

Aus dem Institut für Klinische Chemie
(ehemaliger Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Oellerich)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Molekulare Mechanismen der antiproliferativen und
antifibrotischen Wirkung von Mycophenolsäure *in vitro*

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Christian Koch
aus
Sondershausen

Göttingen 2017

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

Referent: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Oellerich

Ko-Referent: Prof. Dr. med. M. Zeisberg

Datum der mündlichen Prüfung: 17.01.2018

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Molekulare Mechanismen der antiproliferativen und antifibrotischen Wirkung von Mycophenolsäure *in vitro*" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

TABELLENVERZEICHNIS	6
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	7
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
1. EINLEITUNG	13
1.1 CHRONISCHE NIERENINSUFFIZIENZ	13
1.2 RENALE FIBROGENESE	14
1.2.1 EINFÜHRUNG	14
1.2.2 KOLLAGEN UND EZM-BILDENDE ZELLEN	16
1.2.3 EPITHELIALE-MESENCHYMMALE TRANSITION	17
1.3 REVERSIBILITÄT DER FIBROGENESE UND ANTIFIBROTISCHE THERAPIE	19
1.3.1 ÜBERBLICK	19
1.3.2 MPA	21
1.4 HYPOTHESE, ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG	23
2. MATERIAL UND METHODEN	24
2.1 MATERIALIEN	24
2.1.1 CHEMIKALIEN	24
2.1.2 PUFFER UND LÖSUNGEN	28
2.1.3 OLIGONUKLEOTIDE	30
2.1.4 GEBRAUCHSWAREN	32
2.1.5 ANTIKÖRPER	33
2.1.6 GERÄTE	34
2.1.7 ZELLKULTUR UND -BEDARF	36
2.2 METHODEN	39
2.2.1 KOLLAGEN-KONTRAKTIONSSASSAY	39
2.2.2 WUNDVERSCHLUSSASSAY	40
2.2.3 SPINDLE-INDEX	41
2.2.4 CELL PROLIFERATION ELISA, BRDU (CHEMILUMINESCENT)	41
2.2.5 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE	42
2.2.6 ZELLVITALITÄTSKONTROLLE	44
2.2.7 NUKLEINSÄURETECHNISCHE METHODEN	45
2.2.8 MYKOPLASMENTEST	51
2.2.9 PROTEINCHEMISCHE METHODEN	52
2.2.10 <i>RASAL1</i> -PROMOTORMETHYLIERUNGSSTATUS	58
2.2.11 STATISTIK UND BIOINFORMATISCHE AUSWERTUNG	63
3. ERGEBNISSE	64
3.1 EINFLUSS VON MPA AUF DIE GENEXPRESSION VON <i>ITGB1</i>, <i>EPCAM</i> UND <i>RASAL1</i>	64
3.2 EINFLUSS VON MPA AUF DIE KOLLAGEN-KONTRAKTION	65
3.3 EINFLUSS VON MPA AUF DEN <i>RASAL1</i>-PROMOTORMETHYLIERUNGSSTATUS	66
3.4 EINFLUSS VON MPA AUF DIE ZELLPROLIFERATION	68
3.5 EINFLUSS VON MPA AUF DEN WUNDVERSCHLUSS <i>IN VITRO</i>	69

3.6 SPINDLE-INDEX	70
3.7 EINFLUSS VON MPA AUF DIE EXPRESSION EPITHELIALER MARKER	71
3.8 EINFLUSS VON MPA AUF DAS PROTEOM	73
3.8.1 PROTEINE MIT SIGNIFIKANT VERÄNDERTER PHOSPHORYLIERUNG	73
3.8.2 PROTEINE MIT SIGNIFIKANT VERÄNDERTER GESAMTMENGE	77
3.8.3 BIOINFORMATISCHE ANALYSE DER IDENTIFIZIERTEN PROTEINE	82
4. DISKUSSION	83
4.1 EINFLUSS DES TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA 1 AUF HK-2-ZELLEN	83
4.2 WIRKUNG DES EGF AUF HK-2-ZELLEN IN AN- UND ABWESENHEIT VON TGFβ1	85
4.3 EFFEKTE DER MYCOPHENOLSÄURE (MPA) AUF STIMULIERTE HK-2-ZELLEN	86
4.4 FAZIT, LIMITATION UND AUSBLICK	90
5. ZUSAMMENFASSUNG	92
6. ANHANG	94
6.1 ANZAHL UND ÜBEREINSTIMMUNG VON PEPTIDEN	94
6.2 PUBLIKATION	107
6.3 POSTERPRÄSENTATION IM RAHMEN DER DGKL-JAHRESTAGUNG	108
7. LITERATURVERZEICHNIS	109

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Darstellung der einzelnen Bedingungen.	38
Tabelle 2 Zusammensetzung der Einzelmedien für den Kollagen-Kontraktionsassay.	39
Tabelle 3 Zusammensetzung der Einzelmedien für den Wundverschlussassay.	40
Tabelle 4 Puffer und Lösungen zum Cell Proliferation ELISA.	42
Tabelle 5 Monoklonale Antikörper zur durchflusszytometrischen Analyse.	43
Tabelle 6 Zusammensetzung und Bedingungen für die qRT-PCR im LightCycler.	49
Tabelle 7 Reaktionsansatz und Reaktionsbedingungen des Enzymverdaus.	51
Tabelle 8 Zusammensetzung des verwendeten Reaktionsgemischs und Bedingungen für die qRT-PCR im LightCycler.	52
Tabelle 9 Bedingungen der isoelektrischen Fokussierung.	54
Tabelle 10 Zusammensetzung der 12,5 %igen Polyacrylamidgele.	55
Tabelle 11 Reaktionsgemisch für die quantitative Verifizierung des <i>RASAL1</i> -Methylierungsstatus.	60
Tabelle 12 Molekulargewicht, isoelektrischer Punkt und Funktion von Proteinen veränderter Phosphorylierung.	76
Tabelle 13 Molekulargewicht, isoelektrischer Punkt und Funktion von Proteinen veränderter Gesamtmenge.	79

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 DNA-Sequenz nach Behandlung mit dem EZ DNA Methylation-Gold™ Kit.	58
Abbildung 2 Reaktionsbedingungen für den Nachweis unmethylierter DNA.	62
Abbildung 3 Reaktionsbedingungen für den Nachweis methylierter DNA.	62
Abbildung 4 Expression von <i>ITGβ1</i> in HK-2-Zellen.	65
Abbildung 5 Expression von <i>EpCAM</i> in HK-2-Zellen.	65
Abbildung 6 Darstellung resultierender Kollagenmatrizes als virtuelle Gele.	66
Abbildung 7 Genexpression von <i>RASAL1</i> in HK-2-Zellen.	67
Abbildung 8 Schmelzkurven unterschiedlicher Konzentrationen <i>RASAL1</i>	67
Abbildung 9 Zellproliferation unter Einfluss von MPA.	68
Abbildung 10 Reversibilitätsprüfung der Zellproliferation unter Einfluss von G/8AG.	69
Abbildung 11 Wundverschluss Tendenzen stimulierter HK-2-Zellen.	70
Abbildung 12 Inhibitorischer Einfluss von MPA auf den Wundverschluss.	70
Abbildung 13 Spindle-Index stimulierter HK-2-Zellen.	71
Abbildung 14 FACS-Analyse stimulierter HK-2-Zellen.	72
Abbildung 15 Gebildete Ratios nach durchflusszytometrischer Analyse.	73
Abbildung 16 Beispiel eines Polyacrylamidgels stimulierter HK-2-Zellen.	74
Abbildung 17 Relevante Phosphospots im Polyacrylamidgel.	75
Abbildung 18 Exemplarische Darstellung eines silbergefärbten Polyacrylamidgeles.	77
Abbildung 19 Veränderte Proteinspots stimulierter HK-2-Zellen im Polyacrylamidgel.	78
Abbildung 20 Interaktionsnetzwerk unter Einfluss eines durch EGF eruierten Effektes.	86
Abbildung 21 <i>RASAL1</i> - Bedeutung während der chronischen Nierenschädigung.	88
Abbildung 22 Interaktionsnetzwerk unter Einfluss eines durch MPA eruierten Effektes.	89

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
ACE	angiotensin converting enzyme
ACN	Acetonitril
α SMA	alpha smooth muscle actin
APC	Allophycocyanin
AT1	Angiotensin II-Rezeptor-Subtyp 1
APS	Ammoniumpersulfat
cDNA	komplementäre DNA
CD	cluster of differentiation
CDS	coding sequence
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CTGF	connective tissue growth factor
d	Tag
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser, deionisiertes Wasser
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnmt1	DNA-Methyltransferase 1

DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF-2	Elongation factor 2
EGF	epithelial growth fractor
EMT	Epitheliale-Mesenchymale Transition
EndMT	Endotheliale-Mesenchymale Transition
EpCAM	epithelial cell adhesionmolecule
ESRD	End Stage Renal Disease
EtOH	Ethanol
EZM	Extrazellulärmatrix
FCS	Fetales Kälberserum
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
FSC	forward scatter
g	Gramm, Erdbeschleunigung
GAP-1	guanin nucleotide exchange factor
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GOI	gene of interest
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
h	Stunde(n)
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
HGF	hepatocyte growth factor
IMP	Inosin-Monophosphat

IMPDH	Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase
IPG	immobilisierter pH-Gradient
ITG β 1	Integrin β 1
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KO	Körperoberfläche
LDH	Laktatdehydrogenase
Lsg.	Lösung
MeOH	Methanol
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
mind.	mindest/-ens
Mio.	Million
MMF	Mycophenolat-Mofetil
MMP	Metalloproteinasen
MPA	Mycophenolsäure
mRNA	messenger-RNA
mw	molecular weight
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
OTR	oxygen transfer factor
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
pH	pondus Hydrogenii
pI	isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RAS	rat sarcoma
RASAL1	RAS protein activator like 1
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SI	Spindle-Index
SSC	sideward scatter
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TGF β 1	transforming growth factor β 1
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Einheit der Enzymaktivität (Unit)
V	Volt

VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
XMP	Xanthosin-5'-monophosphat

1. Einleitung

1.1 Chronische Niereninsuffizienz

Bei der chronischen Niereninsuffizienz handelt es sich um einen über Monate bis Jahre verlaufenden progredienten Verlust der Nierenfunktion. Als End Stage Renal Disease (ESRD) bezeichnet und nach der National Kidney Foundation definiert über eine glomeruläre Filtrationsrate (GFR) kleiner gleich $15 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ KO beträgt die Prävalenz in Deutschland derzeit etwa 1000 pro 1 Mio. Einwohner (Levey et al. 2003). Es handelt sich um eine Erkrankung mit einer ungünstigen Langzeitprognose, steigende Inzidenz und Prävalenz sowie einer hohen sozioökonomischen Belastung (Eknoyan et al. 2004).

Der Verlust der Nierenfunktion geht hierbei unabhängig von seiner Pathogenese mit der Entwicklung einer Nierenfibrose einher. Dabei korreliert die Zunahme des Narbengewebes eng mit der renalen Funktionseinschränkung. Eine konsekutive Verdrängung der für die Organfunktion spezifischen Zellen bedingt schließlich den gesamten Funktionsverlust der Niere. Die Progression zur ESRD ist ein relativ uniformer Prozess, begleitet von einer Glomerulussklerose, tubulointerstitieller Fibrose sowie einer Veränderung der Gefäßarchitektur durch den Untergang glomerulärer und peritubulärer Kapillaren. Bedeutendster Faktor zum irreversiblen Verlust der renalen Funktion ist hierbei die Fibrosierung des tubulointerstitiellen Gewebes (Nangaku 2004). In der Folge kommt es zu einem Verlust der glomerulären, tubulären und endokrinen Funktionen, welche Störungen im Wasser- und Elektrolythaushalt und im Säuren- und Basenhaushalt nach sich ziehen. Des Weiteren kommt es in der Progression zur verminderten Produktion von Erythropoetin, aktiviertem Vitamin D und Prostaglandinen, was letztlich zur renalen Anämie und Osteopathie führt. Auch besteht eine gesteigerte Retention harnpflichtiger Substanzen mit möglichen toxischen Organschäden und einem erhöhten kardiovaskulären Risiko.

Rund 10000 der über 60000 in Deutschland dialysepflichtigen Patienten warten auf eine Nierentransplantation. Aufgrund der niedrigen Spendenbereitschaft in der Bevölkerung können jährlich lediglich etwa 2500 Nieren transplantiert werden. Das Alter der Patienten für eine Nierenersatztherapie liegt im Median bei 66 Jahren. Die Ursachen der terminalen Niereninsuffizienz sind mannigfaltig, dennoch stellen die diabetische Nephropathie mit etwa 35 %, die hypertensive oder vaskuläre Nephropathie mit rund 25 % und die Glomerulonephritiden mit beinahe 15 % die

bedeutendsten Diagnosen bei Therapiebeginn zum Nierenersatzverfahren dar (Frei und Schober-Halstenberg 2008).

Unabhängig von der zugrunde liegenden Erkrankung kommt es in den verbliebenen, funktionell intakten Glomeruli zu einer Aufrechterhaltung der Nierenrestfunktion über eine intraglomeruläre Drucksteigerung mit Hyperfiltration, die durch ein zusätzliches Vorhandensein einer arteriellen Hypertonie erheblich verstärkt wird. Das Peptidhormon Angiotensin II, Produkt des Renin-Angiotensin-Systems (RAS), ist ein wesentlicher Vermittler dieses Prozesses und führt über eine vermehrte Produktion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren zu einer glomerulären Hypertrophie und Hyperplasie. Ferner korreliert seine Anwesenheit mit einer erhöhten glomerulären Permeabilität mit Verlust der essentiellen Siebfunktion. Die damit einhergehende Proteinurie führt ihrerseits über ihr nephrotoxisches Potential zur progressiven Glomerulussklerose und Entwicklung von Schrumpfnieren (Mezzano et al. 2001). Letztlich vermittelt Angiotensin II auch die Induktion zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und impliziert so zusätzlich eine vaskuläre Dysfunktion, welche sich am Ausmaß des arteriellen Hypertonus beteiligt (Touyz 2004).

1.2 Renale Fibrogenese

1.2.1 Einführung

Als Fibrose wird eine Gewebeveränderung bezeichnet, welche durch die pathologische Vermehrung von Bindegewebszellen mit überschießender Produktion bindegewebiger Komponenten der EZM gekennzeichnet ist. Die zugrunde liegenden Ereignisse der renalen Fibrosierung - in vollem Umfang der sich abzeichnenden Histopathologie - umfassen eine Vielzahl zellulärer Vorgänge und molekularer Mechanismen. Wie jede Fibrogenese beruht auch die renale Fibrosierung auf dem Prinzip der Wundheilung als einer Reaktion nach initial stattgehabter Schädigung.

Der Pathomechanismus wird dabei willkürlich in 4 Phasen eingeteilt:

1.) die zelluläre Aktivierungs- und Schädigungsphase: Hier erlauben aktivierte Tubuli eine erleichterte Migration mononukleärer Zellen über das peritubuläre

Kapillarendothel, wo sie sich zu Makrophagen und Myofibroblasten bzw. aktivierten Fibroblasten differenzieren und das Interstitium besiedeln,

2.) die fibrogenetische Signalphase, in der fibrosefördernde Faktoren wie TGF β , CTGF, Angiotensin II oder Endothelin-1 (u. a.) ausgeschüttet werden, gefolgt von

3.) der eigentlichen fibrogenetischen Phase, die durch eine Akkumulation von Matrixproteinen im Interstitium gekennzeichnet ist und schließlich

4.) die Phase der renalen Destruktion.

Die finale Phase der Destruktion unterscheidet die Fibrogenese von der physiologischen Wundheilung (Strutz und Müller 2006). Während es bei originärer Wundheilung zur Resolution kommt, führt die Fibrogenese zur exzessiven Matrixakkumulation mit Obliteration der Tubuli einschließlich der peritubulären Kapillaren und letztlich zum progressiven Verlust intakter Nephrone mit kontinuierlicher Reduktion der glomerulären Filtrationsrate (Eddy 2000). Limitierender Faktor hinsichtlich Schweregrad und Langzeitprognose der Erkrankung ist vor allem das Ausmaß der tubulointerstitiellen Schädigung (Eddy 1996) und oft unabhängig von der renalen Grunderkrankung (Bohle et al. 1994).

Der Prozess der tubulointerstitiellen Fibrose beinhaltet den Verlust des renalen Tubulussystems und die Ansammlung von EZM-Proteinen (Eddy 1996).

Ihre Akkumulation resultiert aus den folgenden drei Einzelkomponenten:

1. einer vermehrten Produktion von Matrixproteinen (z.B. Fibronectin, Proteoglykane, Kollagen I, III, IV, Laminin, Vitronectin, Tenascin, Heparansulfat),

2. einem verminderten Abbau extrazellulärer Matrix durch verminderte Proteasenbildung (z.B. Metalloproteinasen wie MMP-1, Kollagenase I, Gelatinase A, Gelatinase B, Elastase, Serinprotease) und

3. einer Überexpression von matrixbindenden Rezeptoren (z.B. Integrine vom Typ $\alpha 5 \beta 1$ - Integrin = Fibronectinrezeptor, $\alpha 1 \beta 1$ -Integrin = Kollagen- und Lamininrezeptor) (Eddy 2005).

1.2.2 Kollagen und EZM-bildende Zellen

Ein Hauptcharakteristikum der tubulointerstitiellen Fibrose ist das Auftreten von aktivierten Fibroblasten oder Myofibroblasten im Tubulointerstitium der Niere, welche sich durch eine ausgeprägte Synthese von EZM auszeichnen (Strutz und Zeisberg 2006). Als klassisches Merkmal der Myofibroblasten gilt eine *de novo* Expression von glattmuskulärem Aktin (*alpha smooth muscle actin*, α SMA), wodurch sie morphologisch und funktionell glatten Muskelzellen ähneln (Majno et al. 1971). α SMA verleiht ihnen kontraktile Eigenschaften und damit die Fähigkeit zum Gewebsremodelling bei der Wundheilung (Tomasek et al. 2002). Im Interstitium einer gesunden Niere kommen Myofibroblasten normalerweise nicht vor (Ina et al. 2002). Es bestehen Hinweise auf spezifische Korrelationsmuster bezüglich Fibroblasten und erkranktem Gewebe, darunter einen zahlenmäßig erhöhten Fibroblastenanteil in fibrosiertem Gewebe verglichen mit gesundem Nierengewebe (Strutz et al. 2001; Müller und Rodemann 1991) oder einen durch den Myofibroblastenanteil definierten möglichen prädiktiven Aussagewert bezüglich Stadium und Progression des Nierenversagens (Roberts et al. 1997; Qi et al. 2006).

Umstritten bleibt bis heute die Herkunft der Myofibroblasten. Im Wesentlichen werden derzeit fünf verschiedene Möglichkeiten diskutiert: Erstens die Aktivierung residenter Fibroblasten, zweitens die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) (Hay und Zuk 1995; Ng et al. 1998), drittens die endotheliale-mesenchymale Transition (EndMT), viertens die Migration hämatopoetischer oder mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark (Quan et al. 2006) und fünftens die Rekrutierung aus periadventitiellen Gewebszellen (Strutz und Müller 2006). Mittlerweile gibt es Hinweise auf eine Beteiligung aller Quellen, abhängig vom Zeitpunkt der Schädigung (Grande und López-Novoa 2009).

In einem transgenen Mausmodell konnten Iwano et al. zeigen, dass über ein Drittel der Fibroblasten ihren Ursprung in der EMT von Tubulusepithelzellen haben (Iwano et al. 2002). Trotz vieler Studien sind der Prozess und die Mechanismen, die an der EMT beteiligt sind, noch nicht hinreichend geklärt.

1.2.3 Epitheliale-mesenchymale Transition

Als epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) wird der Prozess bezeichnet, bei dem sich residente Epithelien aus ihrem Zellverband lösen, eine mesenchymale Form annehmen und migratorisches Potenzial entwickeln (Yang und Liu 2001). Physiologisch spielt dieser Prozess während der Wundheilung (EMT Typ II) und der embryonalen Entwicklung (EMT Typ I) eine bedeutende Rolle. Zellen die durch An- und Abschalten bestimmter Gene während der frühen Embryonalentwicklung zwischen dem epithelialen und mesenchymalen Phänotyp wechseln, sind mitverantwortlich für die Plastizität dieser Gewebe (Boyer und Thiery 1993; Thiery und Sleeman 2006). Zudem findet man den Prozess in einem pathophysiologischen Kontext. So ist die EMT wahrscheinlich an der Entwicklung von Metastasen epithelialer Tumoren beteiligt (EMT Typ III) (Jouanneau et al. 1991; Mareel et al. 1990).

Die EMT Typ II beschreibt den Prozess der Umwandlung von residenten Epithelzellen in matrixbildende Fibro- und Myofibroblasten als Adaptation auf Schädigungen und chronischen Zellstress im Rahmen der Regeneration des Epithels (Liu 2010). Verursacht durch eine übermäßige Produktion extrazellulärer Matrixproteine von fibroblastoiden Zellen, führt sie so in chronisch fibrotischen Erkrankungen zur Degeneration epithelialer Strukturen, (Eddy 1996; Kalluri und Neilson 2003). Die EMT Typ II-verursachte Entdifferenzierung der Nierentubulusepithelien zu Fibroblasten stellt hierbei möglicherweise eine Alternative zur konventionellen Apoptose dar (Zeisberg und Kalluri 2004).

Yang und Liu berichteten, dass vier Schlüsselereignisse für die Vollendung der EMT auf zellulärem Level nötig sind (Yang und Liu 2001). Die erste Phase ist durch den Verlust der Zell-Zell-Kontakte und der apikal-basalen Polarität gekennzeichnet. Die resultierende Separation und Destabilisation der Zellen wird begleitet durch das Verschwinden von epithelialen Markerproteinen. Eine Übergangsphase wird von Strutz et al. beschrieben, in der die Zellen eine Kombination aus epithelialen und mesenchymalen Markern exprimieren sowie eine *de novo* Synthese von fibroblast-specific protein (FSP-1) und α -smooth-muscle-actin (α -SMA) betreiben (Strutz et al. 1996). Jedoch wird α -SMA nur in einigen Subpopulationen von Fibroblasten exprimiert (Serini und Gabbiani 1999)

und stellt so einen potentiellen Marker für aktivierte Fibroblasten/Myofibroblasten dar (Ng et al. 1998; Tang et al. 1997).

Diese zweite Phase beinhaltet die Reorganisation des Zytoskelets mit konsekutiver Veränderung der Zellmorphologie, gefolgt von der dritten Phase, in der es zur Zerstörung der Basalmembran durch die Hochregulation von Matrixmetalloproteinasen (MMP-2 und MMP-9) und gegensinniger Regulation der MMP-Inhibitoren kommt (Cheng et al. 2006; Cheng und Lovett 2003). Die Transformation wird durch die Entwicklung eines migratorischen Phänotyps und der Expression von Filopodien sowie Lamellipodien abgeschlossen (Yang und Liu 2001), die den Zellen eine Invasion durch die nun zerstörte Basalmembran ins Tubulointerstitium ermöglichen.

Funktionelle *In-vitro*-Marker der EMT sind eine erhöhte Zellmigration, Invasion sowie eine gesteigerte Ausbreitung und die Entstehung spindelförmiger Zellen (Lee et al. 2006). Eine experimentelle Induktion der EMT erfolgte bislang v. a. *in vitro* durch Behandlung mit den Zytokinen TGF β 1 und EGF (Okada et al. 1997; Tian et al. 2007; Docherty et al. 2006). TGF β 1 das „Schlüsselzytokin“ der renalen Fibrogenese besitzt 3 Isoformen und reguliert die Zellproliferation und -differenzierung sowie die Produktion extrazellulärer Matrixbestandteile. Es ist damit bidirektional sowohl für Reparaturprozesse als auch für eine Zerstörung der Gewebe verantwortlich (Barnard et al. 1990; Border und Ruoslahti 1992). Die Induktion und Aktivierung der TGF β 1-Expression wird durch verschiedene Faktoren wie Angiotensin II, Endothelin-1, Insulin-Like Growth Factor-1, Platelet Activating Factor, Ischämie, Glukose und zahlreiche Medikamente hervorgerufen und führt über Membranrezeptoren mit einer Serin/Threonin-Kinase-Aktivität zur Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, sogenannter Smad-Proteine, und damit zur Aktivierung einer intrazellulären Signalkaskade (Schiffer et al. 2000; Ebner et al. 1993). Dies bewirkt u. a. eine chemotaktische Migration von Monozyten, Leukozyten und Fibroblasten (Roberts et al. 1986; Eddy 1996). TGF β 1 stimuliert die Synthese von Fibronectin, Kollagenen und Proteoglykanen und inhibiert gleichzeitig die Produktion von Proteasen (Ignatz und Massagué 1986). Des Weiteren wird die Bildung von Protease-Inhibitoren gesteigert (Edwards et al. 1987), eine Autoinduktion initiiert (Border und Noble 1994) und die Expression von TGF β 1-spezifischen Rezeptoren hochreguliert (Sutaria et al.

1998). Folglich resultiert eine Verschiebung des Fließgleichgewichtes zwischen Matrixsynthese und -degradation zu Gunsten des Erstgenannten. Der Einfluss von TGF β 1 korreliert ferner mit einer verstärkten Bildung von Integrinen, was eine erleichterte Zell-Matrix-Adhäsion zur Folge hat (Ignatz und Massagué 1987).

Während TGF β 1 ein bekannter EMT-induzierender Faktor ist (Deng et al. 2010), scheint EGF eher die Zellproliferation zu unterstützen und gleichzeitig die Apoptose zu hemmen (Docherty et al. 2006). So konnte u. a. in einer Studie an ovariellen Oberflächenepithelien gezeigt werden, dass EGF in der Lage zu sein scheint die EMT zu induzieren und dabei die Zellmotilität zu steigern, sowie die Aktivität der sezernierten Matrixmetalloproteinasen 2 und 9 (MMP-2 und -9) zu erhöhen (Ahmed et al. 2006). Ähnliche synergistische Effekte des EGF konnten auch an verwendeten HK-2-Zellen eruiert werden (Ya-Chung et al. 2007).

Die Untersuchungen auf Proteinebene basierten bislang einzig auf der Analyse von einzelnen Proteinen wie dem E-Cadherin (CDH1), dem α -Aktin der glatten Muskulatur (α -SMA), der α -Kette des Kollagen Typ I (COL1A1), dem Zytokeratin-18 (KRT18), dem Fibroblast-spezifischen Protein-1 (FSP-1) und dem TGF β 1 (Kalluri und Neilson 2003). Eine Erfassung eines globalen EMT-Proteoms sowie die Identifizierung von phosphorylierten Proteinen sind bisher nicht erfolgt.

1.3 Reversibilität der Fibrogenese und antifibrotische Therapie

1.3.1 Überblick

Im Allgemeinen gilt es bei der Behandlung von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz eine möglichst zeitgerechte nephrologische Betreuung zu ermöglichen und mit der Einstellung von Blutglukose und Blutdruck zu beginnen, um etwaige Komplikationen im Verlauf der Erkrankung hinauszuzögern bzw. abzuwenden (Remuzzi und Bertain 1998). Hilfreiche therapeutische Maßnahmen umfassen auch das Ausschalten nephrotoxischer Noxen sowie die Restriktion der täglichen Proteinzufuhr. Durch letzteres kann eine Proteinurie, die potentiell zu einer zytotoxischen Aktivierung entzündungsspezifischer Zellen und damit zu einer Unterhaltung einer Inflammation führen kann, positiv beeinflusst werden.

Eine spezifische antifibrotische Therapie ist bei der chronischen Niereninsuffizienz derzeit nicht möglich. Therapeutische Konzepte zielen beispielsweise auf die Inhibition bindegewebsbildender Zellen hin. Weiterhin könnte auch die Modulation der in den Pathomechanismus involvierten Signalwege der Fibrosierung, chemotaktischen, angiogenetischen und anderen stimulierenden Modulatoren therapeutisch sinnvoll sein.

Immunologisch vermittelte Nephropathien werden derzeit vorzugsweise mit zur Verfügung stehenden Immunsuppressiva, wie Cyclosporin A und Corticosteroiden, behandelt. Bei primär nicht immunologisch-vermittelter Pathogenese (diabetisch oder hypertensiv) gilt es hingegen, einem hämodynamischen Ungleichgewicht vorzubeugen und damit einen bedeutenden Stressor und Stimulus für proinflammatorische Reaktionen zu limitieren (Zatz 1996). Hierbei steht derzeit v. a. die Blockade des Angiotensin II durch ACE-Hemmer und AT1-Antagonisten im Mittelpunkt der Therapie, durch die es zwar ermöglicht wird die Progression der Erkrankung zu verlangsamen aber bei Weitem nicht erfolgreich zu kurieren (Mezzano et al. 2001; Maschio et al. 1999; Adamczak et al. 2003).

In früheren Studien gelang es, eine potentielle Abschwächung der renalen Fibrosierung durch die Kombination aus einer Angiotensin II-Blockade und einer Gentherapie mit HGF (Yang et al. 2002) sowie durch die simultane Behandlung mit TGF β 1-neutralisierenden Antikörpern und einer Angiotensin II-Blockade zu erreichen (Yu et al. 2004). TGF β 1 und dessen überaus komplexe Signalwege bieten mehrere potentiell mögliche Angriffspunkte in der antifibrotischen Therapie, ähnlich der Targettherapie in der rheumatoiden Arthritis mit TNF- α -Blockern. Im Zuge nun folgender tierexperimenteller Studien gelang es, eine verminderte Progression der chronischen Nierenerkrankungen durch spezifische Inhibition von TGF β 1 durch Antisense-Oligonukleotide (Isaka et al. 2000), durch lösliche TGF β Typ-II-Rezeptoren (Isaka et al. 1999) oder durch das Proteoglykan Dekorin, welches TGF β bindet (Isaka et al. 1996), zu erreichen. Außerdem konnte eine reduzierte renale Fibrosierung durch Überexpression von Smad7, einen TGF β 1-Rezeptor-Antagonisten und damit potenten Inhibitor der Signaltransduktion von TGF β 1, erreicht werden (Lan et al. 2003).

Copeland und Mitarbeiter postulierten 2007 den hemmenden Effekt von Mycophenolat-Mofetil (MMF) auf die im Zuge der renalen Fibrosierung

stattfindende EMT Typ II. Damit könnte MPA zu einer geringeren Fibrosierung des Spenderorgans mit einem verbesserten Langzeitüberleben führen. Es konnte gezeigt werden, dass Mycophenolsäure (MPA) in der Lage zu sein scheint, die *In-vitro*-Aktivierung und Proliferation hepatischer Sternzellen zu hemmen (Greupink et al. 2005), eine Progression der Lungenfibrose zu verhindern (Nihtyanova et al. 2007) und zudem positive Effekte auf den Verlauf der progressiven Form der Sklerodermie besitzt (Stratton et al. 2001). In diesem Zusammenhang wird deutlich, dass MPA neben Lymphozyten auch andere Zellen, einschließlich Fibroblasten, spezifisch in ihrer Funktion zu hemmen scheint, indem es die *de novo* Purinsynthese inhibiert. Dies mündet u. a. in einer Depletion von Guanosin-5'-Triphosphat (GTP), was zum einen den Transfer von Fucose und Mannose auf Glycoproteine verhindert und zum anderen zur verminderten Expression von Adhäsionsmolekülen führt. Die GTP-Depletion scheint weiterhin kleine GTPasen, welche am Transport von Vesikeln innerhalb sekretorischer Signalwege involviert sind, zu beeinflussen (Allison und Eugui 2000; Allison 2005). So konnte an Fibroblasten gezeigt werden, dass die Anwesenheit von MPA eine Verhinderung der Fibrosierung durch Inhibition des Signalwegs der Ras GTPasen bewirkt hat, welche bei Nierenerkrankungen eine wesentliche Rolle bei der Kontrolle intrazellulärer Signalkaskaden besitzen (Hendry und Sharpe 2003; Martinez-Salgado et al. 2008). Darüber hinaus zeigten Dubus und Kollegen, dass MPA die Produktion der extrazellulären Matrixkomponenten Fibronectin und Kollagen Typ I hemmte (Dubus et al. 2002).

1.3.2 MPA

Seit der Erstzulassung 1995 durch die US Food and Drug Administration wird MMF, vor allem in Kombination mit Cyclosporin A und Corticosteroiden, therapeutisch zur Verhinderung einer akuten Abstoßungsreaktion bei Patienten nach Transplantation solider Organe eingesetzt. MMF ist biologisch inaktiv und wurde entwickelt, um die systemische Bioverfügbarkeit seines aktiven Metaboliten MPA zu erhöhen (Lee et al. 1990). Derzeit ist MMF das am häufigsten eingesetzte immunsuppressive Medikament in der Therapie der akuten Abstoßungsreaktion nach Nierentransplantation (Meier-Kriesche et al. 2006). Neben seiner moderaten Toxizität erlaubt MMF bzw. MPA, frühzeitig inflammatorische Vorgänge, die zum

Entstehen und zur Progression fibrotischer Erkrankungen beitragen, günstig zu beeinflussen.

1.3.2.1 Pharmakokinetik von MPA

MMF ($C_{23}H_{31}NO_7$, Molekulargewicht 433,50 g/mol) ist der 2-Morpholinoethylester der Mycophenolsäure. Nach oraler Applikation wird das Prodrug schnell und vollständig resorbiert. Durch die rasche Abspaltung der Estergruppe in der Darmmucosa entsteht die pharmakologisch wirksame Mycophenolsäure. Die orale Bioverfügbarkeit von MMF liegt bei annähernd 100 % und ist dabei unabhängig von seiner Darreichungsform (Bullingham et al. 1996).

Nach erfolgter hepatischer Glukuronidierung über die Glukuronyltransferase wird MPA zu dem stabilen, aber pharmakologisch inaktiven Hauptmetaboliten 7-O-MPA-Glucuronid (MPAG) umgewandelt (Nowak und Shaw 1997). Dieser wird hauptsächlich über die Nieren, zu einem geringen Teil aber auch mit der Galle ausgeschieden. Durch bakterielle Deglukuronidierung im Intestinum entsteht ferner MPA, welches im Rahmen dieses enterohepatischen Kreislaufs zu ungefähr 40 % in den Blutkreislauf reabsorbiert wird. MPA und MPAG bleiben im Serum im Wesentlichen an Albumin gebunden. Eine hohe Serumkonzentration des MPAG bewirkt jedoch eine Verdrängung des MPA aus der Plasmaeiweißbindung und folglich die Erhöhung der freien Fraktion, d. h. des nicht an Serumalbumin gebundenen Anteils, des MPA, welches wiederum pharmakologisch aktiv ist (Nowak und Shaw 1995).

1.3.2.2. Pharmakodynamik von MPA

MPA bewirkt eine durch Guanin reversible und nicht-kompetitive Inhibition der Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase (IMPDH), des Schlüsselenzyms in der *De-novo*-Synthese von Purinbasen, welches die NAD-abhängige Oxidation von IMP zu XMP katalysiert (Franklin und Cook 1969, Sweeney et al. 1972). Die Hemmung dieses Enzyms führt folglich zu einer Verringerung der einzelnen Guanosinnukleotide (GMP, GTP, dGTP), welche für die RNA- bzw. DNA-Synthese benötigt werden (Lowe et al. 1977). MPA inhibiert die in aktivierten Lymphozyten vorkommende IMPDH-Isoform Typ II etwa 5x stärker als die Isoform Typ I (Carr et

al. 1993). Während erstere v. a. in aktivierten Lymphozyten und neoplastischen Zellen exprimiert ist, wird die Isoform Typ I überwiegend in residenten Lymphozyten und in den meisten anderen Zellen gebildet (Konno et al. 1991, Nagai et al. 1992). Die MPA-bedingte Reduktion von Guanosinnukleotiden hemmt v. a. die Glykosylierung von Adhäsionsmolekülen, welche für die Interaktion und Kommunikation von Zellen untereinander bzw. für die Interaktion mit der EZM essentiell sind (Allison et al. 1993).

1.4 Hypothese, Zielsetzung und Fragestellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der potentiell hemmende Einfluss der Mycophenolsäure (MPA) auf die epitheliale mesenchymale Transition Typ II (EMT Typ II) in humanen renalen Tubulusepithelzellen (HK-2) in An- bzw. Abwesenheit der Wachstumsfaktoren EGF und/oder TGF β 1 untersucht werden. Um die Effekte sowohl auf die Genexpression als auch auf die Proteinsynthese zu verifizieren, den epigenetischen Einfluss und zudem die Funktion und die sich verändernde Morphe der Zellen analysieren zu können, wurden *in vitro* unterschiedliche experimentelle Ansätze verfolgt.

Durch die konsekutive Untersuchung der vermeintlich antifibrotischen Wirkung von MPA und die genauen Kenntnisse der beteiligten Signalwege und Interaktionen sollten entsprechende molekulare Zusammenhänge weiter aufgeklärt werden, um einen Beitrag für die Erschließung neuer therapeutischer Ansätze zur Prävention und Therapie der renalen Fibrosierung zu leisten.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Die in dieser Studie verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden von den nachfolgenden Firmen bezogen und erfüllten den Reinheitsgrad pro analysi.

ACN	J. T. Baker, Deventer, Holland
Acrylamid/Bisacrylamid (30%)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Agarose	Life Technologies, Paisley, Schottland
Ameisensäure (Formic acid)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
8-Aminoguanosin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ammoniumbicarbonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ampholyte 3/10	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Ampuwa	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
APS	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
BioRad Protein Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Borsäure	MERCK KGaA, Darmstadt
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
BPB	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
BrdU	Roche Diagnostics, Penzberg
BSA	New England Biolabs Inc., Ipswich, USA
Butanol	MERCK KGaA, Darmstadt

Calciumchlorid	MERCK KGaA, Darmstadt
Cell proliferation ELISA	Roche Diagnostics, Penzberg
CHAPS	AppliChem GmbH, Darmstadt
Chloroform	MERCK KGaA, Darmstadt
ddH ₂ O	UMG, Göttingen
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
dNTP	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DTT	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dulbecco's PBS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Essigsäure 100 %	MERCK KGaA, Darmstadt
Ethanol	GeReSo mbH, Einbeck
Ethidiumbromid	MERCK KGaA, Darmstadt
EZ DNA Methylation-Gold Kit	Zymo Research, Irvine, USA
5x First Strand Puffer	Invitrogen Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Formaldehyd Load Dye	Applied Biosystems/Ambion, Austin, TX, USA
Formalin	J. T. Baker, Deventer, Holland
Glycerin	MERCK KGaA, Darmstadt
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt

Guanosin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Isopropanol	MERCK KGaA, Darmstadt
Iodoacetamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumchlorid	MERCK KGaA, Darmstadt
Kaliumhexacyanoferrat(III)	MERCK KGaA, Darmstadt
Kollagen Typ 1	BD Biosciences, Bedford, USA
Magnesiumchlorid	MERCK KGaA, Darmstadt
Methanol	J.T. Baker, Niederlande
Mineralöl	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
MPA	Roche, Palo Alto, CA, USA
Natriumacetat	MERCK KGaA, Darmstadt
Natriumcarbonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seelze
Natriumchlorid	MERCK KGaA, Darmstadt
Natriumcitrat	MERCK KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid	MERCK KGaA, Darmstadt
Natriumthiosulfat	MERCK KGaA, Darmstadt
Oligo-dT-Primer	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
PBS	GIBCO, Paisley, Großbritannien
Phosphatase Inhibitor	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
PMSF	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Precision Plus Protein Standards	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
All Blue	

Proteinase Inhibitor	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Pro-Q® Diamond Phosphoprotein	Invitrogen, Ltd., Paisley, Großbritannien
Gel Stain	
QI Aquick Purification Kit	QIAGEN Customer Care, Hilden
Reverse Transkriptase	Invitrogen Life Technologies GmbH, Karlsruhe
RNase Inhibitor	Promega GmbH, Mannheim
Salzsäure	MERCK KGaA, Darmstadt
Silbernitrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
SDS	SERVA Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg
SYBR Green I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
SYTO 9 Green	Life Technologies GmbH, Darmstadt
TaqPolymerase	Life Technologies GmbH, Darmstadt
TEMED	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Thioharnstoff	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
TFA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tris	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
TRIzol® Reagenz	Invitrogen Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Trypanblau	MERCK KGaA, Darmstadt
Trypsin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Harnstoff

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

2.1.2 Puffer und Lösungen

Die verwendeten Puffer und Lösungen wurden je nach Bedarf mit deionisiertem Wasser (ddH₂O) oder Ampuwa (steriles pyrogenfreies Wasser) hergestellt, sofern nicht anders angegeben.

Nukleinsäuretechnische Untersuchungen

Agaroselösung:	1,5 % (w/v) Agarose, 1x TBE-Puffer
dNTP-Lösung:	10 mmol/l dATP, 10 mmol/l dCTP, 10 mmol/l dGTP, 10 mmol/l dTTP
10x PCR-Puffer:	200 mmol/l Tris/HCl pH 8,4, 500 mmol/l KCl
10x TBE-Puffer:	890 mmol/l Tris, 890 mmol/l Borsäure, 10 mmol/l Na ₂ EDTA pH 8,0

Proteomics

Proteinaufbereitung

Äquilibrationspuffer 1:	6 mol/l Harnstoff; 30 % (v/v) Glycerin; 2 % (w/v) SDS; 0,15 mol/l Tris (pH 8,8); 0,25 % (w/v) BPB; 15 mmol/l DTT
Äquilibrationspuffer 2:	6 mol/l Harnstoff; 30 % (v/v) Glycerin; 2 % (w/v) SDS; 0,15 mol/l Tris (pH 8,8); 0,25 % (w/v) BPB; 40 g/l Iodoacetamid
Lysepuffer:	7 mol/l Harnstoff, 2 mol/l Thioharnstoff; 4 % (w/v) CHAPS; 1 % (w/v) DTT; 2 % (v/v) Ampholyte; 10 mmol/l PMSF; 1 % (v/v) Phosphatase Inhibitor; 1 % (v/v) Proteinase Inhibitor
BPB-Lösung:	0,25 % (w/v) BPB; 1,5 mol/l Tris (pH 8,8)
PBS-Puffer pH 7,4:	137 mmol/l Natriumchlorid; 2,7 mmol/l Kaliumchlorid;

10 mmol/l Dinatriumhydrogenphosphat;
 1,76 mmol/l Kaliumdihydrogenphosphat

Rehydrationspuffer: 7 mol/l Harnstoff; 2 mol/l Thioharnstoff;
 4 % (w/v) CHAPS; 0,2 % (w/v) DTT; 1 % (v/v)
 Ampholyte

Elektrophorese

Elektrophoresepuffer (5x): 0,025 mol/l Tris (pH 8,3); 0,192 mol/l Glycin;
 0,5 % (w/v) SDS

Phosphoproteinfärbung

Entfärber: 20 % (v/v) ACN; 5 % (v/v) Natriumacetat
 (50 mmol/l, pH 4)

Fixierungslösung: 50 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure

Silberfärbung

Fixierungslösung: 50 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure

Lagerungspuffer: 5 % (v/v) Essigsäure

Lösung für die Entwicklung: 6 % (w/v) Natriumcarbonat; 0,0185 % (v/v)
 Formaldehyd; 16 µmol/l Natriumthiosulfat

Lösung für die Silberfärbung: 12 mmol/l Silbernitrat; 0,026 % (v/v)
 Formaldehyd

Sensitizer: 0,8 mmol/l Natriumthiosulfat

Waschpuffer 1: 50 % (v/v) Ethanol

Waschpuffer 2: 30 % (v/v) Ethanol

In-Gel-Verdau

Entfärbe-Lösung:	25 µl Kaliumhexacyanoferrat(III) (30 mmol/l); 25 µl Natriumthiosulfat (100 mmol/l)
Trypsin-Verdau-Puffer:	25 µl Ammoniumbicarbonat (1 mol/l); 25 µl Trypsin (10 ng/µl); 950 µl ddH ₂ O
Verdau-Puffer ohne Trypsin:	5 µl CaCl ₂ (1 mol/l); 25 µl Ammoniumbicarbonat (1 mol/l); 970 µl ddH ₂ O

2.1.3 Oligonukleotide

Die Sequenzen der, für die quantitative Real-Time-PCR benötigten Primer wurden über die NCBI-Homepage (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) ermittelt. Im Anschluss erfolgte die Primersuche mittels Primer3 Input (version 0.4.0) unter Beachtung gegebener Rahmenbedingungen: Produktlänge von 180-250 bp, eine Primerlänge von max. 23 bp, 60 °C optimaler Annealingtemperatur, sowie einem gc (Guanin-Cytosin)-Anteil von optimal 50 %. Ermittelte Primer waren lediglich von Relevanz, wenn sie sich auf dem kodierenden Anteil des GOI's (CDS (coding sequence)) befanden und sich auf einem Exon komplett anlagern konnten. Im Fall von *ITGB1* galt es, 8 Transkriptvarianten (a-h) eines Genes abzugleichen, um möglichst einen Großteil der sich innerhalb der Varianten gleichenden Genabschnitte mit einem geeigneten Primerpaar abzudecken. Dies konnte erreicht werden unter Zuhilfenahme der *multalin interface page*. Im Weiteren erfolgte die Kontrolle des auserwählten Primerpaares nach Selbst-Komplementarität, um die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten sog. *loops*, *hairpin formations* und anderer etwaig unspezifischer Amplifikate im Zuge der qPCR zu vermeiden.

Alle für die quantitative Real-Time-PCR verwendeten Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Synthesis GmbH (Ebersberg) synthetisiert, von uns bezogen, in Ampuva zu einer Konzentration von 100 µmol/l nach den Angaben des Herstellers gelöst und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Darüber hinaus erfolgte eine Herstellung von Standards für *ITGB1*, *EpCam* und *RASAL1*,

unter Zuhilfenahme eines QI Aquick PCR Purifications Kit nach modifizierten Angaben des Herstellers, welche im Zuge der Genexpressionsanalyse für das Erstellen einer Standardreihe obligat waren.

EF-2 -L 5' - gac atc acc aag ggt gtg cag - 3'

EF-2 -R 5' - gcg gtc agc aca ctg gca ta - 3'

ITGB1 -L 5' - cat ctg cga gtg tgg tgt ct - 3'

ITGB1 -R 5' - ggg gta att tgt ccc gac tt - 3'

EpCam -L 5' - cca gaa caa tga tgg gct tt - 3'

EpCam -R 5' - gca gtc cgc aaa ctt tta ct - 3'

RASAL1 -L 5' - aag tac ctg gcc atc agt gg - 3'

RASAL1 -R 5' - atc cac agt tcc ttg cct tg - 3'

2.1.4 Gebrauchswaren

Cell-Scraper	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Cobass 8000 Probegefäß	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Combitips plus	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf-Cups	Eppendorf AG, Hamburg
FACS-Röhrchen 12x7,5 mm	BD Diagnostics, Heidelberg
Falcon-Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Filterpapier	Whatman Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Gelgießplatten	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Kämme	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gewebekulturplatte 6- bzw. 96-Loch	Nunc Intermed, Roskilde, Dänemark
Kryoröhrchen	Nunc Intermed, Roskilde, Dänemark
Küvetten	Hellma, Müllheim
Light Cycler Kapillaren	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Light Cycler 480 Multiwell Plate 96	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Light Cycler 480 Sealing Foil	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Mikro-Schraubröhre 2 ml PP	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Parafilm "M"	Parafilm, Chicago, Illinois, USA
Pasteur Kapillarpipetten	WU, Mainz
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Pipettierhilfe pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co., Eberstadt
Eppendorf Multipette plus	Eppendorf AG, Hamburg
ReadyStrip™ IPG Strip	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Reagiergefäß 0,5 ml PP	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Serologische Pipette 10 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zellkulturflaschen, 75 cm ²	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Küvetten	Hellma, Müllheim

2.1.5 Antikörper

Zur Durchführung der durchflusszytometrischen Erfassung (FACS) behandelter HK-2-Zellen wurden folgende Antikörper verwendet:

PE anti-human CD326 (EpCAM)

APC anti-human CD29 (ITGβ1)

Von der Firma BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH Eching (D) bezogen, wurden diese bis zu ihrer Verwendung bei 4 °C unter Lichtprotektion gelagert.

2.1.6 Geräte

Zur Durchführung dieser Studie wurden die folgenden Geräte benötigt, die von den jeweils aufgeführten Herstellern bezogen worden waren.

BD FACSDiva Durchflusszytometer	BD Diagnostics, Heidelberg
Canon LiDE 210 Scanner	Canon Deutschland GmbH, Krefeld
CapLC-System	Waters, Milford, MA, USA
Cobass 8000 modular analyzer	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen GmbH, Isernhagen
FLA 5100	Fujifilm Europa GmbH, Düsseldorf
Folienschweißgerät Vacupack 2 Plus	Krupps GmbH, Offenbach am Main
Gel Dryer, Model 583	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gelelektrophoresekammer (Protean xi 2-D Cell)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Glo Runner Mikroplate Luminator	Bioscience Technology, Sunnyvale, CA, USA
Heraeus CO2-Inkubator BBD 6220	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Hamilton Pipette	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Kühlzentrifuge Rotina 35R	Hettich, Tuttlingen
LightCycler	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LightCycler 480	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Magnetrührer	IKA Werke GmbH & Co., Staufen

Mikroskop Diavert	Leitz GmbH, Wetzlar
Heraeus Multifuge 1 S-R	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
NanoDrop 2000c Spectrophotometer	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Zentrifuge Mikro 200	Hettich, Tuttlingen
Netzteil Power Pac 1000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
pH-Meter	Wissenschaftlich-technische Werkstätten GmbH, Weilheim
Personal Cyclor	Biometra, Göttingen
Protean IEF Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Micromass Q-TOF Ultima	Waters GmbH, Eschborn
Reinstwasser-SystemSeralpur pro 90 CN	SERAL Erich Alhäuser GmbH, Ransbach Baumbach
Schüttelmaschine	Schütt, Göttingen & Bühler, Tübingen
SpeedVac SVC100	UniEquip GmbH, München
SterilGard III Advance	The Baker Co., Inc., Sanford, Maine, USA
Ultraschall-Desintegrator Sonifier	Branson Ultraschall GmbH, Dietzenbach
UV-Transilluminator mit Kamera	Bachofer GmbH, Reutlingen
Vakuumzentrifuge Univapo 150 H	UniEquip GmbH, Martinsried/München
Vortex Genie 2	Scientific Industries, USA und Schütt, Göttingen
Waagen	Sartorius, Göttingen

2.1.7 Zellkultur und -bedarf

Die in dieser Studie verwendete Zelllinie und der Zellkulturbedarf wurden von den nachfolgenden Firmen bezogen. Des Weiteren ist hier die, je nach Aufgabenstellung, variierende Zusammensetzung des Zellkulturmediums angegeben.

HK-2-Zellen	ATCC®, Teddington, Großbritannien
Quantum 286 with Glutamax-I	PAA Laboratories GmbH Pasching, Österreich
FCS Gold, Kategorie EU	PAA Laboratories GmbH Pasching, Österreich
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH Pasching, Österreich
Recombinant Human EGF	R&D Systems® GmbH, Wiesbaden
Recombinant Human TGFβ1	R&D Systems® GmbH, Wiesbaden
Kultivierungsmedium:	Quantum 286 with Glutamax-I, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
Gefriermedium:	Quantum 286 with Glutamax-I, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10 % (v/v) FCS Gold, 10 % (v/v) DMSO

Für die Experimente in Zellkultur wurden Human Kidney 2-Zellen (HK-2) verwendet. Diese Zelllinie stammt aus den proximalen Tubuli des Kortex einer nicht-infizierten menschlichen Niere und wurde von der ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, USA) generiert und etabliert. Zur Immortalisierung wurden die Zellen mit Genen des humanen Papilloma-Virus 16 (HPV-16) E6/E7 transformiert. HK-2-Zellen besitzen morphologische und funktionelle Charakteristika humaner Tubulusepithelzellen. Ihre langen, dichtstehenden Mikrovilli, junktionalen Komplexe und die für den Bürstensaum typischen Enzyme wie die alkalische und saure Phosphatase, die γ -Glutamyltransferase sowie die Leucin-Amino-peptidase stellen spezifische Merkmale der proximalen

Tubulusepithelzelle dar. Darüber hinaus verfügen HK-2-Zellen als funktionelle Charakteristika proximaler Tubulusepithelien *in vivo* über einen natriumabhängigen, phlorizinsensitiven Glukosetransport und über die Reaktionsbereitschaft der Adenylatcyclase auf das Parathormon, nicht jedoch auf das antidiuretische Hormon (Ryan et al. 1994).

Die Kultur der adhärent wachsenden Zellen (Monolayer) erfolgte unter Inkubation in 75-cm²-Zellkulturflaschen mit 10 ml Quantum 286 (mit Glutamax-I) sowie 100 µl Penicillin/ Streptomycin (100x) bei 37 °C, 20 % O₂ sowie 5 % CO₂ im Brutschrank. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die für das Wachstum und zur Vitalitätserhaltung erforderlichen Medienwechsel und Subkultivierungen erfolgten in temporär-standardisierten Abständen von 48 h. Vor und nach jedem Mediumwechsel wurden die Zellen unter dem Phasenmikroskop betrachtet, um ihren aktuellen Zustand hinsichtlich Vitalität, Morphologie und möglicher Kontamination zu eruieren. Da die Höhe bzw. das Volumen des Mediums in Kulturflaschen einen kritischen Faktor in der Sauerstoffversorgung der Zellen darstellen (sog. *oxygen transfer rate*, OTR), wurde ein Verhältnis von Medienvolumen zu Kulturoberfläche von 0,2-0,5 ml/cm² gewählt, welches einer Medienhöhe von 2-5 mm entspricht, mit der die Zellen bedeckt sind (Gstraunthaler et al. 1999). Alle verwendeten Lösungen wurden vor dem Arbeiten in einem Wärmebad auf 37 °C vorgewärmt. Zum Passagieren bei annähernder Konfluenz der Zellen wurde das Medium abgesaugt, die Kultur mit 14 ml PBS gewaschen und anschließend mit 3 ml Trypsin (1x) für 3-5 min im Brutschrank inkubiert, wodurch sich die Zellen vom Flaschenboden lösten. Durch die Zugabe von 20 ml Medium wurde das Trypsin inhibiert. Nun erfolgte eine Zentrifugation der Zellen bei 830 rpm für 10 min. Danach wurde der Überstand entfernt und das Pellet mit 10 ml Medium resuspendiert. Die nun vereinzelteten Zellen wurden über die Bestimmung der Zellzahl unter Zuhilfenahme der Neubauerzählkammer zu $1,5 \times 10^6$ Zellen ausgesät und unter Berücksichtigung der jeweiligen Bedingung inkubiert (Tabelle1).

Für einen Bedarfsfall wurden Zellen der gleichen Passage eingefroren. Hierfür wurde die im Vorfeld trypsinisierte Zellsuspension von 1×10^6 Zellen 5 min bei 830 rpm zentrifugiert, zum Pellet 800 µl Medium, 100 µl FCS sowie 100 µl DMSO hinzugefügt und anschließend in Kryoröhrchen über Nacht bei -20 °C gelagert,

bevor sie nach 24 h für einen weiteren Tag bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ und zum Schluss im flüssigen Stickstoff tiefgefroren wurden.

Tabelle 1 Darstellung der einzelnen Bedingungen.

Bedingung	DMSO (0,00005%)	MPA (10 $\mu\text{mol/l}$)	Essigsäure (0,5 $\mu\text{mol/l}$)	EGF (10 $\mu\text{g/l}$)	HCl/BSA (0,6 $\mu\text{mol/l}$)	TGF β 1 (3 $\mu\text{g/l}$)	Guanosin (G) (50 $\mu\text{mol/l}$)	8-Amino- Guanosin (8AG) (100 $\mu\text{mol/l}$)
1	X		X		X			
2		X	X		X			
3	X		X		X		X	X
4		X	X		X		X	X
5	X			X		X		
6		X		X		X		
7	X			X		X	X	X
8		X		X		X	X	X
9	X			X				
10		X		X				
11	X			X			X	X
12		X		x			X	X
13	X		X		X	X		
14		X	X		X	X		
15	X		X		X	X	X	X
16		X	X		X	X	X	X

2.2 Methoden

2.2.1 Kollagen-Kontraktionsassay

Der Kollagen-Kontraktionsassay wurde von Frau Dr. Petrova durchgeführt. Hierfür wurden 2×10^6 Zellen in 35-mm-Schalen (6 *well plates*) verwendet. Ein Ansatz enthielt jeweils eine in Quantum befindliche Zellsuspension, 422,5 µl Kollagen Typ I, 1,5 µl DMSO (0,00005 %) bzw. MPA (10 µmol/L), sowie 1,5 ml spezifisches Medium (Tabelle 2). Nach 60 minütiger Inkubation bei 37 °C waren Zellen, Medium und Kollagen in einer Matrix polymerisiert, sodass die Kontraktion der Matrix über sog. *gentle tapping* (leichtes Beklopfen) der Schale initiiert werden konnte. Ein Mediumwechsel erfolgte nach 24 h. Der Prozess der Kontraktion wurde über die photographische Dokumentation der Fläche nach 48 h ausgewertet.

Tabelle 2 Zusammensetzung der Einzelmedien für den Kollagen-Kontraktionsassay.

Medium		Medium'	
A	0,00005 % DMSO + 10 ng/ml EGF + 3 ng/ml TGFβ1	A'	10 µmol/L MPA + 10 ng/ml EGF + 3 ng/ml TGFβ1
B	0,00005 % DMSO + 10 ng/ml EGF + 3 ng/ml TGFβ1 + G/8AG	B'	10 µmol/L MPA + 10 ng/ml EGF + 3 ng/ml TGFβ1 + G/8AG
C	0,00005 % DMSO	C'	10 µmol/L MPA
D	0,00005 % DMSO + G/8AG	D'	10 µmol/L MPA + G/8AG
E	0,00005 % DMSO + 10 ng/ml EGF	E'	10 µmol/L MPA + 10 ng/ml EGF
F	0,00005 % DMSO + 10 ng/ml EGF + G/8AG	F'	10 µmol/L MPA + 10 ng/ml EGF + G/8AG
G	0,00005 % DMSO + 3 ng/ml TGFβ1	G'	10 µmol/L MPA + 3 ng/ml TGFβ1
H	0,00005 % DMSO + 3 ng/ml TGFβ1 + G/8AG	H'	10 µmol/L MPA + 3 ng/ml TGFβ1 + G/8AG

2.2.2 Wundverschlussassay

Zur Durchführung des *scratch wound closure assay* wurden je 2×10^6 Zellen in 3 ml Medium in 17,35-mm-Schalen, sog. 6 *well plate* für 48 h inkubiert. Dem konfluenten Zellrasen wurde im Anschluss daran eine kreuzförmige artifizielle Wunde mittels einer Pipettenspitze zugeführt und das 48 h alte Medium, samt der, durch den Vorgang der Defektzuführung, aus dem Zellverbund gelösten Zellen abgesaugt. Nun wurde das im Vorfeld präparierte spezifische Medium (Tabelle 3) zu dem jeweiligen *plate* hinzugefügt und die Wunde fotodokumentiert.

Im Verlauf des Wachstums der Zellen wurden die *plates* für die Analyse und Dokumentation der Wundbreite nach 6, 12, 18 und 24 h photographisch erfasst, wobei die Aufnahme bei 60x Vergrößerung der Orientierung diene, um stets die für das *plate* identische Wunde bei 100x Vergrößerung studieren zu können.

Tabelle 3 Zusammensetzung der Einzelmedien für den Wundverschlussassay.

		DMSO (0,00005 %)	MPA (10 µmol/L)	ES (0,5 µM)	EGF (10 µg/L)	HCL/BSA (0,15 µg/0,6 µM)	TGFβ1 (3 µg/L)	G/8-A-G (50 µmol/L/100 µmol/L)
Bedinauna	0	/	/	/	/	/	/	/
	1	3 µl	/	3 µl	/	3 µl	/	/
	2	/	3 µl	3 µl	/	3 µl	/	/
	3	3 µl	/	3 µl	/	3 µl	/	6 µl
	4	/	3 µl	3 µl	/	3 µl	/	6 µl
	5	3 µl	/	/	3 µl	/	3 µl	/
	6	/	3 µl	/	3 µl	/	3 µl	/
	7	3 µl	/	/	3 µl	/	3 µl	6 µl
	8	/	3 µl	/	3 µl	/	3 µl	6 µl
	9	3 µl	/	/	3 µl	3 µl	/	/
	10	/	3 µl	/	3 µl	3 µl	/	/
	11	3 µl	/	/	3 µl	3 µl	/	6 µl
	12	/	3 µl	/	3 µl	3 µl	/	6 µl
	13	3 µl	/	3 µl	/	/	3 µl	/
	14	/	3 µl	3 µl	/	/	3 µl	/
	15	3 µl	/	3 µl	/	/	3 µl	6 µl
	16	/	3 µl	3 µl	/	/	3 µl	6 µl

2.2.3 Spindle-Index

Die nach Tabelle 1 behandelten HK-2-Zellen wurden im Zuge der morphologischen Analyse über die Berechnung eines Spindle-Index (SI) erfasst. Dieser ist das Ergebnis aus der maximalen Länge einer Zelle, geteilt durch ihre maximale Breite (Koo et al. 2010). Damit dient dieser Assay ihrer objektiven Charakterisierung und somit der Verifizierung einer möglichen epithelialen mesenchymalen Transition Typ II (EMT Typ II), deren Existenz mit der Größe des SI wahrscheinlicher wird. Die sich in den Zellkulturflaschen befindlichen und behandelten Zellen wurden nach 24 h fotografisch erfasst und der Spindle-Index anhand folgender Kriterien bestimmt:

Mäanderförmiges Screening der Fotos mit Messungen an clusterrandständigen, nicht vereinzelt, ungekrümmten und objektiv längsten Zellen aus gut fokussierten Bildern. Dabei Ausschluss von Zellen konfluierender Schichten.

2.2.4 Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescent)

Der BrdU ELISA ist eine Methode zur quantitativen Beurteilung der Zellproliferation. Das Verfahren basiert auf einer Inkorporation von BrdU (5-bromo-2'deoxiuridine), anstelle Thymidin in die sich, im Zuge der Proliferation, synthetisierende DNA. 1985 von Porstmann et al. erstmalig beschrieben, später in verschiedenen Laboratorien stetig optimiert und für verschiedene Zelllinien gezeigt, wurde der BrdU ELISA für die Erueierung der Proliferation von HK-2-Zellen verwendet, um eine Reaktion auf die zu analysierenden Stimuli zu untersuchen (Porstmann et al. 1985, Magaud et al. 1988, Muir et al. 1990). Gegenüber der historischen DNA-Färbung mit (3H)-Thymidinen ist beim BrdU ELISA die Anwesenheit von Radioisotopen obsolet, was im Laufe der Entwicklung auf dem Gebiet zu einem zunehmenden Ersatz der konventionellen Methode führte.

Folgende Angaben zum detaillierten Vorgehen entsprechen den Anleitungen der Firma Roche, welche dem Kit beigelegt waren. Die Arbeiten wurden von Frau Dr. Petrova durchgeführt.

Zunächst wurden 5×10^3 Zellen in An- bzw. Abwesenheit der spezifischen Stimuli nach Tabelle 1 in 96 well plates für 72 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Färbung mit 20 µl/well BrdU labeling buffer für 16 h und dem damit

verbundenen Einbau von 5-bromo-2'-deoxyuridine in die DNA von proliferativen Zellen. Danach wurde das Zellkulturmedium entfernt. Die folgende Zugabe von 200 µl/well FixDenat sorgte für eine Denaturierung und Fixation der DNA unter 30-minütiger Inkubation bei 15-25 °C. Danach wurde die FixDenat entfernt. Das Fixieren ist ein notwendiger Schritt, das inkorporierte BrdU über die Bindung spezifischer Antikörper (100 µl/well anti-BrdU-POD working solution), bei 15-25 °C und nach 90-minütiger Inkubation, nachzuweisen. Nach anschließender Entfernung o. g. Lösung, erfolgte ein Aufreinigen der wells über einen Waschvorgang mit 200-300 µl/well washing solution, welcher insgesamt 3 mal durchgeführt wurde. Auch diese Lösung wurde abschließend entfernt. Die immunhistochemische Detektion der Lumineszens am Glo Runner Mikroplate Luminator erfolgte nach Inkubation mit Substrat-Lösung (100 µl/well *substrat solution*). Die gemessenen *relative light units/second* (rlu/s) korrelieren direkt mit dem Ausmaß der DNA-Synthese und insofern mit der Anzahl der proliferierten Zellen.

Tabelle 4 Puffer und Lösungen zum Cell Proliferation ELISA.

Arbeitslösungen	Zusammensetzung
BrdU labeling buffer	BrdU labeling reagent 1:100 dissolved in culture medium
anti-BrdU-POD stock solution	anti-BrdU-POD dissolved in 1,1 ml dH ₂ O
anti-BrdU-POD working solution	anti-BrdU-POD stock solution 1:100 dissolved in antibody dilution solution
washing solution	washing buffer 1:10 dissolved in dH ₂ O
substrat solution	100 µl substrate B dissolved in 10 ml substrate A

2.2.5 Durchflusszytometrische Analyse

Die Durchflusszytometrie dient der Analyse von Zellen hinsichtlich extra- und intrazellulär präsentierter Proteine und erlaubt so neben der Zählung auch die Phänotypisierung von Zellen. Grundlage dieser Methode sind gefärbte Einzelzellsuspensionen, welche mittels laminarer Strömung einen fokussierten Laserstrahl passieren und das dabei erzeugte Streu- und Fluoreszenzlicht detektiert werden kann. Das Vorwärtsstreulicht (FSC (*forward scatter*)) ist hierbei abhängig vom Volumen einer Zelle und ein Maß für die Beugung des Lichtes. Das

Seitwärtsstreulicht (SSC (*sideward scatter*)) ist Ausdruck für die Brechung des Lichtes, die wiederum von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur ihres Zellkerns und von der Menge der Vesikel beeinflusst wird.

Zur Charakterisierung der nach Tabelle 1 für 72 h behandelten HK-2-Zellen wurden zwei gegen verschiedene Zellepitope gerichtete monoklonale Antikörper verwendet. Diese waren Allophycocyanin (APC) bzw. Phycoerythrin (PE) markiert (Tabelle 5).

Tabelle 5 Monoklonale Antikörper zur durchflusszytometrischen Analyse.

Antikörper	Fluorochrom	Extinktion	Emission
anti human CD29 (ITG β 1)	APC	633 nm	660 nm
anti human CD326 (EpCam)	PE	488 nm	578 nm

Das epitheliale, Ca⁺⁺-unabhängige, homophile Zelladhäsionsmolekül EpCAM (CD 326), ist ein Typ I Transmembranglycoprotein von 40 kDa, welches erstmalig an Kolonkarzinomen beschrieben wurde und v. a. durch Epithelzellen exprimiert wird (Herlyn et al. 1979, Munz et al. 2004, Rao et al. 2005). Es besteht aus einer EGF-like Domäne, einer Thyroglobulin-repeat Domäne, einer cysteinarmen Region, einer Transmembrandomäne und einem cytoplasmatischen Ende (Cirulli et al. 1998; Litvinov et al. 1994). Die beiden erstgenannten Regionen bilden eine gemeinsame, globuläre Struktur und sind für die homophile Zell-Zell-Adhäsion essentiell und an der Bindung von Aktinfilamenten an die Zellmembran über alpha-Aktinin beteiligt (Balzar et al. 2001). EpCAM ist ein panepithelialer, basolateral exprimierter Marker, da er in fast allen ausdifferenzierten Geweben, mit Ausnahme von epidermalen Keratinozyten, Myoepithelzellen und einigen anderen spezialisierten epithelialen Zelltypen, exprimiert wird (Balzar et al. 1999). Dies suggeriert, dass die EpCAM-Expression, zumindest in adulten Geweben, auf Epithelzellen beschränkt ist, was eine hohe Spezifität in der Detektion letzterer gewährleistet.

Integrin β 1 (CD29) ist ein Typ I-Glykoprotein von 130 kDa, welches als Epitop neben den meisten hämatopoetischen Zellen auch von Fibroblasten exprimiert wird. Ähnlich dem Fibronectinrezeptor ist es in einer Vielzahl von Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Interaktionen involviert (Hemler 1990, Hynes 1992). Es gehört wie auch 7 weitere beta-Untereinheiten - neben 18 alpha-Untereinheiten - zu der

Familie der Integrine und als solche zu einer Gruppe heterodimerer, panepithelialer Membranrezeptoren, welchen mannigfaltigen Funktionen zuteil werden. Neben o. g. Interaktionen ist er ein wichtiger Bestandteil im Rahmen der Gewebsreparatur. Als Vermittler der Signaltransduktion einer Zelle sind diese Integrine besonders essentiell für die Zellproliferation und -differenzierung.

Die Präparation und durchflusszytometrische Erfassung (FACS) behandelter HK-2-Zellen wurde wie folgt durchgeführt.

Die zu analysierenden Zellen wurden zunächst trypsinisiert und die Zellzahl via Neubauer-Kammer ermittelt. Nach erfolgter Zentrifugation (830 rpm, RT, 10 min) wurden 1×10^6 Zellen in 100 μ l PBS resuspendiert und in ein für die folgende FACS-Analyse spezifisches Röhrchen überführt. Nun wurden dieser Suspension je 20 μ l der oben erwähnten Antikörper hinzugefügt und der gesamte Ansatz bei RT und Dunkelheit für 30 min inkubiert. Schließlich wurden die gefärbten Zellen mit 2 ml PBS gewaschen, um die im Überschuss zugegebenen, nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Danach erfolgte eine Zentrifugation (1200 rpm, RT, 10 min). Nun wurde der Überstand jedes FACS-Röhrchens in einem Ruck über Kopf verworfen, sodass das noch restliche PBS, welches an der Innenseite des Röhrchens haften blieb, zurücklief und die Zellen erneut in Suspension vorlagen. Nach Hinzufügen von 200 μ l PBS konnten die gefärbten Zellen der FACS-Analyse, welche eingangs für die verwendeten und behandelten HK-2-Zellen etabliert wurde, zugeführt und durchflusszytometrisch erfasst werden.

2.2.6 Zellvitalitätskontrolle

Für die Zellvitalitätskontrolle kamen die Trypanblaufärbung und ferner die Bestimmung der Laktat-Dehydrogenase-Konzentration zum Einsatz.

Die Anfärbung der HK-2-Zellen mit Trypanblau diente der Verifizierung von vitalen und avitalen Zellen. Bei dieser Färbung tritt der Farbstoff durch die poröse Membran toter Zellen in das Zytoplasma ein und färbt dieses an, während vitale Zellen den Farbstoff nicht aufnehmen und folglich farblos bleiben.

Nach erfolgtem Trypsinisieren der Zellen unter in 2.1.7 verwendeten Bedingungen, wurden diese bei 830 rpm für 10 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand

entfernt und das Pellet mit 3 ml PBS in Suspension gebracht. Davon wurden nun 10 μ l mit 90 μ l PBS verdünnt und 10 μ l einer, zuvor präparierten, 0,4 %igen Trypanblau-Lösung zugegeben. Nach einer Minute Einwirkzeit erfolgte die Quantifizierung von ungefärbten und angefärbten Zellen in der Neubauer-Zählkammer.

Berechnung:

$$\text{avitale Zellen in \%} = (\text{blaue Zellen/Gesamtzellzahl}) \times 100$$

$$\text{vitale Zellen in 1 ml} = \text{Anzahl nicht gefärbter Zellen} \times 10 \\ (= \text{Verdünnungsfaktor}) \times 1,1 \text{ (Kammerfaktor)} \times 10^4$$

Eine weitere Möglichkeit die behandelten Zellen hinsichtlich ihrer Vitalität hin zu untersuchen, ist die quantitative Bestimmung der Laktat-Dehydrogenase (LDH). Diese erfolgte im Zellüberstand unter Zuhilfenahme des Cobas 8000 modular analyzer. Die Methode beruht auf der Laktat-Dehydrogenase-katalysierten Reduktion von Pyruvat zu Laktat nach der Gleichung:



Dabei wird $\text{NADH} + \text{H}^+$ zu NAD^+ oxidiert. Die Geschwindigkeit der NADH-Abnahme ist dabei direkt proportional der LDH-Konzentration und wurde photometrisch bei 546/340 nm, dem Maximum der $\text{NADH} + \text{H}^+$ -spezifischen Absorption, gemessen.

2.2.7 Nukleinsäuretechnische Methoden

2.2.7.1 Präparation von RNA und DNA der kultivierten HK-2-Zellen

Aus den spezifisch kultivierten Zellen wurden unter Verwendung eines modifizierten TRIzol-Protokolls nach Chomczynski (1993) RNA, DNA sowie Proteine gewonnen.

Auf eine Trypsinisierung der Zellen wurde mit Bedacht verzichtet, um mögliche molekulare Veränderungen der zu gewinnenden Materialien zu vermeiden. Zunächst erfolgte eine Homogenisierung der als Monolayer wachsenden Zellen. Dabei wurde das, in der Zellkulturflasche befindliche Medium abgesaugt und anschließend 1 ml des TRIzol-Reagenz direkt in die Flasche gegeben. Das

TRIzol-Reagenz ist eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat. Mit Hilfe eines *cell scrapers* wurden die Zellen in Suspension gebracht. Nach 5 min Inkubation bei RT erfolgte die Zugabe von 200 µl Chloroform. Diese Suspension wurde dann für 15 s per Hand geschüttelt, für weitere 3 min bei RT inkubiert und in ein Reagiergefäß überführt. Nun erfolgte die Zentrifugation der Proben (12000 x g, 4 °C, 15 min). Dies führte dazu, dass sich jede Probe in 3 Schichten separierte. Die oberste, farblose Phase, etwa 50 % des gesamten Volumens, enthielt die zu gewinnende RNA. Die weißliche Interphase und die rötliche Unterphase (Phenol/Chloroform) beinhalteten die DNA und Proteine. Beide Letztgenannten wurden für die weitere Verwendung zunächst bei -20 °C eingefroren.

Die RNA der oberen Phase wurde anschließend mit 500 µl Isopropylalkohol (100 %) für 10 min präzipitiert. Nach Zentrifugation der Proben (12000 x g, 4 °C, 10 min), wurde das Pellet einmal mit Ethanol (75 %) gewaschen und für 15 min luftgetrocknet. In RNase-freiem Wasser aufgelöst, konnte die gewonnene RNA bei -80 °C gelagert werden.

Die Konzentration der isolierten RNA wurde photometrisch am Nano-Drop bei 260/280 nm ermittelt: $c(\text{RNA}) = E_{260} \cdot \epsilon \cdot f$.

c Konzentration in µg/ml

E_{260} Extinktion gemessen bei einer Wellenlänge von 260 nm

ϵ Nukleinsäurekoeffizient (0,04 µg/ml für RNA)

f Verdünnungsfaktor

Nun erfolgte die Isolation der DNA. Zunächst präzipitierte man die Proben unter Zugabe von 300 µl Ethanol (100 %). Nach 3 min Inkubation bei RT erfolgte eine Zentrifugation der Proben (2000 x g, 4 °C, 5 min). Der Überstand wurde für eine eventl. Proteinisolation bei -80 °C eingefroren. Das Pellet wurde anschließend mit 1 ml einer Natriumcitrat-Ethanolösung (0,1 mol/l Natriumcitrat in 10 % Ethanol, pH 8,5) gewaschen und danach bei RT für 30 min inkubiert. Dann erfolgte eine Zentrifugation (2000 x g, 4 °C, 5 min) und ein Verwerfen des Überstandes. Dieser Waschvorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt. Nach Zufügen von 1,5 ml Ethanol (75 %) und weiterer Inkubation bei RT für 20 min, wurde erneut unter o. g.

Bedingungen abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde dann für 10 min luftgetrocknet und mit 8 mmol/l NaOH resuspendiert. Abschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation (12000 x g, 4 °C, 10 min) und der DNA-haltige Überstand wurde in einem neuen Reagiergefäß gesichert. Unter Zugabe von 1 mmol/l EDTA wurden die DNA-Proben bei -20 °C gelagert.

2.2.7.2 Agarosegelelektrophorese

Nachdem die RNA gewonnen und ihre Konzentration bestimmt worden war, erfolgte eine Überprüfung ihrer Qualität im 1,5 % Agarose-TBE-Gel. Dazu wurden 30 ml 1x TBE mit 1,5 % (w/v) Agarose aufgekocht und auf einen Gelträger gegeben. Das ausgehärtete Gel wurde in eine Gelkammer eingesetzt und diese anschließend mit 1x TBE gefüllt. 2 µl RNA wurden mit 5 µl Formaldehyd Load Dye und 0,1 µl Ethidiumbromid versehen und in die Taschen des Gels geladen. Die elektrophoretische Auftrennung der RNA erfolgte bei 100 V für 45 min. Anschließend wurden die mit Ethidiumbromid angefärbten 28S- und 18S-Banden photographiert und mit der Software LabImage (Kapelan Bio-Imaging GmbH, Halle/Saale) ausgewertet, wobei das Verhältnis der Signalstärke 28S- zur 18S-Bande annähernd 2:1 betrug.

2.2.7.3 Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

2.2.7.3.1 Reverse Transkription

Um die Expression eines Genes quantitativ bestimmen zu können, bedarf es der Analyse der transkribierten RNA. Im Zuge der Amplifizierung von DNA durch die Polymerase-Ketten-Reaktion, kurz PCR, werden jedoch spezifische DNA-Polymerasen verwendet, welche es auf Grund ihrer Spezifität nicht erlauben, gewonnene RNA zu vervielfältigen. Daher führt der erste Weg zur Analyse der Genexpression über die reverse Transkription. Sie ist ein Verfahren, die zu untersuchende RNA in cDNA (complementary DNA) umzuschreiben. Hierbei dient das Enzym Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase.

Initial wurden 2 µg RNA zusammen mit Ampuva auf ein Endvolumen von 18,3 µl gebracht und in einem Gradientencycler zunächst für 3 min bei 80 °C denaturiert.

Anschließend auf 4 °C hinuntergekühlt, wurden 11,7 µl eines RT-Mix hinzugegeben. Dieser setzte sich wie folgt zusammen: 6 µl 5x First Strand Buffer, 1 µl Oligo-dT-Primer, 1,5 µl dNTP-Lösung, 1,2 µl RNasin Inhibitor und 2 µl M-MLV Reverse Transkriptase. Die cDNA-Synthese geschah im Anschluss bei 42 °C für 60 min. Abschließend erfolgte eine Denaturierung bei 80 °C, weiter eine Kühlung auf 4 °C sowie eine Zentrifugation der Probe unter Gewinnung von 28 µl Überstand. Die so gewonnene cDNA konnte bei -20 °C gelagert oder direkt als Ausgangsmaterial für eine PCR genutzt werden.

2.2.7.3.2 Quantitative Real-Time-PCR

Nach erfolgter cDNA-Synthese wurde die quantitative Real-Time-PCR auf einem LightCycler durchgeführt. Sie ist ein molekularbiologisches Verfahren, bei dem DNA-Abschnitte selektiv in einem exponentiellen Verhältnis amplifiziert werden. Die Quantifizierung erfolgt durch stetige Fluoreszenzmessungen in jeder exponentiellen Phase des PCR-Laufs. Dabei ist der Farbstoff SYBR-Green I und seine Interkalierung in doppelsträngige DNA eine obligate Voraussetzung zur Detektion von DNA. Die konsekutive Zunahme des Fluoreszenzniveaus ist somit ein direktes Maß für die Zunahme der sich amplifizierenden DNA von einem zum nächsten Reaktionszyklus.

Die Expression des *gene of interest* (GOI) wurde im Zuge der Analyse der Daten auf das *housekeeping gene EF-2* bezogen, welches nicht reguliert und konstitutiv exprimiert wird.

Das Erhitzen auf 95 °C führt zur Denaturierung der doppelsträngigen DNA, sodass an den nun vorliegenden Einzelsträngen sequenzspezifische Primer binden können. Sie kennzeichnen den Startpunkt für die DNA-Polymerase wie die TaqPolymerase des Archaeobakteriums *Thermus aquaticus*. Erleichtert wird das Annealing der Primer durch ein Herabsetzen der Temperatur, bezogen auf unten stehende Analysen, auf 55 °C - 60 °C. Die DNA-Synthese erfolgt bei 72 °C, der optimalen Arbeitstemperatur der hitzestabilen TaqPolymerase, welche die Anlagerung von Desoxynukleotiden an das 3'-Ende des Primers katalysiert (Elongation). So entstehen die zur DNA-Matrize komplementären Stränge.

Für die Präparation eines PCR-Ansatzes werden jeweils 1 µl cDNA der zu analysierenden Proben, eine Negativkontrolle, eine Standardverdünnungsreihe sowie das PCR Reaktionsgemisch (19 µl pro Probe) benötigt.

Tabelle 6 Die linke Tabellenseite zeigt die Zusammensetzung des verwendeten Reaktionsgemisches, die rechte Tabellenseite die Bedingungen für die qRT-PCR im LightCycler.

Reaktionsgemisch	Stammlösung	µl	Vorgang	°C	s	Zyklen
ddH ₂ O		10,65	initiale Denaturierung	95	30	1
PCR-Puffer (10x)	200 mmol/l Tris (pH 8,4) 500 mmol/l KCl	2	Denaturierung	95	1	35
SYBR-Green I	1:1000	2	Annealing	55	5	
MgCl ₂	50 mmol/l	1,25		57		
BSA	10 mg/ml	1		57		
DMSO	5 % (v/v)	1		60		
dNTP (Nuc-Mix)	je 10 mmol/l	0,4	Elongation	72	10	
forward primer	100 µmol/l	0,25	Messung	87	1	
reverse primer	100 µmol/l	0,25		80		
TaqPolymerase	5 U/µl	0,2		83		
				88		

Anhand dieses Schemas wurde die mRNA-Expression von *ITGB1*, *EpCAM* und *RASAL1* bestimmt, wobei der Elongationsfaktor-2 (*EF-2*), wie oben erwähnt, als Referenzgen verwendet wurde. Die Genexpression wurde als Quotient der Kopien der cDNA des entsprechenden Gens zu den Kopien der cDNA des Referenzgens *EF-2* ausgedrückt (Kopien cDNA Gen/Kopien cDNA *EF-2*).

2.2.7.3.3 Kontrolle der Qualität der PCR-Amplifikate

Um die Reinheit der in der qPCR amplifizierten DNA verifizieren zu können und die Spezifität der festgelegten Rahmenbedingungen für die qPCR hinreichend zu beweisen, wurden zwei Methoden verwendet:

Schmelzkurvenanalyse: Eine Identifizierung des Amplikons erfolgte auf der Grundlage, dass jede DNA-Sequenz eine spezifische Schmelztemperatur besitzt, an dem je 50 % der DNA einsträngig bzw. doppelsträngig vorliegen. Entscheidend hierfür sind die Länge des Amplikons, sowie dessen Guanin-Cytosin-Anteils.

Restriktionsenzymverdau: Hierfür wurden die entsprechenden Sequenzen der GOI's über den BioLabs NEBcutter bearbeitet und geeignete Restriktionsenzyme generiert. Diese besitzen eine Sequenzspezifität, welche dadurch gewährleistet wird, dass sie ausschließlich palindromische Sequenzen von zumeist 6 Basenpaaren in der DNA erkennen. Unter einem Palindrom versteht man eine Reihenfolge von Buchstaben, die von rechts oder von links gelesen, immer den gleichen Sinn ergibt. Ein Restriktionsenzym ist ein bakterielles Enzym und hydrolysiert die Phosphodiesterbindung der doppelsträngigen DNA, sodass die resultierenden DNA-Fragmente durch eine anschließende Gelelektrophorese getrennt und sichtbar gemacht werden können. (Stryer 1996). Unten stehende Tabelle zeigt den Ansatz des Restriktionsenzymverdaus, wobei folgende Enzyme verwendet und von der Firma New England Biolabs Inc., Ipswich, USA bezogen wurden:

Mwo I (v. *Methanobacterium wolfeii*) für EpCam

Xmn I (v. *Xanthomonas manihotis*) für ITG β 1

Tabelle 7 Reaktionsansatz (Gesamtvolumen von 10 µl) und Reaktionsbedingungen des Enzymverdaus. Die Reagenzien wurden gemischt und unter den gezeigten Bedingungen im Biometra-Cycler inkubiert.

Reagenzien	Mwo I (5000 U/ml)	Xmn I (5000 U/ml)	Inkubations- bedingung	Mwo I (5000 U/ml)	Xmn I (5000 U/ml)
Enzym	2 µl	2 µl	Zeit	60 min	60 min
PCR-Produkt	5 µl	3 µl	Temperatur	60 °C	60 °C
10x Puffer	1 µl	1 µl			
ddH ₂ O	2 µl	4 µl			

Zur Darstellung der Bandenmuster des Restriktionsenzymverdaus wie auch der Überprüfung der Qualität der PCR-Produkte wurden Elektrophoresen mit Agarosegelen adäquat dem der Qualitätskontrolle der gewonnenen RNA im Rahmen der TRIzol-Behandlung, durchgeführt.

2.2.8 Mykoplasmentest

Im Rahmen der Überwachung der nukleinsäuretechnischen Arbeiten galt es zu prüfen, ob die verwendeten Zellkulturen Mykoplasmen enthalten. Mykoplasmen sind kleine obligat intrazelluläre Bakterien, welche die Funktion, den Stoffwechsel, das Wachstum sowie immunologische und biochemische Eigenschaften verwendeter HK-2 Zellkultur beeinflussen können.

Eine Kontamination der Zellkulturen mit Mykoplasmen wurde im Folgenden durch eine RT-PCR ausgeschlossen. Die Primer für den Nachweis von Mykoplasmen-DNA (Operon Biotechnologies GmbH, Köln) wurden zuvor in sterilem Wasser zu einer Konzentration von 100 pmol/µl gelöst. Folgendes Primerpaar wurde verwendet:

Forward Primer: 5' – GGG AGC AAA CAG GAT TAG ATA CCC T - 3'

Reverse Primer: 5' – TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC - 3'.

Tabelle 8 Die linke Tabellenseite zeigt die Zusammensetzung des verwendeten Reaktionsgemischs, die rechte Tabellenseite die Bedingungen für die quantitative RT-PCR im LightCycler.

Reaktions- gemisch	Stamm- lösung	μl	Vorgang	$^{\circ}\text{C}$	s	Zyklen
ddH ₂ O		4,3	initiale Denat.	95	30	1
PCR-Puffer (10x)	200 mmol/l Tris pH (8,4) 500 mmol/l KCl	1	Denaturierung	95	1	35
SYBR-Green	1:1000	1	Annealing	55	5	
MgCl ₂	50 mmol/l	0,6	Elongation	72	10	
BSA	10 mg/ml	0,5	Messung	82-84		
DMSO	5 % (v/v)	0,5				
dNTP (Nuc-Mix)	je 10 mmol/l	0,2				
forward prime	100 $\mu\text{mol/l}$	0,1				
reverse prime	100 $\mu\text{mol/l}$	0,1				
TaqPolymerase	5 U/ μl	0,1				

Die Schmelztemperatur liegt bei ca. 76 $^{\circ}\text{C}$, die der Mykoplasmen-DNA bei ca. 82 $^{\circ}\text{C}$. Die Länge des Replikats beträgt 268 Basenpaare. Das Reaktionsgemisch sowie die Reaktionslaufbedingungen im LightCycler sind in Tabelle 8 dargestellt. Pro 1 μl cDNA wurden 9 μl des Reaktionsgemischs hinzugefügt.

2.2.9 Proteinchemische Methoden

2.2.9.1 Proteomics

Proteomics dient der Identifizierung, Quantifizierung und Charakterisierung aller Proteine einer Zelle oder Zellorganelle unter definierten Bedingungen (Choudhary und Grant 2004). Dabei erfassen die Proteomanalysen verschiedener Zellen oder

Gewebe neben einer differentiellen Proteinsynthese auch deren posttranslationale Modifikationen (Dihazi und Müller 2007). Hierfür werden zur Auftrennung von Proteingemischen neben der zweidimensionalen Gelelektrophorese auch chromatographische Methoden und massenspektrometrische Verfahren angewendet. Eine Zuordnung von Proteinen zu intrazellulären Signalwegen erfolgt ferner über die verschiedenen Möglichkeiten der Bioinformatik.

2.2.9.2 Proteinextraktion

Die HK-2-Zellen wurden nach Angaben der Tabelle 1 für 72 h inkubiert, anschließend in eiskaltem PBS gewaschen, mit einem Cell scraper in ein Reagiergefäß überführt und mit Zell-Lysepuffer auf Eis lysiert. In Reflexion der Etablierung dieser Methode für die verwendeten HK-2-Zellen, konnte innerhalb der 72 h nur ungenügend Material gewonnen werden um aus der Gesamtheit eines Proteinlysates einer großen Zellkulturflasche, ausreichend Protein für ein großes Gel zu gewinnen. Um dennoch auf die erforderliche Proteinmenge von 125 µg zu kommen, wurden je 3 Serien einer Bedingung für nachstehende Analysen zu einem gleichen Verhältnis gepoolt. In einem weiteren Schritt erfolgte die Messung der Proteinkonzentration nach dem Protokoll von Bradford (1976) unter Verwendung des BioRad-Protein-Assay. Dafür wurde zunächst eine Standardkurve aus Rinderserumalbumin (BSA) in Ampuva generiert, um im Anschluss daran die Menge an Protein jeder einzelnen Probe bestimmen zu können. Es erfolgte eine Verdünnung der Proben von 1:10 und 1:20 in Ampuva, bevor diese zusammen mit der Standardreihe in einer Doppelbestimmung mit je 200 µl BioRad-Protein-Assay versetzt und auf einer 96 *well plate* für 5 min inkubiert wurden.

Der BioRad-Protein-Assay enthält den Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brilliant-Blau. Durch die Komplexbildung mit Proteinen wird der Farbstoff in seiner blauen, unprotonierten, anionischen Sulfonatform stabilisiert und sein Absorptionsspektrum verschiebt sich von 470 auf 595 nm (Compton und Jones 1985). Die Proteine der einzelnen Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.9.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese (2DE)

Für die Analyse des gesamten Proteoms einer Zelle besitzen eindimensionale Trenntechniken ein unzureichendes Auflösungsvermögen. Für einen solchen Zweck entwickelte O'Farrell die zweidimensionale Gelelektrophorese, die die Proteine nach zwei unabhängigen Kriterien (Nettoladung und Molekulargewicht) trennt und damit die simultane Untersuchung von mehreren hundert Genprodukten auf einem einzigen Gel ermöglicht (O'Farrell 1975). Die verwendete 2DE wurde gemäß dem Protokoll von Görg et al. (Görg et al. 2000) durchgeführt. Die erste Dimension steht für die Trennung der Proteine nach dem isoelektrischen Punkt, der Nettoladung der Proteine. Dazu wurden 125 µg des Gesamt-Proteinlysats jeder Probe mit Rehydrationspuffer und BPB-Lösung (1µl/ml) auf ein Gesamtvolumen von 350 µl aufgefüllt. Auf einen 17 cm langen immobilisierten pH-Gradienten (IPG-Streifen) mit einem nichtlinearen pH-Bereich von 3-10 aufgetragen, wurde dieser anschließend mit jeweils 2 ml Mineralöl beschichtet, und es folgte die passive Rehydratation über 16 h. Nun folgte die isoelektrische Fokussierung der Streifen bei 20 °C nach folgenden Bedingungen.

Tabelle 9 Bedingungen der isoelektrischen Fokussierung.

Spannung	Zeit
500 V	1 h
1000 V	1 h
5000 V	1,5 h
8000 V	32000 Vh

Im Anschluss daran erfolgte die Auftrennung der Proteine nach der zweiten Dimension, dem Molekulargewicht, in einem vertikalen SDS-Trenngel (pH 8,8) mit einem Puffersystem nach Laemmli. Einleitend erfolgte eine Äquillibrierung des zuvor verwendeten Harnstoffpuffersystems auf oben beschriebenes SDS-Puffersystem. Für diese Alkylierung wurden die fokussierten IPG-Streifen zunächst für 20 min in 10 ml Äquillibrationspuffer 1 und danach für weitere 20 min in 10 ml Äquillibrationspuffer 2 bei RT inkubiert. Hierbei bewirkte das im Äquillibrationspuffer 1 enthaltene DTT eine Reduktion der Disulfidbrücken und das im Äquillibrationspuffer 2 enthaltene Iodoacetamid eine Alkylierung der freien Sulfhydrylgruppen der Cysteinreste, wodurch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht werden konnte. Nun wurde je ein IPG-

Streifen auf ein 12,5 %iges Polyacrylamidgel gelegt, das gemäß Tabelle 10 in einem XL-System der Firma BioRad hergestellt wurde.

Tabelle 10 Zusammensetzung der 12,5 %igen Polyacrylamidgele.

Reagenz	2 Polyacrylamidgele (ml)	4 Polyacrylamidgele (ml)
ddH ₂ O	24,6	49,2
1,5 mol/l Tris/HCl (pH 8,8)	19,2	38,4
Acrylamid (30 %)	32,1	64,2
SDS (10 %)	1,1	2,2
APS (10 %)	0,385	0,77
TEMED	0,026	0,052

Zudem wurden je 5 µl des Molekulargewichtsmarkers Precision Plus Protein All Blue auf ein Filterpapier aufgetragen und auf der linken Seite eines jeden Polyacrylamidgels neben dem IPG-Streifen aufgelegt. Die SDS-PAGE erfolgte bei einer Temperatur von 4 °C und einer Spannung von 100 V über 18 h.

Das SDS trennt die Proteine ausschließlich nach der Molekülgröße, wobei die Polyacrylamid-Matrix als molekulares Sieb fungiert. Hierfür werden die Proteine denaturiert und an die Peptidketten lagert sich das SDS an. Auch werden Wechselwirkungen der Proteine unterbunden. Zudem erhalten die Proteine eine negative Ladung, sodass sie sich im elektrischen Feld in Richtung der Anode bewegen können. Es resultiert eine punktförmige Verteilung der einzelnen Proteine des bereits nach dem pI aufgetrennten Proteingemischs, je nach pI und MW des einzelnen Proteins.

2.2.9.4 Phosphoprotein- und Silberfärbung der 2DE-Polyacrylamidgele

Nach abgeschlossener elektrophoretischer Auftrennung der Proteine wurden die Polyacrylamidgele in Färbekammern überführt und zweimal für je 30 min mit 250ml Fixierungslösung pro Polyacrylamidgel fixiert, danach dreimal mit ddH₂O gewaschen und die Phosphoproteinfärbung mit Ready Solution Pro-Q® Diamond Phosphoprotein Gel Stain nach Herstellerangaben vorgenommen. Die 12-stündige Inkubation zur Phosphoproteinfärbung, die nachfolgende 90-minütige Inkubation im Entfärber, das anschließende Waschen der 2DE-Polyacrylamidgele mit ddH₂O

wie auch das Scannen der 2DE-Polyacrylamidgele mit dem Fluoreszenz-Scanner FLA 5100 bei einer Wellenlänge von 532 nm erfolgten in Dunkelheit bei RT. Nach dem Scannen der 2DE-Polyacrylamidgele wurden diese für mindestens eine Stunde in der Silber-Fix/Stop-Lsg. inkubiert, bevor sie der Silberfärbung gemäß der Methode von Blum et al. (Blum et al.1987) zugeführt wurden.

Nun wurden die Polyacrylamidgele jeweils 20 min zunächst mit Waschpuffer 1 und nachfolgend mit Waschpuffer 2 gewaschen. Der zuvor präparierte Sensitizer wurde für genau 60 s auf die 2DE-Polyacrylamidgele gegeben und mit drei 20-sekündigen Waschschritten wieder entfernt, bevor die stets frisch zubereitete Lösung für die Silberfärbung für 20 min auf die 2DE-Polyacrylamidgele gegeben wurde. Nach drei 20-sekündigen Waschschritten wurde die Lösung für den Entwickler auf die 2DE-Polyacrylamidgele gegeben und die Entwicklung nach 3 bis 8 min mittels Silber-Fix/Stop-Lsg. gestoppt. Anschließend wurden die silbergefärbten 2DE-Polyacrylamidgele mit einem Canon LiDE 210 Scanner digitalisiert und in jeweils 300 ml Eisessig aufbewahrt, bevor sie nach einem weiteren Waschschriff mit dem Gel Dryer über 1,5 h bei 80 °C getrocknet wurden.

2.2.9.5 Auswertung der Proteinspots in den 2DE-Polyacrylamidgelen

Die densitometrische Quantifikation der Proteinspot-Intensität, normalisiert zur Gesamtintensität aller Proteinspots eines 2DE-Polyacrylamidgels, erfolgte mittels Delta2D Software gemäß Herstellerangaben (Luhn et al. 2003). Auswahlkriterium für eine massenspektrometrische Identifizierung veränderter Proteinspots des Phosphoprotein-/Protein-Profiles waren ausschließlich signifikante Unterschiede der Proteinspot-Intensität der verschiedenen Bedingungen der HK-2-Zellen, innerhalb derer sie inkubiert wurden.

2.2.9.6 Proteinidentifikation

Der für die Identifikation der veränderten Proteine notwendige In-Gel-Verdau, wurde entsprechend dem modifizierten Protokoll von Shevchenko (Shevchenko et al. 1996) durch Herrn PD Dr. rer. nat. Asif und Mitarbeiter durchgeführt. Hierfür wurden die Proteinspots ausgeschnitten und mit 50 µl, einer zuvor frisch präparierten Entfärbelösung entfärbt. Nach dem Waschen der Polyacrylamid-

gelstücke mit ddH₂O, wurden diese für 15 min mit 40 µl eines 50 %igen Acetonitril-Gemisches inkubiert. Nun wurden die Gel-Stücke bis zum Erreichen eines weißlich, klebrigen Zustandes mit jeweils 40 µl ACN behandelt, bevor sie für weitere 5 min durch Zugabe von 50 µl einer 100 mmol/l Ammoniumbikarbonat-Lösung äquilibriert wurden. Es folgte die Zugabe von 50 µl ACN, um eine 1:1 Lösung zu erhalten. Nach 15-minütiger Behandlung, wurde die Lösung entfernt und die Proben in einer Vakuumzentrifuge für 15 min getrocknet. Nun erfolgte die Alkylierung der Proben durch Hinzufügen von 40 µl 10 mmol/l DTT/ 100 mmol/l Ambic bei Inkubation im Wasserbad (56 °C, 45 min). Nach erfolgter Kühlung der Proben, wurden diese mit je 40 µl 55 mmol/l Iodoacetamid/100mmol/l Ambic behandelt und bei Dunkelheit für 30 min inkubiert. Danach wurde mit jeweils 40 µl 100 mmol/l Ambic gewaschen, eine 1:1 Lösung durch Zugabe von 40 µl ACN initiiert und die Proben für weitere 15 min inkubiert. Dann erfolgte ein erneutes Trocknen der Gel-Stücke nach oben beschriebenem Vorgehen. Die nachfolgende 45-minütige Inkubation der Polyacrylamidgelstücke mit 10 µl Trypsin-Verdau-Puffer erfolgte auf Eis. Anschließend wurden die Polyacrylamidgelstücke mit 20-60 µl Verdau-Puffer ohne Trypsin bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Cup gegeben und mittels Vakuumzentrifuge getrocknet. Die Polyacrylamidgelstücke wurden mit jeweils 25-75 µl einer 0,1 %igen TFA-Lösung bedeckt und die Eppendorf-Cups dann für 30 min in ein Ultraschall-Wasserbad gestellt, um die Peptide aus den Polyacrylamidgelstücken zu extrahieren. Die Überstände wurden entnommen, zu den bereits getrockneten Überständen hinzugegeben und erneut in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Dieser Schritt wurde zunächst mit einer Lösung aus 30 % ACN und 70 % 0,1 %iger TFA-Lösung, danach mit einer Lösung aus 60 % ACN und 40 % 0,1 %iger TFA-Lösung und schließlich mit 100 % ACN wiederholt. Die aus den einzelnen Schritten entnommenen Überstände der einzelnen Proben wurden gepoolt, in der Vakuumzentrifuge getrocknet und die Proben dann bei -20°C bis zur weiteren Analyse gelagert.

In einem letzten Schritt, ebenfalls durch Herrn PD Dr. rer. nat. Asif und Mitarbeiter durchgeführt, wurden die Proben in 0,1 %iger Ameisensäure gelöst und 1 µl Probe für die chromatographische Separation auf ein CapLC-System aufgetragen. Die Analyse der Peptid-Sequenzen erfolgte dann mit einem Micromass Q-TOF Ultima

Massenspektrometer nach einer Elektrospray-Ionisation der Probe im positiven Ionen-Modus. Die erhaltenen Daten wurden mit der Software MassLynx verarbeitet und anschließend durch die Mascot-Suchmaschine mit den Protein-Datenbanken MSDB und Swiss-Prot abgeglichen.

2.2.10 RASAL1-Promotormethylierungsstatus

2.2.10.1 Einführung

Diese Methode diente der Untersuchung der Epigenetik von HK-2-Zellen in An- u. Abwesenheit verschiedener Stimuli (Tabelle 1). Epigenetik beschreibt dabei etwaige genetische Auswirkungen, die nicht allein durch die Nukleotidsequenz bestimmt werden, sondern durch übergeordnete Vorgänge wie die der Modifizierung von Histonmolekülen oder die der Methylierung von DNA. Solch komplexe Interaktionen dienen dazu die Genexpression zu regulieren und zu kontrollieren (Costello und Plass 2001). Dabei ist die DNA-Methylierung noch in weitere Aufgaben involviert, wie dem gene imprinting, dem embryonic development, dem X-chromosome gene silencing oder der Zellzyklusregulation (Adams 1995).

Die heute meist verwendete Grundlage eine DNA-Methylierung zu detektieren und zu quantifizieren, ist die Bisulfit Konversion (Frommer et. al 1992). Diese Technik beinhaltet die Behandlung der genomischen DNA mit Bisulfiten, welche unmethylierte Cytosine in Uracil konvertieren. Methylierte Cytosine bleiben dabei unberührt (Abbildung 1). Das sich abzeichnende DNA-Profil lässt sich über den Einsatz sequenzspezifischer Primerpaare oder über die Verwendung einer Sonde durch eine konventionelle PCR amplifizieren und verifizieren.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Original DNA mit methylierten C ^m pG- Inseln	G	T	T	G	C ^m	G	C	T	C	A	C	T	G	C
DNA- Sequenz nach erfolgter CT Konversion	G	T	T	G	C	G	T	T	T	A	T	T	G	T

Abbildung 1 DNA-Sequenz nach Behandlung mit dem EZ DNA Methylation-Gold™ Kit. Methyliertes Cytosin an #5 blieb intakt, während unmethylierte Cytosine an #7, 9, 11 und 14 in Uracil konvertierten und als Thymine nach anschließender PCR detektiert wurden.

2.2.10.2 Procedere

2.2.10.2.1 Bisulfitbehandlung

Zunächst wurde die genomische DNA aus 2.2.7.1 einer Bisulfit-Reaktion unterzogen. Hierbei orientierte sich das Vorgehen nach den Herstellerangaben des EZ DNA Methylation-GoldTM Kit. In einem ersten Schritt wurde je 1 µg DNA zu insgesamt 20 µl in Ampuva gelöst und das CT Conversion Reagent präpariert. Anschließend erhielt jede Probe 130 µl dieses Ansatzes. Über Kopf geschüttelt, wurden die Proben im Gradientencycler anhand nachstehender Bedingungen inkubiert. Zunächst erfolgte eine initiale Denaturierung bei 98 °C für 10 min und danach die Inkubation bei 64 °C für weitere 2 h 30 min. Nach abschließender Kühlung auf 4 °C wurden die Proben mit je 600 µl M-Binding Buffer versetzt und in eine Zymo-Spin IC Säule überführt. Nun erfolgte eine Zentrifugation (12500 x g, 4 °C, 40 s) und der gebildete Durchlauf wurde entfernt. Danach wurden die Proben mit je 100 µl M-Wash Buffer gewaschen, bevor sie mit je 200 µl M-Desulphonation Buffer bei 22 °C für 30 min inkubiert wurden. Nach erfolgter Inkubation, wurden die Proben unter o. g. Bedingungen abzentrifugiert und zweifach mit je 200 µl M-Wash Buffer gewaschen. Das Auffangröhrchen wurde verworfen, auf jede Säule 20 µl M-Elution Buffer gegeben, abschließend die Probe über eine Zentrifugation (11500 rpm, 1 min) in ein neues Reagiergefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.10.2.2 Quantitative Verifizierung der Proben über die Polymerase-Ketten-Reaktion

Zunächst erfolgte die Ermittlung der Nucleotidsequenz für den Promotor des Gens *h-RASAL1* über die Internetseite genome.ucsc.edu. Hier wurde das in Nature medicine publizierte Primerpaar für den Promotorbereich von *h-RASAL1* eingefügt und so die Sequenz des Genabschnittes sowie dessen Position auf Chromosom 12 bestimmt (chr 12: 113573405-113573865). Anschließend erfolgte das Design von methylierungsspezifischen Primerpaaren über eine, durch das Programm MethPrimer vorgenommene, fiktive Bisulfit-Konversionsreaktion der ermittelten Promotorsequenz (Li und Dahiya 2002). Folgende Primerpaare wurden sowohl für die methylierte als auch für die unmethylierte Gensequenz ermittelt:

hRASAL1 M - L 5' - gtg ggg gat ttt att gga ggc - 3'

hRASAL1 M - R 5' - aaa aaa cgc aac gaa ctc tta ccg - 3'

hRASAL1 U - L 5' - tag gtg ggg gat ttt att gga ggt - 3'

hRASAL1 U - R 5' - caa aaa aca caa caa act ctt acc aaa - 3'.

Da für den methylierten Teil der amplifizierenden DNA im Zuge der Etablierung nur geringe Amplifikatkonzentrationen verifiziert werden konnten, erfolgte die Anwendung einer TaqMan-Sonde. Diese besitzt an einem Ende einen sog. Quencher, einen nicht fluoreszenten Farbstoff namens Dabcyl. An ihrem anderen Ende befindet sich ein Reporter-Fluoreszenzfarbstoff namens Fluorescein, kurz FAM. Da die Taq-Polymerase, die zusätzlich zur Polymeraseaktivität eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität besitzt, die Sonde während der Synthese des Gegenstranges am 5'-Ende abbaut, entfernen sich dadurch Quencher und Fluorophor voneinander und eine steigende Reporter-Fluoreszenz (FRET, Fluorescence resonance energy transfer) kann gemessen werden. Die Messung findet am Ende der Elongation in jedem Zyklus statt.

Folgende Hydrolyse-probe wurde verwendet:

M-probe: 5' - acg aac aaa aaa cga aaa aaa cga ccc - 3'.

Nach einer initialen RT-PCR sowohl für den methylierten, als auch für den unmethylierten Teil der bisulfitkonvertierten DNA, erfolgte eine Sequenzierung der gewonnenen PCR-Produkte über die Firma Seqlab, Göttingen. So aufgereinigte PCR-Amplifikate dienten den späteren RT-PCRs als Standards. Tabelle 11 zeigt die Zusammensetzung des verwendeten Reaktionsgemischs, sowie die eingesetzte Menge an bisulfitkonvertierter DNA für die quantitative RT-PCR im LightCycler 480.

Tabelle 11 Reaktionsgemisch für die quantitative Verifizierung des RASAL1-Methylierungsstatus.

Reaktionsgemisch	Stammlösung	µl
methyliert		
2x Master		10

Reaktionsgemisch	Stammlösung	μl
Forward Primer	100 pmol/ μl	0,15
Reverse Primer	100 pmol/ μl	0,15
TaqMan-Probe		0,05
ddH ₂ O		6,65
Bisulfit-DNA		3
unmethyliert		
2x Master		10
Forward Primer	100 pmol/ μl	0,15
Reverse Primer	100 pmol/ μl	0,15
SYTO 9 Green	1:100	2
ddH ₂ O		6,7
Bisulfit-DNA		1

Die Bedingungen für die qRT-PCR im LightCycler 480 sind in den Abbildungen 2 und 3 dargestellt.

Programs

Program Name	Denat						
Cycles	1	Analysis Mode	None				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:10:00	4.40		0	0	0

Program Name	PCR						
Cycles	50	Analysis Mode	Quantification				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:20	4.40		0	0	0
62	None	00:01:00	2.20		0	0	0
78	Single	00:00:04	4.40		0	0	0

Program Name	Melt						
Cycles	1	Analysis Mode	Melting Curves				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:20	4.40		0	0	0
65	None	00:00:10	2.20		0	0	0
95	Continuous		0.14	4	0	0	0

Program Name	Cool						
Cycles	1	Analysis Mode	None				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
40	None	00:00:01	2.20		0	0	0

Abbildung 2 Darstellung der Reaktionsbedingungen für den Nachweis unmethylierter DNA.

Program Name	Denat						
Cycles	1	Analysis Mode	None				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:10:00	4.40		0	0	0

Program Name	PCR						
Cycles	50	Analysis Mode	Quantification				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:15	4.40		0	0	0
55	Single	00:01:10	2.20		58	0.2	0

Program Name	Cool						
Cycles	1	Analysis Mode	None				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
40	None	00:00:01	2.20		0	0	0

Abbildung 3 Darstellung der Reaktionsbedingungen für den Nachweis methylierter DNA.

2.2.11 Statistik und bioinformatische Auswertung

Die Software Delta2D (V3.6; DECODON GmbH, Greifswald) wurde zur densitometrischen Auswertung der 2DE-Polyacrylamidgele nach einer Phosphoprotein- und einer Silberfärbung verwendet. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden mit dem Computerprogramm Microsoft Excel, Version 2000 (Microsoft Corporation, Washington, USA) errechnet. Der Mann-Whitney-U-Test wurde unter Verwendung einer Software für die statistische Evaluation SPSS (V15.0 für Windows; Chicago, Illinois, USA) vorgenommen. Die massenspektrometrisch ermittelten Daten wurden mittels MassLynx (V4.0; Micromass, Manchester, UK) prozessiert. Die Molecular INTERaction database (HomoMINT; <http://mint.bio.uniroma2.it/mint/Welcome.do>) wurde für die Analyse und für eine graphische Übersicht von direkt und indirekt interagierenden Proteinen innerhalb eines Netzwerkes verwendet (Chatr-aryamontri et al. 2007). Die Kontrolle der Primerpaare auf Selbstkomplementarität erfolgte mit der Software Oligo Explorer 1.4 (<http://www.genelink.com/tools/gl-oe.asp>).

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss von MPA auf die Genexpression von *ITGB1*, *EpCAM* und *RASAL1*

Der Einfluss von MPA, EGF und TGF β 1 auf die Genexpression von *ITGB1*, *EpCAM* und *RASAL1* wurde mittels quantitativer Real-Time-PCR untersucht. In den Abbildungen 4, 5 und 7 sind die Ergebnisse der quantitativen Genexpression normalisiert zur Expression des Elongationsfaktors-2 (*EF-2*) dargestellt, wobei die Kontrolle („-“) jeweils 100 % gesetzt wurde. Die Anwesenheit von TGF β 1 bewirkte eine auf 163 % (TGF β 1) bis 198 % (TGF β 1+EGF) gesteigerte, jedoch nicht signifikante veränderte Expression von *ITGB1*, welche nicht durch den Einfluss von MPA supprimiert werden konnte. Der Einfluss von EGF schien die Expression von *ITGB1* nicht zu beeinflussen. Signifikante Unterschiede in der Expression von *EpCAM* waren sowohl unter Einfluss von TGF β 1 als auch unter Stimulation mit EGF, jeweils in Referenz zur Behandlung mit MPA zu verzeichnen ($p < 0,05$ für EGF versus EGF+MPA, sowie für TGF β 1 versus TGF β 1+MPA, Mann-Whitney-U-Test).

Die Expression von *RASAL1* scheint zumindest nach 72 h keine tendenziellen Unterschiede in den einzelnen Bedingungen zu haben. Trotz der geringen Standardabweichungen, konnten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden.

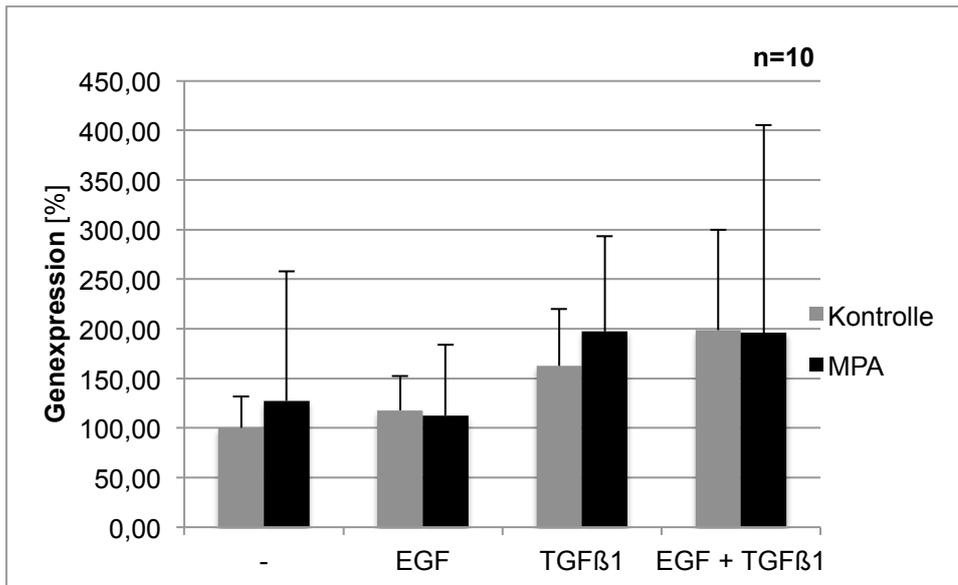


Abbildung 4 Expression von ITGβ1 in HK-2-Zellen.

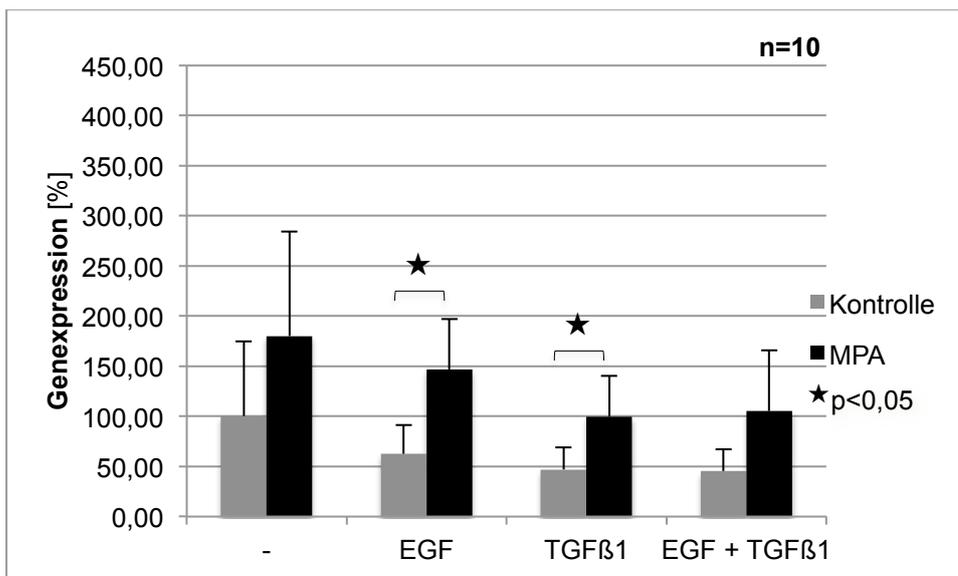


Abbildung 5 Expression von *EpCAM* in HK-2-Zellen.

3.2 Einfluss von MPA auf die Kollagen-Kontraktion

Der Kollagen-Kontraktionstest diente der Untersuchung der Auswirkungen von MPA sowie der verwendeten Wachstumsfaktoren TGFβ1 und EGF auf das Vorhandensein möglicher fibroblastärer Funktionen. Weiterhin wurde die Umkehrbarkeit dieses Effektes durch die Zugabe von Guanosin und 8-Aminoguanosin überprüft.

Abbildung 6 zeigt virtualisierte Gele der verschiedenen Bedingungen.

Die durchschnittliche Fläche der Kollagenmatrix nach 48 h Inkubation betrug in Abwesenheit jeglicher Zellstimulation 82 % der Ausgangsfläche, wogegen die Kollagenmatrix mit MPA nach Zellstimulation 72 % betrug. Die Zugabe von MPA bewirkte somit eine etwa 10 %ige Hemmung der Gel-Matrix-Kontraktion im Vergleich zur Kontrolle, d. h. dass MPA in der Lage zu sein scheint, die Fähigkeit von Epithelzellen Kollagengitter zu bilden, geringfügig, auf inhibitorische Weise zu beeinflussen. Eine Stimulation der Zellen mit EGF und/ oder TGF β 1 führte zu einer signifikanten Kollagengelkontraktion mit einer durchschnittlichen Fläche von 42 % in Referenz zur Ausgangssituation ($p < 0,05$, Mann-Whitney-U-Test). Die Reversibilität der Wirkung von MPA konnte durch die Zugabe von G/8AG bestätigt werden.

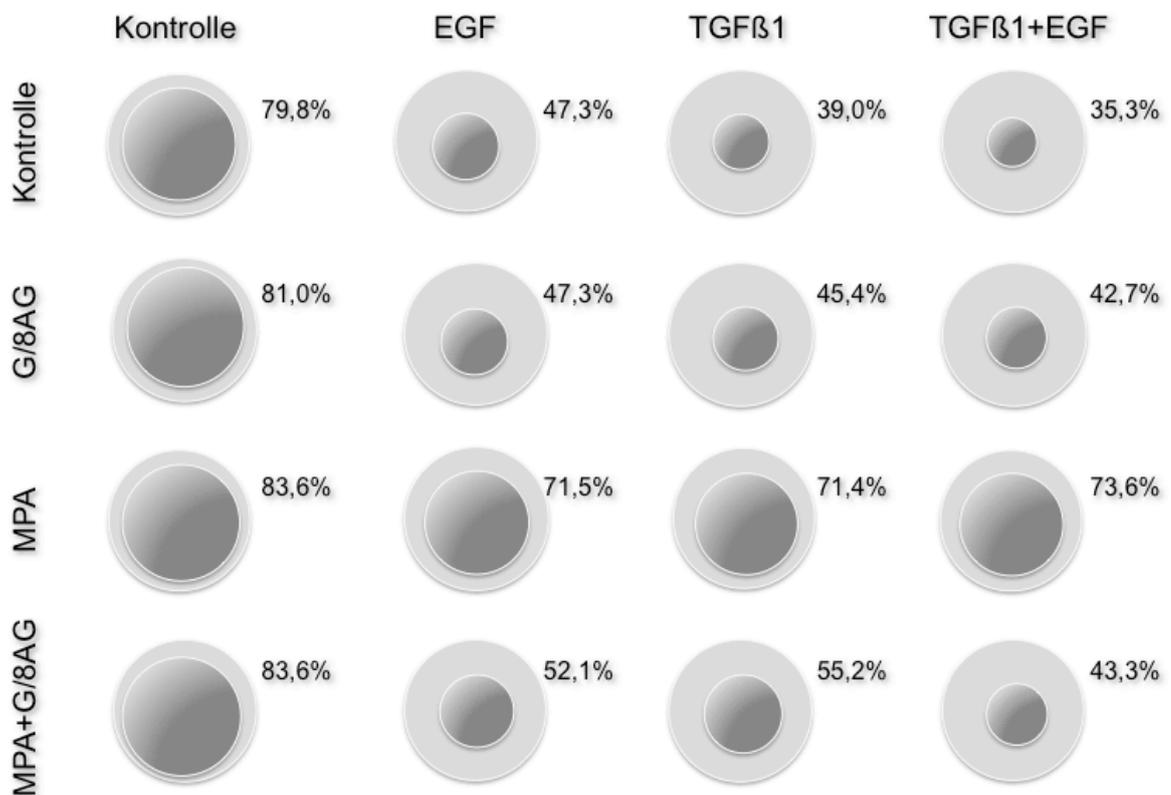


Abbildung 6 Darstellung der durchschnittlichen Flächen der Kollagenmatrizes als virtuelle Gele nach 48 h Inkubation.

3.3 Einfluss von MPA auf den *RASAL1*-Promotormethylierungsstatus

In Abbildung 7 sind die Ergebnisse nach erfolgter RT-PCR dargestellt. Abbildung 8 zeigt die Schmelzkurvenanalyse zur Detektion des Methylierungsstatus.

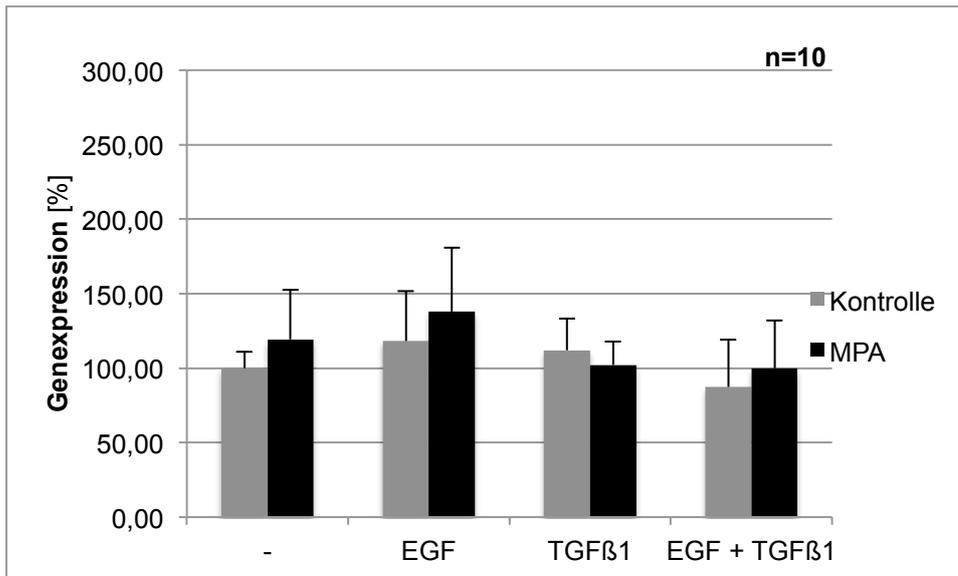


Abbildung 7 Genexpression von *RASAL1* in HK-2-Zellen.

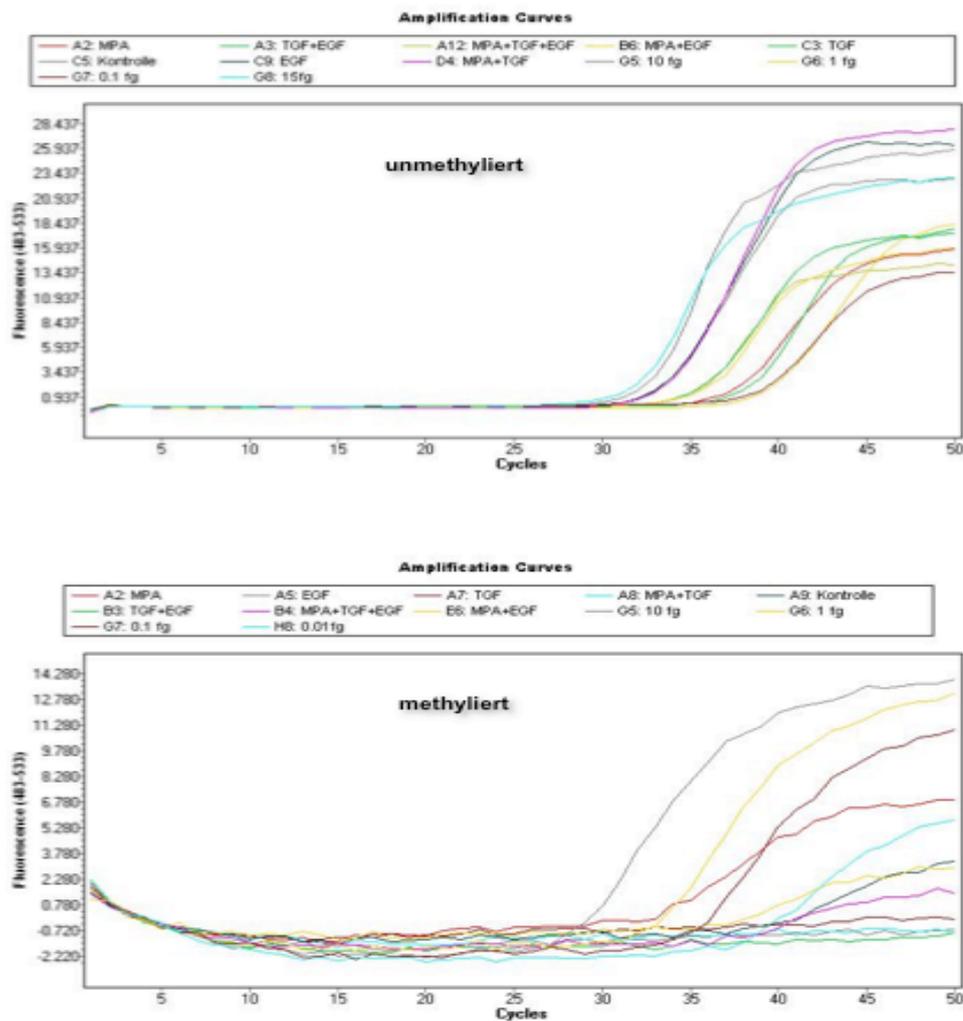


Abbildung 8 Schmelzkurven unterschiedlicher Konzentrationen *RASAL1*.

In den meisten analysierten Proben konnte der methylierte Anteil trotz Verwendung einer hochspezifischen Sonde und optimalen Reaktionsbedingungen schwach oder gar nicht nachgewiesen werden. Sowohl für den unmethylierten als auch für den methylierten Anteil lassen sich keine wesentlichen Unterschiede feststellen.

3.4 Einfluss von MPA auf die Zellproliferation

Der BrdU ELISA diente der quantitativen Erfassung der Zellproliferation in den nach Tabelle 1 für 72 h inkubierten HK-2-Zellen. Nach Inkorporation von BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine), anstelle Thymidin in die sich, im Zuge der Proliferation, synthetisierenden DNA, erfolgte die Detektion der Lumineszenz am Glo Runner Mikroplate Luminator. Die gemessenen relative light units/second (rlu/s) korrelieren direkt mit dem Ausmaß der DNA-Synthese und so mit dem Proliferationsgrad der stimulierten Zellkulturen.

Sowohl in der Kontrolle als auch unter Stimulation der HK-2-Zellen mit den beiden Wachstumsfaktoren zeichneten sich gleichwertige Proliferationstendenzen bei zunehmenden MPA-Konzentrationen ab und bedingten einer halbmaximalen Inhibierungskonzentration (IC_{50}) von 5 $\mu\text{mol/L}$ (Abbildung 9). Unter Zugabe von G/8AG konnte die Reversibilität der Wirkung der Mycophenolsäure in der Kontrolle als auch unter Einfluss von TGF β 1 und EGF bestätigt werden (Abbildung 10).

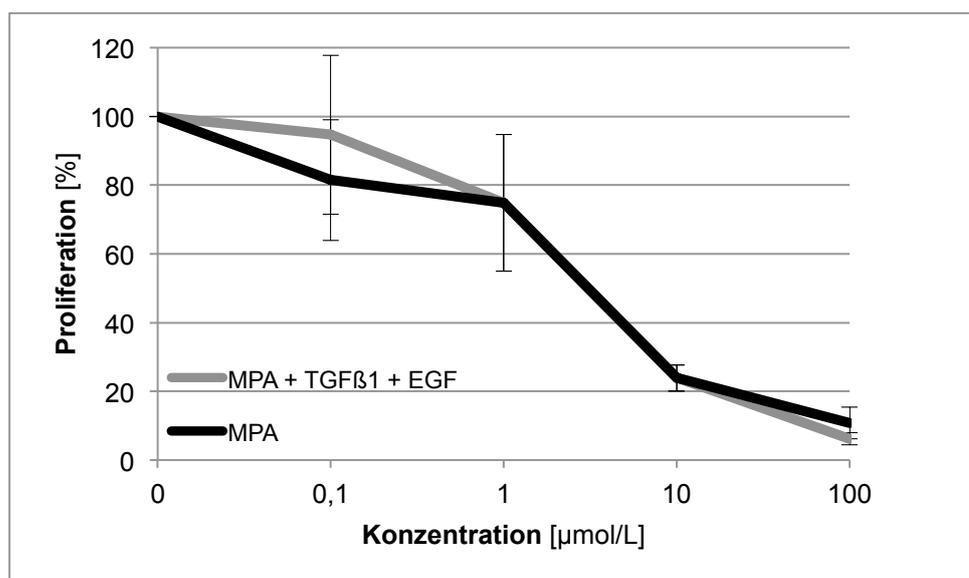


Abbildung 9 Zellproliferation unter Einfluss von MPA.

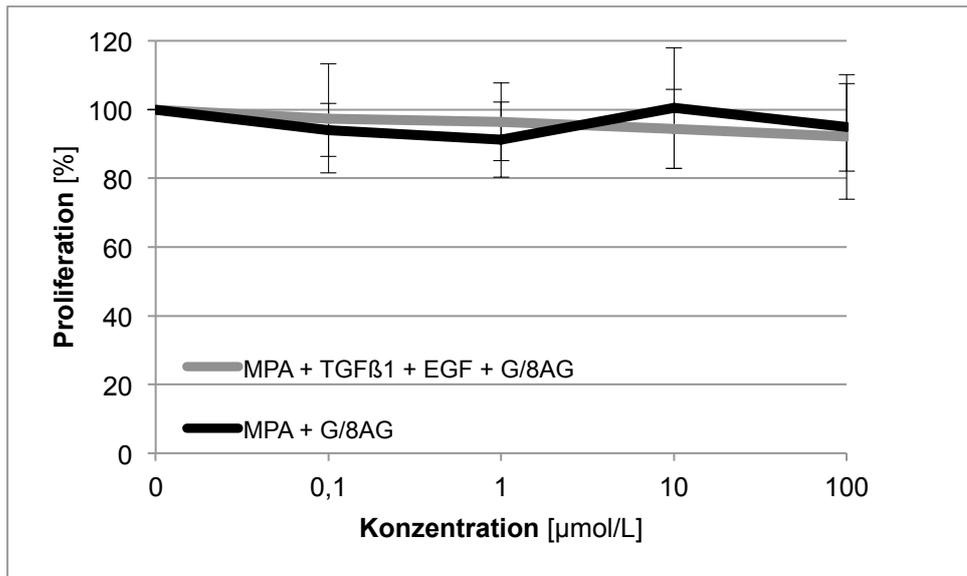


Abbildung 10 Reversibilitätsprüfung der Zellproliferation unter Einfluss von G/8AG.

3.5 Einfluss von MPA auf den Wundverschluss *in vitro*

Zur Untersuchung des Einflusses von MPA und der verwendeten Wachstumsfaktoren TGF β 1 und/ oder EGF auf die Zellfunktion *in vitro*, diente der Wundverschlussassay. Der Verschluss einer artifiziiell zugeführten Wunde im konfluenten Zellrasen wurde prozentual zur Größe der Ausgangswunde unter Annahme eines linearen Wachstumsverhaltens in 6 stündigen Abständen über eine Gesamtdauer von 24 h ausgewertet. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zu 3 Serien sind in den Abbildungen 11 und 12 dargestellt (Kontrolle gekennzeichnet durch „-“).

Im Allgemeinen zeigten sich beschleunigte, aber nicht signifikante Verschluss Tendenzen unter Einfluss der Wachstumsfaktoren TGF β 1 und/oder EGF. Die Inkubation mit MPA führte hingegen nur unter Stimulation mit EGF zu einem mit der Kontrolle identischen Verschlussverhalten, was auf einen inhibitorischen Einfluss der Mycophenolsäure auf die TGF β 1-Wirkung hindeutet. Die statistische Auswertung der Ergebnisse ergab einen signifikanten Unterschied in der Wundbreite nach 24 h unter TGF β 1-Einfluss von 18,9 % der Ausgangswundbreite vs. der Inkubation der HK-2-Zellen mit TGF β 1 in Verbindung mit MPA von 39,6 % der Ausgangswundbreite ($p < 0,05$, Mann-Whitney-U-Test). MPA bewirkte hierbei eine zeitabhängige Verzögerung des Wundverschlusses und damit indirekt eine Inhibition der Wirkung von TGF β 1.

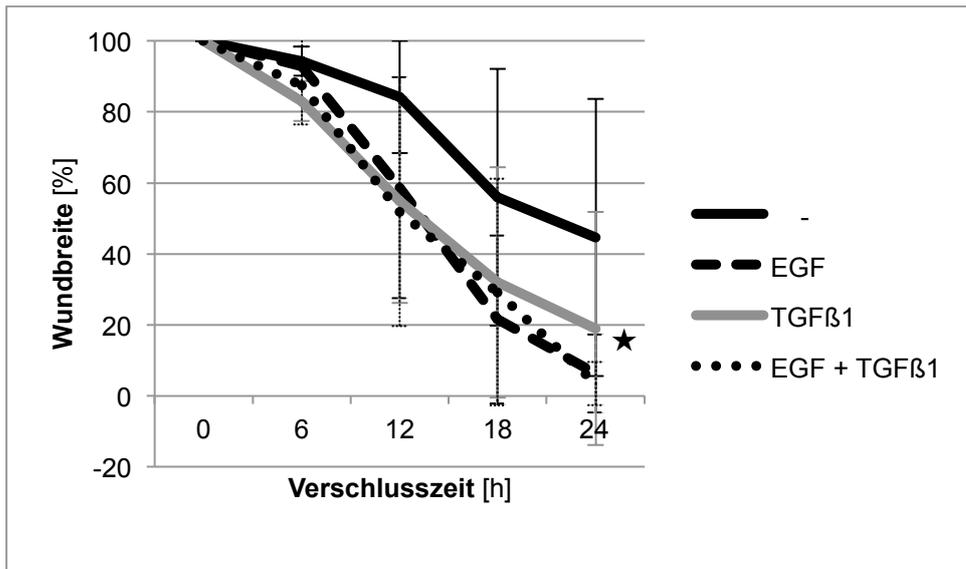


Abbildung 11 Wundverschluss Tendenzen stimulierter HK-2-Zellen.

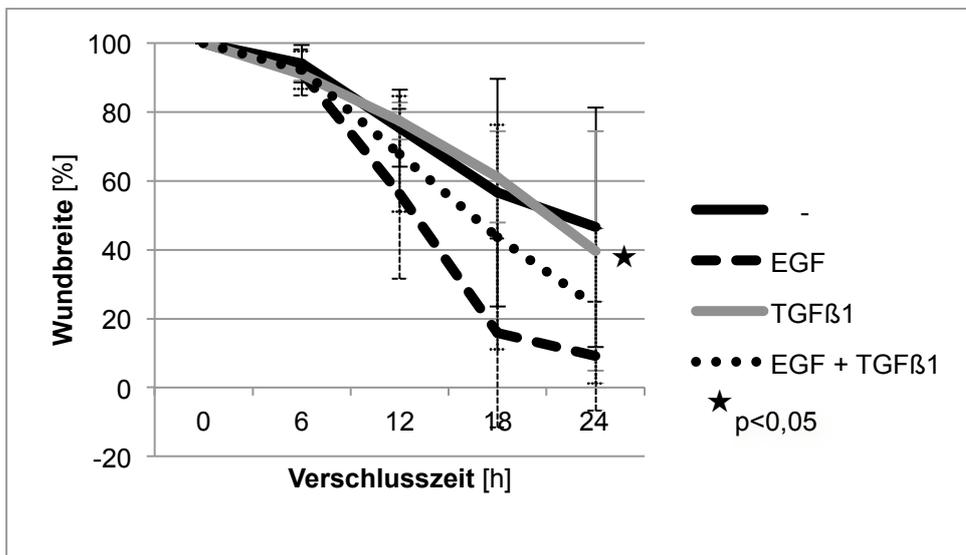


Abbildung 12 Inhibitorischer Einfluss von MPA auf den Wundverschluss stimulierter HK-2-Zellen.

3.6 Spindle-Index

Zur objektiven Charakterisierung der nach Tabelle 1 behandelten HK-2-Zellen, wurden diese nach 24 h photodokumentiert und ein Spindle-Index (SI) als Verhältnis der maximalen Länge einer Zelle, geteilt durch ihre maximale Breite, bestimmt. Dabei ist die Existenz einer möglicherweise stattgehabten epithelialen mesenchymalen Transition Typ II (EMT Typ II) umso wahrscheinlicher, desto höher der Spindle-Index der Zellen ist. Die errechneten medianen Spindle-Indices sind in Abbildung 13 dargestellt (Kontrolle gekennzeichnet durch „-“).

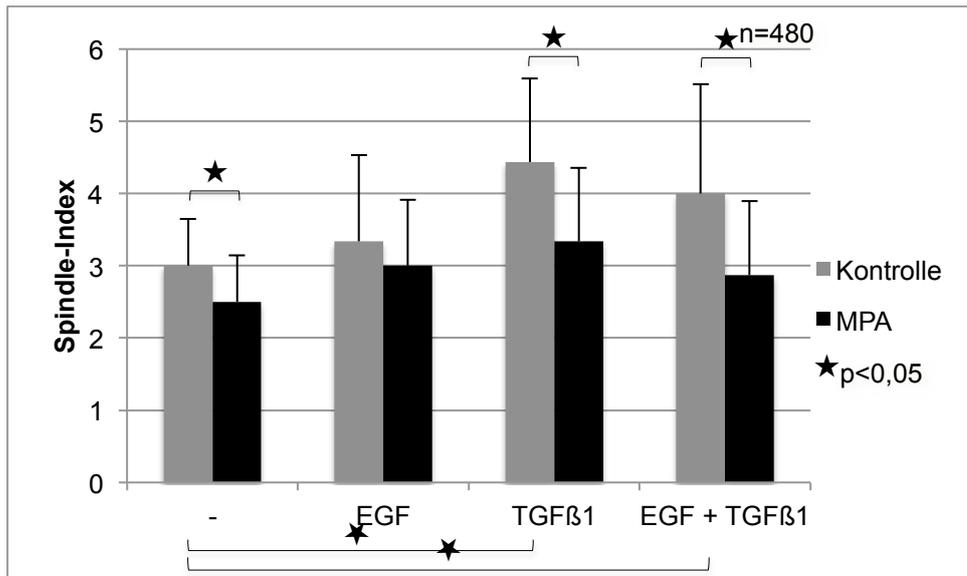


Abbildung 13 Spindle-Index stimulierter HK-2-Zellen.

Signifikante Unterschiede in der Gegenüberstellung der einzelnen Gruppen konnten im Vergleich der Kontrolle mit jener ausschließlich mit MPA behandelten Bedingung, im Vergleich zwischen denen mit TGFβ1 und EGF und denen mit TGFβ1, EGF sowie MPA inkubierten Zellen und zwischen denen, welche allein mit TGFβ1 versus denen mit TGFβ1 und MPA behandelten Zellen eruiert werden. Weiterhin fanden sich signifikante Unterschiede zwischen der Kontrolle und der mit TGFβ1 behandelten Gruppe, zwischen der Kontrolle und derer mit beiden Wachstumsfaktoren inkubierten Zellen und zwischen den mit MPA und derer mit MPA in Verbindung mit TGFβ1 oder in der Kombination mit EGF inkubierten Zellen.

3.7 Einfluss von MPA auf die Expression epithelialer Marker

Die durchflusszytometrische Messung der nach Tabelle 1 behandelten HK-2-Zellen dient der Detektion von EpCam und/ oder ITGβ1 exprimierenden Zellen. Dadurch würde die Existenz einer EMT Typ II neben der Analyse der Genexpression, auch auf der Ebene der Proteine erhärtet werden können. Inwieweit die behandelten Zellen dem ursprünglich, verwendeten Nierenepithel entsprechen oder einen fibro-/ myofibroblastären Charakter tragen, konnte durch die Antikörper-Markierung zytometrisch eruiert werden. Damit war die differenzierte Identifizierung veränderter Einzelzellen aus einem behandelten

Zellpool möglich. Um die relative Unspezifität von ITG β 1 zur Detektion fibro/myofibroblastärer Zellen nutzen zu können, wurden die einzelnen Zellsuspensionen zugleich mit beiden Antikörpern inkubiert. Im Zuge des Setzens der Analysefenster (Gating) wurden die für die mit EpCam und die mit ITG β 1 beladenen Zellen, spezifischen Intensitätsschwellenwerte festgesetzt und folgende Ratio für eindeutig EpCam- oder eindeutig ITG β 1-markierte Zellen gebildet:

Integrin β 1^{High} EpCam^{Low} / Integrin β 1^{Low} EpCam^{High}

In der Kontrolle sowie unter Stimulation mit EGF konnte eine Ratio von ≈ 1 gemessen werden, wohingegen unter Stimulation mit TGF β 1 und unter Inkubation mit beiden Wachstumsfaktoren eine Ratio von $\gg 1$ erfasst werden konnte (Abbildung 14)

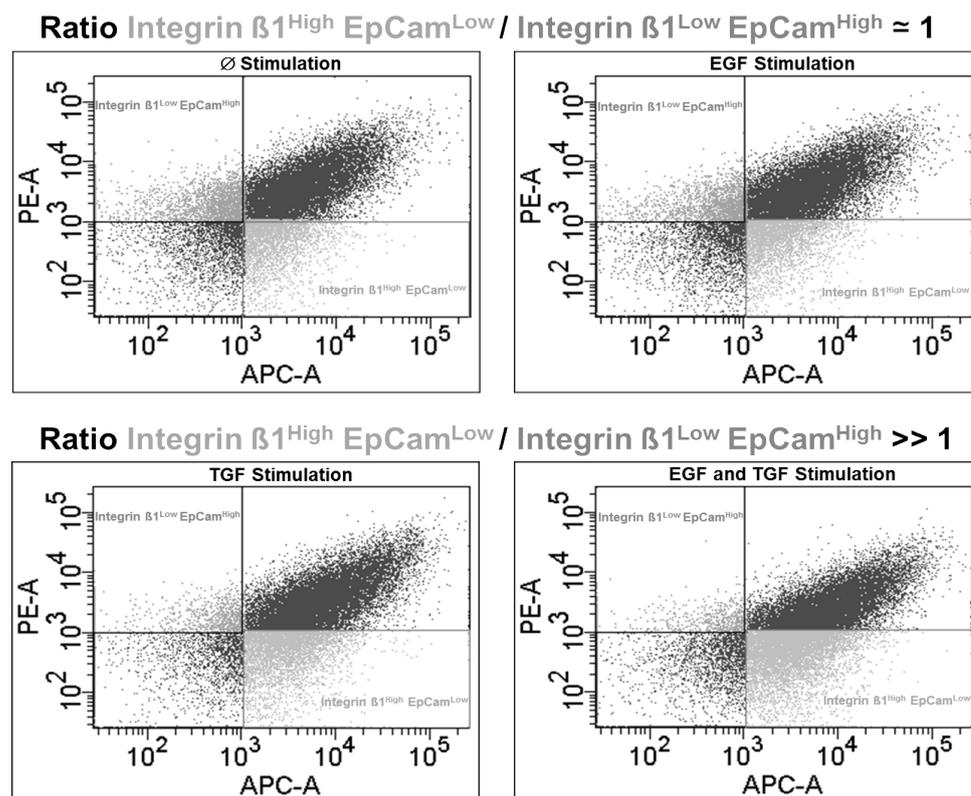


Abbildung 14 FACS-Analyse stimulierter HK-2-Zellen.

Signifikante Unterschiede in den einzelnen Gruppen konnten sowohl in der mit EGF vs. derer mit EGF und MPA und in den Gruppen, der mit TGF β 1 und der mit TGF β 1 und MPA behandelten Zellen erfasst werden ($p < 0,05$, Mann-Whitney-U-

Test). Dies zeigt einen wohl spezifischen Effekt, der mit der Behandlung mit MPA einhergeht und sich auf die Proteinexpression auswirkt, wobei das Verhältnis der Ratios im direkten Vergleich der einzelnen, jeweils mit und ohne MPA behandelten Gruppen, einen bleibenden Trend zeigt der den o. g. Ergebnissen in der Interpretation gleicht (Abbildung 15; Kontrolle gekennzeichnet durch „-“).

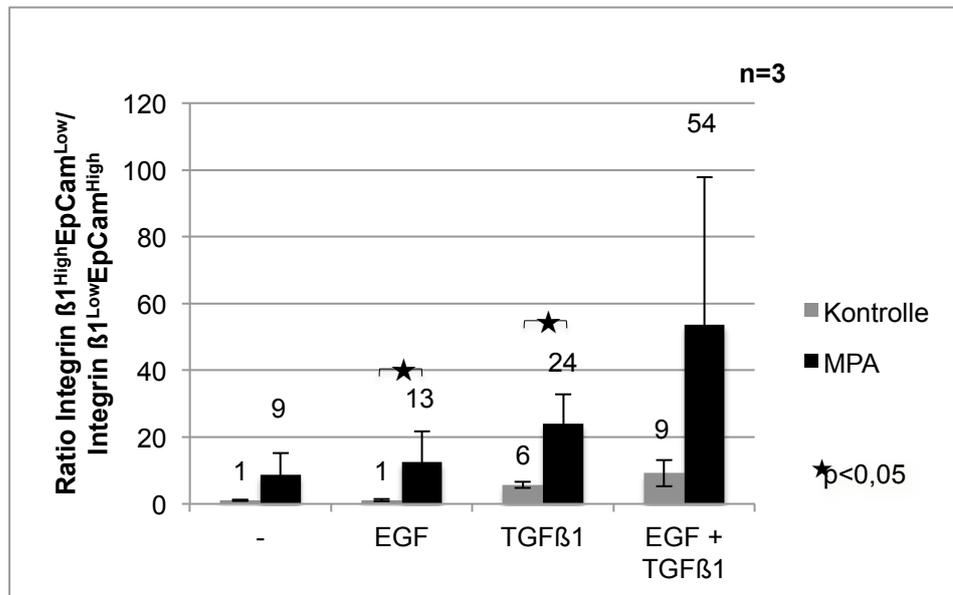


Abbildung 15 Darstellung der gebildeten Ratios nach durchflusszytometrischer Analyse.

3.8 Einfluss von MPA auf das Proteom

3.8.1 Proteine mit signifikant veränderter Phosphorylierung

Für die Untersuchung der Veränderungen innerhalb des Proteoms und der Proteine mit verändertem Phosphorylierungsstatus von HK-2-Zellen wurden diese zunächst wie in Tabelle 1 für 72 h inkubiert. Die Proteine wurden, wie oben beschrieben, extrahiert und mittels 2DE aufgetrennt. Anschließend wurde eine Phosphoproteinfärbung durchgeführt und die 2DE-Polyacrylamidgele mit dem Fluoreszenz-Scanner FLA 5100 eingescannt.

Die Analyse der 4 Bedingungen über den Vergleich innerhalb der verschiedenen Bildpaare mittels der Software Delta2D, bei durchschnittlich 350 gesetzten *match vectors* und 1938 *detected spots*, ergab unter der Zielvorgabe von einem mindestens 50 %igen Unterschied in der Intensität zwei veränderte, faktische Phosphoproteine (STIP1; SUCB1) sowie drei Proteine mit veränderten Phospho-Sites (PDIA3; PRDX4; PCNA).

Die Proteinspots und deren Lokalisation innerhalb des Polyacrylamidgels sind in den Abbildungen 16 und 17 dargestellt.

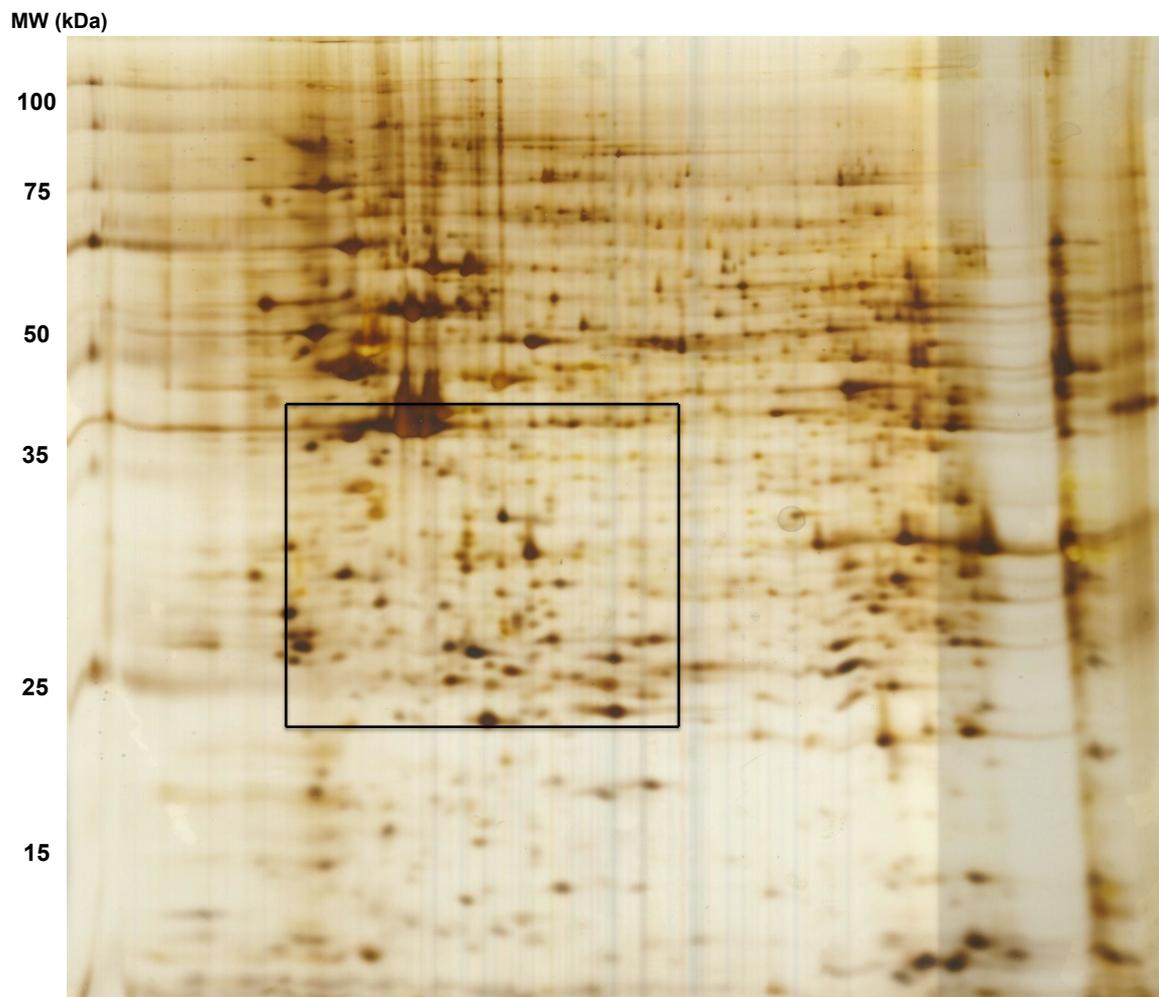


Abbildung 16 Beispiel eines Polyacrylamidgels stimulierter HK-2-Zellen.

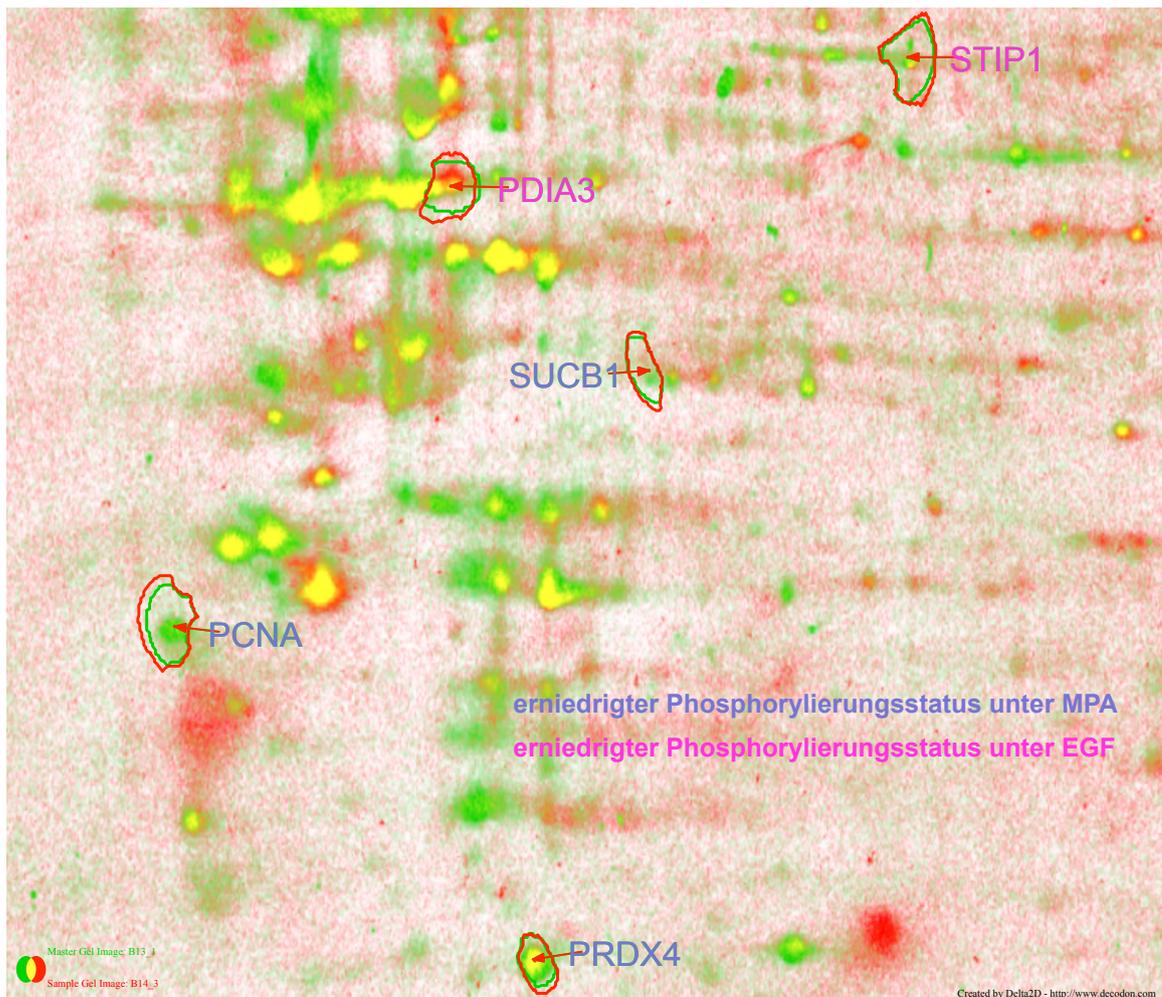


Abbildung 17 Darstellung relevanter Phosphospots im Polyacrylamidgel nach einer Phosphoproteinfärbung.

Um die in der Phosphoproteinfärbung signifikant veränderten Proteinspots identifizieren zu können, wurden die beiden (nach Phosphoprotein- und Silberfärbung) digitalisierten Bilder desselben Polyacrylamidgels mittels der Software Delta2D übereinandergelegt, um so die korrespondierenden Proteinspots im silbergefärbten Bild zu ermitteln. Fünf dieser signifikant veränderten Proteinspots innerhalb des Phosphoprojektes konnten nach Auffinden der korrespondierenden Proteinspots im silbergefärbten Polyacrylamidgel ausgeschnitten und mittels In-Gel-Verdau, Massenspektrometrie und Abfrage der Proteindatenbanken identifiziert werden.

Die in der Phosphoproteinfärbung signifikant veränderten Proteine sind in Tabelle 12 mit der Identifikationsnummer des jeweiligen Proteins bei der Proteindatenbank Uniprot sowie mit den geschätzten und errechneten mw und pi dargestellt.

Tabelle 12 Das Molekulargewicht, der isoelektrische Punkt und die Funktion von Proteinen veränderter Phosphorylierung.

Protein-spot-nr.	Proteinname	Uniprot ID	mw (kDa) Calc./Obs.	pI Calc./Obs.	Funktion*
Proteinspots mit erniedrigtem Phosphorylierungsstatus unter MPA-Einfluss:					
399	SUCB1 Human; Succinyl-CoA ligase (ADP- forming) subunit beta, mitochondrial	Q9P2R7	50,285/~30	7,05/~6,3	Komponente im Citratzyklus
596	PRDX4 Human; Peroxiredoxin-4	Q13162	30,521/~24	5,86/~5,7	antioxidatives Enzym; Rolle in der Aktivierung des Transkript.-faktors NF-kappaB
1088	PCNA Human; Proliferating cell nuclear antigen	P12004	28,750/~27	4,57/~4,5	Kofaktor der DNA- Polymerase delta; DNA-Reparatur
Proteinspots mit erniedrigtem Phosphorylierungsstatus unter EGF-Einfluss:					
332	STIP1 Human; Stress-induced- phosphoprotein 1	P31948	62,599/~40	6,4/~6,7	koordiniert die Funktion von HSP90
364	PDIA3 Human; Protein disulfide- isomerase A3	P30101	56,747/~35	5,98/~5,6	moduliert die Faltung neu synthetisierter Glycoproteine
mw (kDa) – Molekulargewicht in Kilodalton, Calc./Obs. – errechnete/geschätzte Werte, pI – isoelektrischer Punkt,* – Informationen verfügbar unter http://www.proteinatlas.org , http://www.matrixscience.com oder http://www.ncbi.nlm.nih.gov					

3.8.2 Proteine mit signifikant veränderter Gesamtmenge

Die phosphoproteingefärbten 2DE-Polyacrylamidgele wurden anschließend einer Silberfärbung wie oben beschrieben unterzogen. Die Abbildung 18 zeigt exemplarisch ein digitalisiertes Bild nach erfolgter Silberfärbung.

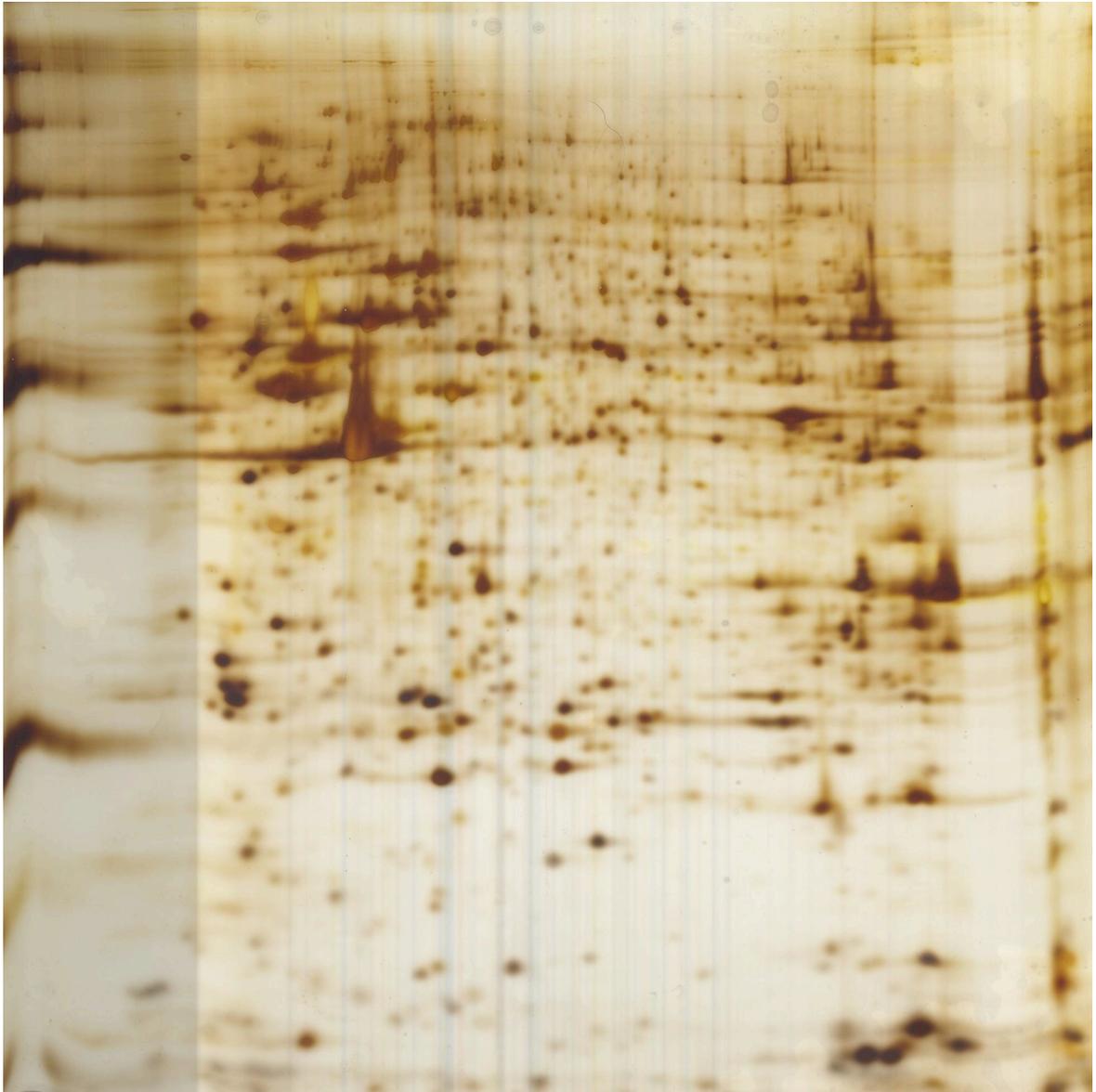


Abbildung 18 Exemplarische Darstellung eines Polyacrylamidgeles nach erfolgter Silberfärbung.

Die vergleichende Analyse der digitalisierten Bilder der silbergefärbten 2DE-Polyacrylamidgele mittels der Software Delta2D ergab 29 Proteinspots mit mindestens 50 %igen Differenzen der relativen Intensität innerhalb der verglichenen Bildpaare bzw. Bedingungen, bei durchschnittlich 400 gesetzten match vectors und 1938 detected spots.

Die Proteinspots und deren Lokalisation innerhalb des Polyacrylamidgels sind in der Abbildung 19 dargestellt.



Abbildung 19 Abbildung veränderter Proteinspots stimulierter HK-2-Zellen im Polyacrylamidgel.

Die in der Silberfärbung signifikant veränderten Proteine sind in Tabelle 13 mit der jeweiligen Identifikationsnummer bei der Proteindatenbank Uniprot sowie mit den geschätzten und errechneten mw und pi dargestellt.

Tabelle 13 Das Molekulargewicht, der isoelektrische Punkt und die Funktion von Proteinen veränderter Gesamtmenge.

Protein-spot-nr.	Proteinname	Uniprot ID	mw (kDa) Calc./Obs.	pi Calc./Obs.	Funktion*
Proteinspots mit vermehrter Gesamtmenge unter MPA:					
455	HNRH3 Human; heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3	P31942	36,903/~35	6,37/~7	Einfluss auf pre-mRNA-Prozessierung; Teilhabe am frühen heat shock-induzierten Splicen
1029	PPIA Human; Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	P62937	18,001/~13	7,68/~7,5	Katalyse der cis-trans-Isomerisation; fördert Proteinfaltung
1090	C1QBP Human; complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial	Q07021	31,343/~31	4,74/~3,5	inhibiert C1 Aktivation im Komplementsystem; bindet Hyaluronsäure
Proteinspots mit verminderter Gesamtmenge unter MPA:					
185	HS90B Human; Heat shock protein HSP 90-beta	P08238	83,212/~80	4,97/~4,5	Signaltransduktion, Proteinfaltung und Degradation; Chaperone
391	EF1A1 Human; Elongation factor 1-alpha 1	P68104	50,109/~51	9,10/~4	Proteinbindung; Elongation
629	UBE2K Human; Ubiquitin-conjugating	P61086	22,393/~24	5,30/~5,2	Proteinbindung

	enzyme E2 K				
661	CBX3 Human; Chromobox protein homolog 3	Q13185	20,798/~18	5,20/~4,5	bindet an Lamin-B- Rezeptoren
669	UBC12 Human; NEDD8- conjugating enzyme Ubc12	P61081	20,887/~15	7,57/~8,3	ATP-Bindung
679	NDKB Human; Nucleoside diphosphate kinase B	P22392	17,287/~13	8,52/~8,5	DNA- und Proteinbindung
753	XRCC5 Human; X-ray repair cross- complementin g protein 5	P13010	82,652/~85	5,55/~5,7	Reparatur von DNA- Doppelstrang- brüchen
786	SSRD Human; translocon- associated protein subunit delta	P51571	18,987/~15	5,67/~5,6	Calcium-Ion- Bindung
827	VDAC1 Human; Voltage- dependent anion-selective channel protein 1	P21796	30,754/~30	8,62/~8,8	reguliert mitochondriale Funktionen; involviert im transmembranen Elektronen- transport
831	ANXA2 Human; Annexin A2	P07355	38,580/~37	7,57/~8,2	Aktinbindendes Protein; Bedeutung für Wundheilung; fördert β 1-Integrin- Internalisation und- Degradation
904	LMNB1 Human; Lamin-B1	P20700	66,368/~75	5,11/~4,9	Komponente der Kernmembran
961	EF1G Human; Elongation factor 1-	P26641	50,087/~51	6,25/~6,7	Elongation

	gamma				
963	ENOA Human; Alpha-enolase	P06733	47,139/~50	7,01/~6,6	Plasminogen- Bindung-Rezeptor
1000	NPM Human; Nucleophosmi n	P06748	32,555/~37	4,64/~4,5	reguliert ARF/p53 pathway
1002	VA0D1 Human; V-type proton ATPase subunit d 1	P61421	40,303/~37	4,89/~4,4	Rezeptor- vermittelte Endocytose
1064	KPYM Human; Pyrovate kinase isozymes M1/M2	P14618	57,900/~75	7,96/~8,2	Funktion für die Glycolyse; NF- kappaB-Bindung
Proteinspots mit verminderter Gesamtmenge unter EGF:					
214	HS90A Human; heat shock protein HSP 90-alpha	P07900	84,607/~80	4,94/~5,3	Signaltransduktion, Proteinfaltung- und Degradation; chaperone
255	TRAP1 Human; Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	Q12931	80,060/~79	8,30/~7,3	chaperone
283	XRCC6 Human; X-ray repair cross- complementin g protein 6	P12956	69,799/~75	6,23/~7,2	Reparatur von DNA- Doppelstrang- brüchen
303	TCPG Human; T-complex protein 1 subunit gamma	P49368	60,495/~75	6,1/~6,4	Proteinfaltung verschiedener Proteine einschließlich Aktin und Tubulin; chaperone
314	HNRPL Human; Heterogeneou s nuclear ribonucleoprot ein L	P14866	64,092/~75	8,46/~8	RNA-Bindung; Transkription
345	PTBP1 Human; polypyrimidine	P26599	57,186/~65	9,22/~9	RNA-Bindung

	tract-binding protein 1				
636	GDIR1 Human; Rho GDP- dissociation inhibitor 1	P52565	23,193/~24	5,02/~4,4	Rho GDP- dissoziierender Inhibitor
664	RL12 Human; 60s ribosomal protein L12	P30050	17,808/~16	9,48/~9	ribisomales Protein, RNA- Bindung
667	PPIB Human; Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	P23284	23,728/~15	9,42/~9	Peptid- und Proteinbindung
761	IMMT Human; Mitochondrial inner membrane protein	Q16891	83,626/~90	6,08/~6	Teil des MINOS; kontrolliert Cytochrom C- Freisetzung
mw (kDa) – Molekulargewicht in Kilodalton, Calc./Obs. – errechnete/geschätzte Werte, pI – isoelektrischer Punkt, * – Informationen verfügbar unter http://www.proteinatlas.org , http://www.matrixscience.com oder http://www.ncbi.nlm.nih.gov					

3.8.3 Bioinformatische Analyse der identifizierten Proteine

Die identifizierten Proteine wurden mit Hilfe der HomoMINT-Datenbank (Chattrayamonti et al. 2007) analysiert. Ein Zusammenhang konnte sowohl für einen MPA-Effekt als auch für einen EGF spezifischen Einfluss verifiziert werden. 22 durch MPA beeinflussten und identifizierten Proteine (SUCB1, PRDX4, PCNA, HNRH3, PPIA, C1QBP, HS90B, EF1A1, UBE2K, CBX3, UBC12, NDKB, XRCC5, SSRD, VDAC1, ANXA2, LMNB1, EF1G, ENOA, NPM, VAOD1, KP YM (Abk.)) befinden sich in einem Interaktionsnetzwerk ebenso wie 12 der, unter EGF-Einfluss stehenden Proteine (HS90A, TRAP1, XRCC6, TCPG, HNRPL, PTBP1, GDIR1, RL12, PPIB, IMMT, PDIA3, STIP1 (Abk.)).

4. Diskussion

Die Fibrosierung von Organen und Geweben im Sinne einer krankhaften Überproduktion von Bindegewebe ist der Endzustand unterschiedlichster pathogenetischer Vorgänge, die gleichwohl zu einer uniformen Schädigung der Gewebe führen. Auch wenn diverse zelluläre Stimuli hierbei eine Rolle spielen, ist doch die Signalkaskade des transformierenden Wachstumsfaktors TGF β 1 von herausragender Bedeutung. TGF β 1 ist in der Lage, die in den Pathomechanismus involvierte epitheliale mesenchymale Transition (EMT Typ II) zu initiieren und zu unterhalten. Hierbei spielt auch der epitheliale Wachstumsfaktor EGF eine wesentliche Rolle, indem er vermutlich zur Verhinderung der Apoptose beiträgt. Die beschriebene Entdifferenzierung der Nierentubulusepithelzellen zu aktivierten Fibroblasten/Myofibroblasten und der damit verbundenen Produktion extrazellulärer Matrixproteine, könnte eine adaptive Antwort auf chronischen Zellstress abbilden und eine Alternative zum programmierten Zelltod darstellen (Zeisberg und Kallurie 2004). Auf der Grundlage des durch Copeland und Mitarbeiter erarbeiteten Postulats, gilt es nunmehr die zugrunde liegenden Mechanismen, die zu einer MPA vermittelten Hemmung der EMT Typ II führen, weiter aufzuklären um somit einen Beitrag zur Therapie und Prävention der Nierenfibrose zu erarbeiten (Copeland et al. 2007).

4.1 Einfluss des Transforming growth factor beta 1 auf HK-2-Zellen

In den vorliegenden *In-vitro*-Untersuchungen führte die Zugabe von TGF β 1 zur Veränderung der Morphologie kultivierter HK-2-Zellen ebenso wie zu einem, im Vergleich zur nativen Zellkultur, veränderten migratorischen Potential. Die daraus resultierende, relative Insuffizienz der Zellmatrix würde den Ergebnissen einer *in vivo* Studie gleichen, welche an humanen chronischen Wunden vollzogen wurde und ähnliche Bedingungen hatte wie in den von uns durchgeführten Experimenten (Grinnell 1992). Da Integrine bekanntermaßen nicht nur für Migration und Zelladhäsion zuständig, sondern auch an der zytoplasmatischen, interzellulären Kommunikation beteiligt sind, hätte deren Vermehrung auf der Zelloberfläche unter dem Einfluss von TGF β 1 einen exponentiellen Anstieg der Zellantwort zur Folge.

Demgegenüber führt TGF β 1 zu einer supprimierten Genexpression des epithelialen Zelladhäsionsmoleküls EpCAM (siehe Abb. 5). Auf der Grundlage einer relativen Similarität zwischen EpCAM und E-Cadherin, dessen Reduktion häufig zur Charakterisierung der Induktion einer EMT Typ III herangezogen wird, sehen wir die supprimierte Genexpression von EpCAM als potentiellen EMT-Marker (Kondo et al. 2004).

Inwieweit die behandelten Zellen dem ursprünglich verwendeten Nierenepithel entsprechen oder einen fibro-/myofibroblastären Charakter tragen, konnte darüber hinaus durch die Antikörper-Markierung zytometrisch analysiert werden. Damit war die differenzierte Identifizierung veränderter Einzelzellen aus einem behandelten Zellpool möglich. Um die relative Unspezifität von ITG β 1 zur Detektion fibroblastärer Zellen zu verbessern, wurden die einzelnen Zellsuspensionen zugleich mit beiden Fluorophor-gekoppelten Antikörpern (ITG β 1 und EpCAM) inkubiert. Die simultane Zunahme der CD29 positiven Zellen unter TGF β 1 Stimulation, bei gleichzeitiger Abnahme der CD326 positiven Zellen, stellt einen weiteren Hinweis auf eine sich abzeichnende EMT dar. Im Kontext dieser wollten wir als nächstes eine vermehrte Bildung von Kollagenen als Teil der durch TGF β 1 induzierten Zellmatrixsynthese durch den Kollagen-Matrix-Kontraktionsassay überprüfen. Hier zeigte sich eine signifikant vermehrte Kollagengelkontraktion mit 39 % der Ausgangsfläche (siehe Abb. 6). Dies gleicht der von Eddy postulierten Akkumulation von EZM-Proteinen während der EMT (Eddy 2005). Ferner untersuchten wir auch die Motilität der Zellen als eine zusätzliche funktionelle Eigenschaft, der sich morphologisch veränderten Zellen mit Hilfe des Wundverschlussassays. Hier ergab die statistische Auswertung der Ergebnisse einen signifikanten Unterschied in der Wundbreite nach 24 h unter TGF β 1-Einfluss von 18,9 % der Ausgangswundbreite. Dies gleicht den Ergebnissen der von Takayama und Kollegen an oralen Plattenepithelcarcinomen durchgeführten Untersuchungen und unterstreicht die durch TGF β 1 induzierte und gesteigerte Motilität des zunehmend fibroblastären Charakters der sich formierten Zellen (Takayama et al. 2009). Dieser spiegelte sich auch in unseren Ergebnissen im Spindle-Index wider und entspricht den Erkenntnissen von Lee und Kollegen (Lee et al. 2006). Unsere Ergebnisse würden in Reflexion unserer Untersuchungen am ehesten die zweite Phase im Prozess der EMT durch die Reorganisation des Zytoskeletts mit konsekutiver Veränderung der Zellmorphie beschreiben.

4.2 Wirkung von EGF auf HK-2-Zellen in An- und Abwesenheit von TGF β 1

Während der Zusammenhang von TGF β 1 mit der Induktion der EMT recht eindeutig belegt ist, bleibt die Frage nach der Wirkung von EGF in diesem Kontext bis heute als unzureichend geklärt (Deng et al. 2010). Es scheint synergistisch zu wirken, eher die Zellproliferation zu steigern und gleichzeitig die Apoptose zu inhibieren (Docherty et al. 2006). Darüber hinaus ist bekannt, dass es die Motilität der Zellen steigert und die Sekretion der Matrixmetalloproteinasen 2 und 9 (MMP-2 und -9) erhöht (Ahmed et al. 2006).

In unseren Genexpressionsanalysen konnten wir zeigen, dass EGF tendenziell die Expression des epithelspezifischen Oberflächenproteins EpCAM inhibiert ähnlich dem Einfluss von TGF β 1. Die Expression von ITG β 1 konnte nicht durch die alleinige Exposition mit EGF beeinflusst werden. Eine Stimulation mit beiden Wachstumsfaktoren führte hingegen zur äquivalenten Expression wie unter dem alleinigen Einfluss von TGF β 1. Selbiges Verhalten konnten wir auch auf der Ebene der Proteine im Rahmen der durchflusszytometrischen Analyse mittels FACS bestätigen. Dem entgegen zeigte sich ein, dem TGF β 1-Einfluss identisches Verhalten im Kollagen-Matrix-Kontraktionsassay. EGF allein oder die Stimulation über die Kombination aus beiden Wachstumsfaktoren führten zu einer signifikanten Kollagengelkontraktion mit einer durchschnittlichen Fläche von 42 % in Referenz zur Ausgangssituation.

Unsere Erkenntnisse aus den Versuchen des Spindle-Index und Wundverschlusses bringen uns zu der Annahme, dass EGF im Sinne einer synergistischen Wirkung in dem Pathomechanismus der epithelialen mesenchymalen Transition beteiligt zu sein scheint ohne diese selbst initiieren zu können.

Eine Erfassung des globalen Proteoms sowie die Identifizierung von phosphorylierten Proteinen unter Einfluss von EGF sind bisher nicht beschrieben worden. In unseren Analysen unter Verwendung der zweidimensionalen Gelelektrophorese zeigten sich 12 in einem Netzwerk befindliche und interagierende Proteine (HS90A, TRAP1, XRCC6, TCPG, HNRPL, PTBP1, GDIR1, RL12, PPIB, IMMT, PDIA3, STIP1 (Abk.)). Die identifizierten Proteine wurden mit Hilfe der HomoMINT-Datenbank (Chatr-aryamontri et al. 2007) analysiert (Abbildung 20).

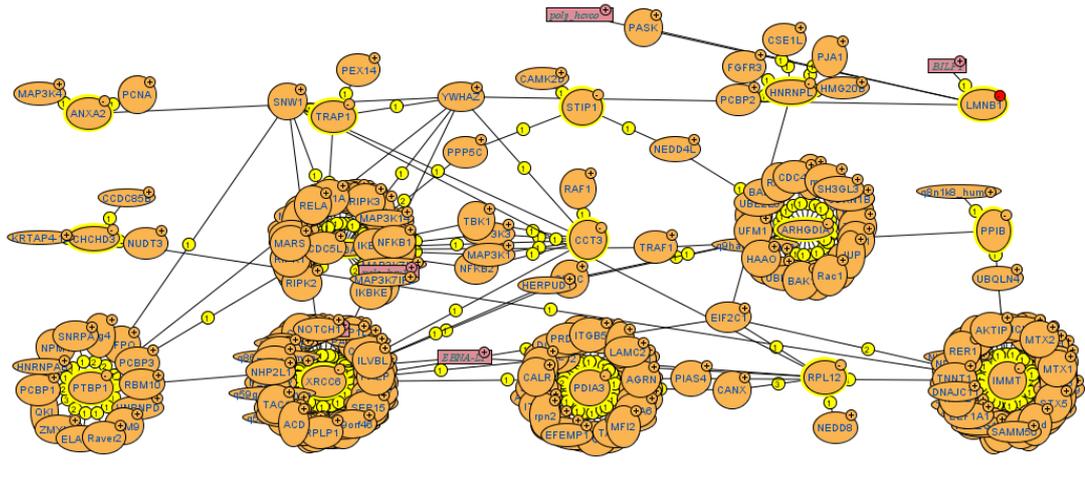


Abbildung 20 Interaktionsnetzwerk unter Einfluss eines durch EGF eruierten Effektes.

Interessant hierbei zeigt sich das Protein GDIR1, ein Rho GDP-dissozierender Inhibitor, welcher seiner Funktion folgend zur Inaktivierung von Rho-GTPasen führt, indem inaktives GDP gebunden bleibt. EGF führte zur verminderten Produktion desselbigen, was im Umkehrschluss dem in vorausgegangenen Untersuchungen beschriebenen Wachstum/ Proliferation entspricht (Heller et al. 2009).

4.3 Effekte der Mycophenolsäure (MPA) auf stimulierte HK-2-Zellen

Antiproliferative Wirkungen der Mycophenolsäure auf proximale Tubulusepithelzellen und Fibroblasten sind bereits in der Vergangenheit belegt worden (Johnsson et al. 2004). In unserem Proliferationsassay zeigten sich entsprechend sowohl in der Kontrolle als auch unter Stimulation mit beiden Wachstumsfaktoren gleichwertig gehemmte Proliferationstendenzen bei zunehmenden MPA-Konzentrationen.

Bezugnehmend auf die Analyse des molekularen Phänotyps bewirkte die Anwesenheit von TGF β 1 eine gesteigerte Genexpression von *ITGB1*, welche nicht durch den Einfluss von MPA supprimiert werden konnte. Signifikante Unterschiede in der Expression von *EpCam* waren sowohl unter Einfluss von TGF β 1 als auch unter Stimulation mit EGF, jeweils in Referenz zur Behandlung mit MPA, zu verzeichnen, was eher für einen eigenständigen Effekt der Mycophenolsäure

spricht. Die Ergebnisse des Spindle-Index legen daher nahe, dass MPA vermutlich an der Aufrechterhaltung des epithelialen Charakters im Sinne der Morphe der stimulierten HK-2-Zellen beitragen könnte. Es ist bekannt, dass es die Produktion der extrazellulären Matrixkomponenten Fibronectin und Kollagen Typ I hemmt (Dubus et al. 2002). Auch dies konnten wir sowohl über einen signifikant verzögerten Wundverschluss als auch über die Tatsache fehlender Bildung etwaiger Adhäsionsmoleküle via Kollagen-Matrix-Kontraktion bestätigen. Die unter Einfluss von MPA und in Anwesenheit von TGF β 1 mit/ohne EGF aufgetretenen Veränderungen der o. g. Morphologie, Zellproliferation und des molekularen Phänotyps der verwendeten HK-2-Zellen waren dabei reversibel.

Darüber hinaus wurde untersucht, ob MPA einen Einfluss auf die nach Branton und Kopp postulierte Bedeutung von *RASAL1* nehmen würde (Abbildung 21). Dieses kodiert für das GAP1, das GTPase-aktivierende Protein 1. Eine Behandlung mit TGF β 1 sollte die Auswirkung einer chronischen Schädigung humaner Nierenepithelzellen simulieren, da in Anlehnung an Branton und Kopp das Epithel nach chronisch, rezidivierenden Belastungen und konsekutivem Zellzyklusarrest mit der Bildung von TGF β 1 beginnt. Dies führt zu einer gesteigerten Aktivität der Dnmt1, der DNA-Methyltransferase1, welche ihrerseits eine Hypermethylierung im Promotorbereich des GOI bedingt. Infolgedessen kommt es zur Enthemmung von RAS, einem Proto-Onkogen, welches in ein Onkogen mutiert und es so zur spontanen Proliferation im Sinne einer überschießenden Narbenbildung durch Umwandlung der Epithelien in Fibroblasten/Myofibroblasten via EMT Typ II kommt (Branton und Kopp 1999).

chronische Nierenschädigung

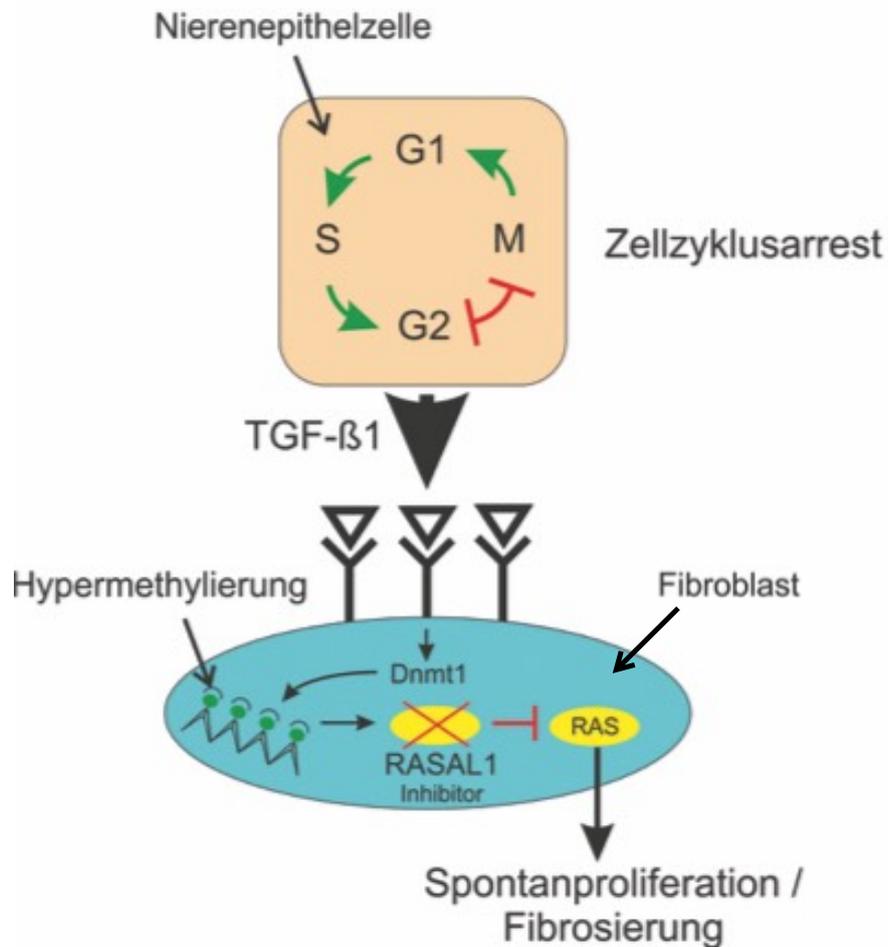


Abbildung 21 *RASAL1* - Bedeutung während der chronischen Nierenschädigung (modifiziert nach Wynn 2010, Seite 4).

Um eine Aussage darüber zu treffen, inwieweit *RASAL1* exprimiert (unmethyliert) bzw. methyliert wird und demzufolge nicht exprimiert (silenced) bleibt, sollte der Methylierungsstatus des Promotors im Gen *RASAL1* in Reflexion zur dargestellten Signalkaskade erhoben werden. In den meisten analysierten Proben konnte der methylierte Anteil trotz Verwendung einer hochspezifischen Sonde (Hydrolyseprobe) und optimalen Reaktionsbedingungen schwach oder gar nicht nachgewiesen werden. Sowohl für den unmethylierten als auch für den methylierten Anteil ließen sich keine wesentlichen Unterschiede feststellen. Eine hinreichende Aussage über den Einfluss von MPA auf den Promotormethylierungsstatus von *RASAL1* war daher nicht möglich.

Identifikation funktionell-beteiligter Proteine und Zusammenhang mit dem (Phospho-)Proteom

Unsere proteinchemischen Untersuchungen ergaben 22 Proteinspots mit mindestens 50 %igen Differenzen der relativen Intensität unter dem Einfluss von MPA. Darunter 3 Proteine mit erniedrigtem Phosphorylierungsstatus, 3 mit vermehrter und 16 mit erniedrigter Gesamtmenge an gebildetem Protein. Die identifizierten Proteine wurden, wie die unter EGF-Einfluss, mit Hilfe der HomoMINT-Datenbank (Chatr-aryamontri et al. 2007) analysiert und könnten zukünftig über folgende Experimente genauer in einen pathologischen Kontext gebracht werden (SUCB1, PRDX4, PCNA, HNRH3, PPIA, C1QBP, HS90B, EF1A1, UBE2K, CBX3, UBC12, NDKB, XRCC5, SSRD, VDAC1, ANXA2, LMNB1, EF1G, ENOA, NPM, VAOD1, KPYM (Abk.)) (Abbildung 22).

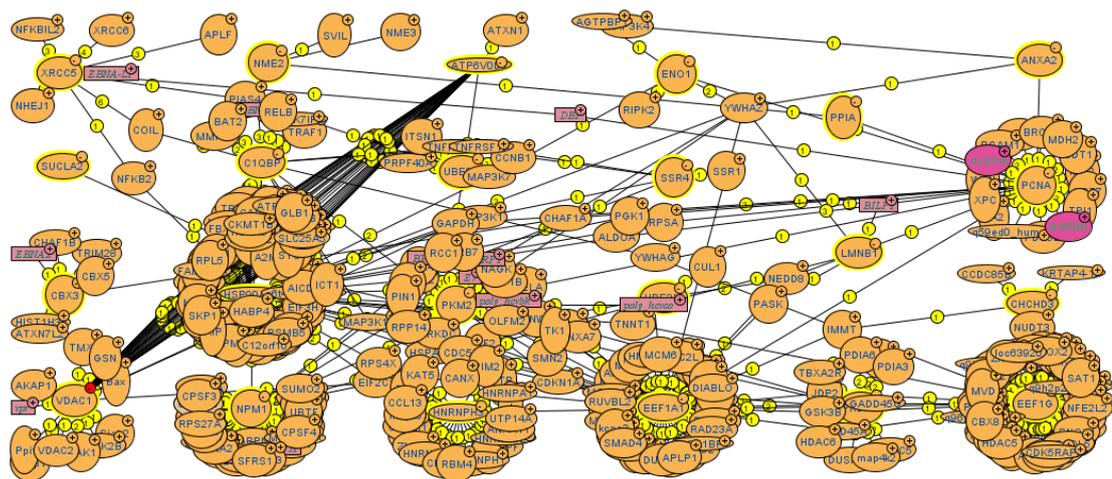


Abbildung 22 Interaktionsnetzwerk unter Einfluss eines durch MPA eruierten Effektes.

Von besonderem Interesse erscheint uns hierbei der durch die Wirkung der Mycophenolsäure erniedrigte Phosphorylierungsstatus des Proteins PRDX4, welches die Signalkaskade von NF kappa B beeinflusst. Ferner war das Protein KPYM, das einen bedeutenden Bindungsfaktor des NF kappa B darstellt, in seiner Gesamtproteinmenge vermindert. Liu und Mitarbeiter konnten ähnliches in einem *In-vivo*-Modell mit unilateraler Ureterobstruktion zeigen (Liu et al. 2013). Die Tatsache, dass NF kappa B und im Kontext sein Signalweg bereits durch Huber und Kollegen (Huber et al. 2004) als wesentlicher Transkriptionsfaktor einer Zelle u. a. für die Proliferation, Plastizität und auch Metastasierung via EMT

verantwortlich gemacht wurde, könnte auch für eine EMT Typ II im Rahmen der Fibrogenese von Belang sein.

4.4 Fazit, Limitation und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte der inhibitorische Einfluss der Mycophenolsäure auf zuvor stimulierte humane renale Tubulusepithelzellen (HK-2) nachgewiesen und die Effekte der verwendeten Wachstumsfaktoren im Kontext der epithelialen mesenchymalen Transition weiter aufgeklärt werden. Erstmals wurde hierbei das gesamte Proteom und überdies auch der Phosphorylierungsstatus von Proteinen studiert, um weitere in diesem pathomechanistischen Zusammenhang stehende Proteine identifizieren zu können. Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um die von uns aufgezeigten Ergebnisse auch in *In-vivo*-Modellen bestätigen zu können und nach neuen therapeutischen Strategien für die Behandlung der renalen Fibrose und ihrer Prävention zu suchen.

Neben den beschriebenen proteinchemischen Methoden wollten wir das epithelspezifische Oberflächenprotein EpCAM für die Identifizierung epithelialer Zellen aus einem Gesamtzellpool für die FACS-Analyse etablieren, um einen spezifischen und zugleich sensitiven Assay generieren zu können, welcher für künftige Experimente im Zusammenhang mit der EMT Typ II eine wertvolle Methode darstellen könnte. Allerdings stellt auch die Spezifität der verwendeten Antikörper einen limitierenden Faktor dar.

Unsere Untersuchungen zum Einfluss von TGF β 1 und/oder EGF auf den *RASAL1*-Promotormethylierungsstatus in stimulierten HK-2-Zellen erbrachten weder eine Tendenz noch einen signifikanten Unterschied innerhalb der Versuchsgruppen, was auf eine mit 72 h zu geringe oder auch zu lange Inkubationszeit zurückzuführen sein könnte.

Die durchgeführten Proteomuntersuchungen zeigen einige technische bzw. analytische Grenzen. In der zweidimensionalen Gelelektrophorese können Proteine zum einen während der isoelektrischen Fokussierung aggregieren und mitunter nicht in das Gel immigrieren und zum anderen im Prozess der Methode verloren gehen. Des Weiteren können seltene Proteine in äußerst geringer Konzentration der Analyse verborgen bleiben. Zudem kann nicht immer

sichergestellt werden, dass es sich bei dem in der Datenbank gefundenen Protein tatsächlich um das untersuchte Protein handelt.

Dennoch bieten unsere Ergebnisse eine Basis für weitere Analysen, gerade weil die Kenntnis über das Proteom Rückschlüsse auf das Genom der Zellen und der expliziten Expression von im Interesse stehenden Einzelgenen zulässt. Wobei letztere zu keiner Zeit die Expression der selbigen Proteine beweist, da nicht alle Proteine *in vivo* so verwendet werden, wie sie nach der Translation der mRNA vorliegen.

5. Zusammenfassung

Die spezifische immunsuppressive und antiproliferative Wirkung der Mycophenolsäure führt zur Hemmung der *De-novo*-Purinsynthese in Lymphozyten. Darüber hinaus, scheint sie auch auf nicht lymphatische Zellen wie Fibroblasten und Epithelzellen Einfluss zu nehmen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der potentiell inhibitorische Einfluss der Mycophenolsäure auf die im Rahmen des Pathomechanismus der Nierenfibrose mehrfach postulierte epitheliale mesenchymale Transition (EMT Typ II) von Tubulusepithelzellen weiter untersucht. Um den funktionellen Einfluss von MPA auf Epithelzellen studieren zu können, wurde eine EGF-abhängige humane Epithelzelllinie aus proximalen Nierentubuli (HK-2) mit den Wachstumsfaktoren EGF und/oder TGF β 1 stimuliert. Simultan erfolgte die Überprüfung der Reversibilität der Wirkung von MPA durch Antagonisierung mit Guanosin/8-Aminoguanosin.

Der Einfluss von MPA und dessen Reversibilität wurden im Rahmen diverser *In-vitro*-Experimente überprüft: Zellproliferation und -vitalität, Kollagen-Matrix-Kontraktion, Wundverschluss, Spindle-Index, Genexpression epithel- und fibroseassoziiierter Gene (s. u.), durchflusszytometrische Quantifizierung anti-CD29- und anti-CD326-markierter Zellen, Untersuchung des Proteoms und Phosphoproteoms.

Die Zellproliferation wurde in Abhängigkeit von o. g. Modulatoren unter steigenden MPA-Konzentrationen gehemmt. Die Stimulation mit EGF und/oder TGF β 1 führte zu einer signifikanten Kollagen-Matrix-Kontraktion, welche durch die Zugabe von MPA suffizient inhibiert werden konnte. Dies suggeriert, dass die Mycophenolsäure in der Lage zu sein scheint, die Fähigkeit von Epithelzellen, Kollagengitter zu bilden, auf hemmende Weise zu beeinflussen vermag. Weiterhin konnte auch der durch TGF β 1 und EGF initiierte Wundverschluss durch Zugabe von MPA entschleunigt werden. Unter der Behandlung mit der Kombination beider Wachstumsfaktoren resultierten signifikant spindelförmigere HK-2-Zellen. Diese Beobachtung würde eine stattgehabte EMT Typ II, zumindest aus rein deskriptiver Sicht, unterstützen. Durch die Zugabe von MPA konnte auch dieser Effekt gehemmt werden. Zwei unterschiedlich regulierte Gene, *ITGB1* und *EpCAM*, wurden auf Proteinebene unter Anwendung durchflusszytometrischer Analyse

ergänzend untersucht. MPA scheint hierbei jedoch einen eigenständigen Effekt auf die Synthese von CD326 zu haben.

In der Erfassung der unter der verwendeten Stimulation veränderten Proteine einschließlich ihres Phosphorylierungsstatus wurden 12 in einem Netzwerk befindliche und interagierende Proteine unter dem Einfluss von EGF sowie 22 kommunizierende Proteine unter dem Einfluss von MPA gefunden.

Die durch die Wirkung der verwendeten Wachstumsfaktoren bedingten Veränderungen sowohl der Zellmorphologie und -motilität als auch des molekularen Phänotyps waren unter der Behandlung mit MPA reversibel, was mit dem beschriebenen antifibrotischen Potential der Mycophenolsäure vereinbar ist.

6. Anhang

6.1 Anzahl und Übereinstimmung von Peptiden

Silberprojekt						
Spotnr	Mass	pI	Score	Anzahl der identifizierten Peptide	Coverage (%)	
185	83212	4,97	900	29(19)	37%	1 MPEEVHHGEE EVETFAFQAE IAQLMSLIIN TFYSNKEIFL RELISNASDA 51 LDKIRYESLT DPSKLDGKE LKIDIIPNQ ERTLTLVDTG IGMTKADLIN 101 NLGTIAKSGT KAFMEALQAG ADISMIGQFG VGFYSAYLVA EKVVVITKHN 151 DDEQYAWESS AGGSFTVRAD HGEPIGRGK VILHLKEDQT EYLEERRVKE 201 VVKK HSQFIG YPITLYLEKE REKEISDDEA EEEKGEKEEE DKDDEEKPKI 251 EDVGSDEEDD SGKDKKKKTK KIKEKYIDQE ELNKTKPIWT RNPDDITQEE 301 YGEFYKSLTN DWEDHLAVKH FSVEGQLEFR ALLFIPRRAP FDLFENK 351 NNIKLYVRRV FIMDSCDELI PEYLNFIGV VSEDLPLNI SREMLQQSKI 401 LKVIRKNIVK KCLELFSELA EDKENYKKFY EAFSKNLKLG IHEDSTNRRR 451 LSELLRYHTS QSGDEMTSLS EYVSRMKETQ KSIYYITGES KEQVANSFV 501 ERVKRKGFV VYMTEPIDEY CVQQLKEFDG KSLVSVTKEG LELPEDEEEK 551 KKMEESKAKF ENLCKLMKEI LDKKVEKVTI SNRLVSSPCC IVTSTYGWTA 601 NMERIMKAQA LRDNSTMGYM MAKK HLEINP DHPIVETLRQ KAEADKNDKA 651 VKDLVLLFE TALLSSGFSL EDPQTHSNRI YRMIKGLGI DEDEVAAEEP 701 NAAVPDEIPP LEGDEDASRM EEVD
214	84607	4.94	127	10(3)	15%	1 MPEETQTQDQ PEEEEEVETF AFQAEIAQLM SLIINTFYNS KEIFLRELIS 51 NSSDALDKIR YESLTDPSKL DSGKELHINL IPNKQDR TLT IVDTGIGMTK 101 ADLNNLGTI AKSGTKAFME ALQAGADISM IGQFGVGFYS AYLVAEKVTV 151 ITKHNDDEQY AWESSAGGSF TVRTDTGEPM GRGTVILHL KEDQTEYLEE 201 RRIKEIVKKH SQFIGYPITL FVEKERDKEV SDDEAEKED

						KEEKEKEKEEK 251 ESEDKPEIED VGSDEEEEEKK DGDKKKKKKI KEKYIDQEEL NKTKPIWTRN 301 PDDITNEEYG EFYKSLTNDW EDHLAVKHFS VEGQLEFRAL LFVPRRAPFD 351 LFENRKKKNN IKLYVRRVFI MDNCEELIPE YLNFIRGVVD SEDLPLNISR 401 EMLQOSKILK VIRKNLVKKC LELFTELAED KENYKKFYEQ FSKNIKLGHI 451 EDSQNRKKLS ELLRYTSAS GDEMVSLLDY CTRMKENQKH IYYITGETKD 501 QVANSAFVER LRKHGLEVIY MIEPIDEYCV QQLKEFEGKT LVSVTKEGLE 551 LPEDEEEKKK QEEKKTKFEN LCKIMKDILE KKVEKVVVSN RLVTSPPCCIV 601 TSTYGWTANM ERIMKAQALR DNSTMGYMAA KKHLEINPDH SIIETLRQKA 651 EADKNDKSVK DLVILLYETA LLSSGFSLED PQTHANRIYR MIKLGGLGIDE 701 DDPTADDTSA AVTEEMPPLE GDDDTSRMEE VD
255	80060	8.30	407	19(9)	29%	1 MARELRALLL WGRRLRPLL APALAAVPGG KPILCPRRTT AQLGPRRNPA 51 WSLQAGRLFS TQTAEDKEEP LHSIISSTES VQGSTSKHEF QAETKKLLDI 101 VARSLYSEKE VFIRELISNA SDALEKLRHK LVSDGQALPE MEIHLQTNAE 151 KGTITIQDTG IGMTQEELVS NLGTIARSGS KAFLDALQNO AEASSKIIGQ 201 FGVGFYSAFM VADRVEVYSR SAAPGSLGYQ WLSGSGVFE IAEASGVRTG 251 TKIIHLKSD CKEFSSEARV RDVVTKYSNF VSFPLYLNGR RMNTLQAIWM 301 MDPKDVREWQ HEEFYRYVAQ AHDKPRYTLH YKTDAPLNIR SIFYVPDMKP 351 SMFDVSRELG SSVALYSRKV LIQTKATDIL PKWLRFIRGV VSEDIPLNL 401 SRELLQESAL IRKLRDVLQQ RLIKFFIDQS KKDAEKYAKF FEDYGLFMRE 451 GIVTATEQEV KEDIAKLLRY ESSALPSGQL TSLSEYASRM RAGTRNIYYL 501 CAPNRHLAEH SPYYEAMKKK DTEVLFCFEQ FDELTLHLR EFDKKKLISV 551 ETDIVVDHYK EEKFEDRSPA AECLSEKETE ELMAWMRNVL GSRVTNVKVT 601 LRLDTHPAMV TVLEMGAARH FLRMQQLAKT QEERAQLLOP TLEINPRHAL 651 IKKLNQLRAS EPGLAQLLVD QIYENAMIAA

						GLVDDPRAMV GRNLNELLVKA 701 LERH
283	69799	6.23	330	16(6)	31%	1 MSGWESYYKT EGDEEAEEEEQ EENLEASGDY KYSGRDSLIF LVDASKAMFE 51 SQSEDELTPF DMSIQCIQSV YISKIISDR DL LAVV FYGT EKDKNSVNFK 101 NIYVLQELDN PGAKRILELD QFKGQQGQKR FQDMMGHGSD YSLSEVLWVC 151 ANLFSVDVQFK MSHKRIMLFT NEDNPHGNDS AKASRARTKA GDLRDTGIFL 201 DL MHLK KPGG FDISLFYRDI ISIAEDEDLR VHFEESKLE DLLRKVRAKE 251 TRKRALSRLK LKLNKDIVIS VGIYNLVQKA LKPPPIKLYR ETNEPVKTKT 301 RTFNTSTGGL LLPSDTKRSQ IYGSRQIILE KEETEELKRF DDPGLMLMGF 351 KPLVLLKHH YLRPSLFVYP EESLVIGSST LFSALLIKCL EKEVAALCRY 401 TPRRNIPPYF VALVPQEEEL DDQKIQVTPP GFQLVFLPFA DDKRKMPFTE 451 KIMATPEQVG KMKAIVEKLR FTYRSDSFEN PVLQQHFRNL EALALDLMEP 501 EQAVDLTLPK VEAMNKRLGS LVDEFKELVY PPDYNPEGKV TKRKHDNEGS 551 GSKRPKVEYS EEELKTHISK GTLGKFTVPM LKEACRAYGL KSGLKKQELL 601 EALTKHFQD
303	60495	6,1	609	29(13)	53%	1 MMGHRPVLVL SQNTKRESGR KVQSGNINAA KTIADIIRTC LGPKSMMKML 51 LDPMGGIVMT NDGNAILREI QVQHPAAKSM IEISRTQDEE VGDGTTSVII 101 LAGEMLSVAE HFLEQQMHPT VVISAYRKAL DDMISTLKKI SIPVDISDSD 151 MMLNIINSSI TTKAISRWSS LACNIALDAV KMVQFEENGR KEIDIKKYAR 201 VEKIPGGIIE DSCVLRGVM NKDVTHTPRMR RYIKNPRIVL LDSSLEYKKG 251 ESQTDIEITR EEDFTRILQM EEEYIQQLCE DIIQLKPDVV ITEKGISDLA 301 QH YLMRANIT AIRRVKTDN NRIARACGAR IVSRPEELRE DDVGTGAGLL 351 EIKKIGDEYF TFITDCKDPK ACTILLRGAS KEILSEVERN LQDAMQVCRN 401 VLLDPQLVPG GGASEMAVAH ALTEKSKAMT GVEQWPYRAV AQALEVIPRT 451 LIQNCGASTI RLTSLRAKH TQENCETWGV

						<p> NGETGTLVDM KELGIWEPLA 501 VKLQTYKTAV ETAVLLLRID DIVSGHKKKG DDQSRQGGAP DAGQE </p>
314	64092	8,46	429	8(5)	16%	<p> 1 MSRRLLPRAE KRRRRLEQRQ QPDEQRRRSG AMVKMAAAGG GGGGGRYGG 51 GSEGGRAPKR LKTDNAGDQH GGGGGGGGA GAAGGGGGGE NYDDPHKTPA 101 SPVVHIRGLI DGVVEADLVE ALQEFGPISY VVVMPPKRQA LVEFEDVLGA 151 CNAVNYAADN QIYIAGHPAF VNYSTSQKIS RPGSDDSRS VNSVLLFTIL 201 NPIYSITTDV LYTICNPCGP VQRIVIFRKN GVQAMVEFDS VQSAQRAKAS 251 INGADIYSGC CTLKIEYAKP TRLNVEKNDQ DTWDYTNPPL SGQGDPSNP 301 NKRQRQPPLL GDHPAEYGGP HGGYHSHYHD EGYGPPPPHY EGRRMGPPVG 351 GHRRGPSRYG PQYGHPPPPP PPPEYGPHAD SPVLMVYGLD QSKMNCDRVF 401 NVFCLYGNVE KVKFMKSKPG AAMVEMADGY AVDRAITHLN NNFMFGQKLN 451 VCVSKQPAIM PGQSYGLEDG SCSYKDFSES RNNRFSTPEQ AAKNRIQHPS 501 NVLHFFNAPL EVTEENFFEI CDELGVKRPS SVKVFSGKSE RSSSGLEWE 551 SKSDALETLG FLNHYQMKNP NGPYPYTLKL CFSTAQHAS </p>
345	57186	9,22	521	13(10)	31%	<p> 1 MDGIVPDIAB GTKRGSDELFF STCVTNGPFI MSSNSASAAN GNDSKKFKGD 51 SRSAGVPSRV IHIRKLPIDV TEGEVISLGL PFGKVTNLLM LKGKNQAFIE 101 MNTEEAANTM VNYTTSVTPV LRGQPIYIQF SNHKELKTDS SPNQARAQAA 151 LQAVNSVQSG NLALAASAAA VDAGMAMAGQ SPVLRRIIVEN LFYPVTLDVDL 201 </p>

						<p>HQIFSKFGTV LKIITFTKNN QFQALLQYAD PVSAQHAKLS LDGQNIYNAC 251 CTLRIDFSKL TSLNVKYNND KSRDYTRPDL PSGDSQPSLD QTMAAAFGLS 301 VPNVHGALAP LAIPSAAAAA AAAGRIAIPG LAGAGNSVLL VSNLNPERVT 351 PQSLFILFGV YGDVQRVKIL FNKKENALVQ MADGNQAQLA MSHLNHKLH 401 GKPIRITLSK HQNVQLPREG QEDQGLTKDY GNSPLHRFKK PGSKNFQNI 451 PPSATLHLSN IPPSVSEEDL KVLFSNNGV VKGFKFFQKD RKMALIQMGS 501 VEEAVQALID LHNHDLGENH HLRVSFSKST I</p>
391	50109	9.10	118	4(4)	11%	<p>1 MGKEKTHINI VVIGHVDSGK STTTGHLIYK CGGIDKRTIE KFEKEAAEMG 51 KGSFKYAWVL DKLKAERERG ITIDISLWKF ETSKYVVTII DAPGHRDFIK 101 NMITGTSQAD CAVLIVAAGV GEFEAGISKN GQTREHALLA YTLGVKQLIV 151 GVNKMDSTEP PYSQKRYEEI VKEVSTYIKK IGYNPDTVAF VPIGWNGDN 201 MLEPSANMPW FKGWKVTRKD GNASGTTLLE ALDCILPPTR PTDKPLRLPL 251 QDVYKIGGIG TVPVGRVETG VLKPGMVVTF APVNVTEVK SVEMHHEALS 301 EALPGDNVGF NVKNVSVKDV RRGNVAGDSK NDPPMEAAGF TAQVIIILNHP 351 GQISAGYAPV LDCHTAHIAC KFAELKEKID RRSKKLEDG PKFLKSGDAA 401 IVDMVPGKPM CVESFSDYPP LGRFAVRDMR QTVAVGVKA VDKKAAGAGK 451 VTKSAQKAQK AK</p>
455	36903	6,37	106	4(2)	13%	<p>1 MDVVMKHNGP NDASDGTVRL RGLPFGCSKE EIVQFFQGLE IVPNGITLTM 51 DYQGRSTGEA FVQFASKEIA ENALGKHKER IGHRYIEIFR SSRSEIKGFY 101 DPPRRLGQR PGPYDRPIGG RGGYYGAGRG SMYDRMRRGG DGYDGGYGGF 151 DDYGGYNNG YGNDGFDDRM RDGRGMGGHG YGGAGDASSG FHGGHFVHMR 201 GLPFRATEND IANFFSPLNP IRVHIDIGAD GRATGEADVE FVTHEDAVAA 251 MSKDKNNMQH RYIELFLNST PGGGSGMGGG GMGGYGRDGM DNQGGYGSVG 301 RMGMGNYSG GYGTPDGLGG YGRGGGSGG YYGQGGMSGG GWRGMY</p>

629	22393	5,3	191	7(4)	28%	1 MANIAVQRIK REFKEVLKSE ETSKNQIKVD LVDENFTELR GEIAGPPDTP 51 YEGGRYQLEI KIPETYPFNP PKVRFITKIW HPNISSVTGA ICLDILKD QW 101 AAAMTLR TVL LSLQALLAAA EPDDPQDAVV ANQYK QNP EM FKQ TARLWAH 151 VYAGAPVSSP EYTK KIENLC AMGFDR NAVI VALSSKSWDV ETATELLLSN
636	23193	5,02	369	12(8)	37%	1 MAEQEPTAEQ LAQIAAENEE DEHSVNYKPP AQ KSIQEIQE LDKDES LRK 51 YKEALLGRVA VSADPNVNV VVTGLTLVCS SAPGPLELDL TGDLES FKKQ 101 SFVLKEGVEY RIKISFRVNR EIVSGMKY IQ HTYRKG VKID KTDY MVGSYG 151 PRAE EYEF LT PVEE APK GML ARG SYSIKSR FTDDDKTDHL SWEWN LTIK K 201 DWKD
661	20798	5,2	68	4(1)	22%	1 MASNKTTLQK MGKKQNGKSK KVEE A PEEF VVEK VLD RRV VNGKVEYFLK 51 WKGFTDADNT WEPEENLDCP ELIEAFLNSQ KAGKEKDGTK RKSLS SD ESD 101 DSKSKKRDA ADKPRGFARG LDPER IIGAT DSSG ELM FLM KWK DSDEADL 151 VLAKEAN MK C PQIV IAFY E E RLTWHSCPED EAQ
664	17808	9,48	150	4(3)	33%	1 MPPKFD PNEI KVVYLR CTGG EVG ATSALAP KIG PLGL SPK KVGDDIAKAT 51 GDWKGLRITV KLTIQNR QAQ IEV VPSASAL IIK ALKEPPR DRKKQKNIKH 101 SGNITFDEIV NIARQMRHRS LARELSG TIK EILG TAQ SVG CNV DGRHPHD 151 IIDDINSGAV ECPAS
667	23728	9,42	544	27(14)	62%	1 MLRLSER NMK VLLAAAL IAG SVFFLL LLPGP SAADEK KKGP KVTVK VYFDL 51 RIG DEDV GRV IFGL FG KTVP KTV DN FVALA TGEK GFGYKN SKFHR VIKDF 101 MIQ GGDF TRG DGTGG KSIYG ERF PDEN FKL KHY PGW VSM ANAG KDT NGS 151 QFF ITTV KTA WLDGKHVVFG KV LEG ME VVR KVESTKTDSR DKPL KDV IIA 201 DCG KIEVE KP FAI AKE

669	20887	7,57	162	8(5)	37%	1 MIKLFSLKQQ KKEEESAGGT KGSSKKASAA QLRIQKDINE LNLPKTCDIS 51 FSDPDDLINF KLVICPDEGF YKSGKFVFSF KVGQGYPHDP PKVKCETMVY 101 HPNIDLEGV CLNILREDWK PVLTINSIIY GLQYLFLEPN PEDPLNKEAA 151 EVLQNNRRLF EQNVQRSMRG GYIGSTYFER CLK
679	17287	8,52	299	13(6)	66%	1 MANLERTFIA IKPDGVQRGL VGEIIKRFEQ KGFRLVAMKF LRASEEHLKQ 51 HYIDLKDRPF FPGLVKYMNS GPVVAMVWEG LNVVKTGRVM LGETNPADSK 101 PGTIRGDFCI QVGRNIIHGS DSVKSAEKEI SLWFKPEELV DYKSCAHDWV 151 YE
753	82652	5,55	326	20(10)	26%	1 MVRSGNKAHV VLCMDVGFTM SNSIPGIESP FEQAKKVITM FVQRQVFAEN 51 KDEIALVLFV TDGTDNPLSG GDQYQNTVH RHLMLPDFDL LEDIESKIQP 101 GSQQADFLDA LIVSMDVIQH ETIGKKFEKR HIEIFDLSS RFSKSQLDII 151 IHSLKKCDIS LQFFLPFSLG KEDGSGDRGD GPFRLLGGHP SFPLKGITEQ 201 QKEGLEIVKM VMISLEGEDG LDEIYSFSES LRKLCVFKKI ERHSIHWPCR 251 LTIGSNLSIR IAAYKSILQE RVKKTWTVVD AKTLKKEDIQ KETVYCLNDD 301 DETEVLKEDI IQGFRYGSDI VPFSKVDEEQ MKYKSEGKCF SVLGFCKSSQ 351 VQRRFFMGNQ VLKVFAARDD EAAVALSSL IHALDDLDMV AIVRYAYDKR 401 ANPQGVAFP HIKHNYECLV YVQLPFMEDL RQYMFSSLKN SKKYAPTEAQ 451 LNAVDALIDS MSLAKKDEKT DTLEDLFPTT KIPNPRFQRL FQCLLHRALH 501 PREPLPIQQ HIWNMLNPPA EVTTSQIPL SKIKTLFPLI EAKKKDQVTA 551 QEIFQDNHED GPTAKKLTKE QGGAHFSVSS LAEGSVTSVG SVNPAENFRV 601 LVKQKKASFE EASNQLINHI EQFLDTNETP YFMKSIDCIR AFREEAIKFS 651 EEQRFNNFLK ALQEKVEIKQ LNHFWIIVVQ DGITLITKEE ASGSSVTAAE 701 AKKFLAPKDK PSGDTAAVFE EGGDVDDLLD MI
761	83626	6,08	327	9(4)	13%	1 MLRACQLSGV TAAQSCLCG KFVLRPLRPC RRYSTSGSSG

						<p>LTTGKIAGAG 51 LLFVGGGIGG TILYAKWDSH FRESVEKTIP YSDKLFEMVL GPAAYNVPLP 101 KKSIIQSGPLK ISSVSEVMKE SKQPASQLQK QKGDTPASAT APTEAAQIIS 151 AAGDTLSVPA PAVQPEESLK TDHPEIGEGK PTPALSEEAS SSSIRERPPE 201 EVAARLAQQE KQEQVKIESL AKSLEDALRQ TASVTLQAIA AQNAAVQAVN 251 AHSNILKAAM DNSEIAGEKK SAQWRTVEGA LKERRKAVDE AADALLKAKE 301 ELEKMKSVIE NAKKKEVAGA KPHITAAEGK LHNMIVDLDN VVKKVQAAQS 351 EAKVVVSQYHE LVVQARDDFK RELDSITPEV LPGWKGMSVS DLADKLSTDD 401 LNSLIAHAHR RIDQLNRELA EQKATEKQHI TLALEKQKLE EKRAFDSAVA 451 KALEHHRSEI QAEQDRKIEE VRDAMENEMR TQLRRQAAAH TDHLRDVLRV 501 QEQLKSEFE QNLSEKLSEQ ELQFRRLSQE QVDNFTLDIN TAYARLRGIE 551 QAVQSHAVAE EEARKAHQLW LSVEALKYSM KTSSAETPTI PLGSAVEAIK 601 ANCSDFNEFTQ ALTAAIPPES LTRGVYSEET LRARFYAVQK LARRVAMIDE 651 TRNSLYQYFL SYLQSLLLFP PQQLKPPPEL CPEDINTFKL LSYASYCIEH 701 GDLELAAKFV NQLKGESRRV AQDWLKEARM TLETKQIVEI LTAYASAVGI 751 GTTQVQPE</p>
786	18987	5,67	238	8(5)	36%	<p>1 MAAMASLGAL ALLLLSSLSR CSAEACLEPQ ITPSYTTSD AVISTETVFI 51 VEISLTCKNR VQNMALYADV GKGQFPVTRG QDVGRYQVSW SLDHKSAHAG 101 TYEVRFFDEE SYSLLRKAQR NNEDISIIPP LFTVSVDRHG TWNQPVVSTE 151 VLAAAIGLVI YYLAFSAKSH IQA</p>
827	30754	8,62	538	17(12)	70%	<p>1 MAVPPTYADL GKSARDVFTK GYGFGLIKLD LKTKSENGLE FTSSGSANTE 51 TTKVTGSLET KYRWTEYGLT FTEKWNTDNT LGTEITVEDQ LARGLKLTFD 101 SSFSPNTGKK NAKIKTGYKR EHINLGCDMD FDIAGPSIRG ALVLGYEGWL 151 AGYQMNFFETA KSRVTQSNFA VGYKTDEFQL HTNVNDGTEF GGSIIYQVKNK 201 KLETAVNLAW TAGNSNTRFG IAAKYQIDPD ACFSAKVNNS SLIGLGYTQT 251 LKPGIKLTLS</p>

						ALLDGKNVNA GGHKLGLGLE FQA
831	38580	7,57	530	23(10)	51%	1 MSTVHEILCK LSLEGDHSTP PSAYGSVKAY TNFDAERDAL NIETAIKTKG 51 VDEVTIVNIL TNRSNAQRQD IAFAYQRRTK KELASALKSA LSGHLETVIL 101 GLLKTPAQYD ASELKASMKG LGTDEDSLIE IICSRTNQEL QEINRVYKEM 151 YKTDLEKDII SDTSGDFRKL MVALAKGRRRA EDGSVIDYEL IDQDARDLYD 201 AGVKRKGTDV PKWISIMTER SVPHLQKVFD RYKSYSPYDM LESIRKEVKG 251 DLENAFLNLV QCIQNKPLYF ADRLYDSMKG KGTRDKVLIR IMVSRSEVDM 301 LKIRSEFKRK YGKSLYYYIQ QDTKGDYQKA LLYLCGGDD
904	66368	5,11	594	27(13)	38%	1 MATATPVPPR MGSRAGGPTT PLSPTRL SRL QEKEELRELN DRLAVYIDKV 51 RSLETENSAL QLQVTEREEV RGRELTGLKA LYETELADAR RALDDTARER 101 AKLQIELGKC KAEHDQLLLN YAKKESDLNG AQIKLREYEA ALNSKDAALA 151 TALGDKKSLE GDLEDLKDQI AQLEASLAAA KKQLADETLL KVDLENRCQS 201 LTEDLEFRKS MYEEEINETR RKHETRLVEV DSGRQIEYEV KLAQALHEMR 251 EQHDAQVRLY KEELEQTYHA KLENARLSSE MNTSTVNSAR EELMESRMRI 301 ESLSSQLSNL QKESRACLER IQELEDLLAK EKDNSRRMLT DKEREMAEIR 351 DQMQQQLNDY EQLLDVKLAL DMEISAYRKL LEGEEERLKL SPSRSSRVTV 401 SRASSRSVR TTRGKRKRVD VEESEASSSV SISHSASATG NVCIEEIDVD 451 GKFIRLKNTS EQDQPMGGWE MIRKIGDTSV SYKYTSRYVL KAGQTVTIWA 501 ANAGVTASPP TDLIWKNQNS WGTGEDVKVI LKNSQGEEVA QRSTVFKTTI 551 PEEEEEEEEEA AGVVVEEELF HQQGTPRASN RSCAIM
961	50087	6,25	438	10(5)	20%	1 MAAGTLYTYP ENWRAFKALI AAQYSGAQVR VLSAPPHFHF GQTNRTPEFL 51 RKFPAGKVPA FEGDDGFCVF ESNAIAYYVS NEELRGSTPE AAAQVVQWVS 101 FADSDIVPPA STWVFPTLGI MHHNKQATEN AKEEVRRILG LLDAYLKTRT 151 FLVGERVTLA

						DITVVCTLLW LYKQVLEPSF RQAFPNTNRW FLTCINQPQF 201 RAVLGEVKLC EKMAQFDAKK FAETQPKKDT PRKEKGSREE KQKPQAERKE 251 EKKAAAPAPE EEMDECEQAL AAEPKAKDPF AHLPK STFVL DEFKRKYSNE 301 DTLSVALPYF WEHFDDKDGWS LWYSEYRFPE ELTQTFMSCN LITGMFQRLD 351 KLRKNAFASV ILFGTNNSSS ISGVWVFRGQ ELAFPLSPDW QVDYESYTWR 401 KLDPGSEETQ TLVREYFSWE GAFQHV GKAF NQ GKIFK
963	47139	7,01	227	8(4)	23%	1 MSILKIHARE IFDSRGNPTV EVDLFTSKGL FRAAVPSGAS TGIYEALRL 51 DNDKTRYMGK GVSKAVEHIN KTIAPALVSK KLVNTEQEKI DKLMIEMDGT 101 ENKSKFGANA ILGVSLAVCK AGAVEKGVPL YRHIADLAGN SEVILPVPF 151 NVINGGSHAG NKLAMQEFMI LPVGAANFRE AMRIGAEVYH NLKNVIKEY 201 GKDATNVGDE GGFAPNILEN KEGLELLKTA IGKAGYTDKV VIGMDVAASE 251 FFRSGKYDLD FKSPDDPSRY ISPDQLADLY KSFIKDYPVV SIEDPFDQDD 301 WGAWQ KTAS AGIQVVGDDL TVTNPKRIAK AVNEKSCNCL LLKVNQIGSV 351 TESLQACKLA QANGWGMVS HRSGETEDTF IADLVVGLCT GQIKTGAPCR 401 SERLAKYNQL LR IEEELGSK AKFAGRNFERN PLAK
1000	32555	4,64	762	18(13)	41%	1 MEDSMDMDMS PLRPQNYLFG CELKADKDYH FKVDNDENEH QLSLRTVSLG 51 AGAKDELHIV EAEAMNYEGS PIKVTLATLK MSVQPTVSLG GFEITPPVVL 101 RLKCGSGPVH ISGQHLVAVE EDAESEDEEE EDVK LLSISG KRSAPGGGSK 151 VPQKKVKLAA DEDDDDDDDEE DDEDDDDDD FDDEEAEEKA PVKKSIRDTP 201 AKNAQKSNQN GKDSKPSSTP RSKGQESFCK QEKTPKTPKG PSSVEDIKAK 251 MQASIEKGGG LPKVEAKFIN YVKNCFRMTD QEAIQDLWQW RKSL
1002	40303	4,89	108	4(3)	13%	1 MSFFPELYFN VDNGYLEGLV RGLKAGVLSQ ADYLNLVQCE TLEDLKLHLQ 51 STDYGNFLAN EASPLTVSVI DDRLKEKMVV EFRHMRNHAY EPLASFLDFI 101

						<p>TYSYMIDNVI LLITGTLHQ SIAELVPKCH PLGSFEQMEA VNIAQTPAEL 151 YNAILVDTPL AAFFQDCISE QDLDEMNI IRNTLYKAYL ESFYKFCTLL 201 GGTTADAMCP ILEFEADRR FIITINSFGT ELSKEDRAKL FPHCGRLYPE 251 GLAQLARADD YEQVKNVADY YPEYKLLFEG AGSNPGDKTL EDRFFEHEVK 301 LNKLAFLNQF HFGVFFAFVK LKEQEARNIV WIAECIAQRH RAKIDNYIPI 351 F</p>
1029	18001	7,68	191	8(4)	42%	<p>1 MVNPTVFFDI AVDGEPLGRV SFELFADKVP KTAENFRALS TGEKGFYK 51 SCFHRIIPGF MCQGGDFTRH NGTGGKSIYG EKFEDENFIL KHTGPGILSM 101 ANAGPNTNGS QFFICTAKTE WLDGKHVVFG KVKEGMNIVE AMERFGSRNG 151 KTSKKITIAD CGQLE</p>
1064	57900	7,96	1240	42(28)	69%	<p>1 MSKPHSEAGT AFIQTQQLHA AMADTFLEHM CRLDIDSPP TARNTGIICT 51 IGPASRSVET LKEMIKSGMN VARLNFSHGT HEYHAETIKN VRTATESFAS 101 DPILYRPVAV ALDTKGPEIR TGLIKGSGTA EVELKKGATL KITLDNAYME 151 KCDENILWLD YKNICKVVEV GSKIYVDDGL ISLQVKQKA DFLVTEVENG 201 GSLGSKKGVN LPGAAVDLPA VSEKDIQDLK FGVEQDVMV FASFIRKASD 251 VHEVRKVLGE KGKNIKIISK IENHEGVRRF DEILEASDGI MVARGLGIE 301 IPAOKVFLAQ KMMIGRCNRA GKPVICATQM LESMIKKPRP TRAEGSDVAN 351 AVLDGADCIM LSGETAKGDY PLEAVRMQHL IAREAEAAIY HLQLFEELRR 401 LAPITSDPTE ATAVGAVEAS FKCCSGAIIV LTKSGRSAHQ VARYRPRAPI 451 IAVTRNPQTA RQAHLYRGIF PVLCKDPVQE AWAEDVDLRV NFAMNVGKAR 501 GFFKKGDVVI VLTGWRPGSG FTNTMRVVPV P</p>
1090	31343	4,74	101	3(2)	17%	<p>1 MLPLLRVPR VLGSSVAGLR AAPASPFQ LLQPAPRLCT RPFGLLSVRA 51 GSERRPGLLR PRGPCACGCG CGSLHTDGDK AFVDFLSDEI KEERKIQKHK 101 TLPKMSGGWE LELNGTEAKL VRKVAGEKIT VTFNINNSIP</p>

						PTFDGEEEPS 151 QGQKVEEQEP ELTSTPNFVV EVIKNDDGKK ALVLDCHYPE DEVGQEDEAE 201 SDIFSIREVS FQSTGESEWK DTNYTLNTDS LDWALYDHLM DFLADRGVDN 251 TFADELVELS TALEHQEYIT FLEDLKSFKV SQ
Phosphoprojekt						
364	56747	5,98	106	4(3)	9%	1 MRLRRALFPP GVALLLAAAR LAAASDVLEL TDDNFESRIS DTGSAGMLLV 51 EFFAPWCGHC KRLAPEYEEA ATRLKGIVPL AKVDCTANTN TCNKYGVSGY 101 PTLKIFRDGE EAGAYDGPRT ADGIVSHLKK QAGPASVPLR TEEEFKKFIS 151 DKDASIVGFF DDSFSEAHSE FLKAASNLRD NYRFAHTNVE SLVNEYDDNG 201 EGIILFRPSH LTNKFEDKTV AYTEQKMTSG KIKKFIQENI FGICPHMTED 251 NKDLIQGKDL LIAYYDVVYE KNAKGSNYWR NRVMMVAKKF LDAGHKLNFA 301 VASRKTFSHE LSDFGLESTA GEIPVVAIRT AKGEK FVMQE EFSRDGKALE 351 RFLQDYFDGN LKRYLKSEPI PESNDGPVKV VVAENFDEIV NNENKDVLE 401 FYAPWCGHCK NLEPKYKELG EKLSKDPNIV IAK MDATAND VPSPYEVRGF 451 PTIYFSPANK KLNPKKYEGG RELSDFISYL QREATNPPVI QEEKPKKKKK 501 AQEDL
596	30521	5,86	117	4(3)	17%	1 MEALPLLAAT TPDHGRHRL LLLPLLLFLL PAGAVQGWET EERPRTREEE 51 CHFYAGGQVY PGEASRVVA DHSLHLSKAK ISKPAPYWEG TAVIDGEFKE 101 LKLTDYRGKY LVFFFYPLDF TFVCPTEIIA FGDRLEEFRS INTEVVACSV 151 DSQFTHLAWI NTPRRQGGLG PIRIPLLSDL THQISKDYGV YLED SGHTLR 201 GLFIIDDKGI LRQITLNDLP VGRSVDETLR LVQAFQYTDK HGEVCPAGWK 251 PGSETIIPDP AGKLYFDKL N
1088	28750	4,57	140	7(3)	28%	1 MFEARLVQGS ILKKVLEALK DLINEACWDI SSSGVNLQSM DSSHVSLVQL 51 TLR SEGFDTY RCDRNLAMGV NLTSMSKILK CAGNEDIITL RAEDNADTLA 101 LVFEAPNQEK VSDYEMKLM LDVEQLGIPE QEYSCVVKMP SGEFARICRD 151 LSHIGDAVVI

						SCAKDGVK FS ASGELGN NI KLSQTSNVDK EEEAVTIEMN 201 EPVQLTFALR YLNFFTKATP LSSTVTLSMS ADVPLVVEYK IADMGHLK YY 251 LAPKIEDEEG S
332	62599	6,4	79	3(1)	7%	1 MEQVNELKEK GNKALSVGNI DDALQCYSEA IKLDPHNHVL YSNRSAAYAK 51 KGDYQKAYED GCKTVDLKPD WGKGYSRCAA ALEFLNRFEE AKRTYEEGLK 101 HEANNPQLKE GLQNMEARLA ERKFMNPFNM PNLQKLESD PRTRTLSDP 151 TYRELIEQLR NKPSDLGTKL QDPRIMTTLS VLLGVDLGSM DEEEEIATPP 201 PPPPPKKETK PEPMEEDLPE NKKQALKEKE LGNDAYKKKD FDTALKHYDK 251 AKELDPTNMT YITNQAAVYF EKG DYNKCRE LCEKAIEVGR ENREDYRQIA 301 KAYARIGNSY FKEEKYKDAI HFYNKSLAEH RTPDVLKKCQ QAEKILKEQE 351 RLAYINPDIA LEEK NKGNEC FQKGDYPQAM KHYTEAIKRN PKDAKLYSNR 401 AACYTKLLEF QLALKDCEEC IQLEPTFIKG YTRKAAALEA MKDYTKAMDV 451 YQKALDLSS CKEAADGYQR CMMAQYNRHD SPEDVKRRAM ADPEVQQIMS 501 DPAMR LILEQ MQKDPQALSE HLKNPVIAQK IQK LM DVGLI AIR
399	50285	7,05	124	3(2)	6%	1 MAASMFYGR L VAVATLRNHR PRTAQRAAAQ VLGSSGLFNN HGLQVQQQQQ 51 RNLSLHEYMS MELLQEAGVS VPKG YVAKSP DEAYAIAKKL GSKDVVIKAQ 101 VLAGGRGKGT FESGLKGGVK IVFSPEEAKA VSSQMIGKKL FTKQTGEKGR 151 ICNQVLVCER KYPRREYYFA ITMERSFQGP VLIGSSHGGV NIEDVAAESP 201 EAIKEPIDI EEGIKKEQAL QLAQKMGFPP NIVESAAENM VKLYSLFLKY 251 DATMIEINPM VEDSDGAVLC MDAK INFDSN SAYR QKKIFD LQDWTQEDER 301 DKDAAKANLN YIGLDGNIGC LVNGAGLAMA TMDI IKLHGG TPANFLDVGG 351 GATVHQVTEA FKLITSDKKV LAILVNIFGG IMRCDVIAQG IVMAVKDLEI 401 KIPVVVRLQG TRVDDAKALI ADSGLK ILAC DDLDEA ARMV VKLSEIVTLA 451 KQAHVDVKFQ LPI

6.2 Publikation

Petrova DT, Brandhorst G, Koch C, Schultze FC, Eberle C, Walson PD, Oellerich M (2015): Mycophenolic acid reverses TGF beta-induced cell motility, collagen matrix contraction, and cell morphology *in vitro*. Cell Biochem Funct 33, 503-508

Posterpräsentation im Rahmen der DGKL-Jahrestagung (siehe 6.3):

Koch C, Petrova DT, Eberle C, Schultze F, Brandhorst G, Oellerich M: The functional effect of mycophenolic acid on renal renal fibrosis *in vitro*; in: Clin Chem Lab Med 2012, Bände 50:A205-A270. P06; Mannheim 2012

Das Projekt wurde gefördert durch die Stiftung für Pathobiochemie und Molekulare Diagnostik der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin e.V.

Mir selbst wurde ein Stipendium durch die "Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin" (DGKL) für engagierte Nachwuchsforscher im Jahre 2012 verliehen.

6.3 Posterpräsentation im Rahmen der DGKL-Jahrestagung

Molekulare Mechanismen der antiproliferativen und antifibrotischen Wirkung von Mycophenolsäure *in vitro*



C. Koch¹, D. T. Petrova¹, C. Eberle¹, F. C. Schultze², G. Brandhorst¹, M. Oellerich¹

¹Abteilung Klinische Chemie / Zentrallabor, Zentrum Innere Medizin, Universitätsmedizin Göttingen, Deutschland

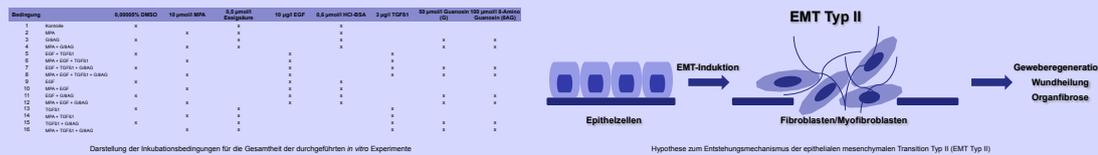
²Abteilung Gastroenterologie und Endokrinologie, Zentrum Innere Medizin, Universitätsmedizin Göttingen, Deutschland

Einleitung

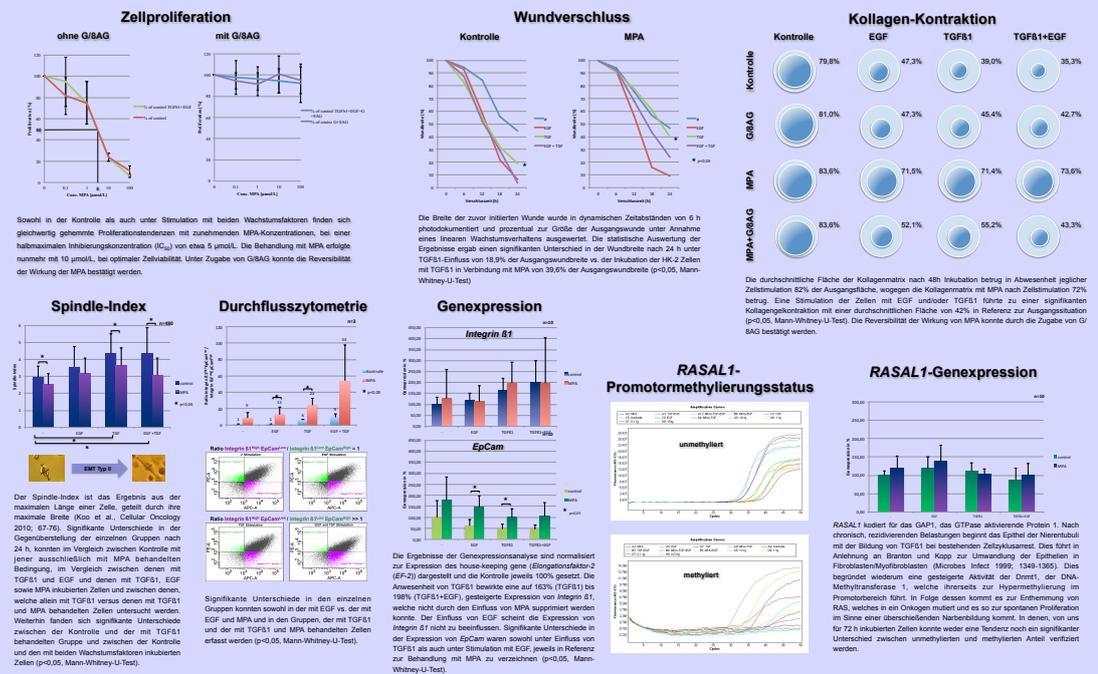
Im Rahmen dieser Studie sollte der potentiell inhibitorische Einfluss der Mycophenolsäure (MPA) auf die epitheliale mesenchymale Transition Typ II (EMT Typ II) in humanen, renalen Tubulusepithelzellen (HK-2) in An- bzw. Abwesenheit der Wachstumsfaktoren EGF und/oder TGFβ1 eruiert werden. Um die Effekte sowohl auf der Ebene der Gene als auch auf derer der Proteine verifizieren, den epigenetischen Einfluss und zudem die Funktion und die sich verändernde Morphe der Zellen analysieren zu können, wurden diverse *in vitro* Experimente durchgeführt.

Methoden

Die verwendeten HK-2 Zellen wurden zu insgesamt 16 verschiedenen Bedingungen für 24-72 h inkubiert, die Proliferation, die Kollagenmatrixkontraktion, der Wundverschluss, der Spindle-Index der Zellen, die Genexpression ausgewählter epithel- und fibrogenassoziierter Gene, der Promotormethylierungsstatus von *RASAL1* untersucht sowie durchflusszytometrische Messungen an anti-CD29 und anti-CD326 markierten Zellen (FACS) durchgeführt.



Ergebnisse



Schlussfolgerungen

- Die Veränderungen der Morphologie, der Zellproliferation sowie des molekularen Phenotyps der verwendeten HK-2 Zellen waren reversibel unter der Behandlung mit MPA in Anwesenheit von TGFβ1 mit/ohne EGF
- MPA scheint die Synthese der Adhäsionsmoleküle in stimulierten Tubulusepithelzellen zu inhibieren
- Die Befunde bestätigen die antifibrotische und antiproliferative Wirkung in renalen Tubulusepithelzellen *in vitro*

Das Projekt wurde gefördert durch die Stiftung für Pathobiochemie und Molekulare Diagnostik der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin e.V.

7. Literaturverzeichnis

Adamczak M, Gross ML, Krtil J, Koch A, Tyralla K, Amann K, Ritz E (2003): Reversal of glomerulosclerosis after high-dose enalapril treatment in subtotally nephrectomized rats. *J Am Soc Nephrol* 14, 2833-2842

Adams RL (1995): Eukaryotic DNA methyltransferases - structure and function. *Bioessays* 17, 139-145

Ahmed N, Maines-Bandiera S, Quinn M, Unger WG, Dedhar S, Auersperg N (2006): Molecular pathways regulating EGF-induced epithelio-mesenchymal transition in human ovarian surface epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol* 290, 1532-1542

Ahmed SH, Clark LL, Pennington WR, Webb CS, Bonnema DD, Leonardi AH, McClure CD, Spinale FG, Zile MR (2006): Matrix metalloproteinases/tissue inhibitors of metalloproteinases - relationship between changes in proteolytic determinants of matrix composition and structural, functional, and clinical manifestations of hypertensive heart disease. *Circulation* 113, 2089-2096

Allison AC (2005): Mechanisms of action of mycophenolate mofetil. *Lupus* 14, 2-8

Allison AC, Eugui EM (1993): The design and development of an immunosuppressive drug, mycophenolate mofetil. *Springer Semin Immunopathol* 14, 353-380

Allison AC, Eugui EM (2000): Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology* 47, 85-118

Balzar M, Winter MJ, de Boer CJ, Litvinov SV (1999): The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *J Mol Med* 77, 699-712

Balzar M, Briare-de Bruijn IH, Rees-Bakker HA, Prins FA, Helfrich W, de Leij L, Riethmuller G, Alberti S, Warnaar SO, Fleuren GJ, Litvinov SV (2001): Epidermal growth factor-like repeats mediate lateral and reciprocal interactions of Ep-CAM molecules in homophilic adhesions. *Mol Cell Biol* 21, 2570-2580

Barnard JA, Lyons RM, Moses HL (1990): The cell biology of transforming growth factor β . *Biochim Biophys Acta* 1032, 79-87

Blum H, Beier H, Gross HJ (1987): Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99

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, 205-210

Border WA, Ruoslahti E (1992): Transforming growth factor- β in disease: the dark side of tissue repair. *J Clin Invest* 90, 1-7

Border WA, Noble NA (1994): Transforming growth factor β in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 331, 1286-1292

Boyer B, Thiery JP (1993): Epithelium-mesenchyme interconversion as example of epithelial plasticity. *APMIS* 101, 257-268

Branton MH, Kopp JB (1999): TGF-beta and fibrosis. *Microbes Infect* 1, 1349-1365

Bullingham RES, Monroe S, Nicholls A, Hale M (1996): Pharmacokinetics and bioavailability of mycophenolate mofetil in healthy subjects after single-dose oral and intravenous administration. *J Clin Pharmacol* 36, 315-324

Carr SF, Papp E, Wu JC, Natsumeda Y (1993): Characterization of human type I and type II IMP dehydrogenases. *J Biol Chem* 268, 27286-27290

Cirulli V, Crisa L, Beattie GM, Mally MI, Lopez AD, Fannon A, Plasznik A, Inverardi L, Ricordi C, Deerinck T, Ellisman M, Reisfeld RA, Hayek A (1998): KSA antigen Ep-CAM mediates cell-cell adhesion of pancreatic epithelial cells: morphoregulatory roles in pancreatic islet development. *J Cell Biol* 140, 1519-1534

Chatr-aryamontri A, Ceol A, Palazzi LM, Nardelli G, Schneider MV, Castagnoli L, Cesareni G (2007): MINT: the Molecular INTeraction database. *Nucleic Acids Res* 35, 572-574

Cheng S, Lovett DH (2003): Gelatinase A (MMP-2) is necessary and sufficient for renal tubular cell epithelial-mesenchymal transformation. *Am J Pathol* 162, 1937-1949

Cheng S, Pollock AS, Mahimkar R, Olson JL, Lovett DH (2006): Matrix metalloproteinase 2 and basement membrane integrity: a unifying mechanism for progressive renal injury. *FASEB* 20, 1898-1900

Choudhary J, Grant SGN (2004): Proteomics in postgenomic neuroscience: the end of the beginning. *Nat Neurosci* 7, 440-445

Clapéron A, Mergey M, Nguyen Ho-Boulidoires TH, Vignjevic D, Wendum D, Chrétien Y, Merabtene F, Frazao A, Paradis V, Housset C, Guedj N, Fouassier L (2014): EGF/EGFR axis contributes to the progression of cholangiocarcinoma through the induction of an epithelial mesenchymal transition. *J Hepatol* 61, 325-332

Compton SJ, Jones CG (1985): Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal. Biochem* 1, 369-374

Copeland JW, Beaumont BW, Merrilees MJ, Pilmore HL (2007): Epithelial-to-mesenchymal transition of human proximal tubular epithelial cells: effects of rapamycin, mycophenolate, cyclosporin, azathioprine, and methylprednisolone. *Transplantation* 83, 809-814

Costello JF, Plass C (2001): Methylation matters. *J Med Genet* 38, 285-303

Deng B, Yang X, Liu J, He F, Zhu Z, Zhang C (2010): Focal adhesion kinase mediates TGF-beta1-induced renal tubular epithelial-to-mesenchymal transition *in vitro*. *Mol Cell Biochem* 340, 21-29

Dihazi H, Müller GA (2007): Urinary proteomics: a tool to discover biomarkers of kidney diseases. *Expert Rev Proteomics* 4, 39-50

Docherty NG, O'Sullivan OE, Healy DA, Murphy M, O'Neill AJ, Fitzpatrick JM, Watson RW (2006): TGF-beta1-induced EMT can occur independently of its proapoptotic effects and is aided by EGF receptor activation. *Am Physiol Renal Physiol* 290, 1202-1212

Dubus I, Vendrely B, Christophe I, Labouyrie JP, Delmas Y, Bonnet J, Combe C (2002): Mycophenolic acid antagonizes the activation of cultured human mesangial cells. *Kidney Int* 62, 857-867

Ebner R, Chen RH, Lawler S, Zioncheck T, Derynck R (1993): Determination of type I receptor specificity by the type II receptors for TGF- β or activin. *Science* 262, 900-902

Eddy AA (1996): Molecular insights into renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 7, 2495-2508

Eddy AA (2000): Molecular basis of renal fibrosis. *Pediatr Nephrol* 15, 290-301

Eddy AA (2005): Can renal fibrosis be reversed? *Pediatr Nephrol* 20, 1369-1375

Edwards DR, Murphy G, Reynolds JJ, Whitham SE, Docherty AJP, Angel P, Heath JK (1987): Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO* 6, 1899-1904

Eknoyan G, Lameire N, Barsoum R, Eckardt KU, Levin A, Levin N, Locatelli F, MacLeod A, Vanholder R, Walker R, Wang H (2004): The burden of kidney disease: improving global outcomes. *Kidney Int* 66, 1310-4

Franklin T. J. and J. M. Cook (1969): The inhibition of nucleic acid synthesis by mycophenolic acid. *Biochem J* 113, 515-524

Frei U, Schober-Halstenberg H-J: Nierenersatztherapie in Deutschland. Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2006/2007. QuaSi-Niere gGmbH, Berlin 2008. from http://www.bundesverband-niere.de/files/QuaSi-Niere-Bericht_2006-2007.pdf; Zugriff am 15.01.2013

Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL (1992): A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci* 89, 1827-1831

Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W (2000): The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21, 1037-1053

Grande MT, López-Novoa JM (2009): Fibroblast activation and myofibroblast generation in obstructive nephropathy. *Nat Rev Nephrol* 5, 319-328

Greupink R, Bakker HI, Reker-Smit C, van Loenen-Weemaes A, Kok RJ, Meijer DKF, Beljaars L, Poelstra K (2005): Studies on the targeted delivery of the antifibrogenic compound mycophenolic acid to the hepatic stellate cell. *J Hepatol* 43, 884-892

Grinnell F (1992): Wound repair, keratinocyte activation and integrin modulation. *J Cell Sci.* 101, 1-5

Gstraunthaler G, Seppi T, Pfaller W (1999): Impact of culture conditions, culture media volumes, and glucose content on metabolic properties of renal epithelial cell cultures. Are renal cells in tissue culture hypoxic? *Cell Physiol Biochem* 9, 150-172

Hay ED, Zuk A (1995): Transformations between epithelium and mesenchyme: normal, pathological, and experimentally induced. *Am J Kidney Dis* 26, 678-690

Heller T, Asif AR, Petrova DT, Doncheva Y, Wieland E, Oellerich M, Shipkova M, Armstrong VW (2009): Differential proteomic analysis of lymphocytes treated with mycophenolic acid reveals caspase 3-induced cleavage of rho GDP dissociation inhibitor 2. *Ther Drug Monit* 31, 211-7

Hemler ME (1990): VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes. *Annu Rev Immunol* 8, 365-400

Hendry BM (2003): Sharpe CC. Targeting Ras genes in kidney disease. *Nephron Exp Nephrol* 93, 129-133

Herlyn M, Steplewski Z, Herlyn D, Koprowski H (1979): Colorectal carcinoma-specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 1438-1452

Hildner K, Märker-Hermann E, Schlaak JF, Becker C, Germann T, Schmitt E, Meyer zum Büschenfelde KH, Neurath MF (1998): Azathioprine, mycophenolate mofetil, and methotrexate specifically modulate cytokine production by T-cells. *Ann NY Acad Sci* 859, 204-207

Huber MA, Azoitei N, Baumann B, Grunert S, Sommer A, Pehamberger H, Kraut N, Beug H, Wirth T (2004): NF- κ B is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest* 114, 569-581

Hynes RO (1992): Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69, 11

Ignatz RA, Massagué J (1986): Transforming growth factor β stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 261, 4337-4345

Ignatz RA, Massagué J (1987): Cell adhesion protein receptors as targets for transforming growth factor β action. *Cell* 51, 189-197

Ina K, Kitamura H, Tatsukawa S, Takayama T, Fujikura Y, Shimada T (2002): Transformation of interstitial fibroblasts and tubulointerstitial fibrosis in diabetic nephropathy. *Med Electron Microsc* 35, 87-95

Isaka Y, Brees DK, Ikegaya K, Kaneda Y, Imai E, Noble NA, Border WA (1996): Gene therapy by skeletal muscle expression of decorin prevents fibrotic disease in rat kidney. *Nat Med* 2, 418-423

Isaka Y, Akagi Y, Ando Y, Tsujie M, Sudo T, Ohno N, Border WA, Noble NA, Kaneda Y, Hori M, Imai E (1999): Gene therapy by transforming growth factor- β receptor-IgG Fc chimera suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 55, 465-475

Isaka Y, Tsujie M, Ando Y, Nakamura H, Kaneda Y, Imai E, Hori M (2000): Transforming growth factor- β 1 antisense oligodeoxynucleotides block interstitial fibrosis in unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* 58, 1885-1892

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, 341-350

Johnsson C, Gerdin B, Tufveson G (2004): Effects of commonly used immunosuppressants on graft-derived fibroblasts. *Clin Exp Immunol* 136, 405-412

Jouanneau J, Tucker GC, Boyer B, Vallés AM, Thiery JP (1991): Epithelial cell plasticity in neoplasia. *Cancer Cells* 3, 525-529

Kalluri R, Neilson EG (2003): Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 112, 1776-1784

Kondo M, Cubillo E, Tobiume K, Shirakihara T, Fukuda N, Suzuki H, Shimizu K, Takehara K, Cano A, Saitoh M, Miyazono K (2004): A role for Id in the regulation of TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Cell Death Differ* 11, 1092-1101

Konno Y, Natsumeda Y, Nagai M, Yamaji Y, Ohno S, Suzuki K, Weber G (1991): Expression of human IMP dehydrogenase types I and II in *Escherichia coli* and distribution in human normal lymphocytes and leukemic cell lines. *J Biol Chem* 266, 506-509

Koo V, El Mekabaty A, Hamilton P, Maxwell P, Sharaf O, Diamond J, Watson J, Williamson K (2010): Novel *in vitro* assays for the characterization of EMT in tumourigenesis. *Cellular Oncology* 32, 67-76

Lan H, Mu W, Tomita N, Huang XR, Li JH, Zhu HJ, Morishita R, Johnson RJ (2003): Inhibition of renal fibrosis by gene transfer of inducible Smad7 using

ultrasound- microbubble system in rat UUO model. *J Am Soc Nephrol* 14, 1435-1448

Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW (2006): The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and diseases. *J Cell Biol* 172, 973-981

Lee WA, Gu L, Miksztal AR, Chu N, Leung K, Nelson PH (1990): Bioavailability improvement of mycophenolic acid through amino ester derivatization. *Pharm Res* 7, 161-166

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. *Annals of Internal Medicine* 139, 137-147

Li LC, Dahiya R (2002): MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics* 18, 1427-1431

Litvinov SV, Bakker HA, Gourevitch MM, Velders MP, Warnaar SO (1994): Evidence of a role of the epithelial glycoprotein 40 (Ep-CAM) in epithelial cell-cell adhesion. *Cell Adhes Commun* 2, 417-428

Liu GX, Li YQ, Huang XR, Wei L, Chen HY, Shi XJ, Heuchel RL, Lan HY (2013): Disruption of Smad7 promotes ANG II-mediated renal inflammation and fibrosis via Sp1-TGF- β /Smad3-NF- κ B-dependent mechanisms in mice. *PLoS One* 8, 53573

Liu Y (2010): New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 21, 212-222

Lowe JK, Brox L, Henderson JF (1977): Consequences of inhibition of guanine nucleotide synthesis of mycophenolic acid and virazole. *Cancer Res* 37, 736-743

Luhn S, Berth M, Hecker M, Bernhardt J (2003): Using standard positions and image fusion to create proteome maps from collections of two-dimensional gel electrophoresis images. *Proteomics* 3, 1117-1127

Magaud JP, Sargent I, Mason DY (1988): Detection of human white cell proliferative responses by immunoenzymatic measurement of bromodeoxyuridine uptake. *J Immunol Methods* 106, 95-100

Majno G, Gabbiani G, Hirschel BJ, Ryan GB, Statkov PR (1971): Contraction of granulation tissue *in vitro*: similarity to smooth muscle. *Science* 173, 548-550

Mareel MM, Van Roy FM, De Baetselier P (1990): The invasive phenotypes. *Cancer Metastasis Rev* 9, 45-62

Martinez-Salgado C, Rodriguez-Pena AB, Lopez-Novoa JM (2008): Involvement of small Ras GTPases and their effectors in chronic renal disease *Cell. Mol. Life Sci* 65, 477-492

Maschio G, Alberti D, Locatelli F, Mann JFE, Motolese M, Ponticelli C, Ritz E, Janin G, Zucchelli P (1999): Angiotensin-converting enzyme inhibitors and kidney protection: the AIPRI trial. The ACE inhibition in progressive renal insufficiency (AIPRI) study group. *J Cardiovasc Pharmacol* 33, 16-20

Meier-Kriesche HU, Li S, Gruessner RWG, Fung JJ, Bustami RT, Barr ML, Leichtman AB (2006): Immunosuppression: Evolution in practice and trends, 1994-2004. *Am J Transplant* 6, 1111-1131

Mezzano SA, Ruiz-Ortega M, Egido J (2001): Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension* 38, 635-638

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, 680-683

Münz M, Kieu C, Mack B, Schmitt B, Zeidler R, Gires O (2004): The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation. *Oncogene* 23, 5748

Muir D, Varon S, Manthorpe M (1990): An enzyme linked immunosorbent assay for bromodeoxyuridine incorporation using fixed microcultures. *Analytical Biochemistry* 185, 377-382

Nagai M, Natsumeda Y, Weber G (1992): Proliferation-linked regulation of type II IMP dehydrogenase gene in human normal lymphocytes and HL-60 leukemic cells. *Cancer Res* 52, 258-261

Nangaku M (2004): Mechanisms of tubulointerstitial injury in the kidney: final common pathways to end-stage renal failure. *Internal Medicine* 43, 9-17

Ng YY, Huang TP, Yang WC, Chen ZP, Yang AH, Mu W, Nikolic-Paterson DJ, Atkins RC, Lan HY (1998): Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in progressive tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats. *Kidney Int* 54, 864-876

Nihtyanova SI, Brough GM, Black CM, Denton CP (2007): Mycophenolate mofetil in diffuse cutaneous systemic sclerosis - a retrospective analysis. *Rheumatology* 46, 442-445

Nowak I, Shaw LM (1995): Mycophenolic acid binding to human serum albumin: characterization and relation to pharmacodynamics. *Clin Chem* 41, 1011-1017

Nowak I, Shaw LM (1997): Effect of mycophenolic acid glucuronide on inosine monophosphate dehydrogenase activity. *Ther Drug Monit* 19, 358-360

O'Farrell PH (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem* 250, 4007-4021

Okada H, Danoff TM, Kalluri R, Neilson EG (1997): Early role of Fsp1 in epithelial-mesenchymal transition. *Am J Physiol* 273, 563-574

Porstmann T, Ternyck T, Avrameas S (1985): Quantitation of 5-Bromo-2-Deoxyuridine incorporation into DNA : An enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response. *J. Immunol. Meth* 106, 169-179

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

Quan TE, Cowper SE, Bucala R (2006): The role of circulating fibrocytes in fibrosis. *Curr Rheumatol Rep* 8, 145-150

Rao CG, Chianese D, Doyle GV, Miller MC, Russell T, Sanders RA Jr, Terstappen LW (2005): Expression of epithelial cell adhesion molecule in carcinoma cells present in blood and primary and metastatic tumors. *Int J Oncol* 27, 49

Remuzzi G, Bertani T (1998): Pathophysiology of Progressive Nephropathies. *N Engl J Med* 339, 1448-1456

Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH, Fauci AS (1986): Transforming growth factor type β : rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci* 83, 4167-4171

Roberts IS, Burrows C, Shanks JH, Venning M, Mc William LJ (1997): Interstitial myofibroblasts: predictors of progression in membranous nephropathy. *J Clin Pathol* 50, 123-127

Ryan M, Johnson G, Kirk J, Fuerstenberg S, Zager R, Torok-Storb B (1994): HK-2: an immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. *Kidney Int* 45, 48-57

Schiffer M, von Gersdorff G, Bitzer M, Susztak K, Bottinger EP (2000): Smad proteins and transforming growth factor beta-signaling. *Kidney Int* 58, 45-52

Serini G, Gabbiani G (1999): Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. *Exp. Cell Res* 250, 273-283

Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M (1996): Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68, 850-858

Stratton RJ, Wilson H, Black CM (2001): Pilot study of anti-thymocyte globulin plus mycophenolate mofetil in recent-onset diffuse scleroderma. *Rheumatology* 40, 84-88

Strutz F, Müller GA (2006): Renal fibrosis and the origin of the renal fibroblast. *Nephrol Dial Transplant* 21, 3368-3370

Strutz F, Zeisberg M (2006): Renal fibroblasts and myofibroblasts in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 17, 2992-2998

Strutz F, Müller GA, Neilson EG (1996): Transdifferentiation: a new angle on renal fibrosis. *Exp Nephrol* 4, 267-270

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, 190-197

Stryer L: *Biochemie*. 4. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 1996

Sutaria PM, Ohebshalom M, McCaffrey TA, Vaughan Jr ED, Felsen D (1998): Transforming growth factor- β receptor types I and II are expressed in renal tubules and are increased after chronic unilateral ureteral obstruction. *Life Sci* 62, 1965-1972

Sweeney MJ, Hoffman DH, Esterman MA (1972): Metabolism and biochemistry of mycophenolic acid. *Cancer Res* 32, 1803-1809

Takayama S, Hatori M, Kurihara Y, Kinugasa Y, Shirota T, Shintani S (2009): Inhibition of TGF-beta1 suppresses motility and invasiveness of oral squamous cell carcinoma cell lines via modulation of integrins and down-regulation of matrix-metalloproteinases. *Oncol Rep.* 21, 205-210

Tang WW, Van GY, Qi M (1997): Myofibroblast and a1 (III) collagen expression in experimental tubulointerstitial nephritis. *Kidney Int* 51, 926-931

Thiery JP, Sleeman JP (2006): Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 131-142

Tian YC, Chen YC, Chang CT, Hung CC, Wu MS, Phillips A, Yang CW (2007): Epidermal growth factor and transforming growth factor-beta1 enhance HK-2 cell migration through a synergistic increase of matrix metalloproteinase and sustained activation of ERK signaling pathway. *Exp Cell Res* 313, 2367-2377

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, 349-363

Touyz RM (2004): Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells: implications in cardiovascular disease. *Brazilian Journal of Medical* 37, 1263-1273

Wynn TA (2010): Fibrosis under arrest. *Nat Med* 16, 523-525

Ya-Chung T, Yung-Chang C, Chiz-Tzung C, Cheng-Chieh H, Mai-Szu W, Aled P, Chih-Wie Y (2007): Epidermal growth factor and transforming growth factor- β 1 enhance HK-2 cell migration through a synergistic increase of matrix metalloproteinase and sustained activation of ERK signaling pathway. *Experimental Cell Research* 11, 2367-2377

Yang J, Dai C, Liu Y (2002): Hepatocyte growth factor gene therapy and angiotensin II blockade synergistically attenuate renal interstitial fibrosis in mice. *J Am Soc Nephrol* 13, 2464-2477

Yang JW, Liu YH (2001): Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. *Am J Pathol* 159, 1465-1475

Yu L, Border WA, Anderson I, Mc Court M, Huang Y, Noble NA (2004): Combining TGF- β inhibition and angiotensin II blockade results in enhanced antifibrotic effect. *Kidney Int* 66, 1774-1784

Zatz R (1996): Haemodynamically mediated glomerular injury: the end of a 15-year-old controversy? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 5, 468-475

Zeisberg M, Kalluri R (2004): The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis. *J Mol Med* 82, 175-181

Danksagung

Nach nunmehr vier Jahren Arbeit ist es vollbracht. Meine Dissertation liegt vor Ihnen.

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die für das Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Dr. M. Oellerich danke ich für die freundliche Bereitstellung der interessanten Fragestellung, für die Möglichkeit des experimentellen Arbeitens sowie fachliche Betreuung.

Frau Dr. D. T. Petrova und Herrn PD Dr. G. Brandhorst gilt aufgrund der hervorragenden Betreuung und der fachkompetenten Unterstützung mein besonderer Dank. Ihre Anregungen, ständige Hilfsbereitschaft, Motivation und Antrieb haben mich selbst nach Antritt meiner Assistenzarztstelle in der doch häufig stress- und arbeitsintensiven Welt der Unfallchirurgie und Orthopädie stets vorangebracht.

Herrn PD Dr. rer. nat. Abdul Rahman Asif möchte ich an dieser Stelle ebenso danken wie auch Herrn Prof. Dr. rer. nat. Hassan Dihazi für die Möglichkeit zur Nutzung der Gerätschaften des Proteomlabors wie auch des Fluoreszenz-Scanners.

Bei allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Klinischen Chemie möchte ich mich für die exzellente technische Assistenz, geduldige Einarbeitung in die einzelnen Methoden sowie für Ihre unersetzliche Hilfe und guten Ideen bedanken. Ferner möchte ich Ihnen danken, da sie stets für eine wohlthuende Arbeitsatmosphäre gesorgt haben. Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person, darum gilt Ihnen mein besonderer Dank.

Bei Dr. B. Usbeck bedanke ich mich, ohne den ich vielleicht nie den Weg in die Medizin eingeschlagen hätte.

Lebenslauf

Am 26.11.1986 wurde ich in Sondershausen geboren.

2006 erlangte ich die Allgemeine Hochschulreife an der "Staatlich berufsbildenden Schule Sondershausen/ Berufliches Gymnasium". Von 2008-2014 widmete ich mich dem Studium der Humanmedizin an der "Georg-August-Universität" zu Göttingen und begann am 01.07.2014 mit meiner Facharztausbildung zum Unfallchirurgen/Orthopäden.

Zum Zeitpunkt der Abgabe der Dissertation befinde ich mich im vierten Jahr meiner Facharztausbildung und bin am Hufeland Klinikum in Bad Langensalza tätig.