehung konnten mittels ACTA-Identifizierung Myofibroblasten als Hauptzellen für die Matrixsynthese identifiziert werden (Alpers et al. 1993).

Im Zusammenhang mit der Nierenfibrose wurde in mehreren Untersuchungen beschrieben, dass die Transformation vom Fibroblasten in den Myofibroblasten über einen transienten Zelltyp, dem sogenannten Proto-Myofibroblasten, läuft (Tomasek et al. 2002; Desmouliere et al. 2005; Hinz et al. 2007). Die Fibroblasten wandern dabei in das verletzte Gebiet, angezogen durch Chemokine, Zytokine und Wachstumsfaktoren. Hier sind die Zellen aufgrund von Kontraktionskräften zunehmender Spannung ausgesetzt. Diese mechanischen Kräfte, die auf der Zelle wirken, induzieren die Transformation der Fibroblasten in die Proto-Myofibroblasten (Tomasek et al. 2002). Diese exprimieren Fibronectin und, im Gegensatz zu Myofibroblasten, noch kein ACTA. Die Stressfasern übertragen über die fokalen Adhäsionsmoleküle die Spannungskraft in die umliegende extrazelluläre Matrix und über die Gap-Junctions intrazellulär. Dies führt dazu, dass im umgebenden Gewebe die Spannung weiter zunimmt. Zudem wird TGF β -1 von Makrophagen, verletzten Epithelzellen und Thrombozyten synthetisiert. In Kombination mit der zunehmenden Spannung führt dies letztlich zur Myofibroblasten Transformation (Hinz et al. 2007). Im Rahmen dieser Arbeit zeigten sich lichtmikroskopisch wie auch durch die Immunfluoreszenzmikroskopie morphologischen Veränderungen. Auf proteomischer Ebene sah man in den zweidimensionalen Gelen nach TGF β -1-Behandlung eine Zunahme der Spots insbesondere im mittleren pH- und MW-Bereich. Durch die massenspektrometrischen Analysen zeigte sich zum einen eine Überexpression der

Strukturproteine. Dies lässt sich als Hinweis auf eine Transformation deuten, da die Myofibroblasten ebenfalls durch eine gesteigerte extrazelluläre Matrixproduktion gekennzeichnet sind (Desmouliere et al. 2005). In der Immunfluoreszenzfärbung zeigte sich ebenfalls eine zunehmende ACTA-Expression in Abhängigkeit von der TGF β 1-Wirkung. Zum anderen zeigte sich eine Überexpression der Proteine des ER-Stresses und des oxidativen Stresses, welche die Anpassung der Zellen an das gestresste Milieu und die Widerstandsfähigkeit der Zellen widerspiegelt. In Abbildung 19 zeigt sich eine Runterregulation der ER-Stress-Proteine nach zweiwöchiger Inkubation mit TGF β -1. Eine mögliche Ursache hierfür wäre, dass die induzierten Fibroblasten sich an das gestresste Milieu angepasst haben, so dass die Expression der ER-Stress-Proteine abnimmt. In Abbildung 18 sieht man weiter, dass nach der zweiwöchigen TGF β -1-Wirkung die induzierten Fibroblasten weiterhin fibrotisch sind. Das zeigt letztlich, dass die Zellen nach Adaption an das gestresste Milieu ihren Phänotyp beibehalten und erklärt weshalb in fibrotischen Nieren ein höherer Anteil an Fibroblasten vorliegt (Müller und Rodemann 1991).

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der Nierenfibrose, genauso wie bei anderen Formen der Organfibrose, sind verschiedene Zellpopulationen involviert. Die Nierenfibrose geht unweigerlich mit dem Verlust der Nierenfunktion einher - unabhängig von der zugrunde liegenden Erkrankung. Die Rolle der renalen Fibroblasten in der Entstehung der Nierenfibrose wird immer mehr favorisiert. Um therapeutische Ansätze entwickeln zu können, ist es wichtig, die Pathomechanismen im Rahmen der Fibroblasten-Transformation zu kennen. Mit dem Etablieren der immortalisierten Zelllinie TK173 als Modell für die normalen Nierenfibroblasten wurden viele Untersuchungen ermöglicht, um die Pathomechanismen der Fibroseentstehung besser verstehen zu können. Im Rahmen dieser Arbeit führte ich eine vergleichende Proteinprofilierung der TK173-Zellen und der mit TGF β -1 behandelten TK173-Zellen durch. Hierfür wurden zunächst das Proteom der TK173-Zelllinie und das Proteom der mit TGF β -1 behandelten TK173-Zelllinie dargestellt. Anschließend erfolgte die massenspektrometrische und computergestützte Auswertung der Proteinspots. Die Datenbankanalyse ergab 114 identifizierte Proteine in den TK173-Zellen und in den TK173-TGF β -1-Zellen. Hierbei zeigten sich 49 Proteine überexprimiert. Diese Proteine konnten hauptsächlich drei funktionellen Gruppen zugeordnet werden. Zum einen Strukturproteine, die bekannte Fibrosemarker darstellen, wie zum Beispiel VIM, FIN und DES. Des Weiteren Proteine der ER-Stress- und UP-Antwort, wie zum Beispiel GRP78, ERP57, ERP72, PDI und CALR, und schließlich Proteine des oxidativen Stresses, wie zum Beispiel PRDX1 und SOD. Mittels Western-Blot-Analysen und der Immunfluoreszenzmikroskopie konnten die Ergebnisse insgesamt bestätigt werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die TGF β -1-Wirkung auf die TK173-Zellen während der Fibroblasten-Transformation zur Aktivierung der ER-Stress-Antwort und des oxidativen Stresses führt. Daneben zeigten sich bekannte Fibrosemarker überexprimiert, welches letztlich die gesteigerte Syntheseaktivität der EZM im Zusammenhang mit der Fibroseentstehung widerspiegelt.

Es gelang in dieser Arbeit, mittels proteomischer Methoden einiges über die Rolle der TGF β -1-induzierten Fibroblasten-Transformation im Zusammenhang mit der Nierenfibrose darzustellen. Neben der Expression der typischen Fibrosemarker konnte eine Verbindung mit dem ER-Stress und dem oxidativen Stress während der Zelltransformation hergestellt werden. Da es im Rahmen der Fibroseentstehung zu

einer gesteigerten Synthese der Komponenten der EZM kommt, ist die Zelle in der Lage, mittels der UPR und dem ER-Stress, der Belastung entgegenzuwirken. Somit gelang es, die Interaktionen der verschiedenen Signalwege, die nach TGF β -1-Behandlung der renalen Fibroblasten auftraten, darzustellen.

Das genaue Verständnis über die Pathomechanismen, die in der Nierenfibrose eine Rolle spielen, erlaubt letztlich die Entwicklung von therapeutischen Ansätzen. Derzeit gibt es noch kein effektives Therapieregime, welches die Entstehung und Progression der Fibrose effektiv hemmen oder rückgängig machen kann. Ein anti-fibrotisches Agens müsste die Inflammation zu Beginn der Gewebereparatur rückgängig machen oder zumindest hemmen können, um eine überschießende ER-Stress-Antwort zu verhindern. In der späten Phase der Reparaturmechanismen müsste es die exzessive Narbenentstehung, also die exzessive Matrix-Akkumulation sowie das Remodelling, verhindern können. Ein anderer interessanter Therapieansatz auf zellulärer Ebene wäre die Hemmung der Zellinduktion.

6. Anhang

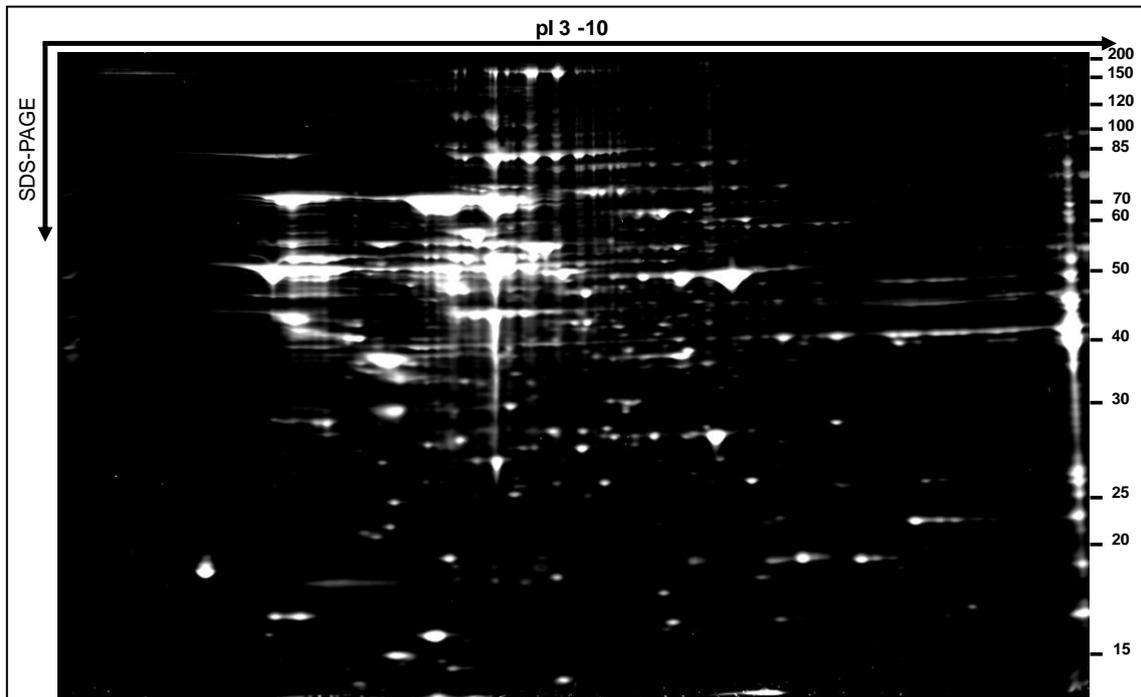


Abbildung 22: Zweidimensionale Gelelektrophorese vom Zellextrakt der TK173-TGF β -1-Zellen. 150 μ g Protein wurden auf einen IPG-Streifen im pH-Bereich 3-10 (Bio-Rad) aufgetragen und fokussiert. Die Auftrennung nach Größe erfolgte auf einem Criterion 12 % Bis-Tris Gel (Bio-Rad). Die Färbung der Proteine erfolgte mit Flamingo[®] (Bio-Rad).

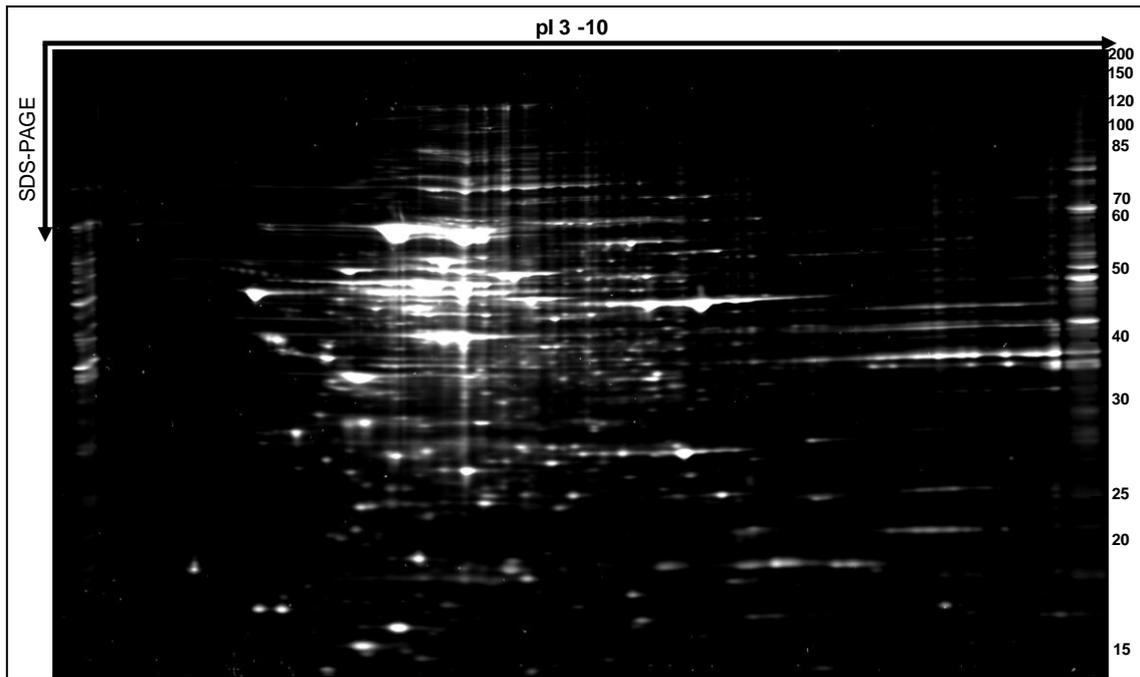


Abbildung 23: Zweidimensionale Gelelektrophorese vom Zellextrakt der TK173-Zellen. 150 µg Protein wurden auf einen IPG-Streifen im pH-Bereich 3-10 (Bio-Rad) aufgetragen und fokussiert. Die Auftrennung nach Größe erfolgte auf einem Criterion 12 % Bis-Tris Gel (Bio-Rad). Die Färbung der Proteine erfolgte mit Flamingo® (Bio-Rad).

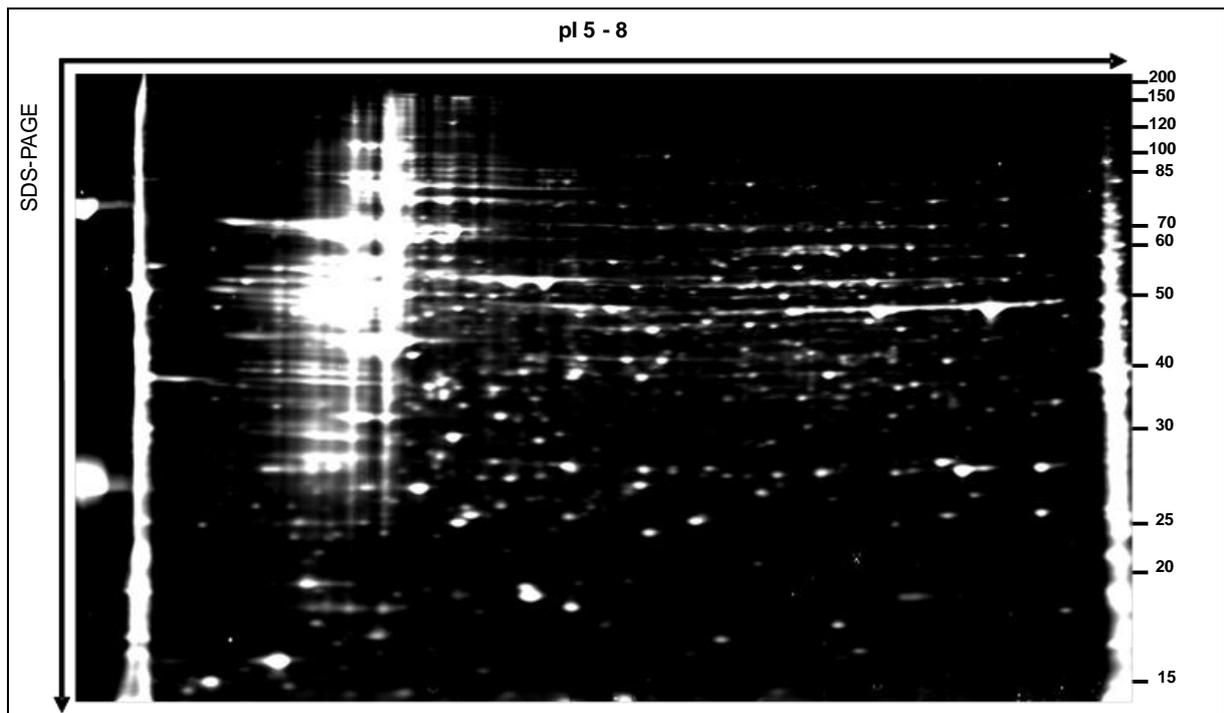


Abbildung 24: Zweidimensionale Gelelektrophorese vom Zellextrakt der TK173-Zellen. 200 μ g Protein wurden auf einen IPG-Streifen im pH-Bereich 5-8 (Bio-Rad) aufgetragen und fokussiert. Die Auftrennung nach Größe erfolgte auf einem Criterion 12 % Bis-Tris Gel (Bio-Rad). Die Färbung der Proteine erfolgte mit Flamingo[®] (Bio-Rad).

Tabelle 11: 13 differenziell unterexprimierte Proteine in den TK173-Zellen nach TGF β -1-Behandlung. Die TGF β -1-Wirkung auf die TK173-Zellen wurde mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese analysiert. Hier sind die Proteine angegeben, die nach der TGF β -1-Behandlung im Vergleich zur unbehandelten TK173-Zelllinie runterreguliert wurden.

Nr.	Proteinname	Genname	Swiss-Prot Acc. Nr.	Mass	MS/MS score
1	Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase	ACP1	P24666	18031	103
2	Chloride intracellular channel protein 1	CLIC1	O00299	26906	98
3	Cystatin-B	CSTB	P04080	11133	92
4	Eukaryotic translation initiation factor 1	EIF1	P41567	12725	78
5	Histidine triad nucleotide-binding protein 1	HINT1	P49773	13793	45
6	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	IMPDH2	P12268	55770	42
7	NADH dehydrogenase[ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	NDUFV2	P19404	27374	109
8	PEST proteolytic signal-containing nuclear protein	PCNP	Q8WW12	18913	96
9	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA	P62937	18001	123
10	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	PKM2	P14618	57937	145
11	Splicing factor, arginine/serine-rich 1	SFRS1	Q07955	27728	
12	Tubulin-specific chaperone A	TBCA	O75347	12847	89
13	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	UBE2N	P61088	17127	

7. Literaturverzeichnis

Alanen HI; Salo KE; Pekkala M; Siekkinen HM; Pirneskoski A; Ruddock LW (2003): Defining the domain boundaries of the human protein disulfide isomerases. *Antioxid Redox Signal* 5: 367-74

Alexakis C; Maxwell P; Bou-Gharios G (2006): Organ-specific collagen expression: implications for renal disease. *Nephron Exp Nephrol* 102: e71-5

Alpers CE; Seifert RA; Hudkins KL; Johnson RJ; Bowen-Pope DF (1993): PDGF-receptor localizes to mesangial, parietal epithelial, and interstitial cells in human and primate kidneys. *Kidney Int* 43: 286-94

Alvarez RJ; Sun MJ; Haverty TP; Iozzo RV; Myers JC; Neilson EG (1992): Biosynthetic and proliferative characteristics of tubulointerstitial fibroblasts probed with paracrine cytokines. *Kidney Int* 41: 14-23

Anderson NL; Anderson NG (1998): Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* 19: 1853-61

Appenzeller-Herzog C; Ellgaard L (2008): The human PDI family: versatility packed into a single fold. *Biochim Biophys Acta* 1783: 535-48

Arnaudeau S; Frieden M; Nakamura K; Castelbou C; Michalak M; Demaurex N (2002): Calreticulin differentially modulates calcium uptake and release in the endoplasmic reticulum and mitochondria. *J Biol Chem* 277: 46696-705

Bachmann S; Kriz W; Kuhn C; Franke WW (1983): Differentiation of cell types in the mammalian kidney by immunofluorescence microscopy using antibodies to intermediate filament proteins and desmoplakins. *Histochemistry* 77: 365-94

Baek HA; Kim Do S; Park HS; Jang KY; Kang MJ; Lee DG; Moon WS; Chae HJ; Chung MJ (2012): Involvement of endoplasmic reticulum stress in myofibroblastic differentiation of lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 46: 731-9

Bedard K; Szabo E; Michalak M; Opas M (2005): Cellular functions of endoplasmic reticulum chaperones calreticulin, calnexin, and ERp57. *Int Rev Cytol* 245: 91-121

Bohle A; Strutz F; Müller GA (1994): On the pathogenesis of chronic renal failure in primary glomerulopathies: a view from the interstitium. *Exp Nephrol* 2: 205-10

Bohle A; Mackensen-Haen S; Von Gise H; Grund KE; Wehrmann M; Batz C; Bogenschütz O; Schmitt H; Nagy J; Müller C et al. (1990): The consequences of tubulo-interstitial changes for renal function in glomerulopathies. A morphometric and cytological analysis. *Pathol Res Pract* 186: 135-44

Bottinger EP (2007): TGF-beta in renal injury and disease. *Semin Nephrol* 27: 309-20

Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54

Brenner BM (2002): Remission of renal disease: recounting the challenge, acquiring the goal. *J Clin Invest* 110: 1753-8

Chiang CK; Hsu SP; Wu CT; Huang JW; Cheng HT; Chang YW; Hung KY; Wu KD; Liu SH (2011): Endoplasmic reticulum stress implicated in the development of renal fibrosis. *Mol Med* 17: 1295-305

Colucci-Guyon E; Portier MM; Dunia I; Paulin D; Pournin S; Babinet C (1994): Mice lacking vimentin develop and reproduce without an obvious phenotype. *Cell* 79: 679-94

Darby I; Skalli O; Gabbiani G (1990): Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest* 63: 21-9

Desmouliere A (1995): Factors influencing myofibroblast differentiation during wound healing and fibrosis. *Cell Biol Int* 19: 471-6

Desmouliere A; Chaponnier C; Gabbiani G (2005): Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen* 13: 7-12

Dickhout JG; Carlisle RE; Austin RC (2011): Interrelationship between cardiac hypertrophy, heart failure, and chronic kidney disease: endoplasmic reticulum stress as a mediator of pathogenesis. *Circ Res* 108: 629-42

Dihazi H; Asif AR; Agarwal NK; Doncheva Y; Müller GA (2005): Proteomic analysis of cellular response to osmotic stress in thick ascending limb of Henle's loop (TALH) cells. *Mol Cell Proteomics* 4: 1445-58

Dihazi H; Dihazi GH; Mueller C; Lahrichi L; Asif AR; Bibi A; Eltoweissy M; Vasko R; Mueller GA (2011): Proteomics characterization of cell model with renal fibrosis phenotype: osmotic stress as fibrosis triggering factor. *J Proteomics* 74: 304-18

Dihazi H; Dihazi GH; Bibi A; Eltoweissy; Mueller CA; Asif RA; Rubel D; Vasko R; Mueller GA (2013): Secretion of ERP57 is important for extracellular matrix accumulation and progression of of renal fibrosis, and is an early sign of disease onset. *J Cell Sci* 126: 3649-63

Diz AP; Carvajal-Rodriguez A; Skibinski DO (2011): Multiple hypothesis testing in proteomics: a strategy for experimental work. *Mol Cell Proteomics* 10: M110 004374

Eckes B; Dogic D; Colucci-Guyon E; Wang N; Maniotis A; Ingber D; Merckling A; Langa F; Aumailley M; Delouvee A et al. (1998): Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts. *J Cell Sci* 111 (Pt 13): 1897-907

Eckes B; Kessler D; Aumailley M; Krieg T (1999): Interactions of fibroblasts with the extracellular matrix: implications for the understanding of fibrosis. Springer Semin Immunopathol 21: 415-29

Eckes B; Colucci-Guyon E; Smola H; Nodder S; Babinet C; Krieg T; Martin P (2000): Impaired wound healing in embryonic and adult mice lacking vimentin. J Cell Sci 113 (Pt 13): 2455-62

Eddy AA (1996): Molecular insights into renal interstitial fibrosis. J Am Soc Nephrol 7: 2495-508

Elton CM; Smethurst PA; Eggleton P; Farndale RW (2002): Physical and functional interaction between cell-surface calreticulin and the collagen receptors integrin alpha2beta1 and glycoprotein VI in human platelets. Thromb Haemost 88: 648-54

Eltoweissy M; Müller GA; Bibi A; Nguye PV; Dihazi GH; Müller CA; Dihazi H (2011): Proteomics analysis identifies PARK7 as an important player for renal cell resistance and survival under oxidative stress. Mol Biosyst 7: 1277-88

Essawy M; Soylemezoglu O; Muchaneta-Kubara EC; Shortland J; Brown CB; El Nahas AM (1997): Myofibroblasts and the progression of diabetic nephropathy. Nephrol Dial Transplant 12: 43-50

Fava RA; McClure DB (1987): Fibronectin-associated transforming growth factor. J Cell Physiol 131: 184-9

Frei U; Schober-Halstenberg H (2007): Nierenersatztherapie in Deutschland. http://www.bundesverband-niere.de/files/QuaSi-Niere-Bericht_2006-2007.pdf

Fuchs E; Weber K (1994): Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. Annu Rev Biochem 63: 345-82

Fuchs E; Cleveland DW (1998): A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. Science 279: 514-9

Gabbiani G (2003): The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. J Pathol 200: 500-3

Gharaee-Kermani M; Wiggins R; Wolber F; Goyal M; Phan SH (1996): Fibronectin is the major fibroblast chemoattractant in rabbit anti-glomerular basement membrane disease. Am J Pathol 148: 961-7

Girndt M (2012): [Clinical issues with uremia]. Internist (Berl) 53: 817-22

Go AS; Chertow GM; Fan D; Mcculloch CE; Hsu CY (2004): Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. N Engl J Med 351: 1296-305

Grande MT; Lopez-Novoa JM (2009): Fibroblast activation and myofibroblast generation in obstructive nephropathy. *Nat Rev Nephrol* 5: 319-28

Hanash KA; Al Zahrani H; Mokhtar AA; Aslam M (2003): Retrograde vaginal methylene blue injection for localization of complex urinary fistulas. *J Endourol* 17: 941-3

Hay ED (1995): An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)* 154: 8-20

Hay ED; Zuk A (1995): Transformations between epithelium and mesenchyme: normal, pathological, and experimentally induced. *Am J Kidney Dis* 26: 678-90

Hebert DN; Molinari M (2007): In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. *Physiol Rev* 87: 1377-408

Herold G: Innere Medizin Eigenverlag, Köln 2011

Hinck AP; Archer SJ; Qian SW; Roberts AB; Sporn MB; Weatherbee JA; Tsang ML; Lucas R; Zhang BL; Wenker J et al. (1996): Transforming growth factor beta 1: three-dimensional structure in solution and comparison with the X-ray structure of transforming growth factor beta 2. *Biochemistry* 35: 8517-34

Hinz B; Celetta G; Tomasek JJ; Gabbiani G; Chaponnier C (2001): Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell* 12: 2730-41

Hinz B; Phan SH; Thannickal VJ; Galli A; Bochaton-Piallat ML; Gabbiani G (2007): The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol* 170: 1807-16

Holthofer H; Miettinen A; Lehto VP; Lehtonen E; Virtanen I (1984): Expression of vimentin and cytokeratin types of intermediate filament proteins in developing and adult human kidneys. *Lab Invest* 50: 552-9

Hruska KA; Mathew S; Lund R; Qiu P; Pratt R (2008): Hyperphosphatemia of chronic kidney disease. *Kidney Int* 74: 148-57

Hudson BG; Tryggvason K; Sundaramoorthy M; Neilson EG (2003): Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. *N Engl J Med* 348: 2543-56

Hynes RO: Fibronectins, Springer-Verlag, New York, 1990

Imamura T; Takase M; Nishihara A; Oeda E; Hanai J; Kawabata M; Miyazono K (1997): Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature* 389: 622-6

Ivaska J; Pallari HM; Nevo J; Eriksson JE (2007): Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Exp Cell Res* 313: 2050-62

Iwano M; Plieth D; Danoff TM; Xue C; Okada H; Neilson EG (2002): Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* 110: 341-50

Ji C; Kaplowitz N; Lau MY; Kao E; Petrovic LM; Lee AS (2011): Liver-specific loss of glucose-regulated protein 78 perturbs the unfolded protein response and exacerbates a spectrum of liver diseases in mice. *Hepatology* 54: 229-39

Kaissling B; Le Hir M (2008): The renal cortical interstitium: morphological and functional aspects. *Histochem Cell Biol* 130: 247-62

Kaissling B; Hegyi I; Loffing J; Le Hir M (1996): Morphology of interstitial cells in the healthy kidney. *Anat Embryol (Berl)* 193: 303-18

Kalluri R (2003): Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 3: 422-33

Kalluri R; Zeisberg M (2006): Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 6: 392-401

Kaneto H; Morrissey J; Klahr S (1993): Increased expression of TGF-beta 1 mRNA in the obstructed kidney of rats with unilateral ureteral ligation. *Kidney Int* 44: 313-21

Karas M; Hillenkamp F (1988): Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 60: 2299-301

Kawada N; Moriyama T; Ando A; Fukunaga M; Miyata T; Kurokawa K; Imai E; Hori M (1999): Increased oxidative stress in mouse kidneys with unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* 56: 1004-13

Kleophas W; Bieber B; Robinson BM; Duttlinger J; Fliser D; Lonnemann G; Rump LC; Pisoni RL; Port FK; Reichel H (2013): Implementation and first results of a German Chronic Kidney Disease Registry. *Clin Nephrol* 79: 184-91

Klinke R; Pape H-C; Silbernagl S: *Physiologie*, 5; Thieme Verlag KG, Stuttgart 2005

Kolb M; Margetts PJ; Anthony DC; Pitossi F; Gauldie J (2001): Transient expression of IL-1beta induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 107: 1529-36

Kopp JB; Factor VM; Mozes M; Nagy P; Sanderson N; Bottinger EP; Klotman PE; Thorgeirsson SS (1996): Transgenic mice with increased plasma levels of TGF-beta 1 develop progressive renal disease. *Lab Invest* 74: 991-1003

Kozlov G; Maattanen P; Thomas DY; Gehring K (2010): A structural overview of the PDI family of proteins. *FEBS J* 277: 3924-36

Küçüköylü S; Rump L (2012): Arterielle Hypertonie als Progressionsfaktor der chronischen Niereninsuffizienz. *Der Nephrologe* 18: 27

Kulkarni AB; Huh CG; Becker D; Geiser A; Lyght M; Flanders KC; Roberts AB; Sporn MB; Ward JM; Karlsson S (1993): Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 770-4

Kunkel SL; Strieter RM; Lindley IJ; Westwick J (1995): Chemokines: new ligands, receptors and activities. *Immunol Today* 16: 559-61

Kypreou KP; Kavvadas P; Karamessinis P; Peroulis M; Alberti A; Sideras P; Psarras S; Capetanaki Y; Politis PK; Charonis AS (2008): Altered expression of calreticulin during the development of fibrosis. *Proteomics* 8: 2407-19

Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5

Lam S; Van Der Geest RN; Verhagen NA; Daha MR; Van Kooten C (2004): Secretion of collagen type IV by human renal fibroblasts is increased by high glucose via a TGF-beta-independent pathway. *Nephrol Dial Transplant* 19: 1694-701

Lasky JA; Brody AR (2000): Interstitial fibrosis and growth factors. *Environ Health Perspect* 108 Suppl 4: 751-62

Lazarides E (1980): Desmin and intermediate filaments in muscle cells. *Results Probl Cell Differ* 11: 124-31

Lee AS (2007): GRP78 induction in cancer: therapeutic and prognostic implications. *Cancer Res* 67: 3496-9

Letterio JJ; Roberts AB (1997): TGF-beta: a critical modulator of immune cell function. *Clin Immunol Immunopathol* 84: 244-50

Levey AS; Bosch JP; Lewis JB; Greene T; Rogers N; Roth D (1999): A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 130: 461-70

Levey AS; Coresh J; Balk E; Kausz AT; Levin A; Steffes MW; Hogg RJ; Perrone RD; Lau J; Eknoyan G (2003): National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Ann Intern Med* 139: 137-47

Lin SL; Kisseleva T; Brenner DA; Duffield JS (2008): Pericytes and perivascular fibroblasts are the primary source of collagen-producing cells in obstructive fibrosis of the kidney. *Am J Pathol* 173: 1617-27

Liu T; Guevara OE; Warburton RR; Hill NS; Gaestel M; Kayyali US (2010): Regulation of vimentin intermediate filaments in endothelial cells by hypoxia. *Am J Physiol Cell Physiol* 299: C363-73

Liu Y (2004): Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol* 15: 1-12

Liu Y (2006): Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int* 69: 213-7

Lopez-Hernandez FJ; Lopez-Novoa JM (2012): Role of TGF-beta in chronic kidney disease: an integration of tubular, glomerular and vascular effects. *Cell Tissue Res* 347: 141-54

Luo S; Mao C; Lee B; Lee AS (2006): GRP78/BiP is required for cell proliferation and protecting the inner cell mass from apoptosis during early mouse embryonic development. *Mol Cell Biol* 26: 5688-97

Majno G; Gabbiani G; Hirschel BJ; Ryan GB; Statkov PR (1971): Contraction of granulation tissue in vitro: similarity to smooth muscle. *Science* 173: 548-50

Massague J (1990): The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 6: 597-641

Massague J (1998): TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67: 753-91

Massague J; Wotton D (2000): Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *Embo J* 19: 1745-54

Maxwell PH; Osmond MK; Pugh CW; Heryet A; Nicholls LG; Tan CC; Doe BG; Ferguson DJ; Johnson MH; Ratcliffe PJ (1993): Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice. *Kidney Int* 44: 1149-62

Mcdonald GA; Sarkar P; Rennke H; Unemori E; Kalluri R; Sukhatme VP (2003): Relaxin increases ubiquitin-dependent degradation of fibronectin in vitro and ameliorates renal fibrosis in vivo. *Am J Physiol Renal Physiol* 285: F59-67

Mendez MG; Kojima S; Goldman RD (2010): Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J* 24: 1838-51

Mery L; Mesaeli N; Michalak M; Opas M; Lew DP; Krause KH (1996): Overexpression of calreticulin increases intracellular Ca²⁺ storage and decreases store-operated Ca²⁺ influx. *J Biol Chem* 271: 9332-9

Michalak M; Corbett EF; Mesaeli N; Nakamura K; Opas M (1999): Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem J* 344 Pt 2: 281-92

Miettinen PJ; Ebner R; Lopez AR; Derynck R (1994): TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *J Cell Biol* 127: 2021-36

Molinari M; Eriksson KK; Calanca V; Galli C; Cresswell P; Michalak M; Helenius A (2004): Contrasting functions of calreticulin and calnexin in glycoprotein folding and ER quality control. *Mol Cell* 13: 125-35

Muchaneta-Kubara EC; El Nahas AM (1997): Myofibroblast phenotypes expression in experimental renal scarring. *Nephrol Dial Transplant* 12: 904-15

Müller GA; Rodemann HP (1991): Characterization of human renal fibroblasts in health and disease: I. Immunophenotyping of cultured tubular epithelial cells and fibroblasts derived from kidneys with histologically proven interstitial fibrosis. *Am J Kidney Dis* 17: 680-3

Müller GA; Frank J; Rodemann HP; Engler-Blum G (1995): Human renal fibroblast cell lines (tFKIF and tNKF) are new tools to investigate pathophysiological mechanisms of renal interstitial fibrosis. *Exp Nephrol* 3: 127-33

Nagaoka T; Kaburagi Y; Hamaguchi Y; Hasegawa M; Takehara K; Steeber DA; Tedder TF; Sato S (2000): Delayed wound healing in the absence of intercellular adhesion molecule-1 or L-selectin expression. *Am J Pathol* 157: 237-47

Nakao A; Afrakhte M; Moren A; Nakayama T; Christian JL; Heuchel R; Itoh S; Kawabata M; Heldin NE; Heldin CH et al. (1997): Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature* 389: 631-5

Nangaku M; Eckardt KU (2006): Pathogenesis of renal anemia. *Semin Nephrol* 26: 261-8

Nath KA (1992): Tubulointerstitial changes as a major determinant in the progression of renal damage. *Am J Kidney Dis* 20: 1-17

Neuhoff V; Arold N; Taube D; Ehrhardt W (1988): Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9: 255-62

Nkf (2002): K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 39: S1-266

O'farrell PH (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250: 4007-21

Okada H; Kalluri R (2005): Cellular and molecular pathways that lead to progression and regression of renal fibrogenesis. *Curr Mol Med* 5: 467-74

Perkins DN; Pappin DJ; Creasy DM; Cottrell JS (1999): Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20: 3551-67

Picard N; Baum O; Vogetseder A; Kaissling B; Le Hir M (2008): Origin of renal myofibroblasts in the model of unilateral ureter obstruction in the rat. *Histochem Cell Biol* 130: 141-55

Pirneskoski A; Klappa P; Lobell M; Williamson RA; Byrne L; Alanen HI; Salo KE; Kivirikko KI; Freedman RB; Ruddock LW (2004): Molecular characterization of the principal substrate binding site of the ubiquitous folding catalyst protein disulfide isomerase. *J Biol Chem* 279: 10374-81

Pyrko P; Schonthal AH; Hofman FM; Chen TC; Lee AS (2007): The unfolded protein response regulator GRP78/BiP as a novel target for increasing chemosensitivity in malignant gliomas. *Cancer Res* 67: 9809-16

Qi W; Chen X; Poronnik P; Pollock CA (2006): The renal cortical fibroblast in renal tubulointerstitial fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 38: 1-5

Rabilloud T (2002): Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics* 2: 3-10

Rastaldi MP (2006): Epithelial-mesenchymal transition and its implications for the development of renal tubulointerstitial fibrosis. *J Nephrol* 19: 407-12

Rastaldi MP; Ferrario F; Giardino L; Dell'antonio G; Grillo C; Grillo P; Strutz F; Müller GA; Colasanti G; D'amico G (2002): Epithelial-mesenchymal transition of tubular epithelial cells in human renal biopsies. *Kidney Int* 62: 137-46

Rehm H. LT: *Proteomic (Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics)*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2010, 209-322

Remick DG (1995): Cytokines: a primer for plastic surgeons. *Ann Plast Surg* 35: 549-59

Remuzzi G; Bertani T (1998): Pathophysiology of progressive nephropathies. *N Engl J Med* 339: 1448-56

Remuzzi G; Benigni A; Remuzzi A (2006): Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. *J Clin Invest* 116: 288-96

Rodemann HP; Müller GA (1991): Characterization of human renal fibroblasts in health and disease: II. In vitro growth, differentiation, and collagen synthesis of fibroblasts from kidneys with interstitial fibrosis. *Am J Kidney Dis* 17: 684-6

Rodemann HP; Müller GA; Knecht A; Norman JT; Fine LG (1991): Fibroblasts of rabbit kidney in culture. I. Characterization and identification of cell-specific markers. *Am J Physiol* 261: F283-91

Schiffer M; Bitzer M; Roberts IS; Kopp JB; Ten Dijke P; Mundel P; Bottinger EP (2001): Apoptosis in podocytes induced by TGF-beta and Smad7. *J Clin Invest* 108: 807-16

Schultz GS; Wysocki A (2009): Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair Regen* 17: 153-62

Schurch W; Seemayer TA; Gabbiani G (1998): The myofibroblast: a quarter century after its discovery. *Am J Surg Pathol* 22: 141-7

Shevchenko A; Wilm M; Vorm O; Mann M (1996): Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68: 850-8

Shi Y; Massague J (2003): Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113: 685-700

Skalli O; Ropraz P; Trzeciak A; Benzonana G; Gillesen D; Gabbiani G (1986): A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol* 103: 2787-96

Slater M (1996): Dynamic interactions of the extracellular matrix. *Histol Histopathol* 11: 175-80

Strieter RM; Wiggins R; Phan SH; Wharram BL; Showell HJ; Remick DG; Chensue SW; Kunkel SL (1989): Monocyte chemotactic protein gene expression by cytokine-treated human fibroblasts and endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 162: 694-700

Strutz F; Müller GA (2006): Renal fibrosis and the origin of the renal fibroblast. *Nephrol Dial Transplant* 21: 3368-70

Strutz F; Zeisberg M (2006): Renal fibroblasts and myofibroblasts in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 17: 2992-8

Strutz F; Renziehausen A; Dietrich M; Amin J; Becker V; Heeg M; Rastaldi MP; Müller GA (2001): Cortical fibroblast culture from human biopsies. *J Nephrol* 14: 190-7

Strutz F; Zeisberg M; Ziyadeh FN; Yang CQ; Kalluri R; Müller GA; Neilson EG (2002): Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. *Kidney Int* 61: 1714-28

Tomasek JJ; Gabbiani G; Hinz B; Chaponnier C; Brown RA (2002): Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 349-63

Towbin H; Staehelin T; Gordon J (1992): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* 24: 145-9

Tsakas S; Goumenos DS (2006): Accurate measurement and clinical significance of urinary transforming growth factor-beta1. *Am J Nephrol* 26: 186-93

Van Duyn Graham L; Sweetwyne MT; Pallero MA; Murphy-Ullrich JE (2010): Intracellular calreticulin regulates multiple steps in fibrillar collagen expression, trafficking, and processing into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 285: 7067-78

Van Vliet A; Baelde HJ; Vleming LJ; De Heer E; Bruijn JA (2001): Distribution of fibronectin isoforms in human renal disease. *J Pathol* 193: 256-62

Verrecchia F; Mauviel A (2002): Control of connective tissue gene expression by TGF beta: role of Smad proteins in fibrosis. *Curr Rheumatol Rep* 4: 143-9

Wada T; Sakai N; Matsushima K; Kaneko S (2007): Fibrocytes: a new insight into kidney fibrosis. *Kidney Int* 72: 269-73

Wahl P; Wolf M (2012): FGF23 in chronic kidney disease. *Adv Exp Med Biol* 728: 107-25

Wang CC (1998): Isomerase and chaperone activities of protein disulfide isomerase are both required for its function as a foldase. *Biochemistry (Mosc)* 63: 407-12

Wasinger VC; Cordwell SJ; Cerpa-Poljak A; Yan JX; Gooley AA; Wilkins MR; Duncan MW; Harris R; Williams KL; Humphery-Smith I (1995): Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 16: 1090-4

Westermeier R; Scheibe B (2008): Difference gel electrophoresis based on lys/cys tagging. *Methods Mol Biol* 424: 73-85

Wetmore DR; Hardman KD (1996): Roles of the propeptide and metal ions in the folding and stability of the catalytic domain of stromelysin (matrix metalloproteinase 3). *Biochemistry* 35: 6549-58

Wilkins MR; Sanchez JC; Gooley AA; Appel RD; Humphery-Smith I; Hochstrasser DF; Williams KL (1996a): Progress with proteome projects: why all proteins

expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev* 13: 19-50

Wilkins MR; Pasquali C; Appel RD; Ou K; Golaz O; Sanchez JC; Yan JX; Gooley AA; Hughes G; Humphery-Smith I et al. (1996b): From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N Y)* 14: 61-5

Willis BC; Liebler JM; Luby-Phelps K; Nicholson AG; Crandall ED; Du Bois RM; Borok Z (2005): Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 166: 1321-32

Xu D; Perez RE; Rezaiekhalthigh MH; Bourdi M; Truog WE (2009): Knockdown of ERp57 increases BiP/GRP78 induction and protects against hyperoxia and tunicamycin-induced apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297: L44-51

Xu T; Bianco P; Fisher LW; Longenecker G; Smith E; Goldstein S; Bonadio J; Boskey A; Heegaard AM; Sommer B et al. (1998): Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice. *Nat Genet* 20: 78-82

Yamaguchi Y; Mann DM; Ruoslahti E (1990): Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. *Nature* 346: 281-4

Yamamoto T; Noble NA; Miller DE; Border WA (1994): Sustained expression of TGF-beta 1 underlies development of progressive kidney fibrosis. *Kidney Int* 45: 916-27

Yamamoto T; Nakamura T; Noble NA; Ruoslahti E; Border WA (1993): Expression of transforming growth factor beta is elevated in human and experimental diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 1814-8

Yang J; Liu Y (2001): Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. *Am J Pathol* 159: 1465-75

Zimmerman KA; Graham LV; Pallero MA; Murphy-Ullrich JE (2013): Calreticulin Regulates Transforming Growth Factor-beta-stimulated Extracellular Matrix Production. *J Biol Chem* 288: 14584-98

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. rer. nat. H. Dihazi für die Bereitstellung meines Arbeitsthemas sowie für die engagierte Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken. Insbesondere für die Hilfestellung und anregenden Diskussionen möchte ich mich bedanken. Weiter gilt mein Dank Prof. Dr. med. G. A. Müller für die Nutzung seines Forschungslabors.

Ein besonderes Dankeschön geht an das Laborteam, vor allem an Elke Brunst-Knoblich für ihre Einarbeitung im Laboralltag sowie für ihre wertvolle Unterstützung bei meiner Arbeit. Weiterhin möchte ich Herrn Dr. rer. nat. Jan-Hendrik Streich danken, der mir immer mit gutem Rat zur Seite stand. Ein weiteres Dankeschön gilt meinen Laborkollegen Rabi Raj Datta und Bettina Buchmaier, die mir im Laboralltag zur Seite standen. Bei Herrn Dr. rer. nat. Nitin Argawal möchte ich mich ebenfalls für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit bedanken.