

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

HGF als anti-fibrotisches Agens: Effekte der Überexpression in renalen Fibroblasten und Tubulusepithelzellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Cathleen Rogge
aus
Magdeburg
Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. F. Strutz

II. Berichterstatter/in:

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Die terminale Niereninsuffizienz</i>	1
1.1.1	Pathogenese und Therapie	2
1.2	<i>Die renale Fibrose und das Tubulointerstitium</i>	3
1.3	<i>Gewebeschädigung, Entzündung und Reparatur</i>	
	- <i>Die renale Fibrose als überschießende Wundheilung -</i>	5
1.5	<i>Die epithelial-mesenchymale Transition</i>	8
1.6	<i>TGF-β1 das „Schlüsselzytokin“ der renalen Fibrogenese</i>	9
1.7	<i>Antifibrotisch wirkende Zytokine</i>	10
1.8	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>	11
1.8.1	Struktur, Synthese und biologische Aktivität von HGF	11
1.8.2	Hepatocyte Growth Factor in renalen Erkrankungen	14
1.9	<i>Fragestellung und Zielsetzung</i>	17
2	Material und Methoden	18
2.1	<i>Material</i>	18
2.1.1	Geräte	18
2.1.2	Gebrauchsmaterialien	19
2.1.3	Chemikalien	20
2.1.4	Antikörper	22
2.1.5	Kit-Systeme	23
2.1.6	Allgemeine Puffer und Lösungen	24
2.1.7	EDV	24
2.2	<i>Methoden</i>	25
2.2.1	Die Zellreihen TFB-HGF/-3.1 und NP1-HGF	25
2.2.2	Zellkultur	32
2.2.3	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	33
2.2.4	Untersuchung der Zellzählung	34
2.2.5	Westernblot	35

2.2.6	Untersuchung der extrazellulären Matrixdegeneration	40
2.2.7	Quantitative Bestimmung von Fibronectin und Kollagen im Zellüberstand	42
2.2.8	Apoptoseuntersuchung mittels FITC-Annexin-V- Markierung und Durchflusszytometrie	44
2.2.9	Statistische Analysen	45
3	Ergebnisse	46
3.1	<i>Untersuchung zum Nachweis einer HGF-Überexpression</i>	<i>46</i>
3.1.1.	PCR zum Nachweis einer HGF- und 3.1-Überexpression nach stabiler Transfektion	46
3.1.2.	Westernblotanalysen zum Nachweis einer HGF-Proteinsekretion nach stabiler Transfektion	46
3.2	<i>Untersuchungen zum proliferativen Effekt von HGF in renalen Fibroblasten und proximalen Tubulusepithelzellen</i>	<i>47</i>
3.2.1	Proliferationsmessung mit Hilfe eines BrdU-Assays.....	47
3.2.2	Zellzählung mittels Trypanblau-Assay.....	50
3.3	<i>Untersuchung zur Wirkung von HGF auf die Synthese Extrazellulärer Matrixproteine</i>	<i>52</i>
3.3.1	Fibronektinsynthese	53
3.4	<i>Analyse der Sekretion extrazellulärer Markerproteine unter dem Einfluss einer HGF-Überexpression</i>	<i>54</i>
3.4.1	Effekt von HGF auf die Sekretion von Fibronectin	55
3.4.2	Effekt von HGF auf die Sekretion von Kollagentyp-I	56
3.5	<i>Matrixdegeneration unter HGF-Überexpression.....</i>	<i>58</i>
3.5.1	Effekt von HGF auf die Aktivität der Matrix-Metalloproteinase-2 und -9	58
3.6	<i>Untersuchungen zum Einfluss einer HGF-Überexpression auf die durch CsA induzierte Apoptose in renalen Fibroblasten und proximalen Tubulusepithelzellen</i>	<i>61</i>
4	Diskussion	64

4.1	<i>HGF fördert die Proliferation proximaler Tubulusepithelzellen und renaler Fibroblasten</i>	66
4.2	<i>HGF hemmt die Produktion extrazellulärer Matrixproteine</i>	68
4.3	<i>Matrixdegeneration – Induktion und Inhibition von MMP-2 und MMP-9</i>	71
4.4	<i>HGF schützt Tubulusepithelzellen und renale Fibroblasten vor Cyclosporin-A-induzierter Apoptose</i>	73
4.5	<i>Schlussfolgerung und Ausblick</i>	79
5	Zusammenfassung	82
6	Literaturverzeichnis	84
7	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	95
7.1	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	95
7.2	<i>Tabellenverzeichnis</i>	96

Abkürzungsverzeichnis

α -SMA	α -Glattmuskelaktin (<i>α-smooth-muscle-actin</i>)
ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
Ang II	Angiotensin II
APS	Ammoniumperoxidsulfat
BMP7	Bone morphogenic protein 7
BrdU	Bromdeoxyuridin
BSA	Bovine Serum Albumin
CsA	Cyclosporin A
CSPD	Disodium 3-(4-methoxyspiro(1,2-dioxetane-3,2-(5'-chloro)tricyclo(3,3,1,1)decan)-4-yl)phenylphosphate
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
ddH ₂ O	Zweifach destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DTT	Dithiotreitol
ECM	Extrazelluläre Matrix (<i>Extracellular Matrix</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz
EGF	Epidermal Growth Factor
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β -aminoethylenether)-NNN'N'-tetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transformation
FCS	Foetales Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor
FN	Fibronectin
FSP-1	Fibroblasten-Spezifisches Protein-1
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HRP	Horse Radish Peroxydase
INF- γ	Interferon- γ

Kol-I	Kollagentyp-I
Kol-IV	Kollagentyp-IV
MMP	Matrix-Metalloproteinase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ("phosphate buffered sodium")
PMSF	Phenylmethansulfonsäurefluorid
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TBM	Tubuläre Basalmembran
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- β 1	Transforming Growth Factor- β 1
ZO-1	Zona-occludens-1

1 Einleitung

1.1 Die terminale Niereninsuffizienz

Die chronische Niereninsuffizienz ist ein weltweites Gesundheitsproblem mit stetig steigender Inzidenz und Prävalenz, sowie schlechter Langzeitprognose und hohen sozioökonomischen Belastungen (Eknoyan et al. 2004). Ursächlich liegen ihr sowohl chronische Nierenerkrankungen, wie beispielsweise die diabetische Nephropathie, Glomerulonephritiden, tubulointerstitielle Erkrankungen, vaskuläre und polyzystische Nephropathien, als auch Systemerkrankungen mit nephrogener Beteiligung zu Grunde. Nach Angaben des Jahresberichtes Quasi-Niere 2005/2006, der ca. 90% aller deutschen Dialysezentren erfasst, ist die Zahl der Dialysepatienten zwischen 1995 und 2005 um 53% und die der Nierentransplantierten um 78% gestiegen (Frei und Schober-Halstenberg 2006). Der Trend zeigt vor allem in den westlichen Industrienationen eine stetig wachsende Inzidenz der großen Volkskrankheiten Diabetes mellitus und arterieller Hypertonus, die die häufigsten Grunderkrankungen der terminalen Niereninsuffizienz darstellen. Ende 2005 wurden in Deutschland ca. 65.000 Patienten mit einem Dialyseverfahren versorgt, wobei mehr als 16.700 Patienten erstmalig in chronische Nierenersatzverfahren aufgenommen wurden. Die ökonomische Bedeutung der chronischen Niereninsuffizienz für das hiesige Gesundheitssystem, ergibt sich aus den hohen Kosten der Nierenersatzverfahren und den Kosten ihrer Folgeerkrankungen. In Deutschland werden für die Dialyse pro Jahr durchschnittlich 50.000-60.000 Euro pro Patient veranschlagt. So wurden 2005 allein 3 Milliarden Euro für die Dialysebehandlung ausgegeben, was somit eine erhebliche Belastung für Gesundheitswesen und Volkswirtschaft darstellt.

1.1.1 Pathogenese und Therapie

Unabhängig von der Grunderkrankung münden chronische Nierenerkrankungen in den meisten Fällen in die terminale Niereninsuffizienz. Diese ist geprägt durch die irreversible Verminderung der glomerulären, tubulären und endokrinen Funktion der Niere. Dadurch bedingt kommt es zum Versagen der exkretorischen Nierenfunktion, was zu Störungen des Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushaltes führt. Die Abnahme der inkretorischen Funktionen, wie die Sekretion von Erythropoetin, aktivem Vitamin D und Prostaglandinen, verändert die Hämodynamik und resultiert in renaler Anämie und Osteopathie. Bedingt durch die eingeschränkte Ausscheidungsfunktion werden harnpflichtige Substanzen retiniert. Diese können toxische Organschäden verursachen und im Besonderen zur Steigerung des kardiovaskulären Risikos bei niereninsuffizienten Patienten führen. Im Terminalstadium, Stadium V der Niereninsuffizienz, liegt die glomeruläre Filtrationsrate unter $15 \text{ ml/min/1,73 m}^2$, was im Regelfall eine Nierenersatztherapie in Form von Dialyse oder eine Nierentransplantation notwendig macht (Herold 2007). Wie schnell die renale Funktion abnimmt, ist einerseits von der Grunderkrankung und andererseits von den Progressionsfaktoren abhängig. Zu den wichtigsten Progressionsfaktoren der Niereninsuffizienz zählen die systemische Hypertonie, die Proteinurie, die hohe Eiweiß- und Phosphatzufuhr, sowie die Hyperlipidämie und die metabolische Azidose. Die therapeutischen Möglichkeiten, auf die Progredienz der Erkrankung Einfluss zu nehmen, sind leider gering. Im Wesentlichen beruhen sie auf der Behandlung der Grunderkrankung und der Progressionsfaktoren. Von entscheidender Bedeutung für das Fortschreiten der Krankheit ist die Einstellung des Blutdruckes, wobei Werte unter 130 mmHg systolisch und 80 mmHg diastolisch angestrebt werden. Präferentiell sollten dazu ACE-Hemmer, bzw. Angiotensin-Rezeptorblocker eingesetzt werden (Herold 2007). Bei Patienten mit diabetischer Nephropathie ist die Einstellung des Blutzuckers auf normoglykämische Werte absolut notwendig. Auch die Proteinrestriktion

(Remuzzi und Bertani 1998) und die frühzeitige medizinische Betreuung von chronisch Nierenkranken durch Nephrologen, kann sich positiv auf die Progressionsverzögerung auswirken (Battle et al. 2006). Keine der derzeit angewandten Therapiestrategien führt zu einem Funktionserhalt der Niere, so dass die Nierentransplantation oder die Dialyse bisher die einzigen Therapiemöglichkeiten sind.

1.2 Die renale Fibrose und das Tubulointerstitium

Die chronische Niereninsuffizienz ist histologisch durch Glomerulosklerose und tubulointerstitielle Fibrose charakterisiert. Unabhängig von der zu Grunde liegenden Erkrankung kommt es durch den fortschreitenden Krankheitsverlauf zu ausgeprägter Gewebevernarbung, die zur Destruktion des Nierenparenchyms und terminaler Niereninsuffizienz führt. Die Zunahme des Narbengewebes korreliert mit der Funktionsverschlechterung und Abnahme des Glomerulumfiltrats. Insbesondere die tubulointerstitielle Fibrose spielt für die Progression renaler Erkrankungen eine wichtige Rolle. Bohle et al. (1994) demonstrierten, dass die zunehmende Erweiterung des Tubulointerstitiums mit einer progredienten Einschränkung der Nierenfunktion assoziiert ist und dass ferner das tubulointerstitielle Volumen mit der Serum-Kreatininkonzentration korreliert. Da der tubulointerstitielle Raum mehr als 80% des Nierenvolumens ausmacht (Palmer 1997), ist es nicht verwunderlich, dass Veränderungen seiner Struktur einen entscheidenden Einfluss auf die Nierenfunktion haben. Der tubulointerstitielle Raum besteht aus Interstitium, Tubuli und Gefäßen (Lemley und Kritz 1991). Durch die tubuläre Basalmembran sind die Tubulusepithelzellen vom Interstitium und den anderen Strukturen getrennt. Sie besteht aus der Hauptkomponente, dem Kollagentyp-IV, und anderen Strukturproteinen. Ersteres bildet als Hauptkomponente das Gerüst der tubulären Basalmembran und bewahrt deren strukturelle Integrität (Timpl 1996). Das Interstitium beinhaltet eine lockere

extrazelluläre Matrix, die hauptsächlich aus Kollagenen (Typ I, Typ III), Fibronectin und Heparansulfatproteoglykan besteht. Sie umgibt interstitielle Fibroblasten und interagiert mit ihnen über Integrine (Zeisberg et al. 2001, Kaissling und Le Hir 1994). Die Fibroblasten, die dabei den grössten Anteil bilden, sind für die Synthese von extrazellulärer Matrix (ECM) verantwortlich (Aumailley und Gayraud 1998). In der gesunden Niere herrscht ein physiologisches Gleichgewicht zwischen Matrixsynthese und Matrixabbau, dieses wird bei chronischen Nierenrkrankungen gestört.

Auf molekularer Ebene liegt dem Prozess der Nierenfibrose eine exzessive Ablagerung von ECM zu Grunde. Sie geht zunächst mit einer Vermehrung interstitieller Zellen (Bohle et al. 1979, Bohle 1982) und mit der Ausweitung des Interstitium einher, welche mit tubulärer Atrophie und tubulärer Dilatation assoziiert ist (Strutz und Neilson 2003). Dieser Prozess exzessiver Matrixakkumulation ist erstens durch die gesteigerte Synthese von Matrixproteinen wie Fibronectin, Proteoglykanen, Kollagen-I, -III, -IV, Laminin, Vitronectin, Tenascin und Heparansulfat geprägt. Zweitens wird durch die verminderte Bildung von Gewebsproteinasen, wie z.B. Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und die gesteigerte Bildung von Protease-Inhibitoren, wie Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMP) und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-Typ-1 (PAI-1), der Matrixabbau gehemmt. Drittens begünstigt die lokale Überexpression von matrixbindenden Rezeptoren, sogenannter Integrine, die Adhäsion von Matrixproteinen (Border und Noble 1994).

1.3 Gewebeschädigung, Entzündung und Reparatur

- Die renale Fibrose als überschießende Wundheilung -

Für das Überleben von Organismen ist die Fähigkeit der Gewebereparation und Regeneration essentiell. Abhängig von Zelltyp und anatomischer Funktion besitzen Zellen ein unterschiedliches Potential, auf Noxen zu reagieren, d.h. sie sind in der Lage, Schädigungen innerhalb bestimmter Grenzen zu tolerieren. Wird diese Toleranzgrenze überschritten, kommt es zur irreversiblen Schädigung der Zellen und Einleitung von Zelltod. Unabhängig vom initialem Insult folgt auf eine Gewebeschädigung immer eine Entzündungsreaktion mit anschließender Wundheilung (Ferguson und O’Kane 2004). Der Entzündungsprozess läuft nach einem allgemeinen Schema ab. Zunächst kommt es zur Bildung und Sekretion unterschiedlicher Mediatoren. Sie bewirken eine Steigerung der vaskulären Permeabilität, die Aktivierung von Endothelzellen und Einwanderung inflammatorischer Zellen (Kofler et al. 2004). Die Entzündungsreaktion ist entscheidend für die zelluläre Regeneration und Deckung von Gewebedefekten mittels Matrixexpansion. Bleibt dieser Prozess zeitlich und lokal begrenzt, kann somit die physiologische Histologie und Funktion wieder hergestellt werden. Voraussetzungen dafür sind, dass keine weiteren Schädigungen auftreten, Entzündungsmediatoren neutralisiert werden und inflammatorische Zellen abgebaut werden. Häufiger als die vollständige Regeneration ist die unvollständige Geweberegeneration. Gründe dafür sind chronisch einwirkende Noxen oder eine bereits vorliegende ausgeprägte Zerstörung der ursprünglichen Gewebearchitektur. An der Niere führen z. B. Schädigungsreize wie Hypertonie, Hyperglykämie oder chronische Entzündungen zu einer anhaltenden, nicht limitierten Wundheilung. Die dadurch bedingte Matrixüberexpression führt zur destruirenden Narbenbildung und Ausbildung einer Schrumpfniere. Auch in anderen Organen mit chronisch-progressiven Erkrankungen wie z.B. Leberzirrhose, Lungen- und Myokardfibrose, findet diese Form der Gewebeantwort statt (Border und Noble 1994). Alle diese Krankheiten

gehen mit einer Fibrosierung und dem daraus resultierenden Funktionsverlust des Organs einher.

1.4 Die renale Fibrogenese

Das heutige Modell der renalen Fibrogenese ist mit der physiologischen Wundheilung vergleichbar, die sich in drei Phasen einteilen lässt. Hierzu zählen die Induktionsphase, Phase der inflammatorischen Matrixsynthese und Phase der postinflammatorischen Matrixsynthese (Strutz und Neilson 2003). Nach initialer Schädigung reagiert die Niere mit einer Entzündungsreaktion. In der Induktionsphase bewirkt die Sekretion von Chemokinen einen vermehrten Einstrom von Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten (Müller et al. 1992). Diesem Chemokingradienten folgend, werden die inflammatorischen Zellen direkt zu dem geschädigten Areal geleitet. Abhängig von der Ätiologie der renalen Schädigung werden entweder glomeruläre oder ins Interstitium eingewanderte Entzündungszellen aktiviert und beginnen mit der weiteren Sekretion schädigender Mediatoren. Die Zytokine stimulieren die Proliferation residenter Fibroblasten und deren Aktivierung zu Myofibroblasten. Des Weiteren fördern sie die Epithelial-Mesenchymale Transition tubulärer Epithelzellen in Matrix-produzierende Zellen. In der sich anschließenden Phase der inflammatorischen Matrixsynthese werden Fibroblasten durch anhaltende Sekretion profibrogener Zytokine durch eingewanderte Entzündungszellen und residente Nierenzellen stimuliert. Zu den wichtigsten Zytokinen der inflammatorischen Matrixsynthese zählen insbesondere Angiotensin-II (AT-II) und Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1). AT-II ist in der Lage, Tubulusepithelzellen und Fibroblasten zur TGF- β 1-Sekretion und Kollagensynthese zu stimulieren (Ruiz-Ortega und Edigo 1997). TGF- β 1 selbst wird als das Schlüsselzytokin der Fibrogenese angesehen. Es wirkt chemotaktisch auf Fibroblasten, fördert deren Transformation zu Myofibroblasten und die Produktion von extrazellulären Matrixproteinen, wie Fibronectin und Kollagen-I. Neben

der Überproduktion unterstützt die verminderte Matrixdegeneration die exzessive Akkumulation von ECM. Die postinflammatorische Phase unterscheidet sich von der physiologischen Wundheilung durch eine ausbleibende Resolution. Trotz Abklingen des primären inflammatorischen Stimulus persistiert die interstitielle Entzündung. Da das Gleichgewicht zwischen Matrixsynthese und Matrixdegeneration gestört ist, führt dieser Prozess zur fortschreitenden Zerstörung der Organarchitektur, zum Funktionsverlust und schließlich zur terminalen Niereninsuffizienz (Strutz und Neilson 2003).

<p>I Induktionsphase Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen durch tubuläre Epithelzellen Infiltration von mononukleären Zellen Freisetzung von profibrogenen Zytokinen Aktivierung und Proliferation von residenten Fibroblasten Epithelial-Mesenchymale Transition</p>
<p>II Inflammatorische Phase Gesteigerte Matrixsynthese und –deposition Kontinuierliche Freisetzung profibrogener Zytokine durch infiltrierende Zellen</p>
<p>III Post-inflammatorische Phase Einstellung des primären Entzündungsstimulus Sekretion von profibrogenen Zytokinen durch Tubulusepithelzellen Autokrine Proliferation aktivierter Fibroblasten</p>

Tab. 1.1: Mechanismen der renalen Fibrose (Strutz und Neilson 2003, 461)

1.5 Die epithelial-mesenchymale Transition

Die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) ist unerlässlich für die embryonale Entwicklung, die Tumorprogression (Thiery 2002) und die Organfibrose (Lee et al. 2006). Während der EMT kommt es zum Verlust epithelspezifischer Charakteristika und zur Ausbildung eines mesenchymalen Phänotyps von Epithelzellen. Die zellmorphologischen Veränderungen führen zum Verlust intrazellulärer epithelialer Adhäsionsmoleküle, an deren Stelle mesenchymale Zytoskelettmarker exprimiert werden. In der embryologischen Entwicklung ermöglicht die EMT den bereits verankerten Zellen, sich im entwickelnden Organismus neu auszurichten. Im adulten Organismus dient die EMT der raschen Rekrutierung vitaler Zellen mit der Absicht, geschädigtes Gewebe relativ schnell durch epitheliale Zellen zu ersetzen (Iwano et al. 2002). Bei der renalen Fibrose spielt die EMT eine zentrale Rolle (Okada et al. 2000). Neuere Studien zeigen, dass die Akkumulation von Kollagen und anderer Matrixkomponenten nicht allein auf die Aktivierung residenter Fibroblasten zu Myofibroblasten zurückzuführen ist. Diese Fibroblasten stammen zum einen vom Knochenmark ab, zum anderen sind sie auf die EMT von Tubulusepithelzellen zurückzuführen (Strutz et al. 1995, Kalluri und Neilson 2003, Neilson 2005). Diese Arbeitsgruppe konnte anhand der Expression von Fibroblasten-spezifischem Protein (FSP1) und *α -smooth muscle actin* (Myofibroblasten-Marker) demonstrieren, dass Tubulusepithelzellen durch Zytokine und Verlust der TBM eine Transition durchlaufen und sich zu Fibroblasten umwandeln können. Während der renalen Fibrogenese läuft die EMT in mehreren Schritten ab. Zu den wichtigsten EMT-Induktoren zählen Wachstumsfaktoren, wie TGF- β 1, EGF, FGF-2, IL-1 und Enzyme, z.B. MMP-2 oder andere Matrixmetalloproteinasen. In der Initialphase werden die Tubulusepithelzellen durch TGF- β 1 und MMP-2 aktiviert (Zeisberg et al. 2001). Daraus resultiert zum einen der Verlust der E-Cadherin-Expression, ein epitheliales Adhäsionsmolekül, das für die Aufrechterhaltung der Zellstruktur verantwortlich ist. Zum anderen

beginnen die aktivierten Epithelien mit der autokrinen Sekretion von TGF- β 1 und MMP-2, was die weitere Destruktion der TBM und Fortsetzung der EMT begünstigt. Durch die EMT verlieren die Tubulusepithelzellen ihre ursprüngliche apikal-basale Polarität und sind in der Lage sich aus ihrem Zellverband zu lösen und durch die geschädigte Basalmembran in das Interstitium zu migrieren (Zeisberg et al. 2002; Zeisberg und Kalluri 2004). Dort wandeln sie sich zu fusiformen, fibroblastenähnlichen Zellen um (Strutz und Müller 2000). Parallel dazu kommt es zur de-novo-Expression mesenchymaler Marker wie α -SMA, Vimentin und FSP-1 (Strutz et al. 1995). Im Interstitium tragen die via EMT entstandenen Fibroblasten entscheidend zur exzessiven Matrixsynthese und deren Deposition und schließlich zur Progression der chronischen Nierenerkrankung bei (Iwano et al. 2002). Ein Teil der migrierten Zellen geht via Apoptose (programmierter Zelltod) zugrunde. Demzufolge scheinen die EMT und die Apoptose am Verlust tubulärer Epithelzellen beteiligt zu sein und wesentlich zur tubulären Atrophie und Krankheitsprogression beizutragen (Zeisberg und Kalluri 2004).

1.6 TGF- β 1 das „Schlüsselzytokin“ der renalen Fibrogenese

Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) ist ein profibrogenes Zytokin mit multifunktionaler Wirkung und wird als das Schlüsselzytokin der renalen Fibrogenese angesehen (Strutz und Neilson 2003). Studien an transgenen TGF- β 1 überexprimierenden Mäusen zeigten eine rasche Entwicklung von Glomerulosklerose und interstitieller Fibrose (Kopp und Klotmann 1990). Auch die Verabreichung von externem TGF- β 1 förderte die Fibrogenese und Expansion renaler Matrix (Border und Noble 1994). Bei Patienten mit chronischen Nephropathien wurden erhöhte TGF- β -Serumkonzentrationen gemessen (Negri 2004). Andere Studien beschrieben, dass in vivo und in vitro die Blockade einer Aktivierung von TGF- β 1 (Isaka et al. 1999) eine verminderte Matrixsynthese und

Matrixakkumulation zur Folge haben und dass die Neutralisierung dieses Zytokins die renale Fibrose bis zu einem gewissen Maß revidieren kann (Chen et al. 2003). TGF- β 1 ist ein Zytokin mit chemotaktischer Wirkung auf Fibroblasten und Monozyten. Es vermittelt die Umwandlung von Fibroblasten zu Myofibroblasten und triggert die Synthese extrazellulärer Matrixkomponenten, wie Fibronectin und Kollagentyp-I. Durch die Stimulation von Integrinen auf der Zelloberfläche werden Zell-Matrixinteraktionen und die Matrixvernetzung begünstigt. Ferner inhibiert TGF- β 1 die Expression von Kollagenasen und stimuliert die Synthese von Proteaseinhibitoren (z.B. PAI-1 und TIMP), wodurch die Matrixdegeneration gehemmt wird. Die Induktion der TGF- β 1-Expression wird durch verschiedene Faktoren hervorgerufen. Dazu gehören Angiotensin-II, Endothelin-1, Insulin-Like Growth Factor-1, Platelet Activating Factor, Thromboxane, aber auch Ischämie, Glukose und zahlreiche Medikamente, wie beispielsweise Cyclosporin A sind dazu in der Lage. TGF- β 1 wird von residenten Nierenzellen und infiltrierenden Leukozyten sezerniert (Eddy 2000). TGF- β 1 fungiert über die Bindung an Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren, die von den meisten Zellen exprimiert werden. Aktiviertes TGF- β 1 bindet zunächst an den Typ-II-Rezeptor, der anschließend an den Typ-I-Rezeptor bindet. Dieser Rezeptorkomplex stellt eine Serin/Tyrosin-Kinase dar, der durch die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, sogenannte Smad-Proteine, eine intrazelluläre Signaltransduktion aktiviert (Schiffer et al. 2000).

1.7 Antifibrotisch wirkende Zytokine

Das grundlegende Problem chronisch progressiver Erkrankungen ist das Ungleichgewicht zwischen pro-fibrogenen und anti-fibrotischen Faktoren, wobei das Verhältnis zu Gunsten der pro-fibrogenen Faktoren verschoben ist. Neben den Zytokinen, die den fibrotischen Gewebeumbau fördern, existieren Antagonisten, anti-fibrotische Zytokine, die diesem Prozess entgegenwirken (Liu 2006). Zu Ihnen gehören z.B. Interferon- γ , ein

immunmodulatorisches Zytokin mit inhibitorischen Effekten auf Myofibroblasten und die Kollagenexpression (Strutz et al. 2000; Giannopoulou et al. 2006). Ein anderes Zytokin aus dieser Reihe ist Relaxin. Es ist in der Lage, die Kollagensynthese zu hemmen und Kollagen Degeneration zu fördern (Negri 2004). Von besonderer Bedeutung sind derzeit das Bone Morphogenic Protein 7 (BMP7) und Hepatocyte Growth Factor (HGF). Sie sind in der Lage, die fibrogenen Aktionen von TGF- β 1 direkt zu antagonisieren (Strutz 2004).

1.8 Hepatocyte Growth Factor

Hepatocyte Growth Factor (HGF), ist ein multifunktionelles Polypeptid mit mitogener, motogener, morphogener und antiapoptotischer Wirkung. Der Arbeitsgruppe Nakamura et al. (1987) gelang es, HGF aus Thrombozyten zu isolieren und dessen Struktur zu beschreiben. In darauf folgenden Studien konnte demonstriert werden, dass HGF ebenfalls von verschiedenen Organen, einschließlich der Niere, exprimiert wird und an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt ist. Neben seinen regenerativen und proliferativen Eigenschaften beschrieben mehrere Arbeitsgruppen, an unterschiedlichen experimentellen Tiermodellen, HGF als einen endogen antifibrotisch wirkenden Faktor, der in der Lage ist, fibrotische Läsionen zu mildern und die Organfunktion zu erhalten (Liu 2004b).

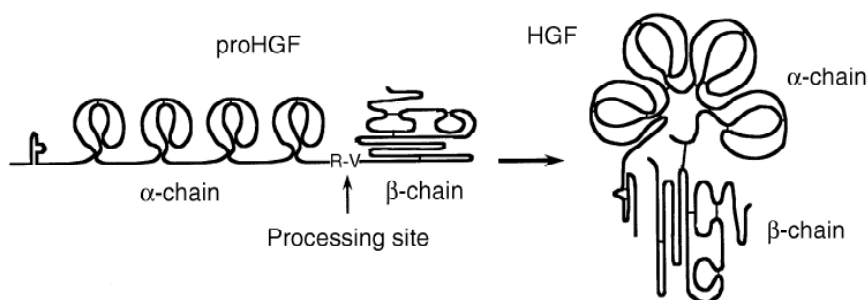
1.8.1 Struktur, Synthese und biologische Aktivität von HGF

Das humane HGF, das auf Chromosom 7q11.2-21 kodiert ist, wird als biologisch inaktive Vorstufe, als Einzelstrang, sezerniert und extrazellulär durch eine spezifische Serin-Protease in die biologisch aktive Form gespalten. Bei der aktiven Form des HGF handelt es sich um ein über Disulfidbrücken gebundenes, heterodimeres Glykoprotein, bestehend aus

einer ca. 69kDa schweren α - und einer ca. 34kDa schweren β -Untereinheit (Matsumoto und Nakamura 2001).

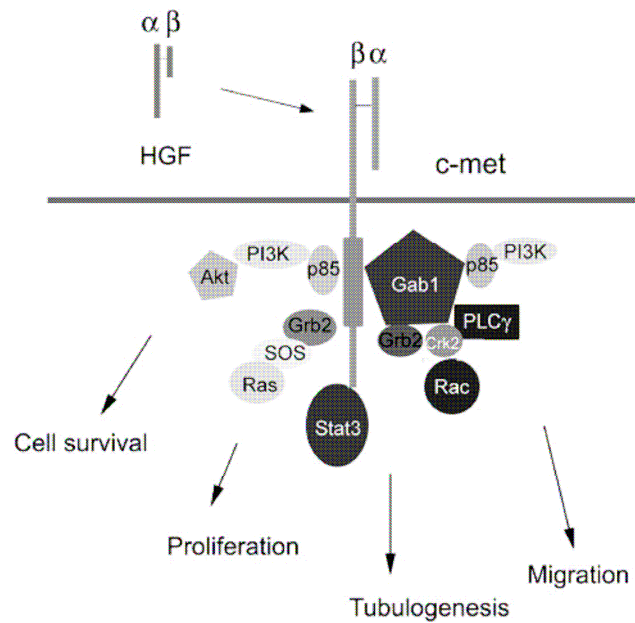
Umfangreiche Studien zeigten, dass HGF verschiedenartige zelluläre Prozesse steuert. Dazu gehören Zellüberleben, Proliferation, Migration und Zelldifferenzierung. Diese verschiedenen biologischen Tätigkeiten werden über einen c-met transmembranen Tyrosinkinase-Rezeptor vermittelt (Matsumoto und Nakamura 2001). Der HGF-Rezeptor wurde 1991 als das Produkt eines, auf Chromosom 7q21-31 gelegenen, c-met Protoonkogens entdeckt (Bottaro et al. 1991). Der 190 kDa schwere c-met Rezeptor ist ein über Disulfidbrücken gebundener Komplex, wobei die extrazellulär gelegene, 50kDa schwere, α -Untereinheit mit der transmembran gelegenen, 145kDa schweren β -Untereinheit verknüpft ist (Park et al. 1987). Die β -Untereinheit besitzt an ihrem intrazellulär gelegenen Ende eine Tyrosinkinasedomäne. Die Bindung von HGF an den c-met Rezeptor induziert, bedingt durch die Aktivierung der Tyrosinkinase, die Autophosphorylierung des intrazellulär gelegenen Rezeptoranteils und bewirkt damit die Rekrutierung von Signalproteinen. Zu diesen Signalproteinen, die mit den unterschiedlichen biologischen Aktivitäten von HGF assoziiert sind, gehören Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphonat 3-Kinase (PI3-Kinase), Phospholipase C- γ , pp60^{src} Tyrosinkinase, Gab-1, Grb2-SoS Komplex, Ras GTPase aktivierendes Protein (Ras-GAP), Shp-2, Crk-2 und STAT-3. Durch die Bindung der Signalproteine an den aktivierten Rezeptor wird eine Signalkaskade induziert. Sie bewirkt die Expression unterschiedlicher Gene und darüber eine spezifische zelluläre Antwort. Beispielsweise reguliert die Induktion des Grb-2/SoS Komplexes, über die Aktivierung von Ras und die Phosphorylierung von ERK, die Zellproliferation (Ponzetto et al. 1994). Die Phosphorylierung von Gab-1, ein Protein, welches den Met-Rezeptor mit Signalproteinen, wie PI-3 Kinase, PLC- γ , Shp-2 und Crk-2 verbindet, spielt eine entscheidende Rolle bei der HGF vermittelten Morphogenese und Zellmigration (Scheaper et al. 2000; Weidner et al. 1996). Montesano et al. (1997) demonstrierten eine durch Gab-1-Expression induzierte

gesteigerte Zellmobilität und Tubulogenese. In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass HGF zur Phosphorylierung von Adhäsionsmolekülen beiträgt und dadurch die Zell-Matrix-Interaktionen fördert und die Cadherin- vermittelte Zell-Zell-Adhäsion herabsetzt (Matsumo et al. 1994; Watabe et al. 1993). Seine zellprotektiven Effekte vermittelt HGF über zwei verschiedene Signalwege. Einerseits induziert es via PI-3- Kinase und Akt Proteinkinase B die Phosphorylierung von Bad und somit die Inaktivierung des pro-apoptotischen Proteins, andererseits induziert HGF die Expression des anti-apoptotischen BCL-xL (Liu 1999). Die essentielle Rolle von HGF bei der Organogenese von Säugern wurde an verschiedenen Tiermodellen mit unterbrochener HGF Expression oder c-Met Rezeptoreffekt deutlich. In einer Studie von Schmidt et al. 1995 verstarben die HGF defizienten Tiere bereits in utero an einer mangelhaften Leber- und Plazentaentwicklung. HGF ist ebenfalls in die Entwicklung anderer epithelialer Gewebe einschließlich der Lunge und Mamma involviert, sowie an deren Regeneration, Funktionserhalt und Tumorgenese beteiligt.



Schematische Strukturen: Prohepatocyte Growth Factor (HGF) und ausgereifter HGF (nach Matsumoto und Nakamura 2001, Seite

Abb. 1.1: 2024)



Vereinfachte Darstellung der Hauptsignalwege von HGF in Nierenzellen (nach Liu 2003, F8)

Nach der Bindung von HGF durchläuft der c-met Rezeptor eine Autophosphorylierung in eine Tyrosinkinase Domäne, was zur Rekrutierung verschiedener intrazellulärer Signalgeber, einschließlich der homologen Src-Domäne, der p85/p110 Untereinheiten der Phosphoinositid 3-Kinase (PI-3K), des Grb2/Sos/Ras Komplexes, der Phospholipase C- γ (PLC- γ) und dem Multiadapterprotein Gab-1. Diese führen zu diversen zellulären Antworten, wie z.B. Zellüberleben, Proliferation, Migration und Tubulogenese.

1.8.2 Hepatocyte Growth Factor in renalen Erkrankungen

HGF wird in der Niere von interstitiellen Zellen, Endothelzellen und Makrophagen produziert. Sein c-Met Rezeptor wird von Tubulusepithelzellen exprimiert. Untersuchungen an verschiedenen Modellen akuter Nierenschädigung (Vijayan et al. 2001, Liu et al. 1999) beschrieben nach initialer Gewebeschädigung eine systemische, bzw. eine lokal gesteigerte Expression von HGF und c-Met. Die Gabe von exogenem HGF stimulierte die Epithelproliferation und beschleunigte die

Regeneration nach akuter Schädigung (Liu et al. 1998). Studien an Modellen chronischer Nephropathie bewiesen, dass sowohl die systemische Applikation von exogenem HGF, als auch der Gentransfer von HGF-cDNA, die renale Fibrosierung mindern kann (Mizuno et al. 1998; Liu und Yang 2006). Die Neutralisierung von endogenen HGF resultiert in forcierter Fibrose (Mizuno et al. 2001). In-vitro-Studien zeigten, dass HGF den pro-fibrotischen Aktionen von TGF- β 1 entgegen wirkt (Yang J et al. 2003, Florquin und Rouschop 2003). Daher nimmt man an, dass die Balance zwischen diesen beiden Zytokinen eine entscheidende Rolle bei der renalen Fibrogenese spielt. Abhängig von der Dauer des Insultes kommt es entweder zur Regeneration oder fortschreitender Fibrosierung. Eine limitierte Nierenschädigung führt zum Übergewicht von HGF und resultiert in Gewebereparation und Regeneration. Eine chronische Schädigung verändert das HGF/TGF- β 1 Verhältnis, zu Gunsten des fibrogenen TGF- β 1 und führt zur Gewebefibrose (Liu 2004b). Daher richtet sich der Forschungsfokus auf die Entwicklung geeigneter Therapiekonzepte, die HGF Konzentration zu steigern, um seine protektive Wirkung in geschädigtem Gewebe zu verstärken.

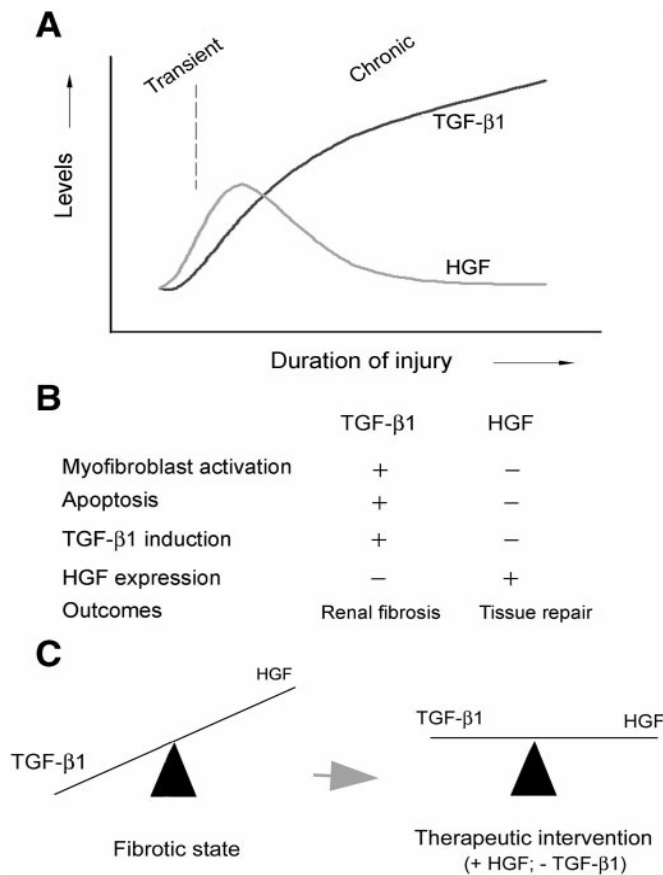


Abb. 1.3: Antagonismus zwischen HGF und TGF-β1 in der Pathogenese der Fibrose (nach Liu 2003, F9)

A: Erklärungsmodell der HGF und TGF-β1 in der geschädigten Niere. Die Dauer des Schädigungsstimulus entscheidet darüber, ob das betroffene Gewebe wieder regeneriert oder fibrosiert. Eine transiente Schädigung (gestrichelte Linie) führt zu einem TGF-β1/HGF Verhältnis, mit Übergewicht des HGF, resultierend in Geweberegeneration und – reparation. Wohingegen chronische Schädigung zu einem TGF-β1/HGF Verhältnis mit deutlichem TGF-β1 Übergewicht führt und die Fibrosierung des Gewebes zur Folge hat.

B: Funktion von TGF-β1 und HGF in fibrotischen Nieren. Das Gleichgewicht des TGF-β1/HGF Verhältnisses. (+ = fördern; - = hemmen)

C: Therapeutische Strategien renalen Fibrose. In fibrotischen Nieren ist das Gleichgewicht zwischen TGF- β 1/HGF gestört und TGF- β 1 dominiert. Daher sollten therapeutische Strategien darauf abzielen, die TGF- β 1 Aktivität zu reduzieren und/oder die HGF Konzentration erhöhen.

1.9 Fragestellung und Zielsetzung

Vorangegangene Arbeiten demonstrierten, dass sowohl die externe Gabe von HGF (Yang and Liu 2003), als auch die gesteigerte endogene HGF-Produktion (Liu et al. 2000) eine interstitielle Fibrosierung am Mausmodell verhindern kann. HGF antagonisiert die TGF- β 1 Aktivitäten. Seine renotropen Wirkungen beziehen sich auf die Stimulation der Proliferation renaler Zellen, Protektion vor Apoptose, anti-inflammatorischer Wirkung und Modulation der Matrixsynthese- bzw. -Degeneration (Liu 2006). Dabei hat HGF vermutlich einen entscheidenden inhibitorischen Effekt auf die epithelial-mesenchymale Transition (Yang J und Liu 2002). Die Verhinderung der morphologischen Umwandlung tubulärer Epithelzellen könnte eine therapeutische Option für Patienten mit chronisch progredienter Niereninsuffizienz bedeuten.

Da die interne Überexpression eines Zytokins häufig andere Wirkungen hat als die externe Gabe, konzentriert sich die hier vorgelegte Arbeit auf die Effekte der Überexpression von HGF in isolierten murinen renalen Fibroblasten und proximalen tubulären Epithelzellen in vitro.

Es wurden folgende Punkte untersucht:

- Einfluss der Überexpression von HGF auf die Proliferation von Fibroblasten und tubulären Epithelzellen
- Beeinflussung der Matrixsynthese und deren Degradation durch endogene HGF-Produktion
- Apoptoseverhalten unter HGF-Überexpression.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Analysewaage, 1213 MP	Sartorius, Göttingen
Autoclav	Tecnorma, Ruhberg
CO ₂ Inkubator Nuaire™	Nuaire, Plymoth, USA
Digiscan	ASYS Hitech GmbH, Österreich
Durchflusszytometer FACS-Claibur	Becton Dickinson, USA
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Elektrophoresesystem mit Gelkammer Mini-Protean® und Blotmodul Mini- TransBlot®	BioRad, Heidelberg
Entwicklungsmaschine Curix 60	Agfa, Leverkusen
Fluor S™-Multimager Fluoreszenzreader für Mikrotiterplatten	BioRad, Heidelberg
Gene Quant	Pharmacia Biotech, Heidelberg
Heizblock	Liebisch, Bielefeld
Kühlzentrifuge, Mikroliterzentrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
Magnetrührer (beheizbar), IKAMAG RCT	IKA Labortechnik, Staufen
Mikroskop, Axioskop	Zeiss, Oberkochen
Mikroskop, Axiovert 100 TV FL	Zeiss, Oberkochen
Mikroskop, Diavert	Leitz, Wetzlar
Mikrolumat LB 96 P	E&G Berthold, Deutschland
Nanopore Wasser-Anlage, Ultrafree 20	Millipore, Eschborn
Netzgerät Power Pack 35/75 für Blot	Phase, Viersen
Netzgerät Power Pack 1000 für Elektrophorese	BioRad, Heidelberg
pH-Meter, Calimac 766	Jürgens, Hannover

Photometer, Spectronic Genesys 5	ThermoScience, USA
Pipettierhilfe, Pipetus-akku®	Hirschmann Labortechnik, München
Spectralphotometer für Mikrotiter, MR 400	Dynatech, Deckendorf
Sterilbank, Hera Save	Heraeus, Hanau
Stickstoffbank, Chronos® Biosave®	Messer, Griesheim
Vakuumkonzentrierer BaVaCo Mini 30	Bachofer, Reutlingen
Vakuumpumpe	Baumüller, Marktdrewitz
Vortex, VF2	Jancke und Kunkel, Stauffen in Br.
Waage Sartorius excellence	Sartorius, Göttingen
Wippe RT-2S	Fröbel, Lindau

2.1.2 Gebrauchsmaterialien

Combitips plus 2,5 ml, 10 ml, steril	Eppendorf, Hamburg
Einfrierröhrchen Nunc Cryo Tube™ Vials	Nalge Nunc, Naperville USA
FACS- Röhrchen 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Falcon Zellkulturflaschen mit Luftfilter T12, T25, T75	Becton Dickinson, USA
Falcon™ Culture Slides	Becton Dickinson USA
Filterpapier 2MM	Whatmann, Wiesloch
Filterpapier für Mini-Trans-Blot® Apparatur	BioRad, Heidelberg
Glaswaren	Schott, Mainz
Mehrkanalpipette, Eppendorf, Research 300	Eppendorf, Hamburg
Mikroliterpipetten (2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Mikroliterplatten Falcon® Mikrotest™ 96	Becton Dickinson, USA
Mikroliterplatten Microlite®2, 96 Vertiefungen	Dynex Technologies, Chandilly, USA
Mikrotiterplatten Microflour 2 Black; Thermo	Labsystem, USA
Neubauer Zählkammer	Saaringia, Deutschland
Parafilm „M“	American National Can™

Pasteurpipetten	Brand, Deutschland
Pipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen 2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen 15 ml (steril), 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Röntgenfilm Kodak X-Omat	Kodak, Stuttgart
Skalpelle	pmf, Köln
Spritzen 2 ml, 5 ml, 10 ml	Braun, Melsungen
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	Sarstedt, Newton, USA
Zymographiegele 10% Gelatine	BioRad, München
12-Well Kulturplatten	Costar [®] , Cambridge

2.1.3 Chemikalien

4',6-Diamin-2'-phenyllindol-dihydrochlorid (DAPI)	Boehringer, Mannheim
Aceton	Merck, Darmstadt
Acrylamid/ Bis 30%	BioRad, München
Ammoniumpersulfat (APS)	Fluka, Buchs, Schweiz
β-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
BM-Chemiluminescence ELISA Substrat	Roche, Mannheim
Bovines Serumalbumin (BSA)	Paesel & Lorei, Hanau
Bradford Reagenz für Proteinassay	BioRad, München
Brij-35	Sigma, Deisenhofen
Bromphneolblau	Sigma, Deisenhofen
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt
Coomassie R-250	Merck, Darmstadt
Cyclosporin A	Novartis, Schweiz
Dimethylsulphoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt

Dithiotreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
DMEM-Medium	Gibco BRL, Paisley, GB
ECL + Westernblotting Detection System	Amersham Pharmacia, Braunschweig
E. coli Bakterien (XL-10 Gold, ultracompetent cells,)	Stratagene, Basel, Schweiz
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethylene-glyccol-bisN,N'N'N'-tetraacetic acid (EGTA)	Sigma, Deisenhofen
Ficoll	Sigma-Aldrich, USA
Foetales Kälberserum (FCS), US-Standard	Gibco BRL, Paisley, GB
Glycerol	Sigma, Deisenhofen
Glyzin	Sigma, Deisenhofen
Humanes Fibronectin	Sigma, Deisenhofen
Humanes Kollagentyp-I	Sigma, Deisenhofen
Hygromycin	Merck, Darmstadt
IMDM-Medium	Gibco BRL, Paisley, GB
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Kollagenase Typ VII	Sigma, Deisenhofen
Kupfer-II-Sulfat	Merck, Darmstadt
L-Ascorbinsäure	Sigma, Deisenhofen
L-Glutamat	Biochrom, Berlin
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Molekulargleichgewichtsstandard Rainbow [®] , Low Range, High Range, Full Range	Amersham, Pharmacia, Braunschweig
Mowiol	Sigma, Deisenhofen
M-Plasmocin	Paesel & Lorei, Hanau
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumdeoxycholat	Sigma, Deisenhofen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg

Natriumvanadat	Sigma, Deisenhofen
Natronlauge (NaOH) 1M	Merck, Darmstadt
Nitrozellulosemembran, Hybond ECL	Amersham Pharmacia, Braunschweig
p-Aminopopionitril	Sigma, Deisenhofen
Phenylmethansulfonsäurefluorid (PMSF)	Boehringer, Mannheim
Ponceau S	Sigma, Deisenhofen
Rinderserumalbumin (BSA)	Paesel & Lorei, Hanau
RPMI-Medium	Gibco BRL, Paisley, GB
Salzsäure (HCl) 1N	Merck, Darmstadt
Tergitol (NP-40)	Sigma, Deisenhofen
TES	Sigma, Deisenhofen
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma, Deisenhofen
Tris-Base	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Trypan-Blau	Biochrom Seromed, Berlin
Trypsin-EDTA 1x	Gibco BRL, Paisley, GB
Tween [®] 20	Boehringer, Mannheim
Wasserstoffperoxyd (H ₂ O ₂)	Merck, Darmstadt
Xylencyanoblau	Sigma, Deisenhofen

2.1.4 Antikörper

Antikörper	Anwendung	Herkunft
Anti-Kaninchen HPR	WB	Amersham Pharmacia, Braunschweig
Anti-Ziege HPR	WB	Santa Cruz Biotechnology, USA
Anti-Maus HPR	WB	Amersham Pharmacia, Braunschweig
Anti-Kaninchen-IgG-Ap	ELISA	Chemicon International, USA
Anti-Ziege-IgG-AP	ELISA	Boehringer, Mannheim

Kaninchen Anti-human-Fibronektin	ELISA, WB	Sigma, Deisenhofen
Ziege Anti- β -Aktin	WB	Santa Cruz Biotechnology, USA

2.1.5 Kit-Systeme

BD ApoAlert™ Annexin V & Apo 2.7

Bioscience Clontec, Becton Dickinson, USA

Enthält:

Annexin V-FITC (20 μ g/ml Tris-NaCl)

1 x Binding Buffer

Propidium Iodid (50 μ g/ml in 1x Binding Buffer)

Cell proliferation ELISA system (Version 2) RPN 250

Amersham Pharmacia, Braunschweig

Enthält:

5-Brom-2-deoxyurifin (BrdU) in PBS

Verdünnungslösung für Antikörper

Fixierlösung

10 x PBS als Waschpuffer

Blockier Reagenz

Tertramethylbenzidin (TMB) in 15% Dimethylsulphoxid (DMSO) (v/v)

Maus-Anti-BrdU HRP, Fab Fragmente

Quiagen® Maxi-Präparationskit

Quiagen, Hilden

Enthält:

Puffer 1

Puffer TE

Puffer 2

LyseBlue (Indikator)

Puffer 3

RNase A

Puffer QBT

Pipettenspitzen

Puffer QC

Filterpatronen

Puffer QF

Ausfällapparat

2.1.6 Allgemeine Puffer und Lösungen

Substanz	Menge
KH_2PO_4	1,44 g
Na_2HPO_4	7,59 g
NaCl	90,0 g
ddH ₂ O, pH 7,4	ad 1000 ml

Tab. 2.1: Phosphat-gepufferte Lösungen (PBS) 10x

Substanz	Menge
Tris-Base	60,5 g
NaCl	87,5 g
ddH ₂ O, pH 7,6	ad 1000 ml

Tab.2.2: Tris-gepufferte Lösung (TBS) 10x

2.1.7 EDV

Microwin TM 3.0 Software	Becton Dickinson	Microtec Laborsysteme, Overath
Gate Plus Software		Becton Dickinson, USA
Multi Analyst TM Software		BioRad, München
MC 200 Chip Software		Zeiss, Oberkochen
Statistica TM Statistik Software		Stat Soft, Hamburg

2.2 Methoden

2.2.1 Die Zellreihen TFB-HGF/-3.1 und NP1-HGF

In der vorliegenden Arbeit wurde eine proximale Tubulusepithelzelllinie (NP1) und eine murine renale Fibroblastenzelllinie (TFB) verwendet. Dabei stammen die NP1-Zellen aus isolierten Tubuli von C57BL/6J Mäusen, charakterisiert durch Immunzytochemie (Strutz et al. 2003). Die TFB-Zellen sind tubulointerstitielle Fibroblasten aus Mäusenieren (Alvarez et al. 1992). Die Etablierung HGF produzierender Zellen erfolgte in beiden Zelllinien durch stabile Transfektion eines Expressionsvektors. Das Plasmid pcDNA3.1hygro(+) ist ein 5,6 kb Vektor. Er enthält einen CMV Promotor, multiple Klonierungsstellen (forward +, reverse -) zur Erleichterung der Klonierung, ein Hygromycinresistenzgen als eukaryonten Marker und ein Ampicillinresistenzgen zur Selektionierung stabiler Zelllinien. Das Plasmid pcDNAHGF enthält einen CMV Promotor und humane HGF cDNA. Die humane HGF-cDNA (2,3 kb), die zuvor aus Placenta isoliert wurde (Hartmann et al. 1992), wurde als Insert in das BamH I-Fragment, ein Polylinker, des pcDNA3.1hygro(+) Vektors (Invitrogen), kloniert.

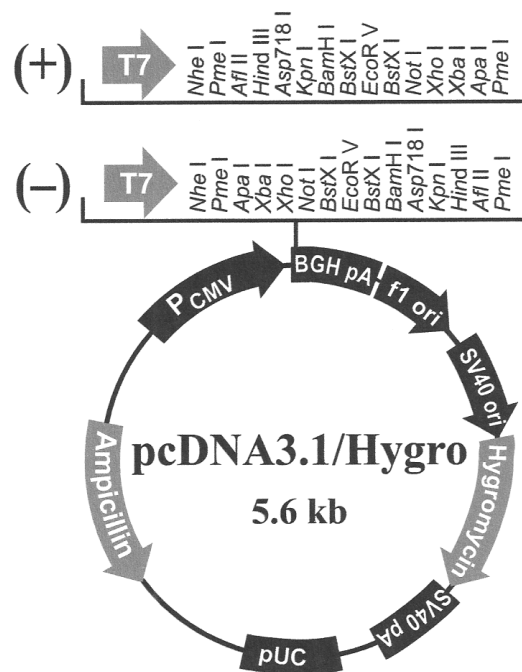


Abb. 2.1: pcDNA3.1/Hygro (+) Vector-Karte, Invitrogen, (www.invitrogen.com)

2.2.1.1 Transfomation

Für die Transformation wurden 100 µl kompetenter E. coli-Bakterien (XL-10 Gold, ultracompetent cells, Stratagene) mit 1 µl des jeweiligen Plasmids (pcDNAHGf/pcDNA3.1) für 30 min auf Eis inkubiert. Um den Durchtritt der Plasmid-DNA in die Zellen zu ermöglichen, wurde die Zellmembran zuvor durch Hitzeschock permeabel gemacht. Dafür wurden die Zellen für 35 s in 42°C warmen Wasserbad erhitzt und anschließend auf Eis für zwei Minuten heruntergekühlt. Danach wurde dem Ansatz 900 µl, auf 42°C vorgewärmtes, SOB Medium hinzugefügt und für eine Stunde auf dem Schüttler bei 230 rpm und 37°C inkubiert. Anschließend wurden je 250 µl der Bakteriensuspension auf Selektiv-Agarplatten ausgesät und bei 37°C über Nacht inkubiert. Da die Transformation nur bei einem Bruchteil der Bakterien stattfindet, werden durch die Verwendung von Hygromycin, alle nicht transformierten Zellen in ihrer Zellwandsynthese

gehemmt und an einer weiteren Vermehrung gehindert. Die transformierten Zellen sind durch das Plasmid mit dem enthaltenen Hygromycin- Resistenzgen geschützt. Die auf dem Selektiv-Agar wachsenden Bakterien haben demzufolge das Plasmid aufgenommen.

2.2.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Für die präparative Isolierung der Plasmid-DNA wurde eine Maxi-Präparation durchgeführt. Dafür wurde von der frisch ausgestrichenen Selektiv-Agarplatte mit einer sterilen Öse vorsichtig eine Bakterienkolonie entnommen. Diese wurde in 100 ml LB-Hygromycin-Medium resuspendiert und für 24 h bei 37°C im Schüttler (300 rpm) inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde danach bei 6000 rpm und 4°C für 15 min zentrifugiert. Das gewonnene Pellet wurde mit einem Quiagen® Maxi-Präparationskit (Quiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aufgearbeitet. Das Pellet wurde zunächst in 10 ml Puffer P1 Lösung (100 g/ml RNAse A, 50 mM Tris-Cl, pH 8,0, 10 mM EDTA) resuspendiert. Anschließend wurden der Suspension 10 ml Lysis-Puffer, P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) zugesetzt, der Ansatz resuspendiert und für 5 min bei RT vorsichtig geschwenkt. Nach Zugabe von 10 ml gekühltem Neutralisationspuffer P3 (3 M K-Acetat, pH 5,5) und 30 min Inkubation auf Eis, wurde die Zellsuspension auf einen QIA-Filter gegeben und bei 10 min bei RT inkubiert und anschließend der Überstand mittels Stempel durch den Filter gedrückt. Der Quiagen-Tip wurde zunächst mit 10 ml QBT-Puffer äquibriert und mit niedriger Geschwindigkeit herunterzentrifugiert. Danach wurde das Zelllysat auf die Quiagen-Tip-Säule gegeben, gewartet bis der Überstand diese gemäß der Schwerkraft durchlaufen hat und das Lysat klar war. Anschließend wurde die Säule mit 200 ml QC-Puffer gewaschen und die DNA mit 15 ml QF-Puffer eluiert. Danach wurden 70% des DNA-Eluats mit 10,5 ml Isopropanol präzipitiert, gemischt und für 30 min bei 4°C bei 30.000 rpm zentrifugiert. Nach erneutem Waschen des DNA-Pellets in 70% Ethanol und 10 min Zentrifugation (15.000 rpm) bei

4°C, wurde der Ethanolüberstand vorsichtig abgeschüttet und das Pellet für 5-10min bei RT luftgetrocknet und in 200 µl TE, pH 8,0 resuspendiert.

Die quantitative Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch in einem UV-Spektrometer über die OD₂₆₀.

2.2.1.3 Restriktion der DNA

Die Restriktion der DNA erfolgte nach Angaben der Enzymhersteller und unter Benutzung der mitgelieferten oder empfohlenen Puffer. Die eingesetzte Enzymmenge und die Dauer der Restriktion wurden dabei auf die DNA Qualität abgestimmt. Routinemäßig wurde für die analytische Restriktion eine Menge von 3 µg pcDNA –3.1 und pcDNA HGF 0,5–1 µl der entsprechenden Restriktionsenzyme verwendet. Diese wurden mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 30 µl gebracht und für 1-2 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 5x Blue Run gestoppt.

2.2.1.4 Analyse der Plasmide mittels Agarose-Gelelektrophorese

Nach der enzymatischen Restriktion wurden die DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese ermittelt. Dazu wurden die Reaktionsansätze mit 10x DNA-Probenpuffer versetzt und auf ein 0,8% Agarosegel geladen. Um die DNA-Banden durch UV-Licht-induzierte Fluoreszenz sichtbar zu machen, wurde der DNA der interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5 µg/ml zugesetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V. Als Größenstandard diente ein 1 kb Marker.

25%	Ficoll 400.000
0,4%	Xylencyanoblau
0,4%	Bromphenolblau

Tab. 2.3: 10x DNA-Probenpuffer

40 mM	Tris-Base
50 mM	EDTA
5 mM	Na-Acetat
32 mM	Essigsäure

Tab. 2.4: 1x TAE-Laufpuffer

2.2.1.5 Stabile Transfektion von TFB und NP1

Die stabile Transfektion der TFB- und NP1-Zellen erfolgte mit der Kalziumchlorid-Methode. Bei dieser Methode nutzt man die Fähigkeit der Zellen, Kalziumphosphatkristalle zu phagozytieren. Auf diese Weise kann kopräzipitierte Plasmid-DNA in die Zellen eingebracht werden. Dabei wird zunächst die freie DNA mit Kalziumchlorid behandelt, so dass zwischen der negativ geladenen DNA und der positiv geladenen Zellmembran weniger abstoßende Kräfte bestehen. Bei einem kurzem Hitzeschock (41-43°C für 60-90 s), öffnen sich die Membranen, so dass die DNA in die Zellen gelangen kann.

Für die stabile Transfektion wurden die NP1- und TFB-Zellen, je $2,5 \times 10^4$ auf 6-Wellplatten ausgesät und in 1 ml DMEM ohne Zusätze über 24h kultiviert. Vier Stunden vor der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel. 30 µg Plasmid-DNA wurden einer Reaktionlösung bestehend aus 500 µl 2,5 M CaCl₂-Lösung (2,5 M CaCl₂ 1:10 in Ampuwa) und 50 µl PBS zugesetzt und gevortext. Nach 20 min Inkubation bei RT wurde die CaCl₂-DNA Lösung unter Schwenken tropfenweise in das Kulturmedium auf die Zellen gegeben. Nach 24 h Inkubation bei 37°C im Mediumwechsel die noch im Medium verbliebene DNA/CaPO₄-Präzipitate entfernt wurden. Nach Absaugen des alten Mediums wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit 3 ml Trypsin von der Schale abgelöst, mehrfach resuspendiert und in Falcon-Röhrchen überführt. Anschließend wurden

sie für 5 min bei 1000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 7 ml Selektivmedium (DMEM + 200 µg/ml Hygromycin B) für eine Primärkultur in 75-cm²-Flaschen ausgesät. Die Subkultivierung der Zellreihen erfolgte gemäß der unter 2.2.1 beschriebenen Methode. Mittels Westernblot-Analysen und PCR wurde die Überexpression von HGF und 3.1 verifiziert.

2.2.1.6 Polymerasekettenreaktion

Die PCR ist eine in-vitro-Technik, mit deren Hilfe sich gezielte DNA-Abschnitte amplifizieren lassen (Mullis et al. 1986). Sie läuft in Zyklen ab, wobei ein Zyklus aus folgenden Schritten besteht: erstens der Denaturierung der DNA bei 94°C, zweitens der Hybridisierung der Primer mit der Einzelstrang-DNA und drittens der Taq-Polymerase-vermittelten DNA-Synthese bei 72°C. Durch Wiederholung des angegebenen Zyklus (30 bis 40x) lässt sich eine Vervielfältigung der DNA etwa um den Faktor 10⁶ bis 10⁷ erreichen. Mit Hilfe des Enzyms Reverse-Transkriptase lassen sich zusätzlich RNA-Sequenzen in cDNA umschreiben (RT-PCR), die dann wiederum mittels PCR amplifiziert werden können. Anhand dieser Methode sollte die Transfektion verifiziert und die Genexpression von HGF und GAPDH, als „housekeeping“-Gene, in NP1- bzw. TFB-Zellen bestimmt werden.

RNA Isolierung

Die NP1- und TFB-Zellen wurden zuerst in einer Konzentration von (0,7 x 10⁶/Flasche) in 25-cm²-Kulturflaschen mit DMEM/10% FCS ausgesät und über 48 h kultiviert. Nach dreimaligem Waschen der adhärennten Zellkultur mit PBS wurde je 1 ml RNA Bee den Flaschen zugefügt. Danach wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Flaschenboden abgelöst und in ein Eppendorfcup überführt. Anschließend wurden 0,2 ml Chloroform hinzugegeben, vorsichtig vermischt und 5min auf Eis belassen, dann für

15min bei 14.000 U/min und 4°C zentrifugiert. Schließlich wurde das RNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in Nuklease-freiem Wasser aufgenommen. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch (Gene Quant II, Pharmacia Biotech) anhand einer Eichgeraden bestimmt.

Für die Untersuchung der Genexpression von HGF und 3.1 wurde ein PCR-Kit (Amersham) verwendet. Oligo-dt, Superscript/RNase H und NTP's stammen von der Firma Gibco-Invitrogen. Folgende Primer wurden verwendet: HGF (396bp), R&D, UK, GAPDH (310bp); MWG, Deutschland

Die RT-PCR in wurde in folgenden Arbeitsschritten durchgeführt:

3 µg RNA + 1 µl Oligo dT + 1 µl dNTP-Mix	→ 10 min bei 70°C, dann 3 min bei 4°C
2 µl RT-Puffer + 1 µl DTT + 2 µl 25 mM MgCl ₂ + 0,5 µl RNase-Out hinzugeben	→5 min bei 42°C
1 µl Superscript/RNase H hinzugeben	→50 min bei 42°C, dann 15 min bei 70°C, dann 20 min bei 37°C

Der nachfolgende PCR-Ansatz hatte folgende Zusammensetzung:

1 µl cDNA; 5 µl PCR Puffer (10x); 1,5µl 25 mM MgCl₂; je 1 µl Sense- bzw. Antisense-Primer; 1 µl dNTP; 0,5 µl Taq-Polymerase; 39 µl Nuklease-freies H₂O.

Die PCR wurde in einem Cycler für 30-35 Zyklen wie oben beschrieben durchgeführt. Dabei wurde die Primer-Hybridisierung jeweils bei 56°C vorgenommen. Die amplifizierte cDNA wurde nun mit Hilfe eines Agarosegels (0,45 g Agarose + 30 ml TAE-Puffer + 2,5 µl Ethidiumbromid) unter 80 V Gleichspannung in TAE-Puffer (2,0 M Tris, 5,71% eiskalte Essigsäure, 0,05 M EDTA) elektrophoretisch aufgetrennt. Dafür wurde sie mit einem Probenpuffer (Bio Rad) versetzt. Als Marker wurde ein Längenstandard der Firma MBI eingesetzt. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht eingescannt (BioRad Fluor S Multimager) und densitometrisch ausgewertet.

2.2.2 Zellkultur

Das Arbeiten mit den Zellkulturen war an die von Freshney (1990) beschriebenen Methoden angelehnt. Die Zellen wurden als Monolayer - Zellkultur in 75-cm²-Flaschen in einem Brutschrank mit wasserdampfgesättigter und 5% CO₂ angereicherter Luft bei 37°C gehalten. Die kontinuierliche Kultur der NP1- und TFB-Zellen erfolgte in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM), dem 10% fötales Kälberserum (FCS), 0,5 mM/ml L-Glutamin, 0,02% Plasmocin und 200 ng/ml Hygromycin B zugesetzt wurden. Zweimal pro Woche wurden die Zellen je nach Bedarf ausgedünnt. Die für die Subkultivierung benötigten Lösungen wurden vor Gebrauch im Wasserbad bei 37°C temperiert. Sämtliche verwendeten Materialien wurden dampfautoklaviert (25 min, 120°C) und steril verpackt aufbewahrt. Vor jedem Arbeitsgang erfolgte eine Hände- und Arbeitsplatzdesinfektion mit 70%igem Ethanol. Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Zum Subkultivieren wurde das Nährmedium abgesaugt und der Zellrasen mit PBS gewaschen. Zum Ablösen vom Flaschenboden wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA bei 37°C für 4 min inkubiert. Danach wurden sie vorsichtig aus der Flasche gespült und durch langsames Resuspendieren in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Im Anschluss wurde die Zellsuspension für 3 min bei 1000 U/min zentrifugiert und das Zellpellet nach Absaugen des Überstandes mit 12 ml Kulturmedium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauerzählkammer wurden die Zellen, in der gewünschten Verdünnung (siehe Tab.2.5) in neue Kulturflaschen ausgesät.

Kulturflaschen	Zellzahl bei Aussaat:	Zellzahl bei Konfluenz	Wachstums- medium:	Trypsin zum Ablösen:
12,5 cm ³	~ 0,3 x 10 ⁶	~ 1-2 x 10 ⁶	2 – 4 ml	1,5 ml
25 cm ³	~ 0,7 x 10 ⁶	~ 3 x 10 ⁶	5 – 6 ml	2 ml
75 cm ³	~ 2,1 x 10 ⁶	~ 9 x 10 ⁶	10 - 12 ml	4 ml

Tab. 2.5: Maße und Volumina zur Subkultivierung von Zellen

2.2.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Die Kryokonservierung der Zellen erfolgte einerseits zum Schutz vor Zellverlust durch Kontamination, andererseits zur Minimierung des genetischen Drifts in kontinuierlichen Zellenlinien, sowie deren Veränderung durch Alterung und Transformation.

Hierfür wurden die Zellen zunächst abtrypsiniert und resuspendiert. Anschließend wurden 0,8 ml dieser Zellsuspension und 0,8 ml eines Einfriermediums (DMEM/FCS/DMSO 40/40/20 v/v/v) gemischt, in ein Kryoröhrchen gegeben und bei -80°C in einer Styroporschachtel eingefroren. Nach 24 h Lagerung bei -80°C folgte die endgültige Einlagerung der Zellen in einen Stickstofftank (-196°C). Der Zusatz des DMSO zum Einfriermedium erfolgte zum Schutz der Zellen vor Zerstörung durch Eiskristalle.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen kurz im Wasserbad bei 37°C angetaut. Das flüssige Medium und der Eiskern wurden dann in 10 ml gekühltes DMEM/20% FCS gegeben und durchmischt. Anschließend folgten zwei Waschschrte in Medium und die Aussaat der Zellen in 12,5-cm²-Zellkulturflaschen.

2.2.4 Untersuchung der Zellzählung

2.2.4.1 Proliferation mittels BrdU

Die mögliche mitogene Wirkung einer HGF-Überexpression auf NP1- und TFB-Zellen, wurde mit Hilfe eines BrdU-Proliferationsassay untersucht. Der BrdU-ELISA ist ein nicht radioaktiver Test, bei dem die Proliferation über den Einbau von 5'-Brom-2'-deoxy-Uridin (BrdU) in die zelluläre DNA bestimmt wird (Gratzner 1982). Die Zellen werden nach der Inkubation mit BrdU lysiert und fixiert. Über die Antikörperbindung an BrdU und anschließendem Substratumsatz, des Farbreagens Tetramethylbenzidin (TMB), wird die Menge an eingebautem BrdU im ELISA Reader bei 450 nm ermittelt. In der vorliegenden Arbeit wurde mit einem modifizierten Kit (Cell proliferation ELISA-System, Version 2, Amersham) gearbeitet. Für diesen Assay wurden die NP1- und TFB-Zellen in 96-Well Mikrotiterplatten (Microfluor 2 Black; Thermo Labsystem, USA) in Konzentrationen von 1000 Zellen pro Well ausgesät und über Nacht in DMEM/10% FCS kultiviert. Anschließend erfolgte eine 24 h Ruhigstellung der Zellen in serumfreiem Medium. Danach wurden die Zellen für 24, 48 bzw. 72 h in folgenden Medien kultiviert: DMEM/ 1% FCS und DMEM + 10% FCS, je 100 µl/Well. Alle Ansätze erfolgten in Triplets. Nach der entsprechenden Inkubation wurden die Zellen bei 37°C für 4h mit BrdU- Labellingreagenz (im Verhältnis 1:1000 mit den jeweiligen Inkubationsmedien verdünnt) inkubiert. Daraufhin wurden die Platten vorsichtig ausgeklopft und mit 200 µl/Well Fixative für 30 min bei RT beschichtet. Nach erneutem Ausklopfen der Platte, wurden die unspezifische Bindungsstellen mittels 200 µl/Well Blockierlösung (30 min bei RT) belegt. Anschließend folgte eine 90-minütige Inkubation mit dem Sekundärantikörper Peroxidase labelled anti-BrdU, der zuvor in einer Antikörper-Verdünnungslösung (Antibody-Dilution-Solution), im Verhältnis 1:100 verdünnt wurde. Nach drei weiteren Waschschrritten mit einem Waschpuffer (1:10 mit ddH₂O) erfolgte die Detektion mittels 100 µl/Well TMB (Peroxydasesubstrat). Die photometrische Messung der optischen

Dichte wurde mit Hilfe eines Digiscan (ASYS Hitech GmbH, Österreich) bei 450nm durchgeführt.

2.2.4.2 Zellzählung

Um die Ergebnisse des Proliferationsassays zu validieren, wurde die Proliferation mittels Zellzählung untersucht. Die Art der Kultivierung entsprach der des BrdU-ELISAs. Nach 24, 48 und 72 h wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA abgelöst, anschließend mit Trypan-Blau 0,5% (w/v) gefärbt und unter Verwendung der Neubauer-Zählkammer (Saaringa, Deutschland) gezählt.

2.2.5 Westernblot

2.2.5.1 Proteinisolierung

Zur Isolierung von Proteinen aus Zellkulturen wurden die Zellen ($0,7 \times 10^6$ /Flasche) zuerst in 25-cm²-Kulturflaschen mit DMEM/10% FCS ausgesät und über Nacht kultiviert. Für die Untersuchung zum Einfluss einer HGF-Überexpression auf die Bildung extrazellulärer Matrixproteine wurden die NP1- und TFB-Zellen für 48 h in DMEM mit nur 1% FCS kultiviert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 3,5 ml PBS gewaschen. Zur Proteinisolierung wurden 1,5 ml Lysispuffer, dem zuvor Phenylmethansulfonsäurefluorid zur Hemmung endogener Proteasen zugesetzt wurde, in die Kulturflaschen gegeben und für 10 min auf Eis belassen. Mittels Zellschaber wurden dann die Zellen vom Flaschenboden gelöst, das Zelllysate mittels Pipette abgesaugt, in ein 15-ml-Tube überführt und bei 4°C für 10 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Aus dem Überstand wurde mit der Methode nach Bradford (1976) die Proteinkonzentration bestimmt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm durch die Bindung von Coomassie-Blau an Proteine. Zwischen der Intensität

des gebildeten Farbkomplexes und der Proteinkonzentration besteht ein proportionaler Zusammenhang. Für die Messung wurden 50 µl Probe bzw. Lysispuffer als Leerwert, mit 2,45ml Bradford- Reagenz (1:4 in ddH₂O, filtriert) versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration am Photometer (Spectronic Genesys 5) bei 595nm gemessen und anhand einer Eichgeraden des Proteinstandards, bestimmt.

Substanz	Menge
Natriumdeoxycholat	0,4 g
Nonidet P 40	1 ml
EGTA	1,9 g
Tris 1 M, pH 7,4	1 ml
ddH ₂ O, pH 7,4	ad 100 ml

Direkt vor der Lyse: 1:500 (v/v) PMSF [3% PMSF (w/v) in Isopropanol] zusetzen

Tab. 2.6: Lysispuffer

2.2.5.2 SDS-Page-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der gewonnenen Proteine hinsichtlich ihrer Größe, wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid-Gelelektrophorese) nach Laemmli (1970) angewandt. Dabei wandern die durch SDS (Sodiumdodecylsulfat) denaturierten und negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe durch die Gelmatrix. Diese stellt ein dreidimensionales Netzwerk dar, dessen Porengröße durch den prozentualen Anteil an Polyacrylamid bestimmt wird. Die Diffusionsgeschwindigkeit der Proteine im Gel ist von ihrer relativen Molekülmasse abhängig, dementsprechend wandern kleine Moleküle schneller als grosse. Durch die Zugabe von Mercaptoethanol werden

Protein-Protein-Wechselwirkungen, durch die Öffnung von Disulfidbrücken, aufgehoben.

Substanz	Trenngel	Sammelgel
ddH ₂ O	4,8 ml	6,1 ml
1,5 M Tris HCl, pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml
10% SDS (w/v)	100 µl	100 µl
Acrylamid/Bis (30%)	2,5 ml	1,3 ml
10% APS (w/v)	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	10 µl

Tab. 2.7: Zusammensetzung der Gele

Zur Herstellung der Gele wurden die entsprechenden Lösungen frisch angesetzt und anschließend in eine vorbereitete Elektrophoreseapparatur gegossen. Damit das Gel auspolymerisieren konnte, wurde es für 30 min luftdicht mit Isopropanol überschichtet. Nach Entfernung des Isopropanols wurde das Sammelgel aufgegossen und ein Probenkamm mit 10 Taschen von oben zwischen die Glasplatten gesteckt. Zunächst wurden 50 µg der zu analysierenden Proben mit Aceton ausgefällt (10 min auf Eis) und lyophilisiert. Anschließend wurden die Pellets mit 25 µl Probenpuffer versetzt, resuspendiert und für zwei Minuten im Heizblock bei 93°C denaturiert. Im Anschluss wurden die Geltaschen, mit Hilfe einer Hamilton-Spritze, mit je 50 µg Protein beladen. Zusätzlich zu den Proben wurde ein geeigneter Molekulargewichtsstandard auf das Gel aufgetragen (Rainbowmarker™ Amersham), der zuvor im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer vermengt wurde. Die Elektrophorese fand bei 140 V in einem Mini-Protean 2 System (BioRad, München) im Eisbad statt bis das Bromphenolblau den unteren Gelrand erreicht hatte.

2.2.5.3 Elektrophoretischer Proteintransfer (Blotting)

Substanz	Menge
Tris-Base	3,30 g
Glycin	14,4 g
Methanol	100 ml
ddH ₂ O	ad 1000 ml

Tab. 2.8: Transferpuffer

Die in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden zunächst nach der Methode von Towbin et al. (1979) auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Zur Vorbereitung wurden Whatman-Filter und Nitrocellulosemembranen in der Größe des Gels zurechtgeschnitten und 15 min in Transferpuffer vorinkubiert. Anschließend wurde das zu blottende Acrylamidgel auf die Membranen gelegt. Die übereinander geschichteten Materialien wurden dann mit dem Blot-Nassmodul zusammengebaut. Nach dem Einsetzen der Blotkassette in die mit Transferpuffer gefüllte Blotkammer wurde der als Kathode fungierende Deckel der Blotkammer aufgesetzt und die Elektroden an ein Netzgerät angeschlossen. Der Transfer erfolgte über Nacht bei 30 V Gleichspannung und 4°C. Um den Erfolg des Transfers zu kontrollieren, wurde eine reversible Ponceaufärbung durchgeführt. Dazu wurden die Membranen für 10 min bei RT in Ponceau-Lösung eingefärbt und anschließend in zwei Schritten je 5 min in 5%iger Essigsäure wieder entfärbt.

2.2.5.4 Blockieren der Membranen

Damit die Antikörper spezifisch an die gesuchten Proteine binden können, müssen unspezifische Bindungsstellen blockiert werden. Hierfür wurden die Nitrocellulosemembranen über Nacht bei 4°C in einer Blockierlösung

(pH 7,4) inkubiert. Das ermöglicht, dass die Antikörper ausschließlich mit ihrem spezifischen Antigen reagieren. Dadurch werden Hintergrundsignale bei der späteren Filmentwicklung minimiert.

Substanz	Konzentration der Lösung
Magermilchpulver	5% (w/v)
Tween 20	0,2% (v/v)
in PBS, pH 7,4	

Tab. 2.9: Blockierlösung

2.2.5.5 Detektion

Das Prinzip des Western-, bzw. Immunoblots beruht auf einer immunologischen Antikörperreaktion. Dabei bindet ein primärer Antikörper an ein auf die Membran transferiertes Protein. Dieser spezifische Antikörper wird anschließend durch einen mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugierten sekundären Antikörper gebunden. Für die Inkubation der Antikörper wurde eine Antikörper-Grundlösung aus PBS und 3% BSA und eine Waschlösung, bestehend aus PBS/ 0,5% Tween 20, hergestellt. Die Membranen wurden zuerst 1 h bei RT mit einem Primärantikörper inkubiert, danach dreimal 10 min in der Waschlösung gereinigt und anschließend für 1 h bei RT mit einem Sekundärantikörper inkubiert. Im Anschluss erfolgte nochmals ein dreimaliger Waschvorgang von je 10 min.

Antigen	Spezies, Bezeichnung	Inkubation in 3% BSA/ PBS
Human Fibronectin	Kaninchen, polyklonal	1:5000
Anti- β -Aktin	Ziege, polyklonal	1:1000
Anti-human HGF	Maus, polyklonal	1:1000

Tab. 2.10: Primärantikörper

Antigen	Spezies, Bezeichnung	Inkubation in 3% BSA/ PBS
Anti-Kaninchen HRP	Esel, polyklonal	1:3000
Anti-Ziege HPR	Esel, polyklonal	1:5000
Anti-Maus HPR	Schaf, polyklonal	1:5000

Tab. 2.11: Sekundärantikörper

Im Anschluss an die Antikörperinkubation folgte die Detektion mittels „ECL⁺ Western blotting detection Kit“ (Amersham, Braunschweig) gemäß dem Protokoll des Herstellers. Die entsprechenden Signale waren nach 20-60 s auf dem Röntgenfilm sichtbar.

2.2.6 Untersuchung der extrazellulären Matrixdegeneration

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind endogene Proteasen, die die Fähigkeit besitzen, extrazelluläre Matrix, einschließlich der Basalmembranen, aufzuspalten. Sie sind an vielen physiologischen und pathologischen Gewebsumbauprozessen beteiligt. Um zu untersuchen, welchen Einfluss HGF auf die Aktivierung von MMPs hat, wurden Gel-Zymographien nach Quesada et al. (1997) durchgeführt. Dies ist eine sensitive Methode für die Bestimmung der Enzymaktivität von MMPs. In diesem Versuch werden, je nachdem welche Proteasen untersucht werden sollen, Casein- oder Gelatiningele verwendet, in denen die Proben elektrophoretisch aufgetrennt werden. Diese Gele dienen den Proteasen als Substrat und werden nach Aktivierungs-, Entwicklungs-, Färbe- und Entfärbeschritten als helle Banden im Gel sichtbar. Aus der Breite und Intensität der Banden kann man semiquantitativ auf die Proteaseaktivität der MMPs schließen. Die Identifikation der MMPs erfolgte anhand eines Zymographiemarkers und der Lage der Banden.

2.2.6.1 Bestimmung von Matrix-Metalloproteinasen

Für diesen Versuch wurden NP1- und TFB-Zellen, in einer Konzentration von 9000 Zellen/Well auf einer 12 Well-Platte in DMEM/10% ausgesät. Anschließend wurden die Zellen 24 h mit serumfreien Medium beruhigt und für weitere 48 h in 1,5 ml/Well in DMEM/ 1% FCS kultiviert. Die Mediumüberstände wurden im Anschluss in Eppendorfgefäße überführt und mittels Vakuumkonzentrierer (Ba Va Co Mini 30, Bachofer) auf ca. 1/3 ihres ursprünglichen Volumens konzentriert. Um die Volumenunterschiede ausgleichen zu können, die durch die Konzentrierung entstehen, wurde das Probengewicht vor und nach der Zentrifugation bestimmt. Anschließend wurden die Proben im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer verdünnt und auf das Gel aufgetragen. Da es in diesem Versuch um den Nachweis der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 ging, verwendeten wir 10% Gelatinegele (BioRad, München). Als MMP Standard wurde ein Gelatinase-Standard (Chemicon International, USA) verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte bei 120 V in einem Mini-Protean 2 System (BioRad, München).

Substanz	Menge	Substanz	Menge
ddH ₂ O	2,15 ml	Tris-Base	15,0 g
0,5M Tris- HCl, pH 6,8	1,25 ml	Glycin	72,0 g
Glycerol	2,50 ml	SDS	5,0 g
10% SDS	4,0 ml	ddH ₂ O, pH 8,3	ad 500 ml
1% Bromphenolblau	0,1 ml		

Tab. 2.12: Probenpuffer

Tab. 2.13: Laufpuffer

Substanz	Konzentration	Menge
Tris-Base	50 mM	6,06 g
NaCl	200 mM	11,7 g
CaCl ₂ (dehydriert)	5 mM	0,56 g
30% Brij-35	0,02%	0,67 ml
ddH ₂ O		ad 1000 ml

Tab. 2.14 **Entwicklungspuffer, pH 7,5**

Nach der Elektrophorese wurde das fertige Gel für 45 min bei 37 °C in Renaturierungspuffer (Triton X-100, Sigma, Deisenhofen) ad 1 Liter ddH₂O eingelegt und anschließend über Nacht bei ebenfalls 37 °C in Entwicklungspuffer inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Gel in einem Färbepuffer (40% Methanol, 10% Essigsäure und Coomassie-Blau R- 250 (Merck, Darmstadt) für eine Stunde bei 37 °C gefärbt und schließlich in der gleichen Lösung ohne Farbstoff bis zum Sichtbarwerden der Banden entfärbt. Zur endgültigen Aufklärung der Banden und Lagerung wurden die Gele in einen Konservierungspuffer (10% Essigsäure, 100 g Glycin, ad 1000ml ddH₂O) gegeben. Die densitometrische Auswertung erfolgte mittels Multi-AnalystTM Software und Bio Rad Fluor STM Multimanager.

2.2.7 Quantitative Bestimmung von Fibronectin und Kollagen im Zellüberstand

Mit Hilfe des ELISAs wurde untersucht, welchen Effekt die Überexpression von HGF auf die Kollagen- und Fibronectinsynthese von TFB- und NP1-Zellen hat. Hierfür wurde die Konzentration der Kollagentyp-I- und Fibronectin-Proteinsekretion in den jeweiligen Zellüberständen bestimmt (Bornstein et al. 1990). Der ELISA erfolgte in folgenden Schritten: Bindung des Fibronectins, bzw. Kollagens an eine Kunststoffmatrix, Detektion des Proteins mittels Primärantikörper, Bindung

eines AP-konjugierten Sekundärantikörpers und anschließende Chemiluminiszenzmessung.

2.2.7.1 Fibronektin ELISA

Für die Gewinnung der Überstände wurden die NP1- und TFB-Zellen (9000 Zellen/ Well) in 12 Well-Platten (Costar; Cambridge) ausgesät, über Nacht in DMEM/ 10% FCS kultiviert und am nächsten Tag in serumfreiem Medium für 24 h beruhigt. Anschließend erfolgte eine 48 h Kultivierung in 1,5 ml/Well in DMEM/ 1% FCS. Im Anschluss wurden die Zellüberstände gewonnen, im Verhältnis 1:1 mit Aqua dest. verdünnt und je 100 µl auf eine 96 Well-Mikrotiterplatte (Microlite™, Dynex Technology, USA) pipettiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Zusätzlich wurde eine Standardverdünnungsreihe (1 pg/ml-100 ng/ml rekombinantes Fibronektin, Sigma) zur Ermittlung der Standardkurve auf die Platten pipettiert. Die Auftragung der Proben erfolgte in Triplets. Am nächsten Tag wurden die Platten auf einer Unterlage ausgeklopft, für 30-40 min bei RT luftgetrocknet und zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für 1 h bei RT in PBS/ 3% Magermilchpulver inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper, Anti-Fibronektin (Sigma), 1:5000 in 10 ml PBS/ 1% BSA (1 h bei RT). Im Anschluss wurden die Platten dreimal mit PBS/ 0,05% Tween gewaschen und mit dem Sekundärantikörper, Anti- Rabbit-AP (Chemicon), 1:1000 in PBS/ 1% BSA (1 h bei RT), beschichtet. Danach erfolgte erneut ein dreimaliges Waschen mit PBS/0,05% Tween. Für die Detektion, wurden im Abstand von 4 s (in anschließender Messreihenfolge) je 100 µl/Well BM Chemilumineszenz-ELISA Substrat (Roche, Grenzach, Whylen) einpipettiert. Nach 15 min konnte die Lumineszenz im Mikrolumat LB 96 P (EG&G, Berthold, Deutschland) gemessen werden. Die Fibronektinkonzentration wurde anhand der Standardkurve durch Micro Win™ 3,0 Software (Mikrotek Laborsysteme, Overath, Deutschland) berechnet.

2.2.7.2 Kollagentyp-I ELISA

Der Einfluss der HGF-Überexpression auf die Kollagen-Synthese wurde mit Hilfe des ELISAs bestimmt. Die Arbeitsschritte des Kollagentyp-I ELISA entsprechen im Wesentlichen den unter 2.2.7.1 aufgeführten. Sie unterscheiden sich in der Verwendung anderer Antikörper: Primärantikörper (Anti-Kollagen Typ I, Southern Biotechnologies, USA), im Verhältnis 1:1000 verdünnt, Sekundärantikörper (Anti- Ziege- AP, Boehringer Mannheim, Deutschland) 1:1000 verdünnt. Als Standard diente in diesem Versuch Kollagentyp-I (rekombinant, Sigma, Deisenhofen) in der Konzentration 1 pg/ml bis 100 µg/ml.

2.2.8 Apoptoseuntersuchung mittels FITC-Annexin-V- Markierung und Durchflusszytometrie

Um den Effekt von HGF auf das Apoptoseverhalten renaler Zellen zu untersuchen, wurden FACS (Fluorescence activated cell sorting)-Analysen durchgeführt. In diesem Experiment wurde ein modifiziertes Annexin-V Kit (BD ApoAlert™ Annexin V & Apo 2,7- PE, Bioscience Clontech, USA) verwendet. TFB- und NP1-Zellen wurden in einer Konzentration von $0,7 \times 10^6$ in 25 cm³ Kulturflaschen ausgesät, über Nacht in DMEM 10% FCS kultiviert und am folgenden Tag für 24 h in serumfreien Medium beruhigt. Zur Apoptoseinduktion wurden die Zellen für 48 h mit Cyclosporin A (CsA) in den Konzentrationen 100, 500 und 1000 ng/ml stimuliert. Nach erfolgter Stimulation wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA in Suspension gebracht und zentrifugiert (4000 U/min, 5 min). Anschließend wurden sie in DMEM 10% FCS gewaschen, erneut zentrifugiert, in Bindungspuffer resuspendiert und in FACS-Probenröhrchen überführt. Im letzten Arbeitsschritt wurden die Zellen für 15 min mit Annexin V-FITC (20 µg/ ml in Tris-NaCl) und Propidiumjodid (PJ) (50 µg/ml in 1x Bindungspuffer) bei RT und Dunkelheit inkubiert. Die

Analyse der Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometer (FACS-Calibur, Becton Dickinson, USA) bei einer Wellenlänge von 488 nm.

2.2.9 Statistische Analysen

Alle Werte wurden als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. Dabei wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) der logarithmierten Daten in einem allgemein linearen Modell durchgeführt (GLM Procedure; SAS System Software) um statistische Unterschiede zwischen den als Positivkontrolle verwendeten, HGF überexprimierenden TFB- und NP1-Zellen und den als Negativkontrolle benutzten, HGF negativen TFB- und NP1-Zellen, zu ermitteln. Weitere Analysen wurden paarweise mit Hilfe des Contrast-Statements durchgeführt. Dazu wurde bei signifikanter Varianz ein F-Test durchgeführt (Positivkontrolle vs. Negativkontrolle) und mittels Holm-Prozedur für multiple Tests eine Staffelung des Signifikanzniveaus vorgenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung zum Nachweis einer HGF-Überexpression

3.1.1. PCR zum Nachweis einer HGF- und 3.1-Überexpression nach stabiler Transfektion

Um nachzuweisen, dass nach stabiler Transfektion mit pcDNA-HGF die TFB- und NP1-Zellen HGF-DNA exprimieren wurden PCR auf HGF durchgeführt. In den Zellreihen TFB-HGF und NP1-HGF konnte eine entsprechende Genexpression nachgewiesen werden

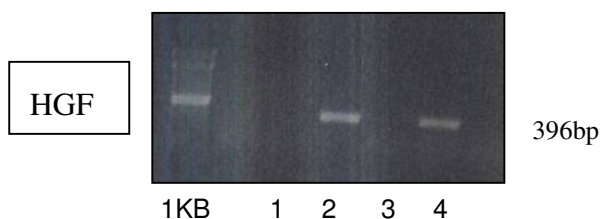


Abb. 3.1: PCR-Gelelektrophorese auf HGF- bei 1: TFB-3.1, 2: TFB-HGF, 3: NP1-3.1, 4: NP1-HGF

3.1.2. Westernblotanalysen zum Nachweis einer HGF-Proteinsekretion nach stabiler Transfektion

Zum Nachweis einer HGF-Proteinsekretion durch HGF-Überexpression, wurden aus den transfizierten Zellreihen Proteine isoliert und mittels Westernblot analysiert.

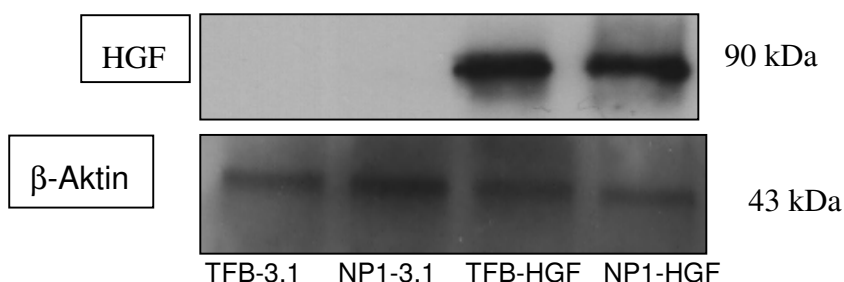


Abb. 3.2: Dargestellt ist ein Westernblot. Er zeigt die HGF-Proteinexpression der HGF-überexprimierenden Zellen (TFB-HGF, NP1-HGF). Die Kontrollzellreihen (TFB-3.1, NP1-3.1) sind für HGF negativ. Unten ist ein Westernblot auf β -Aktin der gleichen Probe abgebildet. Er dient dem Nachweis gleicher Proteinkonzentration.

3.2 Untersuchungen zum proliferativen Effekt von HGF in renalen Fibroblasten und proximalen Tubulusepithelzellen

Vorangegangene Arbeiten hatten einen proliferativen Effekt von HGF in vivo auf Tubulusepithelzellen in Modellen akuter und chronischer Nierenschädigung nachweisen können (Liu 2004b). Seine mitogene Wirkung konnte ebenfalls an anderen Zelltypen und Zellen anderer Organe bestätigt werden (Vargas et al. 2000). Eine mitogene Wirkung konnte ebenfalls an verschiedenen Zelltypen unterschiedlicher Organe bestätigt werden. In der vorliegenden Arbeit sollte die Wirkung einer HGF-Überexpression in vitro u.a. auf die Proliferation von renalen Fibroblasten und proximalen Tubulusepithelzellen untersucht werden.

3.2.1 Proliferationsmessung mit Hilfe eines BrdU-Assays

Der Einfluss von HGF auf die Mitoserate renaler Fibroblasten (TFB) und proximaler Tubulusepithelzellen (NP1) sollte mit Hilfe eines BrdU-ELISA untersucht werden. Bei diesem Test wird die Proliferation der Zellen über den Einbau von 5-Brom-2deoxy-Uridin in die zelluläre DNA bestimmt.

Hierfür wurden die HGF-überexprimierenden NP1- und TFB-Zellen auf 96-Wellplatten (1×10^3 Zellen/Well) ausgesät und für 24, 48 und 72 h kultiviert. Als Negativkontrolle dienten die mit einem Kontrollvektor transfizierten NP1- und TFB-Zellen.

Es konnte in beiden Zelllinien eine Steigerung der Proliferationsrate durch die Überexpression von HGF nachgewiesen werden. Die Proliferationssteigerung der HGF-überexprimierenden TFB-Zellen betrug in DMEM/ 1% FCS nach 24 h das 1,36fache ($136 \pm 24\%$), nach 48 h das 1,38 fache ($138 \pm 27\%$) und nach 72 h das 1,49 fache ($149 \pm 32\%$) der Negativkontrolle. In DMEM/10% FCS zeigte sich eine vergleichbare Proliferationssteigerung, nach 24 h entsprach die Zellvermehrung dem 1,41fachen ($1,41 \pm 0,13$) nach 48 h dem 1,49fachen ($1,49 \pm 0,14$) und nach 72 h dem 1,57fachen ($1,57 \pm 0,32$) der Ausgangszellzahl der Kontrolle. Eine Zeitabhängigkeit der Proliferationssteigerung konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden. Die Steigerung der Proliferation der HGF-überexprimierenden NP1-Zellen betrug in DMEM/ 1% FCS nach 24 h das 1,23fache ($1,23 \pm 0,11$), nach 48 h das 1,30fache ($1,30 \pm 0,08$) und nach 72 h das 1,38fache ($1,38 \pm 0,36$) der Negativkontrolle. In DMEM/ 10% FCS zeigte sich bei der gleichen Zellreihe eine zeitabhängige Zunahme der Proliferationssteigerung. Nach 24 h entsprach der Wachstumszuwachs der NP1-HGF Zellen dem 1,21fachen ($1,21 \pm 0,08$), nach 48 h dem 1,36fachen ($1,36 \pm 0,12$) und nach 72 h dem 1,64fachen ($1,64 \pm 0,36$) der Kontrolle.

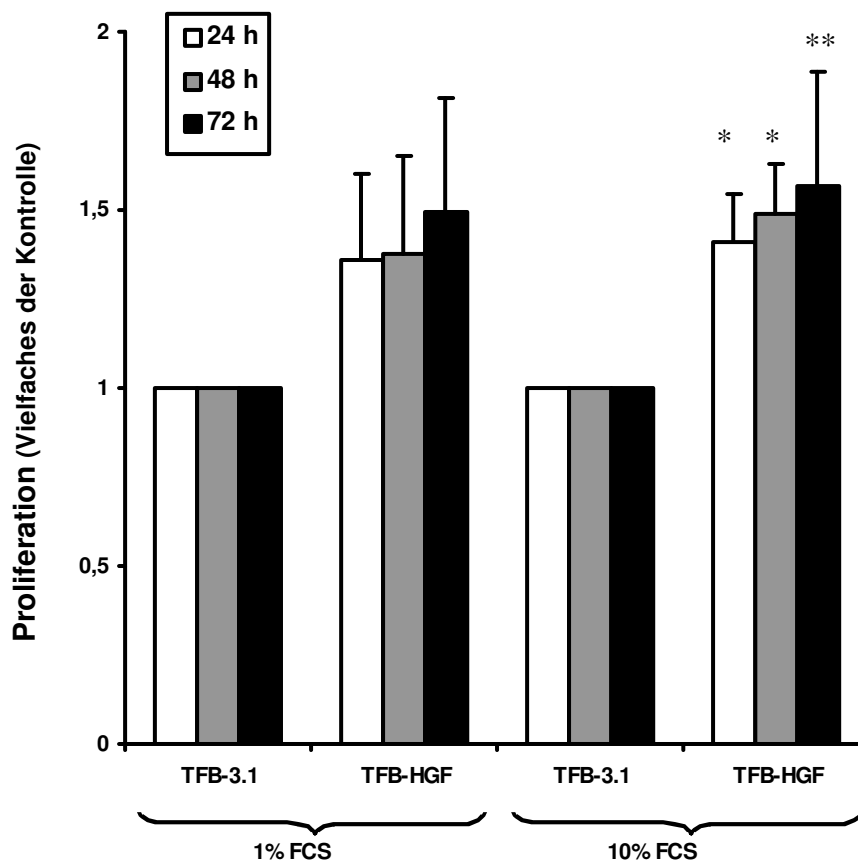


Abb. 3.3: Bestimmung der Proliferation von TFB-Zellen nach Überexpression von HGF und nach 24, 48 und 72 h Inkubation mit 1% und 10% FCS. Die TFB-3.1 Zellen dienten jeweils als Negativkontrolle (MW \pm SE, n = 5). HGF stimulierte signifikant die Proliferation der TFB-Zellen nach 24 h Inkubation. (* = $p < 0,05$ vs Negativkontrolle, ** = $p < 0.005$).

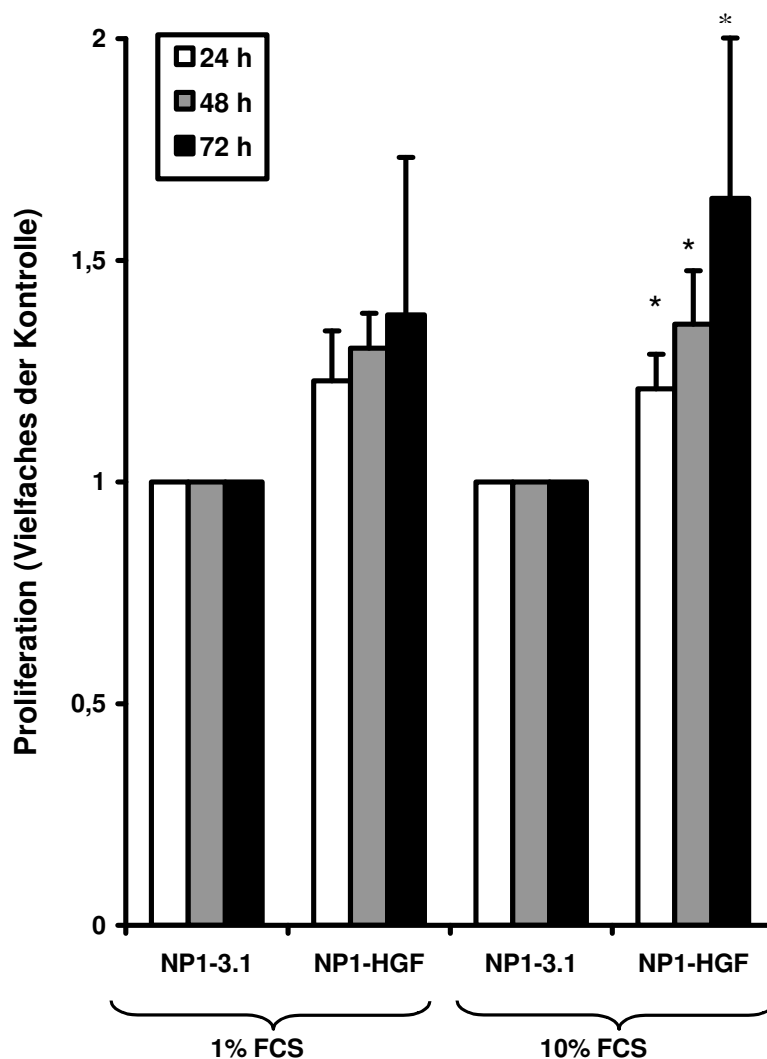


Abb.3.4: Bestimmung der Proliferation von NP1-Zellen nach HGF Überexpression und nach 24, 48 und 72 h Inkubation mit 1% und 10% FCS. Die NP1-3.1-Zellen dienen jeweils als Negativkontrolle ($MW \pm SE$, $n = 5$). In DMEM/10% FCS steigerte HGF signifikant zeitabhängig die Proliferation der NP1-Zellen gegen die Negativkontrolle (* = $p < 0,05$ vs Negativkontrolle)

3.2.2 Zellzählung mittels Trypanblau-Assay

Der im BrdU-Proliferationsassay gezeigte proliferationssteigernde Effekt von HGF auf Tubulusepithelzellen und renalen Fibroblastenzellen, sollte durch eine zweite Methodik verifiziert werden. Hierzu wurde die Zellzahl nach Stimulation für 24, 48 und 72 h mit Hilfe eines Trypanblau-Assays

bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die Zellzahl in der Tat mit den Ergebnissen des Proliferationsassays korrelierte.

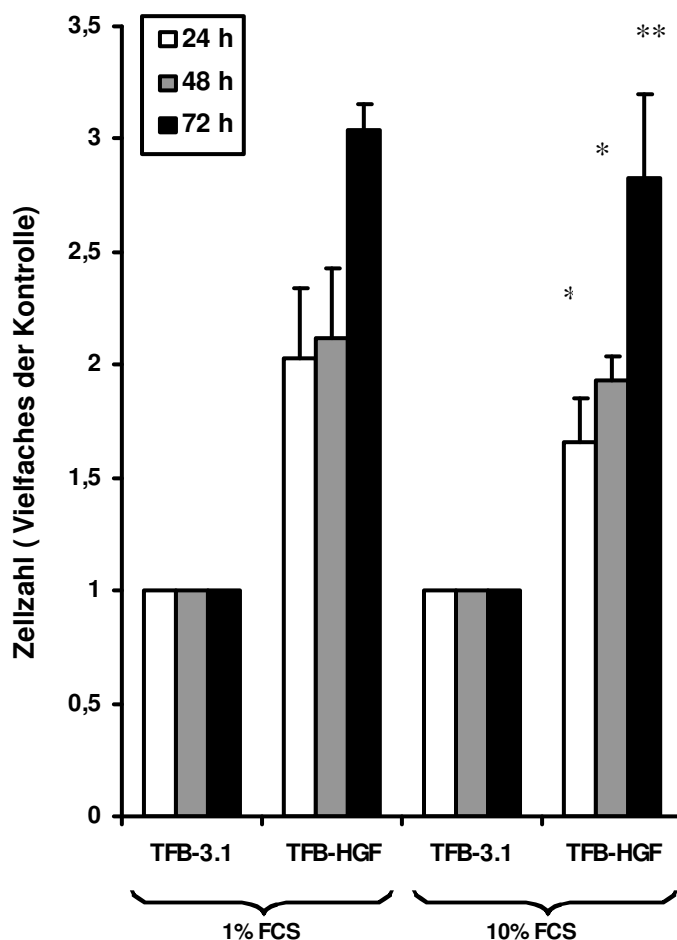


Abb. 3.5: Bestimmung der Proliferation mittels Zellzählung von TFB-HGF Zellen nach 24, 48 und 72 h Inkubation mit 1% und 10% FCS. Die TFB-3.1 Zellen dienten jeweils als Negativkontrolle ($MW \pm SE$, $n = 5$). HGF stimulierte signifikant die Proliferation der TFB-Zellen nach 24 h, 48 h, 72 h Inkubation in 10% FCS. (* = $p < 0,05$ vs Negativkontrolle, ** = $p < 0.005$).

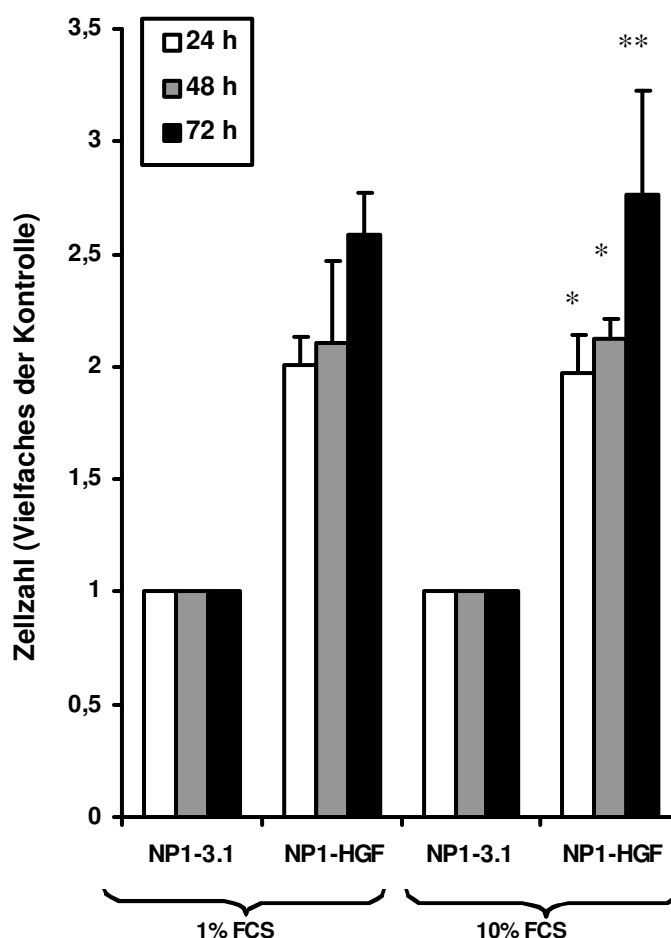


Abb. 3.6: Bestimmung der Proliferation mittels Zellzählung von NP1-HGF Zellen nach 24, 48 und 72 h Inkubation mit 1% und 10% FCS. Die NP1-3.1 Zellen dienen jeweils als Negativkontrolle (MW \pm SE, n = 5). HGF stimulierte signifikant die Proliferation der NP1-Zellen nach 24 h, 48 h, 72 h Inkubation in 10% FCS. (* = $p < 0,05$ vs Negativkontrolle, $p^* = < 0,05$, ** = $p < 0,005$).

3.3 Untersuchung zur Wirkung von HGF auf die Synthese extrazellulärer Matrixproteine

Nachdem in den Vorversuchen ein proliferativer Effekt von HGF sowohl in renalen Fibroblasten als auch in proximalen Tubulusepithelzellen gezeigt werden konnte, sollte darüber hinaus die Wirkung einer endogenen HGF-Überexpression auf die Synthese und Akkumulation extrazellulärer

Matrixproteine (ECM) untersucht werden. Die Synthese und Deposition dieser Proteine stellt neben der Proliferation und Aktivierung von Fibroblasten eines der Hauptcharakteristika der renalen Fibrogenese dar (Strutz und Neilson 2003).

3.3.1 Fibronektinsynthese

Beispielhaft für die ECM wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirkung einer HGF-Überexpression auf die Synthese von Fibronektin in proximalen Tubulusepithelzellen und renalen Fibroblasten untersucht. Fibronektin ist ein Protein der interstitiellen Matrix. Bei der renalen Fibrose spielt es eine wichtige Rolle, da es zum einen vermehrt gebildet wird. Zum anderen ist Fibronektin in der Lage den Fibrosierungsprozess durch die Induktion von TGF- β 1 (Fava und McClure 1987) und chemotaktische Wirkung auf Entzündungszellen aufrechtzuerhalten (Eddy 2000).

Ein möglicher Einfluss einer HGF-Überexpression auf die Fibronektinsynthese von Tubulusepithelzellen und renalen Fibroblasten wurde mittels Westernblot auf Proteinebene untersucht. Verglichen mit der Kontrolle bewirkte die Überexpression von HGF bei den TFB-Zellen, eine Inhibition der Fibronektinsynthese um 33,66% \pm SE(13,17). Bei den NP1-Zellen führte HGF zu einer 28,2% \pm SE(13,73) geringeren Synthese des Proteins verglichen mit den HGF negativen NP1-Zellen (NP1-3.1).

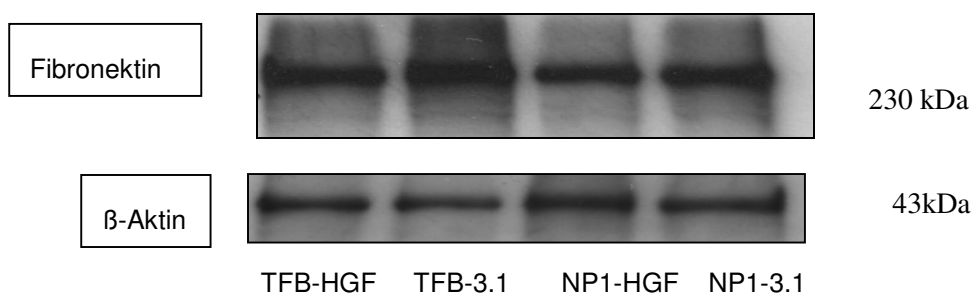


Abb. 3.7: Dargestellt ist ein repräsentativer Blot. Er zeigt die Fibronektinkonzentration der HGF überexprimierenden TFB- und NP1-Zellen, sowie der Kontrollzellreihen TFB-3.1 und NP1-3.1, nach 48 h Inkubation in DMEM 1% FCS. Im Bereich von 230 kDa finden sich die Fibronektinbanden. Unten: die gleiche Probe auf β -Aktin zum Nachweis gleicher Proteinkonzentration

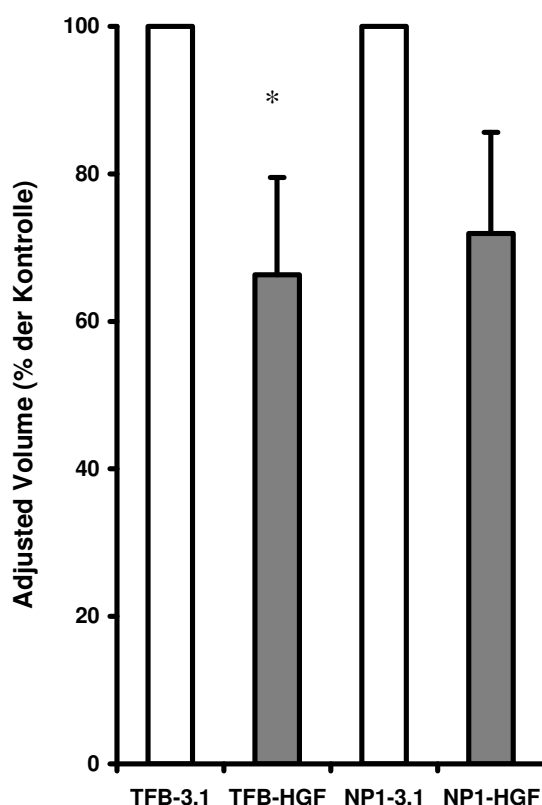


Abb. 3.8: Dichteanalyse der Fibronektinkonzentration. Inhibition der Fibronektinprotein-Synthese durch HGF-Überexpression in TFB- und NP1-Zellen nach 48 h Inkubation in DMEM/1% FCS. Als Negativkontrolle dienten TFB-3.1 und NP1-3.1. Die Werte sind als Prozent der Negativkontrolle angegeben (MW \pm SE, n = 5), (*= p < 0,05 vs Negativkontrolle)

3.4 Analyse der Sekretion extrazellulärer Markerproteine unter dem Einfluss einer HGF-Überexpression

Mit Hilfe eines semiquantitativen ELISAs wurde die Sekretion der beiden Matrixproteine, Fibronektin und Kollagentyp-I, im Überstand von HGF-überexprimierenden Tubulusepithelzellen (NP1-HGF) und renalen Fibroblasten (TFB-HGF) bestimmt. Als Negativkontrolle dienten erneut die mit einem Kontrollvektor transfizierten Zelllinien (TFB-3.1 und NP1-3.1).

Die Analysen wurden nach 48 h Inkubation in DMEM/ 1% FCS durchgeführt.

3.4.1 Effekt von HGF auf die Sekretion von Fibronectin

Wie nach den Vorergebnissen erwartet, ließ sich im Überstand der TFB-HGF Zellen eine, im Vergleich zu den TFB-3.1 Kontrollzellen, deutlich geringere Fibronektinkonzentration ermitteln. Die durchschnittliche Fibronektinsekretion der TFB-3.1 Zellen, betrug 1073,68 ng/ml, die der TFB-HGF Zellen dagegen nur 598,47 ng/ml. Damit sezernierten die HGF-überexprimierenden Zellen lediglich die Hälfte der Fibronektinmenge ($55,7\% \pm 3,1$ SE) der Kontrollzellen. Der inhibitorische Effekt der HGF-Überexpression auf die Fibronektinsekretion in den TFB-Zellen konnte als statistisch signifikant ermittelt werden. Einen vergleichbar hemmenden Effekt von HGF auf die Fibronektinsekretion zeigte sich ebenfalls in den Tubulusepithelzellen. Hier wurde im Überstand der HGF-überexprimierenden NP1-Zellen (NP1-HGF) eine durchschnittliche Konzentration von 802,59 ng/ml gemessen. Bei den NP1-3.1 Kontrollzellen hingegen wurde eine Durchschnittskonzentration von 1324,65 ng/ml ermittelt, was einer Reduzierung der Fibronektinsekretion um ca. 40% entspricht ($60\% \pm 7$ SE der Kontrolle). Die Inhibition der Fibronektinsekretion war auch bei den NP1-Zellen als statistisch signifikant nachweisbar.

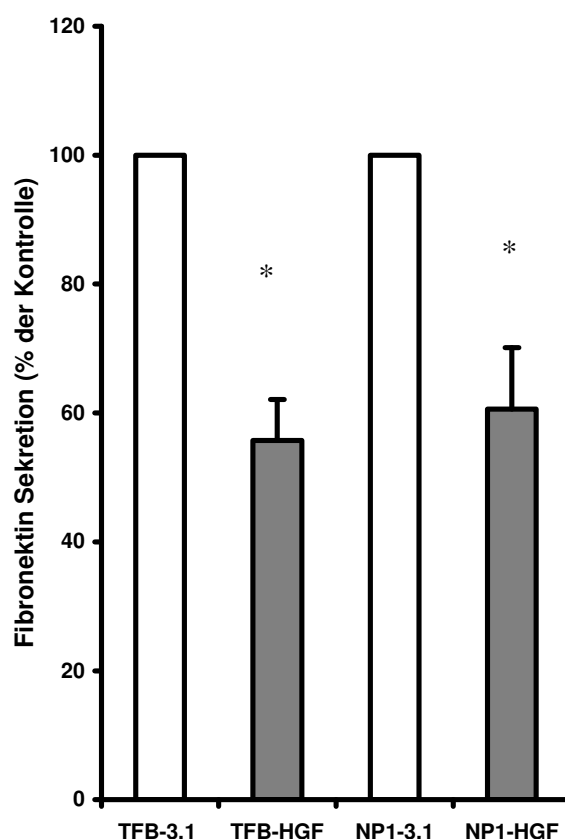


Abb. 3.9: Fibronectinsekretion von HGF-überexprimierenden TFB- und NP1-Zellen nach 48h Inkubation in DMEM/1% FCS. Detektion des Fibronectins aus den Zellüberständen mit Hilfe eines quantitativen ELISAs. Die graphische Darstellung der Daten erfolgt als Prozent der Negativkontrolle, TFB-3.1 und NP1-3.1 (MW \pm SE pro 10^3 Zellen, n = 4), (* = p < 0,005 vs Negativkontrolle)

3.4.2 Effekt von HGF auf die Sekretion von Kollagentyp-I

Analog der Experimente zur Fibronectinsekretion sollte ermittelt werden in welchem Maße die HGF-Überexpression einen Einfluss auf die Sekretion von Kollagentyp-I hat. Hierfür wurden ebenfalls ein quantitativer ELISA durchgeführt. Dabei zeigte sich ein sehr viel geringerer inhibitorischer Effekt auf die Sekretion des ECM-Proteins. So lag die Kollagentyp-I Konzentrationen im Überstand der HGF-überexprimierenden NP1- und TFB-Zellen nur gering unter denen der Kontrollzellen. Die

durchschnittliche Kollagenkonzentration der NP1-HGF Zellen lag bei $234,7 \text{ ng/ml} \pm 2,60 \text{ SE}$ vs $241,2 \text{ ng/ml} \pm 2,67 \text{ SE}$ bei den NP1-3.1 Zellen, jeweils pro 10^3 Zellen. Dieses entspricht einer 2,31% geringeren Kollagensekretion der HGF überexprimierenden Tubulusepithelzellen. Ähnlich verhielten sich die Kollagenkonzentrationsunterschiede bei den Fibroblasten, $277,91 \text{ ng/ml} \pm 2,48 \text{ SE}$ bei TFB-HGF vs $300,36 \pm 2,44 \text{ SE}$ bei TFB-3.1, jeweils pro 10^3 Zellen. Die Hemmung der Kollagensekretion durch HGF-Überexpression betrug hier ca. 7,4 % der Kontrolle.

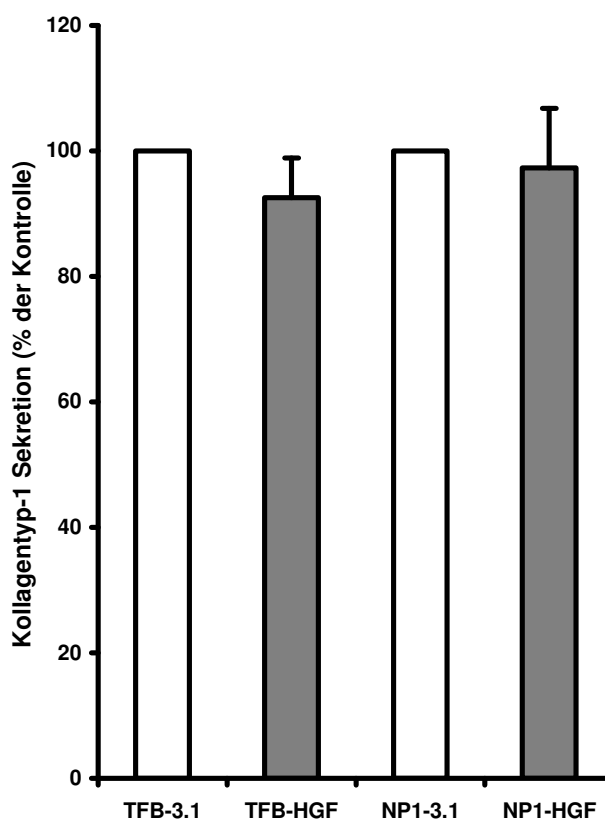


Abb.3.10: Kollagentyp-I-Sekretion von HGF-überexprimierenden TFB- und NP1-Zellen nach 48 h Inkubation mit DMEM/ 1% FCS. Detektion des Kollagentyp-I aus den Zellüberständen mit Hilfe eines quantitativen ELISAs. Die graphische Darstellung der Werte erfolgte als Prozent der Negativkontrolle, TFB-3.1 und NP1-3.1 (MW \pm SE pro 10^3 Zellen, n = 4)

3.5 Matrixdegeneration unter HGF-Überexpression

Die extrazelluläre Matrix-Homöostase unterliegt der Balance von Synthese und Degeneration extrazellulärer-Matrix-Komponenten. Dieses Gleichgewicht ist bei der renalen Fibrose gestört und führt zur exzessiven Matrixakkumulation (Liu 2006). Die extrazelluläre Matrixdegeneration wird durch eine Familie Zink- und Kalzium-abhängiger, matrixabbauender Enzyme reguliert. Sie sind als Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) bekannt (Birkedal-Hanssen 1995). Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass HGF in der Lage ist MMPs zu aktivieren und somit die Matrixdegeneration zu fördern (Liu et al. 2000).

3.5.1 Effekt von HGF auf die Aktivität der Matrix-Metalloproteinase-2 und -9

Um zu untersuchen in welchem Umfang die HGF-Überexpression einen Einfluss auf die Aktivierung von MMPs hat, wurden in der vorliegenden Arbeit Gel-Zymographien durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode kann die Enzymaktivität anhand ihrer Kollagenaufspaltung abgeschätzt werden (Quesada et al. 1997). Hierfür wurden nach 48 h Inkubation Zellkulturüberstände von TFB-HGF, NP1-HGF, sowie von den mit dem Kontrollvektor transfizierten Zellreihen NP1-3.1 und TFB-3.1 gewonnen. Eine durch HGF-Überexpression gesteigerte Enzymaktivität ließ sich bei den NP1-Zellen, sowohl für MMP-9 als auch MMP-2 nachweisen vs einer geringeren MMP-2 und MMP-9 Aktivität durch HGF-Überexpression bei den TFB-Zellen. In den Zellkulturüberständen von NP1-HGF zeigte sich eine signifikante Aktivitätssteigerung von MMP-2 um $28\% \pm 8$ SE und von MMP-9 um $34\% \pm 19$ SE im Vergleich zu den NP1-3.1 Kontrollzellen. Bei den renalen Fibroblasten schien die Überexpression von HGF einen gegenteiligen Effekt zu haben. Die von den TFB-HGF-Zellen gewonnenen

Überstände zeigten eine deutlich verminderte proteolytische Aktivität verglichen mit den Kontrollzellen TFB-3.1. Die Enzymaktivität lag für MMP-2 bei $87\% \pm 9$ SE und für MMP-9 bei $68\% \pm 12$ SE der Kontrollzellen (NP1-3.1).

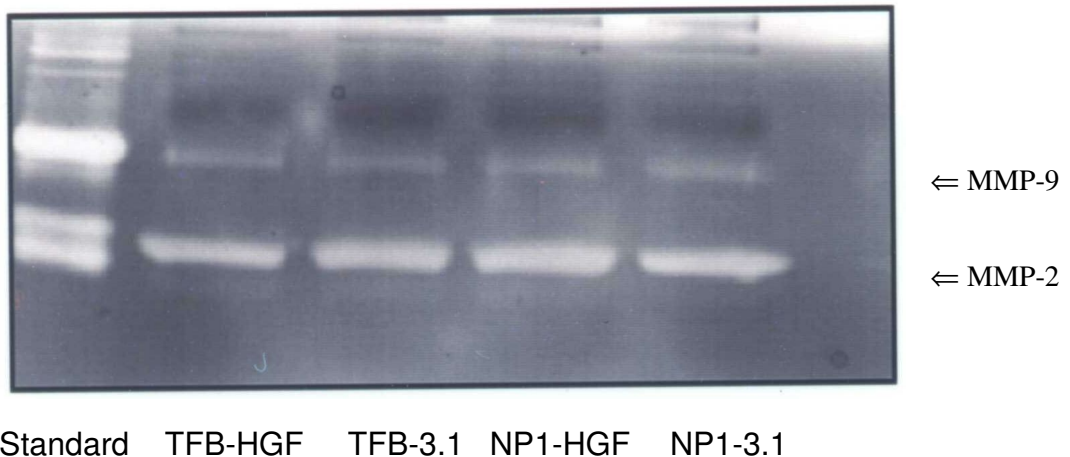


Abb. 3.11: Zymographische Analyse der MMP-2- und MMP-9-Aktivität aus Mediumüberständen kultivierter Tubulusepithelzellen (NP1-HGF, NP1-3.1) und Fibroblasten (TFB-HGF, TFB-3.1).

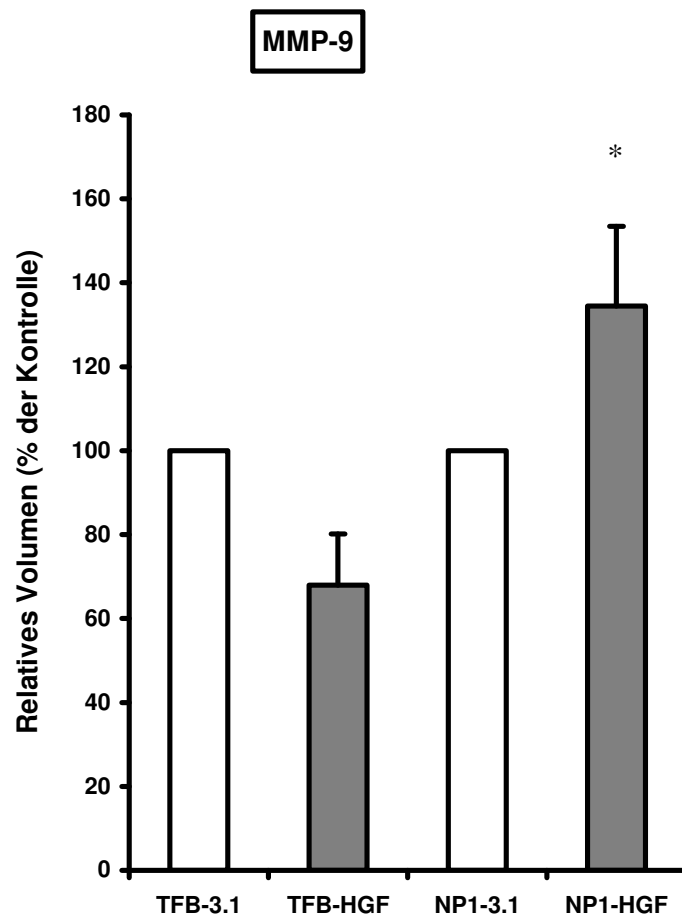


Abb. 3.12 Bestimmung der MMP-9-Enzymaktivität aus Zellüberständen HGF-überexprimierender TFB- und NP1-Zellen und den Kontrollzellreihen TFB-3.1 und NP1-3.1 nach 48 h Inkubation in DMEM/ 1% FCS. Die densitometrisch ermittelten Werte, sind als Prozent der Kontrolle angegeben (MW \pm SE, n = 5), (* = p < 0,05 vs Negativkontrolle)

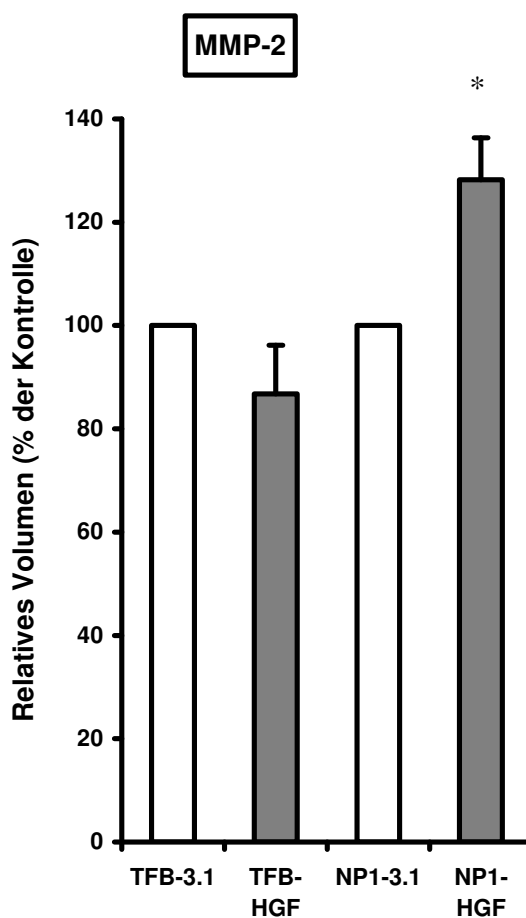


Abb. 3.13: Bestimmung der MMP-2-Enzymaktivität aus Zellüberständen HGF-überexprimierender TFB- und NP1-Zellen und den Kontrollzellreihen TFB-3.1 und NP1-3.1 nach 48 h Inkubation in DMEM/ 1% FCS. Die densitometrisch ermittelten Werte, sind als Prozent der Kontrolle angegeben (MW \pm SE, n = 5), (* = p < 0,05 vs Negativkontrolle)

3.6 Untersuchungen zum Einfluss einer HGF-Überexpression auf die durch CsA-induzierte Apoptose in renalen Fibroblasten und proximalen Tubulusepithelzellen

HGF wird unter anderem als Überlebensfaktor bezeichnet. Eine nephroprotektive und antiapoptotische Wirkung konnte in vivo an

mehreren Modellen akuter und chronischer Nierenschädigung demonstriert werden (Liu 2004).

Um eine mögliche pro- oder antiapoptotische Wirkung einer HGF-Überexpression in unseren Zellkultursystemen zu untersuchen, wurden FACS-Analysen auf Annexin durchgeführt. Hierfür wurden die HGF-überexprimierenden Tubulusepithelzellen (NP1-HGF) und Fibroblasten (TFB-HGF), sowie die als Kontrollzelllinien dienenden NP1-3.1- und TFB-3.1 Zellen mit Cyclosporin A (CsA) behandelt. Die CsA-Inkubation erfolgte für 48 h in der Dosierung 100, 500 und 1000 ng/ml. Nach anschließender Markierung mit Annexin und Propidiumjodid konnten die apoptotischen Zellen mittels FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) –Analyse detektiert und gezählt werden. Unter der CsA-Stimulation kam es in allen Zelllinien zur Apoptoseinduktion. Diese fiel bei den HGF-überexprimierenden Zellen geringer aus als bei den Kontrollzellen. Jedoch ließ sich bei der Auswertung keine eindeutige konzentrationsabhängige Apoptoserate eruieren. Die hier ausgeführte Auswertung bezieht sich auf die Messergebnisse der Versuchsreihe, bei der die Zellen für 48 h mit 500 ng/ml Cyclosporin A behandelt wurden. Die Ergebnisse zeigten bei den HGF-überexprimierenden Fibroblasten (TFB-HGF) eine 42,3% ($57,7\% \pm 3,12$ SE, als % der Kontrolle) geringere Apoptoserate, gegenüber der Negativkontrolle TFB-3.1. Bei den HGF-überexprimierenden Tubulusepithelzellen (NP1-HGF) ließ sich eine um 58,7% ($41,3\% \pm 4,4$ SE, als % der Kontrolle) geringere Apoptoserate nachweisen als bei den Kontrollzellen NP1-3.1. Aus diesem Versuch wird eine protektive, bzw. antiapoptotische Wirkungsweise von HGF deutlich. HGF inhibierte sowohl bei den Tubulusepithelzellen als auch bei den Fibroblasten die durch Cyclosporin A-induzierte Apoptose.

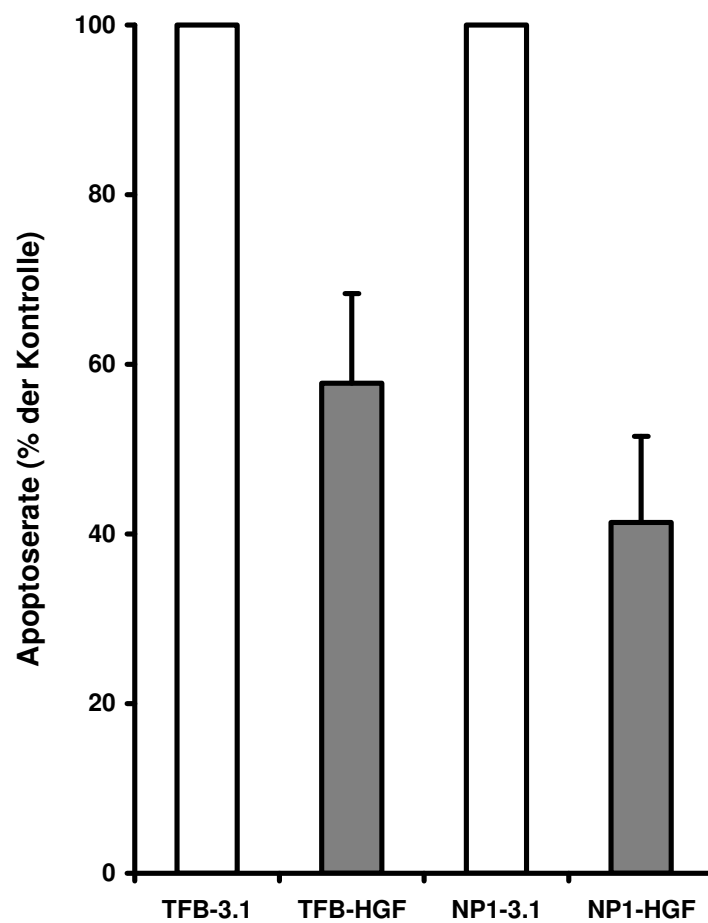


Abb. 3.14: Bestimmung der Apoptoserate von TFB-HGF und NP1-HGF und ihrer Kontrollzellreihen, TFB-3.1 und NP1-3.1, nach 48 h CsA-Stimulation 500 ng/ml. Die Werte sind als Prozent der Kontrolle angegeben (MW \pm SE, n = 3), (*= p < 0,005 vs Kontrolle).

4 Diskussion

Die chronische Niereninsuffizienz ist auch heute noch eine Erkrankung mit limitierten therapeutischen Möglichkeiten. Unabhängig von der primären Ätiologie der Nierenerkrankung führt die chronische Schädigung renaler Zellen zu einem progressiven Organumbau, der durch interstitielle Fibrose, tubuläre Atrophie und Glomerulosklerose geprägt ist (Liu 2006). Die Schädigung der tubulointerstitiellen Zellen induziert die Infiltration von Makrophagen und fördert über die Freisetzung profibrogener Zytokine, die Differenzierung residenter Tubulusepithelzellen und Fibroblasten zu Myofibroblasten. Dieser als Epithelial Mesenchymale Transition (EMT) bezeichnete Mechanismus spielt eine wichtige Rolle für die Resolution und Progression chronisch renaler Erkrankungen (Strutz und Neilson 2003). Während der EMT kommt es zur phänotypischen Umwandlung epithelialer Zellen zu Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften (Liu 2004). Dabei verlieren die Zellen ihre epitheliale Polarität und zelluläre Integrität, bedingt durch den Verlust ihrer ursprünglichen Zell-Zell-Kontakte (Zeisberg und Kalluri 2004). Zusätzlich führen Veränderungen in der Aktinstruktur des Zytoskeletts zur de-novo-Expression von *α -smooth muscle actin* (α -SMA), was die zelluläre Migrationsfähigkeit steigert. Durch die Zerstörung der tubulären Basalmembran (TBM) migrieren die zu Myofibroblasten aktivierten Zellen ins Interstitium, wo sie zu einer vermehrten Matrixsynthese beitragen (Wahab und Mason 2006) und schließlich zur fortschreitenden Zerstörung der Organstruktur und terminaler Niereninsuffizienz führen. Die EMT wird durch eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Metalloproteinasen (MMP) reguliert, die die Zerstörung der TBM in unterschiedlichem Ausmaß bewirken. Zu den wichtigsten EMT-fördernden Wachstumsfaktoren gehören CTGF und TGF- β 1. Diesen wirken die gegensinnig regulierten renotropen Wachstumsfaktoren HGF und BMP7 entgegen.

Vorangegangene Studien zeigten, dass eine Reduktion der TGF- β 1/CTGF Konzentration oder hohe Konzentrationen an HGF/ BMP7 zu einer Krankheitsregression führen können. Daher erhofft man sich, dass der therapeutische Einsatz antifibrotischer Agenzien eine effektive Strategie darstellt, die pathologische ECM-Ablagerung zu inhibieren und die fibrogenen Mechanismen zu modifizieren. HGF hat multiple biologische Aktivitäten in einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen, einschließlich renalen Tubulusepithelzellen, Fibroblasten, Endothelzellen und Mesangiumzellen. Es ist ein physiologischer Mediator für Geweberegeneration, der während akuter Schädigung und in frühen Stadien chronischer Schädigungsprozesse vermehrt exprimiert wird. Bei anhaltender Gewebeschädigung nimmt die Konzentration an HGF ab und Wachstumsfaktoren mit antagonistischer Wirkung werden überexprimiert. Dies verändert das Gleichgewicht zwischen HGF und profibrotischen Faktoren und verschiebt es zu Gunsten der Letzteren (Liu 2004). Daraus resultiert im weiteren Verlauf eine exzessive Matrixsynthese sowie -akkumulation und damit einhergehend eine progressive Fibrose. HGF besitzt mitogene, motogene und morphogene, sowie antiapoptische und antiinflammatorische Eigenschaften (Liu und Yang 2006). Die Verabreichung des HGF-Proteins als subkutane oder intravenöse Injektion führt zu einer beschleunigten Regeneration nach akuter Nierenschädigung und verzögert die renale Fibrose chronisch geschädigter Nieren (Yang J und Liu 2002). Die klinische Anwendung von exogenem HGF ist nicht unproblematisch, da HGF nur über eine kurze Halbwertszeit verfügt (Kawaida et al.1994) und die HGF-Gaben häufig wiederholt werden müssen. Die Gentherapie stellt eine effektive und ökonomisch vertretbare Alternative dar die Konzentration an exogenen und endogenen HGF zu erhöhen (Liu 2006). Die Folgen der systemischen HGF-Applikation und Wirkungen anhaltender und unphysiologisch hoher HGF-Konzentrationen auf peripheres Gewebe sind noch nicht ausreichend erforscht und müssen kritisch betrachtet werden. Takayama et al. (1997a) beschrieben an transgenen Mäusen mit diffuser HGF-

Überexpression unerwünschte morphologische und funktionelle Veränderungen, wie Glomerulosklerose, tubuläre Hyperplasie und polyzystische Merkmale, sowie eine erhöhte Inzidenz an Tumorentwicklung. In dem von Fiaschi-Taesch et al. (2004) entwickelten transgenen Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die gezielte Überexpression von HGF in proximalen Tubulusepithelzellen keinen nachteiligen Einfluss auf die Entwicklung und Funktion normaler Nieren nimmt und vor akut-ischämisch bedingtem Nierenversagen schützt. Um den Effekt der HGF-Überexpression in renalen Zellen weiter zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit in-vitro-Analysen an nativen proximalen Tubulusepithelzellen und interstitiellen Fibroblasten durchgeführt.

4.1 HGF fördert die Proliferation proximaler Tubulusepithelzellen und renaler Fibroblasten

Während der renalen Fibrogenese kommt es vornehmlich durch TGF- β 1 getriggert zu einem vermehrten Untergang tubulärer Epithelzellen via Apoptose. Die daraus resultierende tubuläre Atrophie ist eines der histologischen Charakteristika der tubulointerstitiellen Nierenfibrose (Strutz und Neilson 2003). An unterschiedlichen Modellen der chronischen Nierenschädigung konnte die antagonistische Wirkungsweise von TGF- β 1 und HGF auf die Regulation von tubulärer Proliferation und Apoptose nachgewiesen werden (Liu 2004). So führt die akute Gewebeschädigung kurzzeitig zur vermehrten HGF-Sekretion und gesteigerter tubulärer Proliferation. Bei anhaltender Schädigung nimmt sowohl die Proliferationsrate als auch die Konzentration an endogenem HGF ab, im Gegenzug dazu steigt die Konzentration an TGF- β 1. Die Neutralisation von endogenem HGF bewirkt ein reduziertes tubuläres Wachstum und eine gesteigerte TGF- β 1 Expression. Andererseits bewirkt

die Gabe von exogenem HGF eine gesteigerte tubuläre Proliferation und vermindert die TGF- β 1 Konzentration (Mizuno et al. 2000, 2001).

Um den direkten Einfluss einer HGF-Überexpression auf die Proliferation von proximalen Tubulusepithelzellen (NP1-HGF) zu untersuchen, führten wir Proliferationsanalysen durch. Mittels Bromdeoxyuridin-Inkorporation konnten wir demonstrieren, dass die Überexpression von HGF die Mitoserate der proximalen Tubulusepithelzellen (NP1-HGF) steigert. Die Proliferationsrate der HGF-überexprimierenden NP1-Zellen war bis zu 1,3fach gegenüber den Kontrollzellen (NP1-3.1) gesteigert. Zur Validierung der Ergebnisse der BrdU-Proliferationsassays wurden Zellzählungen durchgeführt.

Diese Ergebnisse zur endogenen HGF-Überexpression bestätigen Arbeiten von Miller et al. (1994) und Kawaida et al. (1994) die an einem Modell der akut ischämischen und akut toxischen Nierenschädigung nachweisen konnten, dass die Verabreichung von rekombinantem HGF die Regeneration und Proliferation von Tubulusepithelzellen fördert. Die Arbeitsgruppe von Dai et al. (2002) demonstrierte an Mäusen mit akuter Nierenschädigung, dass die intravenöse Injektion eines HGF-Gen enthaltenden Plasmids, die Tubulusepithelzellen vor Apoptose schützt und deren Proliferation und Regeneration fördert. Dieser mitogene Effekt von HGF konnte ebenfalls an Modellen chronischer Nierenschädigung nachgewiesen werden. Beispielsweise zeigte die Arbeitsgruppe von Gao et al. (2002) am Modell der chronisch obstruktiven Nephropathie, dass mittels HGF-Gentherapie die Proliferation von Tubulusepithelzellen gesteigert wird. Das lässt vermuten, dass unter pathologischen Bedingungen, HGF durch die Proliferationsinduktion tubulärer Epithelzellen zum Erhalt der zellulären Integrität und der Organarchitektur beitragen kann.

Zusätzlich zu den Proliferationsanalysen an proximalen Tubulusepithelzellen wurde der direkte Einfluss einer HGF-Überexpression auf die Proliferation von interstitiellen Fibroblasten (TFB-HGF) untersucht. Mittels Bromdeoxyuridin-Inkorporation konnte gezeigt

werden, dass die Überexpression von HGF ebenfalls die Mitoserate der renalen Fibroblasten (TFB-HGF) steigert. Verglichen mit den Kontrollzellreihen war die Proliferationsrate bis zu 1,49fach gesteigert. Zur Validierung der Ergebnisse wurden erneut Zellzählungen durchgeführt, die die Ergebnisse der BrdU-Inkorporation bestätigten.

Es gibt mehrere Mechanismen, die die Fibroblastenaktivierung bewirken, eine davon ist die parakrine Stimulation durch profibrogene Wachstumsfaktoren wie z.B. TGF- β 1, PDGF oder FGF-2 (Zeisberg et al. 2001). Anhand unserer Ergebnisse lässt sich die Frage ableiten, in wie weit die Überexpression von HGF einen profibrogenen Stimulus für TFB-Zellen darstellt. Bedingt die anhaltende autokrine HGF-Stimulation eine kontinuierliche, nicht limitierte Fibroblastenproliferation und begünstigt demzufolge die Fibrosierung des renalen Gewebes? Da die Fibrogenese nicht nur von der gesteigerten Zellproliferation abhängig ist, sondern ebenfalls durch die exzessive Matrixakkumulation und verminderte Matrixdegeneration bestimmt wird, untersuchten wir des weiteren den Effekt der HGF-Überexpression auf die Bildung extrazellulärer Matrixproteine und Aktivität von Matrix degenerierenden Proteasen.

4.2 HGF hemmt die Produktion extrazellulärer Matrixproteine

In den letzten Jahren demonstrierten zahlreiche Studien das antifibrotische Potential von HGF. So konnte an Modellen akuter und chronischer Nierenerkrankungen gezeigt werden, dass sowohl endogenes HGF als auch die Verabreichung von exogenem HGF-Protein die renale Fibrosierung reduziert und den renalen Funktionsverlust verzögert (Liu 2004). Die exzessive Akkumulation extrazellulärer Matrixkomponenten ist das zentrale Ereignis der interstitiellen Fibrose. Sie ist begleitet von tubulärer Atrophie und Expansion des interstitiellen Raumes und mündet in der Destruktion der physiologischen Gewebsarchitektur mit

einhergehendem renalen Funktionsverlust. Kollagentyp-I, -III, -IV, -V, -VII, -XV, Fibronektin und Laminin gehören dabei zu den für die Fibrogenese relevantesten Matrixproteinen (Eddy 2000). Fibronektin ist ein Matrixprotein, das wichtig für die Zellmigration, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen ist. Darüber hinaus ist es in der Lage die Expression von TGF- β 1 zu induzieren (Fava und McClure 1987) und chemotaktisch zu wirken (Eddy 2000). Kollagentyp-IV ist in der gesunden Niere eine der Hauptfaserkomponenten der interstitiellen Matrix und der tubulären Basalmembran (Eddy 2000). Im Rahmen der renalen Fibrogenese wird Kollagen vermehrt von aktivierten Fibroblasten, d.h. Myofibroblasten gebildet. Bei der interstiellen Fibrose stellen neben Fibronektin verschiedene Kollagene den größten Anteil der ECM-Komponenten dar (Strutz und Müller 2000).

Um herauszufinden, welchen Effekt eine HGF-Überexpression auf die Bildung extrazellulärer Matrixkomponenten durch renale Fibroblasten und proximale Tubulusepithelzellen hat, wurden Analysen zur Synthese und Expression von Fibronektin durchgeführt. Hierfür wurden die jeweiligen Zellen 48 h kultiviert und anschließend die Fibronektinexpression mittels Westernblot analysiert bzw. ergänzend die Fibronektinsekretion aus dem Überstand mit einem ELISA gemessen. Anhand dieser Experimente konnte gezeigt werden, dass eine HGF-Überexpression die Fibronektinsynthese und -sekretion, sowohl in renalen Fibroblasten, als auch in proximalen Tubulusepithelzellen inhibiert. Die Fibronektinexpression wurde bei den TFB-Zellen um ca. 34% und bei den NP1-Zellen um 28%, verglichen mit den HGF negativen Kontrollzellen supprimiert. Die Fibronektinsekretion wurde noch deutlicher, nämlich um 44% bei den TFB-Zellen und 39% bei den NP1-Zellen reduziert.

Diese Ergebnisse stützen die Beobachtungen zur progressiven Fibronektinexpression in einem Modell der chronisch obstruktiven Nierenerkrankung. In diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sowohl eine intravenöse Gabe von HGF-Protein (Yang J und Liu

2003) als auch die Injektion eines HGF-Gen enthaltenden Plasmids (Yang J et al. 2001) die Fibronectinexpression um bis zu 48% unterbinden kann. Ergänzend wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss einer HGF-Überexpression auf einen weiteren wichtigen Bestandteil der ECM, dem Kollagentyp-I, untersucht. Hierbei zeigte sich lediglich ein geringer suppressiver Effekt von HGF auf die Sekretion von Kollagentyp-I, sowohl durch die Tubulusepithelzellen (8%) als auch durch die renalen Fibroblasten (3%).

Unsere Beobachtungen konnten daher vorliegende Untersuchungen zur verminderten Kollagentyp-I Synthese an einem Modell der obstruktiven Nierenschädigung nicht bestätigen. Diese Studien zeigten eine Reduktion der Kollagentyp-I Akkumulation um ein Drittel, sowohl durch Injektion eines HGF-Gen enthaltenden Plasmids (Yang J et al. 2001), als auch durch nachträgliche systemische Gabe eines HGF-Proteins (Yang J und Liu 2003).

In dem hierfür verwendeten Tiermodell war die Induktion der Nierenfibrose durch operative Obstruktion der Ureteren erfolgt. Infolgedessen nach Ausschüttung verschiedener Mediatoren (TGF- β 1), eine Umwandlung der renalen Fibroblasten und damit eine gesteigerte Sekretion von extrazellulären Matrixproteinen stattfand. Diese stimulierte Umwandlung sowohl der Tubulusepithelzellen, als auch der renalen Fibroblasten lässt sich jedoch in dem vorliegenden Zellkultursystem nicht simulieren, so dass der inhibitorische Effekt von HGF auf die ECM-Synthese zwischen den beiden Systemen nicht komplett vergleichbar ist. Hierbei ist positiv hervorzuheben, dass im vorliegenden Fall der HGF-Überexpression die Fibronectinproduktion ohne einen fibrogenen Stimulus gehemmt wurde, so dass man annehmen kann, dass eine HGF-Überexpression die Fibronectinsynthese auch im Falle eines profibrogenen Stimulus unterdrückt, bzw. die Schwelle, die zu einer vermehrten Fibronectinsynthese führt, hochsetzt.

4.3 Matrixdegeneration – Induktion und Inhibition von MMP-2 und MMP-9

Die Matrixhomöostase befindet sich physiologischer Weise in einer Balance zwischen Matrixproduktion und -Abbau. Es wird angenommen, dass die exzessive Matrixablagerung, wie sie in fibrotischen Nieren zu finden ist, zum einen durch eine Überproduktion an Matrixkomponenten und zum anderen durch ihren mangelnden Abbau verursacht ist. Physiologischerweise produziert das Nierengewebe eine Vielzahl von Proteasen mit proteolytischer Funktion. Dabei spielen das Plasminogen/Plasmin- und das MMP-System eine wichtige Rolle. Sie sind in der Lage die verschiedenen Matrixproteinkomponenten abzubauen (Liu 2006). In zahlreichen Untersuchungen konnte eine erhöhte Konzentration an Plasminogen Aktivator Inhibitor-1 (PAI-1) und Gewebeinhibitoren von MMP-1 (TIMP) in geschädigten Nieren nachgewiesen werden (Jernigan and Eddy 2000, Shamara et al. 1995). Die MMPs gehören zu einer Großfamilie von mindestens 13 Enzymen, die sich durch ihre Substratspezifität voneinander unterscheiden. Sie werden von Fibroblasten, Endothel-, Epithelzellen und anderen Zellen, wie z.B. Tumorzellen gebildet und als inaktive Proenzyme in den extrazellulären Raum sezerniert, wo sie anschließend von anderen Proteasen aktiviert werden (Löffler und Petrides 1998). Von HGF als Zytokin mit antifibrotischem Potential erhoffte man sich, dass es den Matrixkatabolismus dahingegen modifiziert, dass es in bereits fibrotischen Nieren den Matrixabbau stimuliert und revidiert. Die Arbeitsgruppe von Gong et al. (2003) demonstrierte, dass HGF den Matrixabbau fördert, indem es sowohl Plasminogen/Plasmin, als auch MMP-Mechanismen beeinflusst. Dworkin et al. (2004) wiesen an 2/3 nephrektomierten Ratten nach, dass die Verabreichung von exogenem HGF zu einer vermehrten Expression von MMP-9 und Reduktion von TIMP-2 und PAI-1 führt. Daraus folgerte man, dass HGF durch die Aktivierung

matrixdegradierender Proteasen den Prozess der Fibrosierung und Matrixablagerung verlangsamen kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung einer HGF-Überexpression auf die Induktion bzw. Inhibition einer Matrixdegeneration beispielhaft anhand der Aktivität der Metalloproteinasen-2 und -9 untersucht. Hierfür wurden proximale Tubulusepithelzellen und renale Fibroblasten mit und ohne HGF-Überexpression für 48 h kultiviert, die Überstände abgenommen und die proteolytische Aktivität von MMP-2 und -9 gelzymographisch analysiert. Hierbei konnte für die proximalen Tubulusepithelzellen eine Aktivitätssteigerung von MMP-2 (um 28%) und MMP-9 (um 34%) durch HGF nachgewiesen werden. Bei den Fibroblasten bewirkte HGF eine verminderte Aktivität von MMP-2 (um 13%) und MMP-9 (um 32%). Die Beobachtungen zur Steigerung der proteolytischen Aktivität von MMP-9 durch HGF in einem renalen Epithelzellkultursystem bestätigen Untersuchungen von Liu et al. (2000). Diese konnten eine 8-fache Steigerung der MMP-9 Expression nach 48 h Behandlung mit einem rekombinanten HGF in einem HKC-Zellsystem zeigen. Im Gegensatz zur MMP-9 Expression ließ sich dort keine Steigerung von MMP-2 nachweisen, was jedoch auch auf die verschiedenen Zellkultursysteme zurückzuführen sein kann. Der Unterschied in der Wirkung einer HGF-Überexpression auf die MMP-2/9 Aktivität zwischen den renalen Fibroblasten und den Tubulusepithelzellen lässt sich aufgrund der unterschiedlichen Zellarten erklären. So kann im Fall der renalen Fibroblasten eine HGF-Überexpression die verschiedenen Wege der MMP-Aktivierung inhibieren bzw. die Inhibitoren aktivieren.

Die Bedeutung matrixdegenerierender Enzyme in Bezug auf die Reduktion von Matrixablagerungen und damit Limitierung der Fibrogenese, wird anhand neuer Studien kontrovers diskutiert. Yang und Mitarbeiter (2002) demonstrierten an knock-out Mäusen für Tissue Plasminogen Activator (tPA), dass der pathogene Effekt von tPA in der Induktion von MMP-9 liegt. MMP-9 ist am Abbau von Kollagentyp-IV

beteiligt, dass den wichtigsten Bestandteil der tubulären Basalmembran darstellt. MMP-9 und MMP-2 sind am Abbau der TBM beteiligt und bilden zusammen mit einigen Wachstumsfaktoren, wie TGF- β 1 die Hauptinduktoren der EMT (Zeisberg und Kalluri 2004). Durch die Zerstörung der strukturellen und funktionellen Integrität der Basalmembran wird vermehrt TGF- β 1 gebildet, was wiederum die Aktivierung von interstitiellen Fibroblasten und Tubulusepithelzellen zu Myofibroblasten begünstigt. Diese können die geschädigte Membran passieren und in das Interstitium migrieren, wo sie zur vermehrten ECM-Synthese und Ablagerung beitragen. Unter dem Aspekt der EMT-Induktion durch verstärkte MMP-Aktivität könnte eine HGF-Überexpression durch eine zusätzliche Aktivierung der MMPs die Degeneration der tubulären Basalmembran fördern und den Fibrosierungsprozess damit unterstützen.

4.4 HGF schützt Tubulusepithelzellen und renale Fibroblasten vor Cyclosporin-A-induzierter Apoptose

Cyclosporin A ist derzeit eines der am häufigsten eingesetzten Immunsuppressiva. Es wird neben der Therapie von Autoimmunerkrankungen wie z.B. rheumatoider Arthritis, Lupus erythematodes und Psoriasis, in der Transplantationsmedizin zur Prävention von Organabstoßungen angewendet. Kurzfristig wirkt sich die Immunsuppression durch CsA günstig auf das Transplantatüberleben aus (Opelz und Dohler 2001). Eine langfristige Anwendung führt jedoch häufig aufgrund seiner Nephrotoxizität zur Transplantatschädigung, bzw. zur chronischen CsA-induzierten Nephropathie, was seine klinische Anwendung limitiert. CsA kann akut zu einer tubulären Schädigung führen (Bobadilla et al. 1998; Wu 2007). Längere CsA-Exposition kann in einer tubulären Atrophie, gestreiften interstitiellen Fibrose und progressiven Nierenschädigung resultieren (Shiab 1996, Shiab et al. 1996). Die

Mechanismen, die dieser tubulointerstitiellen Schädigung zu Grunde liegen, sind multifaktoriell, wobei der programmierte Zelltod (Apoptose) eine entscheidende Rolle spielt (Thomas et al. 1998). Je nach Schweregrad des Stimulus gehen geschädigte Zellen via Nekrose oder Apoptose zugrunde. Werden im Rahmen einer Gewebeschädigung viele Zellen apoptotisch führt dies im weiteren Verlauf zur Zerstörung des ursprünglichen Gewebes, zunehmender Fibosierung und gesteigerter ECM-Ablagerung (Menè und Amore 1998). Tubulusepithelzellen sind die Angriffsorte ischämisch und toxisch bedingter Apoptose. Healy et al. (1998) demonstrierten, dass CsA direkt toxisch auf Tubulusepithelzellen wirkt und zum Zellzyklusarrest führt. Ferner zeigten sie eine dosisabhängige Apoptose-, bzw. Nekroseinduktion. Nekrose und Apoptose sind zwei verschiedene Formen des Zelltodes, die sich in ihrer Morphologie und in ihrem Mechanismus unterscheiden. Die Apoptose folgt einem genetisch festgelegten Muster und ist durch Zellschrumpfung, Kondensation des Chromatins, Verdichtung der Zellorganellen und DNA-Fragmentierung charakterisiert. Neben diesen Veränderungen kommt es in der Frühphase der Apoptose zu Umstrukturierungen an der Zellmembran und zur Exposition von zuvor nach intrazellulär gerichteten Phosphatidylserin (Huynh et al. 2002). Im Gegensatz dazu kommt es bei der Nekrose zu einer frühen Zerstörung der Zellmembran (Krammer 2000). Diese Veränderungen führen in der Durchflusszytometrie zu unterschiedlicher Lichtstreuung, was die Unterscheidung zwischen nekrotischen und apoptotischen Zellen ermöglicht (Vermes et al. 1995).

Der Unterschied zwischen beiden Formen ist, daß die Zellmembran in frühapoptotischen Stadien noch intakt ist, während sie schon bei der Nekroseeinleitung die Zellintegrität verliert und durchlässig wird. Zur Evaluierung einer möglichen antiapoptotischen Wirkung von HGF wurden FACS-Analysen nach Apoptoseinduktion durch Cyclosporin A durchgeführt. Hierbei bindet der FITC (Fluoresceinisothiocyanat) markierte Annexin-Antikörper an das in der frühen Apoptose exponierte Phosphatidylserin (Vermes et al. 1995) Da nekrotische Zellen aufgrund

des Verlustes ihrer Membranintegrität ebenfalls mit Annexin binden können ist eine weitere Differenzierung apoptischer von nekrotischen Zellen notwendig. Dieses erfolgt mittels Gegenfärbung mit Propidiumjodid (PI), das nur die permeable Membran passieren kann und mit der DNA interkaliert. Bei einer fehlenden Färbung liegt somit eine intakte Membranintegrität vor, was eine Nekrose ausschließt.

Das Ziel dieser Analyse war einerseits die zytotoxische Wirkung von CsA auf die beiden Zellreihen, die renalen Fibroblasten und die Tubulusepithelzellen zu untersuchen und andererseits zu ermitteln welchen Einfluss dabei eine HGF-Überexpression auf das Apoptoseverhalten der jeweiligen Zellreihe haben kann. Dabei sollten ebenfalls mögliche konzentrationsabhängige Unterschiede herausgestellt werden.

Für die Untersuchungen wurden die Zellen 48 h mit 100, 500 und 1000 ng/ml CsA behandelt. Die zytotoxische Wirkung des CsA war bei allen Zellreihen makroskopisch anhand avitaler, im Medium treibender Zellen und mikroskopisch anhand von Lücken in den jeweiligen Monolayern deutlich zu erkennen. In den Versuchsansätzen mit 1000 ng/ml war dieses Phänomen am stärksten ausgeprägt, so dass teilweise nur noch sehr wenige Zellen im Zellverband integriert waren. Für die geplante FACS-Analyse war die Menge zu gering. Die Zellkulturen, die mit 100 und 500 ng/ml CsA über 48 h behandelt wurden, zeigten ausreichend intakte Monolayer, so dass diese Versuchsansätze für die FACS-Analyse verwendet werden konnten. Bei der Auswertung der mit 100 ng/ml CsA behandelten Zellkulturen konnten keine wesentlichen Unterschiede bezüglich des Apoptoseverhaltens gezeigt werden, so dass die Konzentration zur Apoptoseinduktion mutmaßlich zu gering war.

Eindeutige Unterschiede waren allerdings bei den Analysen der Versuchsansätze mit 500 ng/ml zu beobachten. Hier zeigte sich einerseits ein Unterschied zwischen den HGF-überexprimierenden Zellen und den HGF-negativen Kontrollzellreihen. Sowohl bei den HGF-überexprimierenden Fibroblasten (TFB-HGF), als auch bei den HGF-überexprimierenden Tubulusepithelzellen (NP1-HGF) war die

Apoptoserate gegenüber den HGF-negativen Zellen geringer. Die TFB-HGF zeigten eine 42% geringere Apoptoserate gegenüber den TFB-3.1. Bei den NP1-HGF war die Apoptoserate um 59% geringer als bei den NP1-3.1. Verglich man die beiden Zelltypen miteinander, so zeigte sich, dass die Apoptoserate der HGF-überexprimierenden Fibroblasten um 13% höher lag als bei den Tubulusepithelzellen. Die hier vorgelegten Ergebnisse lassen auf einen zytoprotektiven Effekt einer HGF-Überexpression gegenüber einer CsA-induzierten Apoptose schließen.

Diese Ergebnisse unterstützen die von Mizui et al. (2004) beschriebenen protektiven Effekte einer HGF-Überexpression bezüglich einer CsA-induzierten Apoptose. Sie untersuchten *in vivo* und *in vitro* die Auswirkung einer HGF-Gentherapie auf die CsA-induzierte Nephropathie. Dabei konnten sie zeigen, dass mittels HGF-Gentransfektion Tubulusepithelzellen vor Apoptose geschützt werden. Sie führten TUNEL-Assays zur Detektion apoptotischer Zellen durch und demonstrierten dabei einerseits eine zeit- und konzentrationsabhängige Apoptoseinduktion durch CsA und wiesen andererseits eine mehr als 50% geringere Apoptoserate bei den HGF-transfizierten Zellen als bei den HGF-negativen Kontrollzellen nach. Anhand von Westernblotanalysen konnten sie ferner eine gesteigerte Expression von antiapoptotischen Markerproteinen, wie phosphorylierte Akt-Kinase und Bcl-2 bei HGF-positiven HK-2 Zellen (Tubulusepithelzellen) nachweisen, die bei den HGF-negativen Zellen nach CsA Behandlung supprimiert waren. Mittels immunhistochemischen Färbungen von Rattennieren, die über 2-3 Wochen mit CsA behandelt wurden, zeigten sie eine bis 40% geringere Ausbreitung der interstitiellen Fibrose. Ähnliche zytoprotektive Effekte durch HGF waren an anderen renalen Epithelzellen beschrieben worden. Die Arbeitsgruppe von Forni et al. (2001) untersuchte die protektiven Effekte einer systemischen HGF-Substitution vor CsA-induzierter Apoptose, allerdings an glomerulären Epithelzellen. Sie wiesen ebenfalls eine Konzentrations- und Zeitabhängigkeit nach. Ferner zeigten sie, dass eine Vorbehandlung mittels systemischen HGF-Gaben glomeruläre

Epithelzellen vor der CsA-induzierten Apoptose schützt. Eine zytoprotektive Wirkung einer HGF-Überexpression wurde an renalen Fibroblasten bisher nicht beschrieben

In-vitro- und in-vivo-Studien zeigten, dass sowohl vermehrtes endogenes und exogenes HGF Tubulusepithelzellen vor Apoptose unterschiedlicher Ursache schützt (Liu 2004; De Souza et al 2003; Foroni et al. 2001, Herrero-Fresneda et al. 2006). Nachdem Yang J und Liu (2001) am Modell der obstruktiven Nephropathie gezeigt hatten, dass die Injektion eines HGF-cDNA Plamids zur Steigerung endogener HGF-Konzentration und reduzierter Fibrose führt, demonstrierten Gao et al. (2002), dass HGF-Gentransfer die Progression der chronisch obstruktiven Nephropathie verzögert und Tubulusepithelzellen vor Apoptose schützt. Ähnliche Ergebnisse erzielte die Arbeitsgruppe von Dai (2002). Sie untersuchte die protektive Wirkung einer HGF-Gentherapie an Folsäure geschädigten Mäusenieren.

Die antiapoptotische Wirkung von HGF in renalen Epithelzellen und deren zugrunde liegende Mechanismen sind nicht vollständig geklärt. Die Apoptose ist ein genregulierter Prozess, dem prinzipiell zwei unterschiedliche Signalwege zugrunde liegen. Zum einen die positive Induktion durch Ligandenbindung an einen membrangebundenen „Todes-Rezeptor“, z.B. Fas-Rezeptor und zum anderen die negative Induktion durch den Verlust von Suppressorsignalproteinen zu denen im besonderen Maße die der Bcl-2 Proteinfamilie gehören (Itho et al 1991, Yang E und Korsmeyer 1996). Ein anderer wichtiger Aspekt des Zellüberlebens ist das Gleichgewicht zwischen antiapoptotischen und proapoptotischen Proteinen (Liu 1998).

Die Endstrecke der Apoptosekaskade mündet in der Aktivierung von Caspasen, insbesondere der Caspase-3 und -9 (Ortiz et al. 1998, Ortiz 2000). Shiab et al. (1996) demonstrierten, dass CsA die Expression von Caspase-3 und des Fas-Gens induziert und zu einer Expressionssteigerung von TGF- β 1 führt (Shiab et al. 1996; Mizui et al. 2004).

HGF entfaltet, in Abhängigkeit des Apoptose auslösenden Stimulus, seine protektiven und regenerativen Leistungen über unterschiedliche Mechanismen, aber vor allem über eine gesteigerte Expression antiapoptotischer Signalproteine. Einer dieser Mechanismen ist die Phosphorylierung der Akt-Kinase, von der bekannt ist, dass sie vor Apoptose schützt. Mizui et al. (2004) konnten bei ihren Untersuchungen an Tubulusepithelzellen zum einen eine CsA-induzierte Inaktivierung der Akt-Kinase und zum anderen eine durch HGF-Überexpression gesteigerte Akt-Kinase-Aktivität nachweisen. An der Aufrechterhaltung des Zellzyklus und Zellüberlebens sind ebenfalls die der Akt-Kinase nachgeschalteten Signalproteine, wie E2F, c-myc und Bad beteiligt. Die Phosphorylierung von Bad und die darauffolgende Dissoziation vom Bcl-xL ist der wichtigste Schritt der antiapoptotischen Akt-Kinase-Kaskade (Mizui et al. 2004). In Untersuchungen, bei denen durch Serumentzug Apoptose induziert wurde, konnte nachgewiesen werden, dass HGF die PI-3-Kinase aktiviert und darüber die Phosphorylierung der Akt-Kinase bewirkt. Daraufhin kommt es zur Phosphorylierung des proapoptotischen Bad-Proteins, das dadurch inaktiviert wird. Gleichzeitig bewirkt HGF die Freisetzung von Bcl-xL, einem anderen antiapoptotischen Protein, der Bcl-2 Familie (Liu 1999). In einer Studie an unilateraler Ureterobstruktion konnte Gao et al. (2002) zeigen, dass HGF die Expression von Bcl-2 stimuliert. Bcl-2 ist ein Apoptoseinhibitor, dessen Gegenspieler das Bax-Protein ist. In der Regulation von Zellwachstum und -Tod haben beide Proteine gegenteilige Wirkung. CsA reduziert in Tubulusepithelzellen die Konzentration an Bcl-2 und führt zu einer gesteigerten Expression von Bax (Shiab et al. 1999). Die Arbeitsgruppe von Mizui et al. (2004) demonstrierte neben der Aktivierung von Akt, dass HGF die Expression von Bcl-2 in CsA geschädigten Tubulusepithelzellen induziert. Ferner konnten sie nachweisen, dass die Hochregulation von Bcl-2 mit der Inhibition der Caspase-3, durch HGF korreliert. CsA induziert die Expression von TGF- β 1. Yazawa et al. (2004) zeigten, dass der Gentransfer von HGF, die

durch CsA gesteigerte TGF- β 1 Konzentration reduziert. HGF ist dadurch in der Lage die proapoptotische Wirkung von TGF- β 1 zu unterdrücken.

4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte ein proliferativer, antifibrogener und antiapoptotischer Effekt einer HGF-Überexpression sowohl in Tubulusepithelzellen als auch in renalen Fibroblasten nachgewiesen werden.

In früheren Untersuchungen war eine wichtige Rolle von HGF in der Pathophysiologie der renalen Fibrose beschrieben worden. Die Umwandlung von tubulären Epithelzellen zu mesenchymalen Fibroblasten (EMT) gilt hierbei als eines der charakteristischen Merkmale der chronischen Nierenschädigung. Die Aufrechterhaltung der Matrixsynthese und das Fortschreiten der Fibrose wird hauptsächlich mit der Präsenz profibrogener Zytokine in Verbindung gebracht.

TGF- β 1 übernimmt dabei eine der Hauptrollen (Strutz und Neilson 2003). Es wirkt chemotaktisch auf Fibroblasten, fördert die Transformation von Fibroblasten zu Myofibroblasten und induziert die Synthese extrazellulärer Matrixproteine, wie Fibronectin und Kollagentyp-I (Strutz et al. 1995). Die Überexpression von TGF- β 1 in der Niere bewirkt eine rasch fortschreitende Fibrosierung und Funktionsverschlechterung (Liu 2006). Border und Noble (1994) untermauerten die zentrale Rolle von TGF- β 1 in der Fibrogenese. HGF stellt einen physiologischen Gegenspieler zu TGF- β 1 dar. Eine anhaltende Schädigung des Organs bewirkt eine kontinuierliche Abnahme der HGF-Konzentration. Im Gegenzug dazu wird vermehrt TGF- β 1 gebildet. In chronisch geschädigtem Gewebe führt das veränderte HGF/TGF- β 1 Verhältnis zu einer verstärkten Myofibroblastenaktivierung, EMT und damit zu einer exzessiven Matrixakkumulation (Eddy 2000).

Der Versuch mittels Verabreichung von exogenem HGF die Balance zwischen den beiden Zytokinen wiederherzustellen, um somit die fibrotische Wirkung von TGF- β 1 zu verhindern, erwies sich in vielen Experimenten als erfolgreich. So gelang es Yang J und Liu (2002) nachzuweisen, dass die durch TGF- β 1-induzierte Aktivierung interstitieller Fibroblasten zu Myofibroblasten durch die Gabe von exogenem HGF blockiert wird. Anhand weiterer Untersuchungen demonstrierten sie, dass exogenes HGF ebenfalls die durch TGF- β 1 stimulierte EMT proximaler Tubulusepithelzellen verhinderte (Yang J und Liu 2002). Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von exogen zugeführten HGF im Organismus, versuchte man mittels Gentransfer in Tiermodellen eine HGF-Überexpression zu erzeugen. Diese alternative HGF-Darreichung erwies sich als eine vielversprechende Methode, die renale Fibrose in chronisch geschädigten Nieren zu minimieren bzw. aufzuhalten. Gao et al. (2002) demonstrierten am Beispiel der chronisch obstruktiven Nephropathie, dass der wiederholte Transfer humaner-HGF cDNA zu einer lokal erhöhten HGF-Konzentration führte. Die HGF-exprimierenden Tiere zeigten im Vergleich zu den Kontrolltieren eine verminderte tubulointerstitielle Schädigung. Ähnliche Ergebnisse erzielten Cruzado et al. (2004) am Modell der fortgeschrittenen diabetischen Nephropathie. Die Arbeitsgruppe von Yazawa et al. (2004) untersuchte den Effekt der HGF-Gentherapie an der chronischen Cyclosporin A-induzierten Nephropathie. Ihre Ergebnisse konnten, eine deutlich geringere interstitielle Fibrosierung nachweisen. Herrero-Fresneda et al. (2006) untersuchten den Effekt einer HGF-Gentherapie am Modell der chronischen Transplantatniere. Auch sie konnten nachweisen, dass durch die Behandlung mit humaner HGF-cDNA der tubulointerstitielle Schaden minimiert und regenerative Prozesse induziert werden können. Bemerkenswert ist, dass sich der antifibrotische Effekt von HGF v.a. in der verzögerten Gabe, d.h. bei schon manifester Fibrosierung als besonders effektiv herausstellte. Diese voneinander unabhängigen Ergebnisse lassen vermuten, dass die HGF-

Gentherapie als eine mögliche innovative therapeutische Strategie zur Prävention der terminalen Niereninsuffizienz zu betrachten ist.

Das renotrope Potential von HGF im Bezug auf den Erhalt der renalen Struktur und Funktion, ist jedoch auch differenziert zu betrachten. Bei Untersuchungen an transgenen Mäusen, die HGF überexprimierten, beobachteten Takayama et al. (1997a) die Entwicklung einer progressiven polyzystischen Nierenerkrankung. Die autokrine Stimulation der renalen Zellen bewirkte eine gesteigerte zelluläre Proliferation, die zu tubulärer Hypertrophie und Glomerulosklerose führte. Bei weiteren Untersuchungen zeigte sich bei den gleichen Tieren eine deutlich erhöhte Inzidenz für Tumorentwicklung unterschiedlichen Ursprungs (Takayama et al. 1997b).

5 Zusammenfassung

Chronisch progressive Nierenerkrankungen münden, begleitet durch tubulointerstitielle Fibrose, in eine terminale Niereninsuffizienz. Bedingt durch die Ausschüttung von Chemokinen werden Entzündungszellen rekrutiert, proinflammatorische Mediatoren freigesetzt und darüber interstitielle Fibroblasten zur Matrixsynthese angeregt. Im Rahmen der Fibrogenese gehen Tubulusepithelzellen apoptotisch zu Grunde oder durchlaufen via epithelial-mesenchymaler Transition eine phänotypische Umwandlung zu ECM produzierenden Zellen. Durch tubuläre Atrophie und exzessive Matrixsynthese kommt es zur progressiven Fibrosierung und folglich zu renalem Funktionsverlust.

Entscheidend für die Fibrogenese ist die Imbalance zwischen profibrogenen und antifibrogenen Zytokinen. Chronische Schädigungen führen zu einer gesteigerten Expression von TGF- β 1, dem potentesten profibrogen wirkenden Zytokin. HGF ist ein endogenes Zytokin, mit renoprotektiven Fähigkeiten. Es besitzt als Antagonist von TGF- β 1 ein hohes antifibrotisches Potential.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte einer HGF-Überexpression an murinen Tubulusepithelzellen (NP1) und kortikalen Fibroblasten (TFB) hinsichtlich der Proliferation, Matrixsynthese, -Degeneration, und Apoptose untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass eine HGF-Überexpression die Proliferation proximaler Tubulusepithelzellen und renaler Fibroblasten stimuliert. In den aufgeführten BrdU-Assays steigerte HGF die Proliferation der TFB-Zellen z.B. nach 72 h um das 1,49fache. Bei den NP1-Zellen zeigte sich nach 72 h eine 1,38fache Proliferationssteigerung. Anhand von Western Blots und ELISA konnte gezeigt werden, dass eine HGF-Überproduktion die Fibronektinsekretion der TFB-Zellen um bis zu 44% und die der NP1-Zellen bis zu 40% senkt. Die Kollagentyp-I-Sekretion wurde lediglich in geringerem Umfang inhibierend beeinflusst.

Zur Ermittlung des Einflusses einer HGF-Überexpression auf die Matrixdegeneration wurde die proteolytische Aktivität der Proteasen MMP-2 und MMP-9 in Zellkulturüberständen zymographisch ermittelt. Bei den NP1-Zellen konnte eine durch HGF-Überexpression gesteigerte Aktivität für MMP-2 (28%) und MMP-9 (32%) nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den HGF-überexprimierenden TFB-Zellen eine verminderte Aktivität sowohl von MMP-2 (13%) als auch MMP-9 (32%).

Nach Cyclosporin-A-induzierter Apoptose konnte mittels FACS-Analysen, nach Annexin-V- und PI-Färbung, ein zytoprotektiver Effekt durch HGF-Überexpression nachgewiesen werden. Es konnte für die TFB-Zellen eine 42% geringere und für die NP1-Zellen eine 59% geringere Apoptoserate gegenüber den HGF-negativen Zellen ermittelt werden.

Diese Beobachtungen sind hinsichtlich zukünftiger Therapiestrategien interessant. In der Literatur wurde das antifibrotische Potential von HGF hinsichtlich Prävention und Regression experimentell induzierter renaler Fibrose sowohl durch systemische Substitution seines Proteins als auch via Gentransfer, beschrieben. Allerdings bedarf es weiterer Untersuchungen, ob die klinische Anwendung von HGF am Menschen eine mögliche Therapiestrategie chronisch progressiver Nierenerkrankungen darstellt.

6 Literaturverzeichnis

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

Aumailley M, Gayraud B (1998): Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J Mol Med* 7, 253-265

Battle D, Ramadugu P, Soler MJ (2006): Progress in retarding the progression of advanced chronic kidney disease: Grounds for optimism. *Kidney Int* 70, S40-S44

Birkedal-Hanssen H (1995): Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 7, 728-735

Bobadilla NA, Gamba G, Tapia E, Garcia-Torres R, Bolio A, Lopez-Zetina P, Herrera-Acosta J (1998): Role of NO in cyclosporine nephrotoxicity: Effects of chronic NO inhibition and NO synthases. *Am J Physiol* 274, F791-F798

Bohle A (1982): Die Bedeutung des Niereninterstitiums für die Nierenfunktion. *Klin Wochenschr* 60(19), 1186-90

Bohle A, Christ H, Grund KE, Mackensen S (1979): The role of the interstitium of the renal cortex in renal disease. *Contrib Nephrol* 16:109-114

Bohle A, Strutz F, Müller GA (1994): On the pathogenesis of chronic renal failure in primary glomerulonephropathies: a view from the interstitium. *Exp Nephrol* 2(4), 205-210

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

Bornstein I, Voyta JC, Lazzari KG, Murphy O, Edwards B, Kricka LJ (1990): Improved chemiluminescent detection of alkaline phosphatase. *Biotechniques* 9, 160-161

Bradford, M (1976): A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem* 72, 248-254

Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmiecik TE, Vivande Woude GF, Aronson SA (1991): Identification of hepatocyte growth factor receptor as the c-met protooncogene product. *Science* 251, 802-804

Chen S, Iglesias-de-la Cruz MC, Jim B, Hong SW, Isono M, Ziyadeh FN (2003): Reversibility of established diabetic glomerulopathy by anti- TGF-beta antibodies in db/db mice. *Biochem Biophys Res Commun* 300, 16-22

Cruzado J M, N ria L, Torras J, Riera M, Fillat C, Herrero-Fresneda I, Aran J M, Alperovich G, Vidal A, Griny  J M (2004): Regression of Advanced Diabetic Nephropathy by Hepatocyte Growth Factor Gene Therapy in Rats. *Am Diabetes Assoc Inc* 53: 1119-1127

Dai C, Yang J, Liu Y (2002): Single injection of naked plasmid encoding hepatocyte growth factor prevents cell death and ameliorates acute renal failure in mice. *J Am Soc Nephrol* 13, 411-422

De Souza DM Jr, Razvickas CV, Goncalves EA, Okano IR, Camargo SM, Monte JC, dos Santos OF (2003): The role of growth factors on renal tubular cells submitted to hypoxia and deprived of glucose. *Ren Fail* 25, 341-353

Dworkin LD, Gong R, Tolbert E, Centrecchio J, Yano N, Zanabli A, Esparaza A, Rifai A (2004): Hepatocyte growth factor ameliorates progression of interstitial fibrosis in rats with established renal injury. *Kidney Int* 65, 409-419

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

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(4), 1310-1340

Fava RA und McClure DB (1987): Fibronektin associated transforming growth factor. *J Cell Physiol* 131, 184-189

Ferguson MW, O'Kane S (2004): Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. *Philos Trans R Soc Lon B Biol Sci* 359, 839-850

Fiaschi-Taesch NM, Santos S, Reddy V, van Why SK, Philbrick WF, Ortega A, Esbrit P, Orloff JJ, Garcia- Ocana A (2004): Prevention of acute

ischemic renal failure by targeted delivery of growth factors to the proximal tubule in transgenic mice: the efficacy of parathyroid hormone-related protein and hepatocyte growth factor. *J Am Soc Nephrol* 15, 112-125

Florquin S, Rouschop KM (2003): Reciprocal functions of hepatocyte growth factor and transforming growth factor-beta 1 in the progression of renal diseases: a role for CD44? *Kidney Int Suppl* 86, 15-20

Foroni A, Li H, Foschi A, Striker GE, Striker LJ (2001): Hepatocyte growth factor, but not insulin-like growth factor I, protects podocytes against cyclosporineA-induced apoptosis. *Am J Pathol* 158, 275-280

Frei U, Schober-Halstenberg HJ (2006), Nierenersatztherapie in Deutschland, Bericht 2005/2006. *Quasi Niere* 2005/2006, 36

Freshney R: Tierische Zellkulturen; Walter de Gruyter, Berlin 1990

Gao X, Mae H, Ayabe N, Takai T, Oshima K, Hattori M, Ueki T, Fujimoto J, Tanizawa T (2002); Hepatocyte growth factor gene therapy retards the progression of chronic obstructive nephropathy. *Kidney Int* 62, 1238-1248

Giannopoulou M, Iszkula SC, Dai C, Xiaoyue T, Yang J, Michalopoulos GK, Liu Y (2006): Distinctive role of Stat3 and Erk-1/2 activation in mediating interferon- γ inhibition of TGF- β_1 action. *Am J Physiol Renal Physiol* 290, F1234-1240

Gong R, Rifai A, Tolbert EM, Centracchio JN, Dworkin LD (2003): Hepatocyte Growth Factor Modulates Metalloproteinases and Plasminogen Activator/Plasmin Proteolytic Pathways in Progressive Renal Interstitial Fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 14, 3047-3060

Gratzner HG (1982): Monoclonal antibody to 5-bromo-and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science* 218, 474-475

Hartmann G, Naldini L, Weidner KM, Sachs M, Vigna E, Comoglio PM, Birchmeier W (1992): A functional domain in the heavy chain of scatter factor/hepatocyte growth factor binds the c-Met receptor and induces cell dissociation but not mitogenesis. *Cell Biol* 89, 11574-11578

Healy E, Dempsey M, Lally C, Ryan MP (1998): Apoptosis and necrosis: Mechanisms of cell death induced by cyclosporine A in a renal proximal tubular cell line. *Kidney Int* 54, 1955-1966

Herold G und Mitarbeiter: Innere Medizin, Selbstverlag Köln 2007

Herrero-Fresneda I, Torras J, Franquesa M, Vidal A, Cruzado JM, Lloberas N, Fillat C, Grinyó JM (2006): HGF gene therapy attenuates renal allograft scarring by preventing the profibrotic inflammatory-induced mechanisms. *Int Soc Nephrol* 70, 265-274

Huynh MN, Fadok VA, Henson PM (2002): Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF- β 1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest* 109, 41-50

Isaka Y, Akagi Y, Ando Y, Tsujie M, Sudo T, Ohno N, Border WA, Kaneda Y, Hori M, Imai E: Gene therapy by transforming growth-beta receptor-IgG Fc chimera suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 55 (2), 465-75

Itho N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizuhima S, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S (1991): The polypeptide encoding by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66, 233-243

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

Jernigan SM, Eddy AA: Experimental insights into the mechanisms of tubulointerstitial scarring. In: *Mechanisms and Clinical Management of Chronic Renal Failure*, 2nd Ed., El Nahas AM, Oxford University Press, Oxford 2000, 104-145

Kaissling B, Le Hir M (1994): Characterization and distribution of interstitial cell types in renal cortex of rats. *Kidney Int* 45, 709-720

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

Kawaida K, Matsumoto K, Shimazu H, Nakamura T (1994): Hepatocyte growth factor accelerates prevents failure and accelerates renal regeneration in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 4357-4361

Kofler S, Nickel T, Weis M (2004): The role of cytokines in cardiovascular diseases. Focus on endothelial response to inflammation. *Clin Sci (Lond)* 2004

- Kopp JB**, Klotmann PE (1990): Cellular and molecular mechanisms of cyclosporin nephrotoxicity. *J Am Nephrol* 1:162-179
- Krammer PH** (2000): Apoptose. *Dtsch Arztebl* 97, B-1481-1488
- Laemmli UK** (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature* 227, 680-85
- Lee MJ**, Shoukat D, Kalluri R, Thompson EW (2006): The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* 7, 973-981
- Lemley KV**, Kritiz W (1991): Anatomy of the renal interstitium. *Kidney Int* 39, 370-381
- Liu Y** (1999): Hepatocyte growth factor promotes renal epithelial cell survival by dual mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol* 277, F624-633
- Liu Y** (2003): Hepatocyte growth factor in kidney fibrosis: therapeutic potential and mechanisms of action. *Am J Renal Physiol* 287: F7-F16
- Liu Y** (2004a): Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol* 15 (1), 1-12
- Liu Y** (2004b): Hepatocyte growth factor in kidney fibrosis: therapeutic potential and mechanisms of action. *Am J Physiol Renal Physiol* 287, F7-F16
- Liu Y** (2006): Renal fibrosis: New Insights into pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int* 69, 213-217
- Liu Y**, Yang J (2006): Hepatocyte Growth Factor: new arsenal in the fight against renal Fibrosis? *Kidney Int* 70, 238-240
- Liu Y**, Sun AM, Dworkin LD (1998): Hepatocyte growth factor protects renal epithelial cells from apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 246, 821-6
- Liu Y**, Tolbert EM, Lin L, Thursby MA, Sun AM, Nakamura T, Dworkin LD (1999): Up-regulation of hepatocyte growth factor receptor: An amplification and targeting mechanism for hepatocyte growth factor in acute renal failure. *Kidney Int* 55, 442-453

Liu Y, Rajur K, Tolbert E, Dworkin LD (2000): Endogenous hepatocyte growth factor ameliorates chronic renal injury by activating matrix degradation pathways. *Kidney Int* 58, 2028-2043

Löffler G, Petrides PE: *Biochemie und Pathobiochemie*, 6. Auflage; Springer Verlag, Berlin 1998

Matsumoto K, Nakamura T (2001): Hepatocyte growth factor: Renotropic role and potential therapeutics for renal diseases. *Kidney Int* 59, 2023-2038

Matsumoto K, Matsumoto K, Nakamura T, Kramer RH (1994) Hepatocyte growth factor/scatter factor induces tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase (p125FAK) and promotes migration and invasion by oral squamous cell carcinoma cells. *J Biol Chem* 269(50), 31807- 31813

Menè P, Amore A (1998): Apoptosis: potential role in renal diseases. *Nephrol Dial Transplant* 13, 1936-1943

Miller SB, Martin DR, Kissane J, Hammerman MR (1994): Hepatocyte growth factor accelerates recovery from acute ischemic renal injury in rats. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 266, F129-F134

Mizui M, Isaka Y, Takabatje Y, Mizuno S, Nakamura T, Ito T, Imai E, Hori M (2004): Elektroporation-mediated HGF gene transfer ameliorated cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 65, 2041-2053

Mizuno S, Kurosawa T, Matsumoto K, Mizuno-Horikawa Y, Okamoto M, Nakamura T (1998): Hepatocyte growth factor prevents renal fibrosis and dysfunction in a mouse model of chronic renal disease. *J Clin Invest* 101, 1827-1834

Mizuno S, Matsumoto K, Kurosawa T, Mizuno-Horikawa Y, Nakamura T (2000): Reciprocal balance of hepatocyte growth factor and transforming growth factor- β 1 in renal fibrosis in mice. *Kidney Int* 57, 937-948

Mizuno S, Matsumoto K, Nakamura T (2001): Hepatocyte growth factor suppresses interstitial fibrosis in a mouse model of obstructive nephropathy. *Kidney Int* 59, 1304-1314

Montesano R, Soriano JV, Pepper MS, Orci L (1997): Induction of epithelial branching tubulogenesis in vitro. *J Cell Physiol* 173, 152-61

- Müller GA**, Markovic-Lipovski J, Frank J und Rodemanne HP (1992): The role of interstitial cells in the progression of renal diseases. *J Am Soc Nephrol* 2, 198-205
- Mullis K**, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Ehrlich H (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51, 263-73
- Nakamura T**, Nawa K, Jichihara A (1984): Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* 122, 1450- 1459
- Nakamura T**, Katsuhiko N, Ichihara A, Kaise N, Nichino T (1987): Purification and subunit structure of hepatocyte growth factor from rat platelets. *FEBS Letters*, 224 (2) 311- 316
- Nakamura T**, Nichizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, Tashiro K, Shimizu S (1989): Molecular Cloning and Expression of Human Hepatocyte Growth Factor. *Nature* 342, 440-44
- Negri AL** (2004): Prevention of renal fibrosis in chronic renal diseases: Antifibrotic agents. *J Nephrol* 17, 496-503
- Neilson EG** (2005): Setting a trap for tissue fibrosis. *Nat Med* 11, 373-374
- Okada H**, Innoue T, Suzuki H, Strutz F, Neilson EG (2000): Epithelial-mesenchymal transformation of renal tubular epithelial cells in vitro and in vivo. *Nephrol Dial Transplant* 15, 44-46
- Opelz G**, Dohler B (2001): Cyclosporine and long-term kidney graft survival. *Transplantation* 72, 1267-1273
- Ortiz A** (2000): Apoptotic regulatory proteins in renal injury. *Kidney Int* 58, 467-485
- Ortiz A**, Lorz C, Catalán MP, Ortiz A, Coca S, Edigo J (1998): Cyclosporine A induces apoptosis in murine tubular epithelial cells: Role of caspases. *Kidney Int Suppl* 68, S25-S29
- Palmer BF** (1997): The renal tubule in the progression of chronic renal failure. *J Invest Med* 45, 34-43
- Park M**, Dean M, Kaul K, Braun MJ, Gonda MA, Vande Woude G (1987) Sequence of MET protooncogene cDNA has features characteristics of the tyrosine kinase family of growth- factor receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 84 (18), 6379-6383

Ponzetto C, Bardelli A, Zehn Z, Maina F, dalla Zonca P, Giordano S, Graziani A, Panayotou G, Comoglio PM (1994) A multifunctional docking site mediates signalling and transformation by hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell Press* 77(2), 261- 271

Quesada AR, Barbacid MM, Mira E, Fernandez-Resa P, Marquez G, Aracil M (1997): Evaluation of fluorometric and zymographic methods as activity assays for stromelysins and gelatinases. *Clin Exp Metastasis* 15, 339-344

Remuzzi G, Bertani T (1998): Pathophysiology of progressive nephropathies. *New Engl J Med* 339, 1448-1456

Ruiz-Ortega M und Edigo J (1997): Angiotensin II modulates cell growth-related events and synthesis of matrix proteins in renal interstitial fibroblasts. *Kidney Int* 52, 1497-510

Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Lorenzo O, Esteban V, Blanco J, Mezzano S, Edigo J (2002): AngiotensinII regulates the synthesis of proinflammatory cytokines and chemokines in the kidney. *Kidney Int Suppl*, 82, 12-22

Scheaper U, Gehring NH, fuchs KP, Sachs, Kempkes B, Birchmeier W (2000): Coupling of Gab1 to c-Met, Grb2, and Shp2 Mediates Biological Responses. *J Cell Biol* 149, 1419-1432

Schiffer M, Gersdorff G von, Bitzer M , Susztak K, Bottinger EP (2000): Smad proteins and transforming growth factor beta-signaling. *Kidney Int* 58 [Suppl 77], S45-52

Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, Brinkmann V, Zschesche W, Sharpe M, Gherardi E, Birchmeier C (1995): Scatter factor/ hepatocyte growth factos is essential for liver development. *Nature* 373, 699-702

Shamara AK, Mauer SM, Kim Y, Michael AF (1995): Altered expression of matrix metalloproteinase-2, TIMP, and TIMP2 in obstructive nephropathy. *J Lab Clin Med* 125, 754-61

Shiab FS (1996): Cyclosporine nephropathy: pathophysiology and clinical impact. *Semin Nephrol* 16, 536-547

Shiab FS, Andoh TF, Tanner AM, Noble NA, Border WA, Franceschini N, Bennett WM (1996): Role of transforming growth factor-beta 1 in experimental chronic cyclosporine nephropathy. *Kidney Int* 49, 1141-1151

Shiab FS, Andoh TF, Tanner AM, Yi H, Bennett WM (1999): Expression of apoptosis regulatory genes in chronic cyclosporine nephrotoxicity favors apoptosis. *Kidney Int* 56: 2147-59

Strutz F (2004): Fibrose und potentielle Reversibilität: Bedeutung von BMP-7. *Spek Nephrol* 17, 17-27

Strutz F, Müller GA (2000): Transdifferentiation comes of age. *Nephrol Dial Transpl* 15, 1729-1731

Strutz F, Neilson EG (2003): New insights into mechanisms of fibrosis in immune renal injury. *Springer Semin Immunopathol* 24, 459-476

Strutz F, Okada H, Lo CW, Danoff T, Carone RL, Tomaszewski JE, Neilson EG (1995): Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP-1. *J Cell Biol* 130, 393-405

Strutz F, Heeg M, Kochsiek T, Siemers G, Zeisberg M, Müller GA (2000a): Effects of pentoxifylline, pentyfilline and γ -Interferon on proliferation, differentiation, and matrix synthesis of human renal fibroblasts. *Nephrol Dial Transplant* 15, 1535-1546

Strutz F, Zeisberg M, Hemmerlein B, Sattler B, Hummel K, Becker V, Müller GA (2000b): Basic Fibroblast growth factor is increased in human renal fibrogenesis and may mediate autocrine fibroblast proliferation. *Kidney Int* 57, 1521-1538

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

Takayama H, Larochelle WJ, Sabins SG, Otsuka T, Merlino G (1997a): Renal tubular hyperplasia, polycystic disease, and glomerulosclerosis in transgenic mice overexpressing hepatocyte growth factor/ scatter factor . *Lab Invest* 77, 131-138

Takayama H, LaRochelle WJ, Sharp R, Otsuka T, Kriebel P, Anver M, Aaronson SA, Merlino G (1997b): Diverse tumorigenesis associated with aberrant development in mice overexpressing hepatocyte growth factor/ scatter factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 701-706

Thiery JP (2002): Epithelial-mesenchymal transition in tumor progression. *Nat Rev Cancer* 2 (6), 442-54

Thomas SE, Andoh TF, Pichler RH, Shankland SJ, Couser WG, Bennett WM, Johnson RJ (1998): Accelerated apoptosis characterizes cyclosporine-associated interstitial fibrosis. *Kidney Int* 53, 897-908

Timpl R (1996): Macromolecular organization of basement membranes. *Curr Opin Cell Biol* 8, 618-624

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology* 24, 145-149

Vargas GA, Hoeflich A, Jehle P (2000): Hepatocyte growth factor in renal failure: Promise and reality. *Kidney Int* 57, 1426-1236

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger (1995): A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184, 39-51

Vijayan A, Martin DR, Sadow JL, Kissane J, Miller SB (2001): Hepatocyte growth factor inhibits apoptosis after ischemic renal injury in rats. *Am J Kidney Dis* 38, 274-278

Wahab NA, Mason RM (2006): A critical look at growth factors and epithelial-to-mesenchymal transition in the adult kidney. *Nephron Exp Nephrol* 104, e129-134

Watabe M, Matsumoto K, Nakamura T, Takeichi M (1993): Effect of Hepatocyte Growth Factor on Cadherin- Mediated Cell- Cell Adhesion. *Cell Struct Func* 18, 117-124

Weidner KM, Di Cesare S, Sachs M, Brinkmann, Behrens J, Birchmeier W (1996): Interaction between Gab1 and the c- Met receptor tyrosine kinase is responsible for epithelial morphogenesis. *Nature* 384, 173- 176

Wu MS (2007): From bedside to bench drug-induced tubulointerstitial disease cyclosporine nephropathy study from models of cultured renal epithelial cells. *Chang Gung Med J* 30(1), 7-16

Yang CW, Faulkner GR, Whaba IM, Christianson TA, Bagby GC, Jin DC, Abboud HE, Andoh TF, Bennett WM (2002): Expressions of apoptosis-

related genes in chronic cyclosporine nephrotoxicity in mice. *Am J Transplant* 2, 391-399

Yang E and Korsmeyer SJ (1996): Molecular thanaopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* 88, 386-401

Yang J, Liu Y (2002): Blockage of tubular epithelial to myofibroblast transition by hepatocyte growth factor prevents renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 13, 96-107

Yang J, Liu Y (2003): Delayed administration of hepatocyte growth factor reduces renal fibrogenesis in obstructive nephropathy. *Am J Physiol* 284: F349-57

Yang J, Dai C, Liu Y (2001): Systemic administration of naked plasmid encoding hepatocyte growth factor ameliorates chronic renal fibrosis in mice. *Gene Ther* 8 (19), 1470-9

Yang J, Shultz RW, Mars WM, Wegner RE, Li Y, Dai C, Nejak K, Liu Y (2002): Disruption of tissue-type plasminogen activator gene in mice reduces renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *J Clin Invest* 110 (10), 1525-1538

Yang J, Dai C, Liu Y (2003): HGF suppresses renal interstitial myofibroblast activation and intercepts Smad signal transduction. *Am J Pathol* 163, 621-632

Yazawa K, Isaka y, Takahara S, Imai E, Ichimau N, Shi Y, Namba Y, Okuyama A (2004): Direct Transfer of hepatocyte growth factor into kidney suppresses cyclosporin A nephrotoxicity in rats. *Nephrology Dialysis Transplantation* 19, 812-816

Zhang et al 2000

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

Zeisberg M, Strutz F, Müller GA (2001): Renal Fibrosis: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 10, 315-320

Zeisberg M, Maeshima Y, Mostermann B, Kalluri R (2002): Extrazellular matrix microenvironment regulates migratory behaviour of activated tubular epithel cells. *Am J Pathol* 160, 2001-2008).

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb.1.1	Struktur von Pro-HGF und HGF	Seite 13
Abb. 1.2	Hauptsignalwege von HGF in Nierenzellen	Seite 14
Abb. 1.3	Antagonismus zwischen HGF und TGF- β 1	Seite 16
Abb. 2.1	pcDNA3.1/Hygro (+) Vektorkarte	Seite 26
Abb. 3.1	PCR-Gelelektrophorese auf HGF	Seite 46
Abb.3.2	HGF-Westernblot	Seite 47
Abb. 3.3	BrdU-Proliferationsassay von TFB	Seite 49
Abb. 3.4	BrdU-Proliferationsassay von NP1	Seite 50
Abb. 3.5	Proliferationsassay (Zellzählung) von TFB	Seite 51
Abb. 3.6	Proliferationsassay (Zellzählung) von NP1	Seite 52
Abb. 3.7	Fibronektin-Westernblot	Seite 53
Abb. 3.8	Dichteanalyse des Fibronektin-Westernblot	Seite 54
Abb. 3.9	Fibronektin ELISA	Seite 56
Abb. 3.10	Kollagentyp-I ELISA	Seite 57
Abb. 3.11	Zymographische Analyse MMP-2 und MMP-9	Seite 59
Abb. 3.12	MMP-9 Enzymaktivität	Seite 60
Abb. 3.13	MMP-2 Enzymaktivität	Seite 61
Abb. 3.14	Apoptoserate	Seite 63

7.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1	Mechanismen der renalen Fibrose	Seite 7
Tab. 2.1	Phosphat-gepufferte Lösung	Seite 24
Tab. 2.2	Tris-gepufferte Lösung	Seite 24
Tab. 2.3	10x DNA-Probenpuffer	Seite 28
Tab. 2.4	1x TAE-Laufpuffer	Seite 29
Tab. 2.5	Maße und Volumina zur Subkultivierung von Zellen	Seite 33
Tab. 2.6	Lysispuffer	Seite 36
Tab. 2.7	Zusammensetzung der Gele	Seite 37
Tab. 2.8	Transferpuffer	Seite 38
Tab. 2.9	Blockierlösung	Seite 39
Tab. 2.10	Primärantikörper	Seite 39
Tab. 2.11	Sekundärantikörper	Seite 40
Tab. 2.12	Probenpuffer	Seite 41
Tab. 2.13	Laufpuffer	Seite 41
Tab. 2.14	Entwicklungspuffer, pH 7,5	Seite 42

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben ganz herzlich danken.

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. med. G.A. Müller als Leiter der Abteilung Nephrologie und Rheumatologie, für die Ermöglichung dieser Arbeit. In besonderer Weise möchte ich mich bei Herrn Prof Dr. med. F. Strutz für die interessante Themenstellung, die stete Diskussionsbereitschaft und die gute Betreuung, sowohl während des experimentellen Teils, als auch im Anschluss bei der Abfassung dieser Arbeit, bedanken.

Ein weiterer Dank gilt den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, Frau Diana Lichtblau und Frau Swantje Wehn und Christina Lauterberg, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Die gute Arbeitsatmosphäre und die Kollegialität haben sehr zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. E. Brunner sei stellvertretend für die Abteilung „Medizinische Statistik“ für die Hilfe bei der statistischen Auswertung meiner Daten gedankt.