

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

**Die Rolle der Bone Morphogenetic Proteins (BMP)-5 und -7
in der humanen Normalniere und bei der hypertensiven Nephropathie**

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

vorgelegt von

Björn Tampe

aus
Backnang

Göttingen 2011

Dekan:	Prof. Dr. med. C. Frömmel
I. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. F. Strutz
II. Berichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. J. Wilting
III. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. T. Crozier
Tag der mündlichen Prüfung:	30.05.2012

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Klinische Relevanz der hypertensiven Nephropathie	1
1.2	Volkswirtschaftliche Relevanz	2
1.3	Pathophysiologie der hypertensiven Nephropathie	2
1.4	Epithelial-mesenchymale Transition (EMT)	3
1.5	TGF-beta-Superfamilie	4
1.5.1	Transforming Growth Factor-beta1 (TGF-beta1)	5
1.5.2	Bone Morphogenetic Protein-7 (BMP-7)	6
1.5.3	Bone Morphogenetic Protein-5 (BMP-5)	10
1.6	Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha)	11
1.7	Angiotensin-2 (AT-2)	13
1.8	Aktuelle Therapieregime	14
1.9	Zielsetzung	15
2.	Material und Methoden	16
2.1	Material	16
2.1.1	Geräte	16
2.1.2	Software	17
2.1.3	Gebrauchsmaterialien	17
2.1.4	Chemikalien	18
2.1.5	Kitsysteme	19
2.1.6	Allgemeine Puffer und Lösungen	19
2.1.7	Antikörper	21
2.1.8	Stimulanzen	22
2.1.9	Primer für die rtPCR	22
2.1.10	Humanes Nierengewebe	22
2.1.11	Zelllinie HK-2	23
2.2	Methoden	23
2.2.1	Immunfluoreszenz in humanen Gewebeproben	23
2.2.2	Immunhistochemie in humanen Gewebeproben	24
2.2.3	Färbung mit Hämatoxylin <i>in vitro</i>	25
2.2.4	Immunfluoreszenz <i>in vitro</i>	26

Inhaltsverzeichnis

2.2.5	real-time PCR (rtPCR)	27
2.2.6	Western Blot	30
2.2.7	Apoptose-Assay mittels FACS-Analyse	32
2.2.8	Statistische Auswertung	33
3.	Ergebnisse	34
3.1	Lokalisation der Expression von BMP-7 in der humanen Normalniere	34
3.2	Expression von BMP-7 bei der hypertensiven Nephropathie	35
3.2.1	Unveränderte Lokalisation von BMP-7	35
3.2.2	Verminderte Expression von BMP-7	36
3.2.3	Vermehrte Expression von TNF-alpha und TGF-beta1	37
3.3	Regulation von BMP-7 und dessen Rezeptoren <i>in vitro</i>	38
3.3.1	Einfluss des RAAS auf die Expression und intrazelluläre Aktivität von BMP-7	38
3.3.2	Verminderte Expression von BMP-7 nach Stimulation mit TNF-alpha und TGF-beta1	40
3.3.3	Regulation der BMP-Rezeptoren BMPR-1A, -1B und -2	41
3.4	Funktionen von BMP-7 <i>in vitro</i>	42
3.4.1	BMP-7 hat TGF-beta1-neutralisierende Effekte in HK-2-Zellen	42
3.4.2	BMP-7 hat TNF-alpha-neutralisierende Effekte in HK-2-Zellen	48
3.5	BMP-5-Expression in der humanen Normalniere	49
3.6	Verminderte Expression von BMP-5 bei der hypertensiven Nephropathie	50
3.7	Regulation von BMP-5 <i>in vitro</i>	51
3.7.1	Einfluss des RAAS auf die Expression von BMP-5	51
3.7.2	Einfluss von TNF-alpha und TGF-beta1 auf die Expression von BMP-5	51
3.8	Funktionen von BMP-5 <i>in vitro</i>	53
3.8.1	BMP-5 hat TGF-beta1-neutralisierende Effekte	53
3.8.2	BMP-5 hat TNF-alpha-neutralisierende Effekte	58
4.	Diskussion	60
4.1	Regulation und Funktionen von BMP-7	60
4.1.1	BMP-7 in der adulten Normalniere und bei der hypertensiven Nephropathie	60
4.1.2	BMP-7 und EMT <i>in vitro</i>	61

Inhaltsverzeichnis

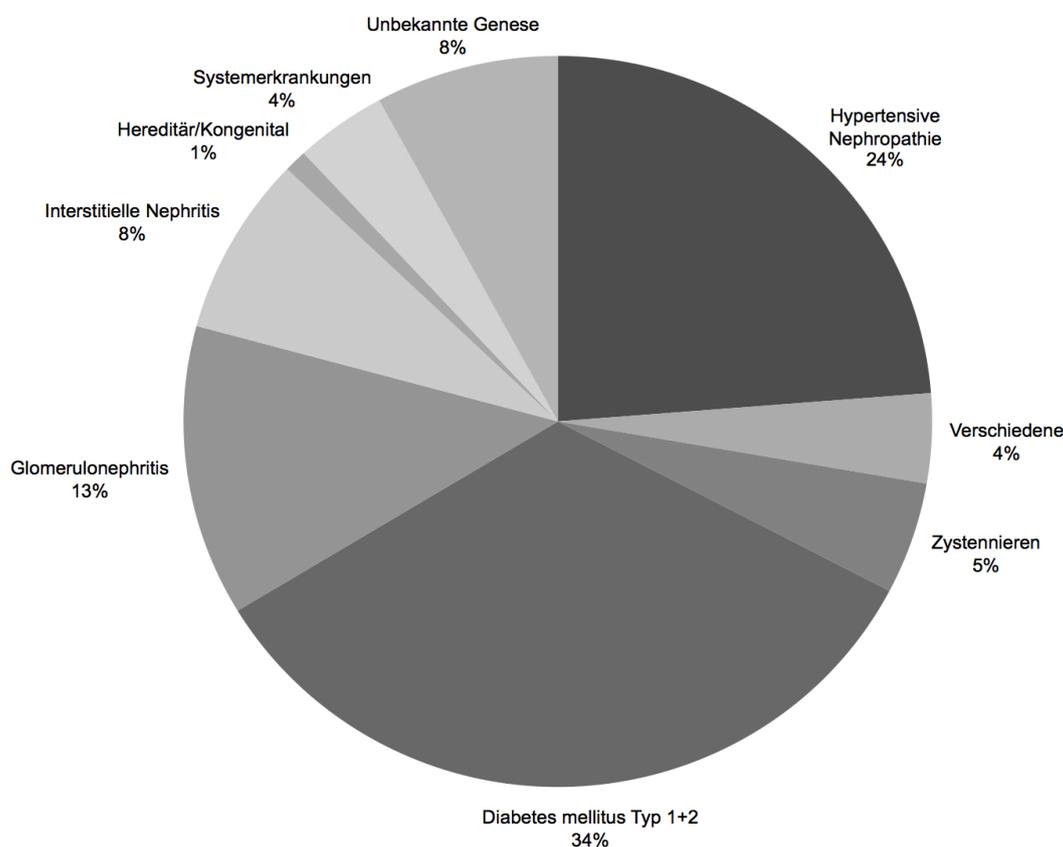
4.1.3	BMP-7 und inflammatorische Prozesse	63
4.2	Regulation und Funktionen von BMP-5	64
4.2.1	BMP-5 in der adulten Normalniere und bei der hypertensiven Nephropathie	64
4.2.2	BMP-5 und EMT <i>in vitro</i>	64
4.2.3	BMP-5 und inflammatorische Prozesse	65
4.3	Verbindung zwischen Inflammation und Fibrose	66
5.	Zusammenfassung	68
6.	Anhang	70
6.1	Abkürzungsverzeichnis	70
6.2	Abbildungsverzeichnis	71
6.3	Tabellenverzeichnis	76
7.	Literaturverzeichnis	77

1. Einleitung

1.1 Klinische Relevanz der hypertensiven Nephropathie

Die Gruppe der chronischen Nierenerkrankungen, welche mit einer progredienten Niereninsuffizienz einhergehen und letztendlich zur Dialysepflicht führen, stellen eines der zentralen Themen in der Nephrologie dar. Es wird geschätzt, dass weltweit mehr als 500 Millionen Menschen an einer chronischen Nierenerkrankung leiden, dies entspricht in etwa jedem Zehnten der Gesamtbevölkerung (Eknoyan et al. 2004). Weltweit sind 1,5 Millionen Menschen von der Dialyse abhängig oder leben mit einer Spenderniere. Auch in Deutschland sind viele Menschen von einer chronischen Nierenerkrankung betroffen, der Bundesverband QuaSi-Niere gab für das Jahr 2006 eine Prävalenz von etwa 800 Dialysepatienten und rund 300 Nierentransplantierten pro Million Einwohner an (Frei und Schober-Halstenberg 2008). Dies entspricht für Deutschland derzeit rund 70.000 Dialysepatienten, etwa 24.000 Menschen leben mit einer transplantierten Niere. Hierbei stellt die hypertensive Nephropathie nach der diabetischen Nephropathie die derzeit zweithäufigste Ursache für eine neu aufgetretene chronische Niereninsuffizienz dar und ist in etwa 24% dieser Fälle für eine terminale Niereninsuffizienz verantwortlich.

Abbildung 1: Inzidenz der Ursachen für eine neu aufgetretene terminale Niereninsuffizienz bei lebenden Dialysepatienten in Nierenersatztherapie im Jahre 2006 (modifiziert nach Frei und Schober-Halstenberg 2008, Seite 35)



1.2 Volkswirtschaftliche Relevanz

In dem Zeitraum zwischen 1997 und 2006 hat die Prävalenz der terminalen Niereninsuffizienz jährlich um etwa 4,4% zugenommen, am 31.12.2006 waren in Deutschland 66.508 Patienten mit einer Dialysebehandlung versorgt. Die anfallenden Kosten belaufen sich pro Patient auf etwa 40.000 Euro jährlich, so dass alleine die Dialysebehandlungen in Deutschland geschätzte Kosten in Höhe von rund 3 Milliarden Euro im Jahr verursachen (Frei und Schober-Halstenberg 2008). Daraus ergibt sich eine immense Belastung für das Gesundheitssystem mit hoher volkswirtschaftlicher Relevanz. Dies unterstreicht die Dringlichkeit präventiver Maßnahmen.

1.3 Pathophysiologie der hypertensiven Nephropathie

Auf Grund der hohen Prävalenz der arteriellen Hypertonie mit über 10 Millionen betroffenen Patienten in Deutschland ist diese der wichtigste Risikofaktor für die Progression nahezu aller Nierenerkrankungen und führt zu einem über 3-fach erhöhten relativen Risiko für eine terminale Niereninsuffizienz (Hsu et al. 2009). Bei der hypertensiven Nephropathie kommt es zu einer Verdickung der afferenten Arteriolen durch hyaline, arteriosklerotische Ablagerungen im Bereich der Gefäßwände, welche zur Einengung des Gefäßlumens und konsekutiver Schädigung der Glomeruli und Tubuli durch Sauerstoffmangel führt. Durch die Minderperfusion wird die Feinregulation des Gefäßtonus der afferenten Arteriole durch den Vasodilatator Stickstoffmonoxid (NO) gestört, da dieser abhängig von einem laminaren Blutfluss und einer kontinuierlichen Scherspannung ist und nur noch vermindert aus dem Gefäßendothel sezerniert wird. In der Konsequenz kommt es zu einer zusätzlichen Einschränkung der Nierendurchblutung und Aktivierung des intrarenalen Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) mit Steigerung des arteriellen Blutdruckes (Juncos et al. 1995). Das histopathologische Korrelat dieser Veränderungen ist eine tubulointerstitielle Fibrosierung mit einem chronischen Tubulusepithelschaden und einer relativen Vermehrung des Interstitiums (Floege und Grone 1995, Panzer et al. 2006). Da unterschiedlichste Grunderkrankungen der Niere zu einer tubulointerstitiellen Fibrose führen, folgt diese gemeinsamen Pathomechanismen und man vermutet ähnliche Vorgänge auch in anderen parenchymatösen Organen wie Leber, Herz oder Lunge (Strutz und Müller 1999, Zeisberg M und Kalluri 2004a).

Die Fibrose stellt einen pathologischen Vernarbungsprozess dar, welcher in die Stadien der Induktions-, Inflammations- und Postinflammationsphase eingeteilt werden kann (Kuncio et al. 1991). Die Induktionsphase ist durch eine Leukozytenmigration von insbesondere dendritischen, mononukleären Zellen, Lymphozyten und Mastzellen charakterisiert, welche mit dem Fibrosierungsgrad korreliert (Holdsworth und Summers 2008, John und Nelson 2007, Kondo et al. 2001, Müller et al. 1992, Sean Eardley und Cockwell 2005, Strutz und Neilson 1994, Vielhauer et al. 2004). Ein wichtiger Mechanismus bei der Migration von Entzündungszellen stellt die Induktion inflammatorischer Zytokine wie dem Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha), dem Transforming Growth Factor-beta1 (TGF-beta1) und Angiotensin-2 (AT-2) dar, welche neben chemotaktischen auch

pro-fibrotische Effekte induzieren können (Strutz und Neilson 1994, Wardle 1993, Zhong et al. 2010). In der anschließenden Phase der Inflammation kommt es zu einer Aktivierung interstitieller Fibroblasten durch diese inflammatorischen Zytokine, welche sowohl von migrierten Entzündungszellen wie auch von residenten Zellen der Niere gebildet werden. Die Folge ist eine gesteigerte Synthese und eine exzessive Ablagerung extrazellulärer Matrixproteine bei vermindertem Matrixabbau (Jones et al. 1992). Die letzte Phase der Postinflammation ist nach Abklingen der initialen Entzündungsreaktion durch eine Proliferation interstitieller Zellen, insbesondere von aktivierten Fibroblasten, mit andauernder extrazellulärer Matrixdeposition, eine Schädigung des funktionellen Tubulusepithels sowie eine Rarefizierung der Kapillaren gekennzeichnet und führt zum progredienten Verlust der Organfunktion (Bohle et al. 1979, Ng et al. 1998).

1.4 Epithelial-mesenchymale Transition (EMT)

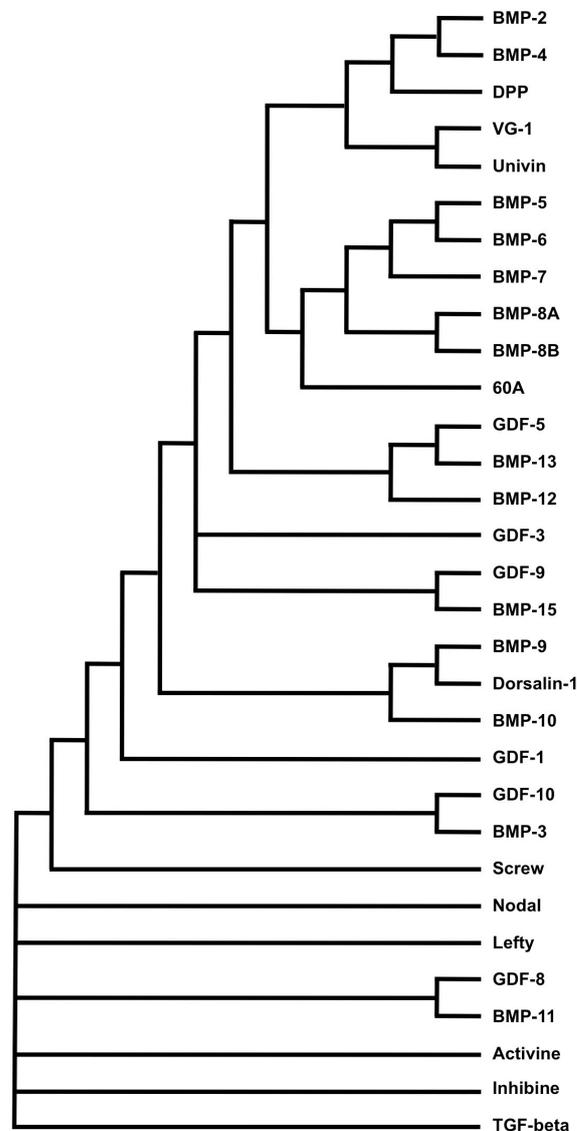
Als ein weiterer Ursprung aktivierter Fibroblasten bei der tubulointerstitiellen Fibrose werden Tubulusepithelzellen diskutiert, welche durch das gestörte zelluläre Milieu dedifferenzieren, den tubuloepithelialen Verband verlassen und Ähnlichkeiten mit mesenchymalen Zellen entwickeln sollen (Zeisberg M und Duffield 2010, Zeisberg M et al. 2003). Dieser Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) wurde erstmals in der frühen Embryogenese als Grundlage für die Gastrulation und die Ausbildung des Neuralrohrs beschrieben (Thiery et al. 2009, Zeisberg M und Neilson 2009). Des Weiteren ist der molekulare Mechanismus der EMT in adulten epithelialen Krebszellen Grundlage für infiltratives Wachstum und Metastasierungsprozesse (Thiery 2002, Yang und Weinberg 2008, Yang et al. 2004). In adulten Zellen der Niere konnten erstmalig Zuk et al. Veränderungen im Sinne einer EMT *in vitro* nachweisen, nachdem Tubulusepithelzellen in einer kollagenhaltigen Gelmatrix einen spindelförmigen Phänotyp ähnlich zu Fibroblasten entwickelten (Zuk et al. 1989). Auf Grund des Nachweises einer EMT in verschiedenen Entwicklungsstadien und Zellentitäten des Organismus wurde diese als Typ 1 für embryonale Epithelzellen, Typ 2 für adulte Epithel- und Endothelzellen sowie Typ 3 für metastasierende Krebszellen klassifiziert (Kalluri und Weinberg 2009).

Mittlerweile wurden eine Vielzahl inflammatorischer und pro-fibrotischer Zytokine wie der Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha), der Transforming Growth Factor-beta1 (TGF-beta1), der Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) oder Angiotensin-2 (AT-2) identifiziert, welche eine EMT in adulten Epithelzellen induzieren können (Burns et al. 2010, Chuang et al. 2008, Kalluri und Weinberg 2009, Strutz et al. 2002, Zeisberg M und Neilson 2010). Pathophysiologische Endstrecke ist hierbei die Induktion mesenchymaler Gene wie Vimentin, alpha-Smooth Muscle Actin (alpha-SMA), dem Fibroblasten-spezifischen Protein-1 (FSP-1) oder Kollagen Typ1 bei gleichzeitigem Verlust epithelialer Marker wie Zona occludens-1 (ZO-1), E-Cadherin oder Zytokeratin (Strutz et al. 1995, Strutz et al. 2002, Zeisberg M und Duffield 2010, Zeisberg M et al. 2003).

1.5 TGF-beta-Superfamilie

Die Superfamilie des Transforming Growth Factor-beta (TGF-beta) umfasst eine Vielzahl konservierter Polypeptide, welche als sezernierte Faktoren eine wichtige Rolle in Wachstums- und Differenzierungsprozessen unterschiedlichster Zelltypen aufweisen. Aktuell konnten mindestens 43 Proteine aus Invertebraten und Vertebraten von Drosophila bis hin zu Säugern identifiziert werden, welche der TGF-beta-Superfamilie zuzuordnen sind (Ducy und Karsenty 2000). Hierzu zählen die Transforming Growth Factors (TGFs), Activine, Inhibine, Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), Nodal, Growth Differentiation Factors (GDFs) und Lefty (Lin et al. 1993, Meno et al. 1996, Zhao 2003, Zhou et al. 1993).

Abbildung 2: TGF-beta-Superfamilie (modifiziert nach Ducy und Karsenty 2000, Seite 2208)



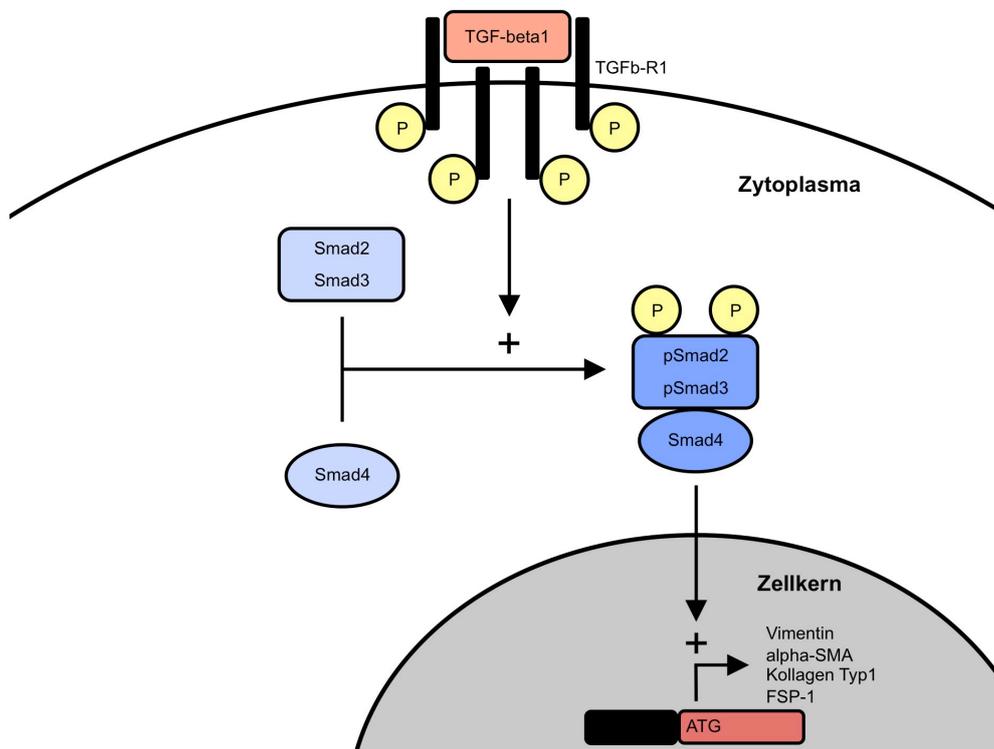
Durch die Regulation von Wachstum, Differenzierung, Matrixsynthese und Apoptose zeigen viele Mitglieder wichtige Funktionen während der Embryonalentwicklung wie Musterbildung und Spezifikation von Geweben. Im adulten Organismus konnte die Beteiligung an Reparaturmechanismen von Geweben und an der Modulation des Immunsystems aufgezeigt werden (Heldin et al. 1997). Die Bezeichnung der TGF-beta-Superfamilie lässt sich auf das erste isolierte Mitglied TGF-beta1 zurückführen, welches die Proliferation verschiedener Zelllinien beeinflusst (Massagué 1990). Die dem Namen TGF-beta1 abzuleitenden Transformationseigenschaften basieren eher auf sekundären Effekten hinsichtlich der Induktion von Wachstumsfaktoren und Matrixbildung (Moses et al. 1990).

1.5.1 Transforming Growth Factor-beta1 (TGF-beta1)

Die verschiedenen Mitglieder der Transforming Growth Factors-beta (TGFs-beta) gelten als die bedeutendsten Zytokine und Hauptmediatoren der Fibrogenese in der Niere wie auch in anderen Organen, wie zum Beispiel Leber, Herz und Lunge (Border und Noble 1994). Beim Menschen sind bislang drei Isoformen mit TGF-beta1, -beta2 und -beta3 identifiziert worden. An der Fibrogenese in der Niere sind insbesondere Effekte von TGF-beta1 beteiligt, da sich ein Großteil der pathologischen Veränderungen wie Glomerulosklerose, Tubulusatrophie, Fibroblastenakkumulation und vermehrte Deposition extrazellulärer Matrix durch eine pathologisch erhöhte Aktivität von TGF-beta1 erklären lassen (Hugo 2003, Peters et al. 1998, Schaefer et al. 2002, Sterzel et al. 2001, Strutz et al. 2001, Wolf und Ritz 2005).

Die Wirkung von TGF-beta1 an der Zielzelle wird durch dessen Rezeptoren TGFb-R1, -R2 und -R3 vermittelt, wobei die wesentlichen Effekte über den TGFb-R1 transduziert werden (Ebner et al. 1993). Nach Bindung von TGF-beta1 an dessen Rezeptor kommt es zu einer Aktivierung der intrazellulären Smad-Signalkaskade mit Phosphorylierung von Smad2/3 und Komplexbildung mit Smad4 (Heldin et al. 1997, Massagué 1992). Dieser Smad-Komplex reguliert im Zellkern die Expression einer Vielzahl von Genen, welche für die Differenzierung und die Proliferation der Zielzelle wichtig sind. So reguliert TGF-beta1 beispielsweise die Proliferation von renalen Fibroblasten oder induziert in epithelialen Zellen die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) mit spindelförmiger Zellmorphologie und Expression mesenchymaler Gene wie alpha-Smooth Muscle Actin (alpha-SMA), dem Fibroblastenspezifischen Protein-1 (FSP-1), Vimentin oder Kollagen Typ1 (Strutz et al. 1995, Strutz et al. 2002, Zeisberg M und Duffield 2010, Zeisberg M et al. 2003). In transgenen Mäusen führen diese Prozesse bei Überexpression von humanem TGF-beta1 zur Entwicklung einer Niereninsuffizienz mit vermehrter tubulointerstitieller Fibrosierung (Kopp et al. 1996). Diese Beobachtungen belegen die Relevanz von TGF-beta1 als Mediator der Fibrose *in vivo*.

Abbildung 3: TGF-beta1-Signalkaskade



1.5.2 Bone Morphogenetic Protein-7 (BMP-7)

Bone Morphogenetic Protein-7 (BMP-7) ist ein körpereigenes Protein, welches ursprünglich als ein die Knochenbildung induzierender Faktor identifiziert wurde (Sampath et al. 1992, Urist 1965). So zeigt BMP-7 bei subkutaner Verabreichung von Proteinextrakten aus der Knochenmatrix von Ratten ektope Ossifikationsherde (Sampath et al. 1992). Das Protein ist ein Homodimer aus 431 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 35 kDa, das reife Monomer besteht aus 139 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 16 kDa (Celeste et al. 1990, Ozkaynak et al. 1990). Die ursprüngliche Bezeichnung Osteogenic Protein-1 (OP-1) wurde in BMP-7 geändert, nachdem die Zugehörigkeit des Proteins zur Familie der BMPs nachgewiesen werden konnte (Urist 1965, Urist et al. 1983).

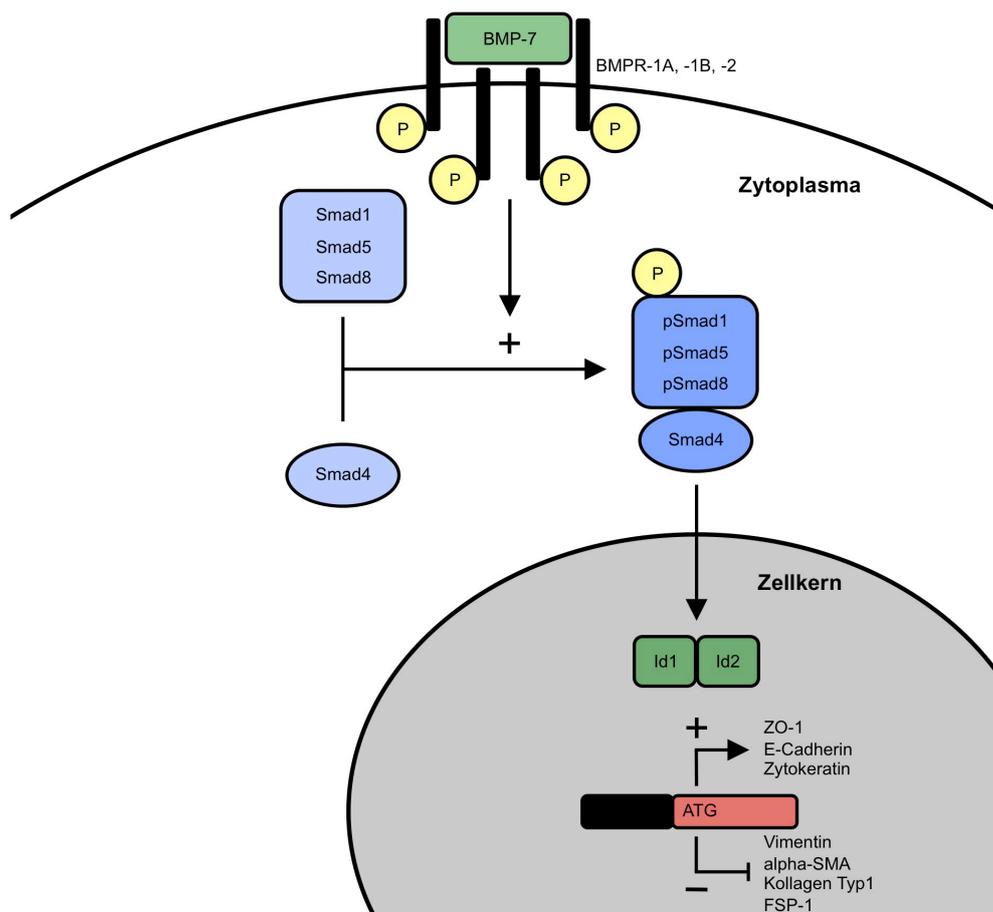
Das Vorläuferprotein des aktiven BMP-7 wird zunächst als ein Komplex bestehend aus zwei Propeptidketten, Prodomäne und Signalpeptid sezerniert und erst durch proteolytische Trennung von Signalpeptid und Propeptid aktiviert (Zeisberg M 2006).

Abbildung 4: Aktivierung von BMP-7 (modifiziert nach Bramlage und Müller 2010, Seite 528)



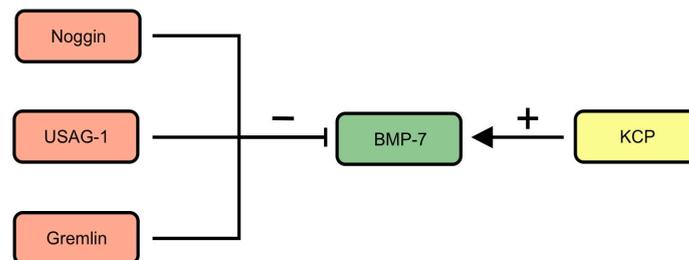
An der Zielzelle bindet BMP-7 an die membrangebundenen BMP-Rezeptoren BMPR-1A (synonym ALK3), -1B (synonym ALK6) und -2 und führt zu einer Aktivierung der intrazellulären Smad-Signalkaskade mit Phosphorylierung von Smad1/5/8 zu pSmad1/5/8 und Komplexbildung mit Smad4 (Derynck et al. 1996, Tamaki et al. 1998, Zeisberg M et al. 2003). Dieser Komplex reguliert im Zellkern die Expression einer Vielzahl von Genen über Aktivierung von DNA-Bindeprotein-Inhibitoren (Id), insbesondere Id2 und Id3, welche sich hemmend auf verschiedene Transkriptionsfaktoren auswirken. So beeinflussen Id2 und Id3 nach Aktivierung die Zelldifferenzierung über eine Induktion epithelialer Gene wie Zona occludens-1 (ZO-1), E-Cadherin und Zytokeratin bzw. eine Hemmung der Expression mesenchymaler Gene wie alpha-Smooth Muscle Actin (alpha-SMA), Kollagen Typ1, dem Fibroblasten-spezifischen Protein-1 (FSP-1) oder Vimentin (Strutz et al. 1995, Strutz et al. 2002, Zeisberg M und Duffield 2010, Zeisberg M et al. 2003). Hierdurch entsteht eine Zellmorphologie vom epithelialen Phänotyp. Des Weiteren regulieren Id-Proteine die Proliferation, die Angiogenese, den Zellzyklus und die Apoptose (Norton 2000, Sikder et al. 2003).

Abbildung 5: Intrazelluläre Signalkaskade von BMP-7 (modifiziert nach Bramlage und Müller 2010, Seite 528)



Eine Reihe extrazellulärer Moleküle kann die Aktivität von BMP-7 modulieren, zum Beispiel inhibieren Noggin, das Uterine Sensitization-associated Gene-1 (USAG-1) und Gremlin die biologische Aktivität von BMP-7. Dagegen verstärkt das Kielin-Chordin-ähnliche Protein (KCP) die biologische Wirkung von BMP-7 (Bechtel und Zeisberg M 2009).

Abbildung 6: Modulatorische Faktoren von BMP-7 (modifiziert nach Bechtel und Zeisberg M 2009, Seite 1690)



Über die Funktion im Knochenstoffwechsel hinaus wird den Mitgliedern der BMP-Familie eine zentrale Bedeutung bei der Embryogenese verschiedener Organe zugeordnet. Zahlreiche Experimente konnten eine Wirkung von BMPs auf Gewebedifferenzierung, -wachstum und -regeneration in unterschiedlichen Organen belegen (Ducy und Karsenty 2000). BMP-7 ist ein so genanntes Morphogen, welches eine wichtige Rolle bei der Nierenentwicklung spielt (Hogan 1996, Kazama et al. 2008). So lässt sich BMP-7 erstmals an Tag 11 post conceptionem vorwiegend im Epithel der Ureterknospe und den kondensierenden mesenchymalen Zellen der murinen Nephrogenese nachweisen (Piscione et al. 1997). Fehlt das Protein, so zeigen BMP-7-defiziente Mäuse eine ausgeprägte Dysplasie beider Nieren und versterben postnatal innerhalb des ersten Tages an den Folgen einer Niereninsuffizienz (Godin et al. 1999). Diese Fehlbildungen werden durch einen Untergang mesenchymaler Zellen an Tag 12 post conceptionem verursacht, aus welchen durch den Prozess der mesenchymal-epithelialen Transition (MET) im weiteren Verlauf die Tubulusepithelzellen entstehen würden. Somit wird BMP-7 eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und der Differenzierung von Tubulusepithelzellen zugeschrieben (Dudley et al. 1995, Luo et al. 1995, Zeisberg M et al. 2004). Des Weiteren konnten im Laufe des letzten Jahrzehnts Studien verschiedener Arbeitsgruppen übereinstimmend demonstrieren, dass BMP-7 anti-inflammatorische und anti-fibrotische Effekte in Tiermodellen des akuten und chronischen Nierenversagens besitzt. Im Gegensatz zu direkten Inhibitoren von TGF-beta1 wie neutralisierenden Antikörpern besitzt BMP-7 eine eigene intrinsische Aktivität und wirkt den Effekten von TGF-beta1 nicht nur entgegen, sondern kann diese auch rückgängig machen. Da TGF-beta1 wie auch BMP-7 ihre Wirkung insbesondere über die Smad-Signalkaskade nach intrazellulär vermitteln, ist die Signaltransduktion beider Proteine eng miteinander gekoppelt und führt zur gegenseitigen Beeinflussung (Bechtel und Zeisberg M 2009, Zeisberg M 2006).

Einer der zentralen Wirkmechanismen von BMP-7 scheint die Antagonisierung der TGF-beta1-vermittelten Schädigung von Tubulusepithelzellen zu sein. So konnte gezeigt werden, dass BMP-7 regenerativ auf Tubulusepithelzellen wirkt, indem es die epithelial-mesenchymale Transition (EMT)

antagonisiert (Zeisberg M et al. 2003). Darüber hinaus hemmt BMP-7 die Aktivierung von Fibroblasten und führt in der Zellkultur zu einer mesenchymal-epithelialen Transition (MET), die morphologischen Veränderungen mesenchymaler Fibroblasten hin zu Zellen ähnlich epithelialen Ursprungs (Zeisberg M und Kalluri 2004b, Zeisberg M et al. 2005). Dies könnte eine weitere regenerative Ressource für Reparaturmechanismen in der Niere darstellen und die anti-fibrotische Wirkung von BMP-7 unterstreichen.

Ein weiterer Effekt von BMP-7 ist eine verminderte inflammatorische Reaktion in Tiermodellen des akuten und chronischen Nierenversagens, welche insbesondere über TNF-alpha reguliert wird (Gould et al. 2002). So konnte gezeigt werden, dass BMP-7 protektive Effekte auf das Tubulusepithel auch über eine verminderte Rate apoptotischer Epithelzellen vermittelt (Yanagita 2007). Darüber hinaus führt die anti-inflammatorische Wirkung von BMP-7 zu einer verminderten Migration und Akkumulation von Entzündungszellen in der Niere (Vukicevic et al. 1998).

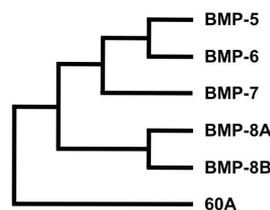
Die Applikation von rekombinantem humanen BMP-7 (rhBMP-7) in Ratten und Mäusen mit akutem Nierenversagen bewirkt eine signifikant beschleunigte Regeneration der Nierenfunktion und -struktur (Vukicevic et al. 1998). Unterschiedliche Effekte wurden im Folgenden auch in verschiedenen Modellen chronischer Nierenerkrankungen beschrieben. In Vergleichsstudien am Rattenmodell der diabetischen wie auch der obstruktiven Nephropathie waren protektive Effekte von BMP-7 für die Niere signifikant besser als die des ACE-Hemmers Enalapril (Wang S et al. 2003). Des Weiteren zeigte BMP-7 nach intraperitonealer Injektion im Mausmodell der akuten Glomerulonephritis anti-fibrotische und regenerative Effekte (Sugimoto et al. 2007). Ähnliche Ergebnisse erbrachten Studien in Tiermodellen der diabetischen Nephropathie bei Diabetes mellitus Typ 1, der Lupusnephritis und des Alport-Syndroms (Sugimoto et al. 2007, Zeisberg M et al. 2003). Da in anderen Organen ähnliche Pathomechanismen über TGF-beta1 vermittelt werden, zeigt BMP-7 auch hier anti-inflammatorische bzw. anti-fibrotische Effekte. Beispiele hierfür sind Tiermodelle chronischer Lebererkrankungen, der Herzfibrose und chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (Maric et al. 2003, Zeisberg EM et al. 2007).

In verschiedenen Tiermodellen des akuten und chronischen Nierenversagens wurden die Regulation und die Funktion von BMP-7 näher untersucht, doch Ergebnisse aus humanem Gewebe liegen nur wenige vor. Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass BMP-7 in der humanen Normalniere insbesondere tubulointerstitiell und bei der hypertensiven Nephropathie vermindert exprimiert wird (Bramlage et al. 2010). Dies könnte auf ähnliche Regulationsmechanismen wie in Tiermodellen chronischer Nierenerkrankungen zurückzuführen sein. Auch wenn die genaue molekulare Wirkungsweise noch nicht verstanden ist, besteht Hoffnung, dass BMP-7 bei Patienten mit akuten oder chronischen Erkrankungen der Niere ein vergleichbares therapeutisches Potential wie im Tiermodell aufweist.

1.5.3 Bone Morphogenetic Protein-5 (BMP-5)

Das Bone Morphogenetic Protein-5 (BMP-5) ist ein weiteres Mitglied der TGF-beta-Superfamilie und nimmt neben den anderen BMPs eine wichtige Rolle im Knochen- und Knorpelstoffwechsel ein (King et al. 1994). BMP-5 ist ein Homodimer aus 454 Aminosäuren mit einem molekularen Gewicht von 52 kDa, das reife Monomer besteht aus 138 Aminosäuren mit einem molekularen Gewicht von 16 kDa (Celeste et al. 1990). Das Protein entstammt derselben Subgruppe von 60A-Proteinen wie BMP-6, -7, -8A und -8B und zeigt starke Homologien zu insbesondere BMP-6 und -7, so dass auch Kreuzhybridisierungen möglich sind (Ducy und Karsenty 2000, Hogan 1996).

Abbildung 7: 60A-Superfamilie (modifiziert nach Ducy und Karsenty 2000, Seite 2208)



Vergleicht man die Aminosäuresequenz der reifen Domäne von BMP-7 mit der Aminosäuresequenz von BMP-5, so zeigt sich eine signifikante Homologie von 78% (Celeste et al. 1990, Jaroszewski et al. 2005).

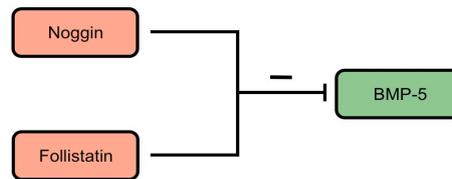
Abbildung 8: Alignment der Aminosäuresequenz der reifen Domäne von BMP-7 (oben) und BMP-5 (unten), Übereinstimmungen in Schwarz

1	TPKNQ EAL RMANVAENSS SD Q Q ACKKHELYV S FRDLGWQDWIIAPEGYAA Y CEGEC A FPLNS Y MNATNHAI V QTLVH FIN PETVPK P CCAPT Q LNAIS	100
1	SS S HQ D SSRMSSVGDY N T S E Q ACKKHELYV S FRDLGWQDWIIAPEGYAA F YCDGEC S FPLN A HMNATNHAI V QTLVH L MPD H VPK P CCAPT K LNAIS	100
101	VLYFDSSNVILKKYRNMVVR AC GCH	126
101	VLYFDSSNVILKKYRNMVVR SC GCH	126

Ähnlich zu BMP-7 wird das Vorläuferprotein des aktiven BMP-5 zunächst als ein Komplex bestehend aus Propeptidkette, Prodomäne und Signalpeptid sezerniert und erst durch proteolytische Trennung von Signalpeptid und Propeptid aktiviert (Celeste et al. 1990). An der Zielzelle bindet BMP-5 an die membrangebundenen BMP-Rezeptoren BMPR-1A, -1B und -2 und führt wie auch BMP-7 zu einer Aktivierung der intrazellulären Smad-Signalkaskade, insbesondere über die Phosphorylierung von Smad1/5/8 zu pSmad1/5/8 (Beck et al. 2001, Johnsen et al. 2009). Dieser Komplex reguliert im Zellkern die Expression von Genen über Aktivierung von DNA-Bindeprotein-Inhibitoren (Id), welche sich hemmend auf verschiedene Transkriptionsfaktoren auswirken. So konnte in kultivierten Zellen der Nebennierenrinde *in vitro* ein Einfluss von BMP-5 auf die Aktivierung von Id1 und auf die Zellproliferation nachgewiesen werden (Johnsen et al. 2009).

Es konnte eine Reihe extrazellulärer Faktoren wie die inhibierenden Modulatoren Noggin und Follistatin identifiziert werden, welche die biologische Aktivität von BMP-5 beeinflussen (Beck et al. 2001, Johnsen et al. 2009).

Abbildung 9: Modulatorische Faktoren von BMP-5



Über die Funktion im Knochenstoffwechsel hinaus wird BMP-5 eine zentrale Bedeutung bei der Embryogenese verschiedener Organe zugeordnet. So konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass BMP-5 an der Nephrogenese beteiligt ist und in der postnatalen Niere exprimiert wird (Dudley und Robertson 1997, King et al. 1994, Ozkaynak et al. 1992). BMP-5-defiziente Mäuse sind im Gegensatz zu BMP-7-defizienten Mäusen lebensfähig, zeigen allerdings auch ausgeprägte Veränderungen im Bereich der Nieren und der ableitenden Harnwege mit Hydronephrose beider Nieren (Kingsley et al. 1992, Zhao 2003). Es wird angenommen, dass BMP-5 und -7 synergistische Effekte aufweisen und BMP-5 in BMP-7-defizienten Mäusen teilweise die Rolle des fehlenden BMP-7 in der Nephrogenese übernehmen kann (Oxburgh et al. 2005). Das Fehlen beider Proteine in BMP-5/BMP-7-defizienten Mäusen führt verglichen zur alleinigen BMP-7-Defizienz zu einem exazerbierten Phänotyp und dem intrauterinen Versterben an Tag 10,5 post conceptionem (Solloway und Robertson 1999).

Über die Regulation und die Funktion von BMP-5 in der adulten Niere ist bislang nur wenig bekannt. Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass BMP-5 in der adulten humanen Normalniere tubulointerstitiell und ähnlich wie BMP-7 bei der hypertensiven Nephropathie vermindert exprimiert wird (Bramlage et al. 2011). Auch wenn die genaue Regulation und Funktion insbesondere in der adulten Niere noch nicht genau geklärt ist, so nimmt BMP-5 neben BMP-7 eine wichtige Rolle in der Nephrogenese ein und könnte ähnlich protektive Effekte in Modellen des akuten und chronischen Nierenversagens zeigen.

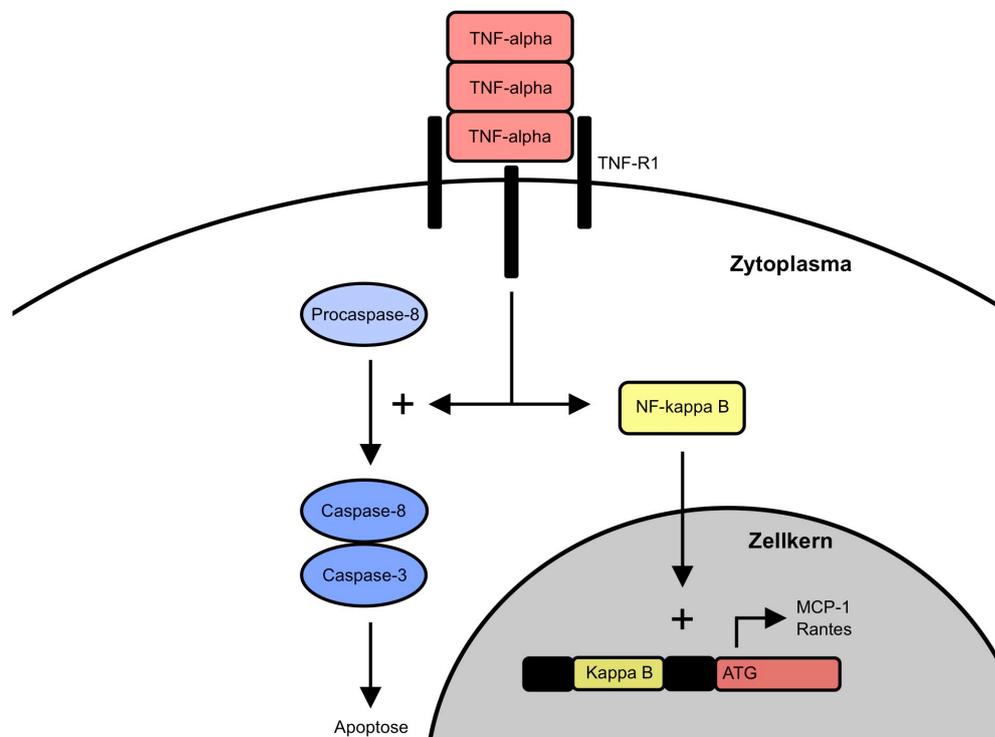
1.6 Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha)

Der Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha) wird in seiner Vorstufe als transmembranöses Protein transkribiert, welches sich zu einem stabilen Homotrimer mit einer molekularen Größe von jeweils 26kDa arrangiert. Die Aktivierung dieser membrangebundenen Vorstufe in dessen aktive lösliche Form erfolgt über eine proteolytische Spaltung durch die Metalloprotease TNF-alpha-Converting-Enzyme (TACE), welche nun eine molekulare Masse von 51 kDa aufweist.

Als potentester Mediator von Entzündungsreaktionen spielt TNF-alpha eine zentrale Rolle bei der Induktion und der Regulation inflammatorischer Prozesse verschiedenster Gewebeentitäten und wird neben Entzündungszellen von zum Beispiel Fibroblasten, endothelialen und epithelialen Zellen exprimiert. Seine Wirkung an der Zielzelle vermittelt TNF-alpha über dessen Rezeptoren, wobei die inflammatorische und zytotoxische Wirkung im Gewebe über den TNF-R1 vermittelt wird und TNF-R2 isoliert von Zellen des blutbildenden Systems exprimiert wird (Stewart und Marsden 1995). Nach

Bindung von TNF-alpha an dessen membrangebundenen Rezeptor kommt es zu einer Aktivierung des intrazellulären Faktors Nuclear Factor-kappa B (NF-kappa B), welcher als Transkriptionsfaktor das kappa-B-Motiv, ein DNA-Abschnitt von etwa 10 Basenpaaren Größe, erkennt und nachgeschaltete Gene regulieren kann. So induziert TNF-alpha über NF-kappa B die Transkription von in etwa 200 inflammatorischen und regulatorischen Zytokinen wie das Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) und Rantes, welche die Migration von insbesondere mononukleären Entzündungszellen aus dem Blut regulieren und verstärken (Leonard und Yoshimura 1990, Luster 1998, Nelson et al. 1993, Rollins et al. 1991, Rovin et al. 1995, Schall et al. 1990, Zoja et al. 1998). Zum anderen kann TNF-alpha den programmierten Zelltod Apoptose über den Caspase-Signalweg induzieren. Nach Bindung von TNF-alpha an dessen Rezeptor kommt es zu einer Aktivierung der Initiatorcaspase Procaspase-8 zu Caspase-8, welche wiederum die Effektorcaspase Caspase-3 initiiert (Thornberry und Lazebnik 1998). Konsekutiv werden einerseits Proteine inaktiviert, welche den Zellzyklus erhalten und der Apoptose entgegenwirken (Bhardwaj et al. 2007, Li et al. 1998). Andererseits kommt es zu einem Abbau von Teilen des Zytoskeletts und zu einer Kondensation des Chromatins durch Abbau von Lamin, einem Bestandteil der Kernmembran (Enari et al. 1998, Liu et al. 1997, Orth et al. 1996, Takahashi et al. 1996). Endstrecke ist die Einstellung des zellulären Zyklus sowie des Zellmetabolismus, was zum programmierten Zelltod Apoptose führt.

Abbildung 10: Intrazelluläre Signalkaskade von TNF-alpha



Im Tiermodell des post-ischämischen akuten Nierenversagens wird TNF-alpha vermehrt exprimiert und nimmt eine frühe, zentrale Rolle bei der Induktion bzw. der Regulation der inflammatorischen Reaktion ein. So zeigte sich nach intraperitonealer Applikation eines neutralisierenden Bindeproteins

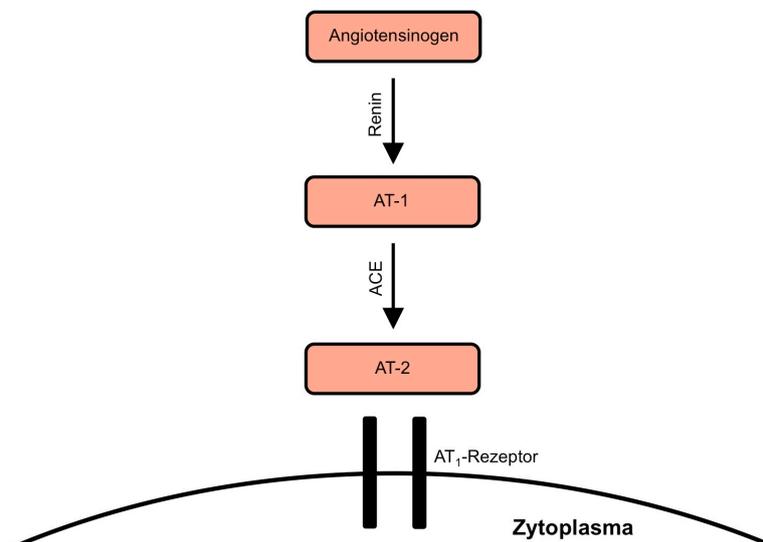
gegen TNF-alpha eine Reduktion der inflammatorischen Reaktion mit verminderter Migration und Aktivierung von Entzündungszellen, eine Verbesserung der Funktionsparameter sowie ein schnellere Regeneration der Niere (Donnahoo et al. 1999).

Auch bei chronischen Nierenschädigungen spielen inflammatorische Prozesse mit einer andauernden interstitiellen Inflammation und Migration von Entzündungszellen eine zentrale Rolle (Guijarro und Egido 2001, Krensky und Ahn 2007, Lange-Sperandio et al. 2007, Segerer et al. 2000). So lassen sich in Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen inflammatorische Proteine wie TNF-alpha, das C-reaktive Protein (CRP) oder die Interleukine (IL)-1 und -6 vermehrt im Plasma nachweisen (Lee und Kalluri 2010).

1.7 Angiotensin-2 (AT-2)

Das für die Blutdruckregulation und Nierenperfusion wichtige Peptid Angiotensin-2 (AT-2) ist Teil des intrarenalen Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und hat einen relevanten Einfluss auf die Entstehung der arteriellen Hypertonie und der Fibrogenese bei der hypertensiven Nephropathie (Johnson et al. 1992). Angiotensinogen wird in der Leber gebildet und durch das Enzym Renin in dessen Vorstufe Angiotensin-1 (AT-1) überführt. Die aktive Form Angiotensin-2 (AT-2) wird durch das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) gebildet und vermittelt dessen Wirkung über die membrangebundenen Rezeptoren AT₁ und AT₂.

Abbildung 11: RAAS-Signalkaskade



Über einen verminderten afferenten Blutfluss infolge arteriosklerotischer Verengungen der Arteriolen wird das RAAS stimuliert, was zu einer erhöhten Konzentration von AT-2 führt. Dies führt über die systemische Blutdrucksteigerung mit erhöhter glomerulärer Druckbelastung zu oxidativem Stress und zu einem gestörten zellulären Milieu. Neben dem Einfluss auf den systemischen Blutdruck konnte gezeigt werden, dass AT-2 in der Niere zu einer vermehrten Expression von inflammatorischen bzw.

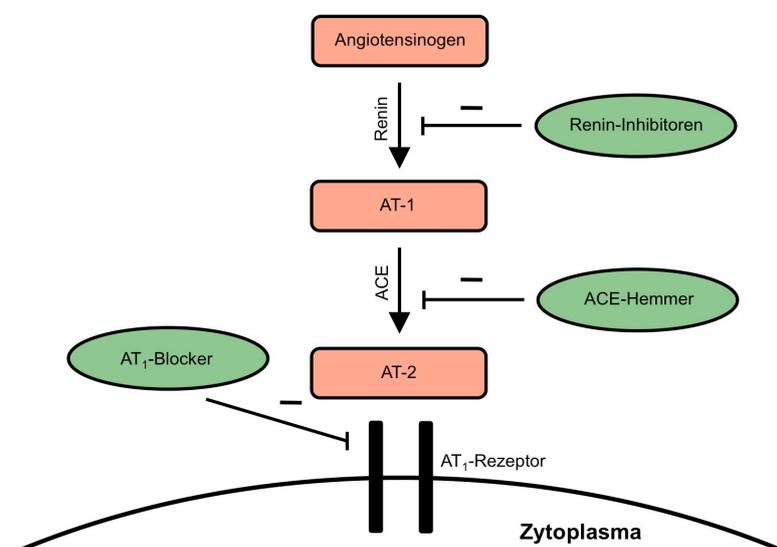
pro-fibrotischen Zytokinen führt, insbesondere von TNF-alpha und TGF-beta1 (Klahr und Morrissey 1998). Die Folgen sind eine vermehrte Produktion extrazellulärer Matrixproteine und Veränderungen im Sinne einer epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) *in vitro* (Burns et al. 2010, Johnson et al. 1992, Kagami et al. 1994, Wolf et al. 1999). Im Tiermodell zeigte sich nach kontinuierlicher, systemischer Applikation von AT-2 eine tubulointerstitielle Fibrose mit tubulärer Atrophie, vaskulärer und glomerulärer Schädigung sowie vermehrter Leukozyteninfiltration (Johnson et al. 1992).

1.8 Aktuelle Therapieregime

Die Möglichkeiten bei der Therapie der progredienten hypertensiven Nephropathie sind begrenzt. Im Vordergrund steht die optimale Einstellung der zu Grunde liegenden arteriellen Hypertonie sowie von Begleiterkrankungen, welche zu einer zusätzlichen Schädigung der Niere führen. Zusätzliches Problem ist die frühzeitige Diagnosestellung, da klinische Zeichen der Niereninsuffizienz wie Anstieg der Retentionsparameter im Blut sowie eine erhöhte Eiweißausscheidung im Urin erst in späteren Stadien der Erkrankung auftreten (Wiederkehr et al. 2005).

Die medikamentöse Therapie konzentriert sich hauptsächlich auf die antihypertensive Behandlung mit RAAS-Inhibitoren. Zum einen werden Hemmstoffe des Angiotensin-Converting-Enzyms (ACE), sog. ACE-Hemmer, angewandt, welches für die Aktivierung von Angiotensin-1 (AT-1) zu Angiotensin-2 (AT-2) verantwortlich ist. Alternativ können auch direkte Antagonisten am AT₁-Rezeptor, sog. AT₁-Rezeptor-Antagonisten oder AT₁-Blocker verwendet werden. Zum anderen steht in den letzten Jahren mit dem direkten Renininhibitor Aliskiren der Firma Novartis eine weitere Medikamentengruppe zur Verfügung, welche in die Signalkaskade des RAAS eingreift (Riccioni et al. 2010). Die medikamentöse Inhibition des RAAS kann die Progredienz der hypertensiven Nephropathie verlangsamen, doch häufig den fortschreitenden Verlust der Organfunktion nicht gänzlich aufhalten (Turgut et al. 2010).

Abbildung 12: Wirkmechanismus der RAAS-Inhibitoren



1.9 Zielsetzung

Aus Tiermodellen akuter und chronischer Nierenerkrankungen ist bekannt, dass BMP-7 in der geschädigten Niere vermindert exprimiert wird. Darüber hinaus zeigt die Applikation von rekombinantem humanen BMP-7 (rhBMP-7) in diesen Modellen regenerative und protektive Effekte. Diese lassen sich insbesondere auf eine verminderte Apoptoserate, eine Reduktion der Akkumulation inflammatorischer Zellen sowie regenerative Effekte auf das Tubulusepithel der Niere zurückführen. Zugehörige Studien wurden meist in Tiermodellen durchgeführt, dagegen sind Ergebnisse aus humanen Nieren derzeit nur wenige verfügbar. In diesem Kontext waren folgende Fragestellungen Ziele dieser Arbeit:

- a) In welchen Kompartimenten der humanen Niere wird BMP-7 exprimiert und ist die in Tiermodellen akuter und chronischer Nierenerkrankungen beobachtete verminderte Expression von BMP-7 auf die humane hypertensive Nephropathie übertragbar?
- b) Welchen Einfluss hat das für die Entstehung der hypertensiven Nephropathie relevante RAAS auf die Expression und Funktion von BMP-7 und dessen Rezeptoren BMPR-1A, -1B und -2 in der humanen proximalen Tubulusepithelzelllinie HK-2?
- c) Haben die pro-inflammatorischen bzw. pro-fibrotischen Faktoren TNF-alpha und TGF-beta1 einen Einfluss auf die Expression von BMP-7 und dessen Rezeptoren in HK-2-Zellen?
- d) Welchen Effekt hat die Stimulation von HK-2-Zellen mit BMP-7 auf TNF-alpha- bzw. TGF-beta1-induzierte Effekte *in vitro*?

BMP-5 ist ein weiteres Protein aus derselben Subgruppe wie BMP-7 und weist starke Homologien zu diesem auf. Wie BMP-7 ist auch BMP-5 an der Organogenese der Niere beteiligt, dessen Rolle in der adulten Niere ist jedoch bislang unbekannt. Daher waren weitere Fragestellungen der vorliegenden Arbeit:

- e) Zeigt BMP-5 ein ähnliches Expressionsmuster wie BMP-7 in der humanen Niere und ist die hypertensive Nephropathie mit einer veränderten Expression von BMP-5 assoziiert?
- f) Hat AT-2 als Teil des RAAS einen Einfluss auf die Expression von BMP-5 in HK-2-Zellen?
- g) Welchen Effekt haben die pro-inflammatorischen bzw. pro-fibrotischen Faktoren TNF-alpha und TGF-beta1 auf die Expression von BMP-5?
- h) Zeigt BMP-5 in HK-2-Zellen einen Einfluss auf TNF-alpha- bzw. TGF-beta1-vermittelte Effekte *in vitro*?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Analysewaage, 1213 MP	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Autoklav	Biomedis, Gießen, Deutschland
CO ₂ -Inkubator Nuaire Autoflow	Nuaire, Plymouth, USA
Durchflusszytometer FACSCalibur	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen, Deutschland
Elektrophoresekammer Mini-Protean	BioRad, München, Deutschland
ELISA-Reader DigiScan	ASYS Hitech, Eugendorf, Österreich
Entwicklungsmaschine Kodak-X-Omat	Kodak, Rochester, USA
Fluor S-Multimager	BioRad, München, Deutschland
Fluoreszenzkamera ColorView	Olympus, Münster, Deutschland
Heizblock TR-L288	Liebisch, Bielefeld, Deutschland
Homogenisator ULTRA-TURRAX	IKA, Wolfen, Deutschland
Kühlzentrifuge GS-6R	Beckmann, München, Deutschland
Kühlzentrifuge, Mikroliterzentrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Lichtmikroskop	Leica, Solms, Deutschland
Magnetrührer (beheizbar), IKAMAG RCT	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Mikroskop Axiovert S100TV	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mikrotom 2040	Reichert-Jung, Nussloch, Deutschland
Nanopore Wasseranlage Ultrafree 20	Millipore, Eschborn, Deutschland
pH-Meter MP 220	Mettler Toledo, Columbus, USA
Photometer BioPhotometer plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe pipetus-akku	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Plattformschüttler Titramax 100T	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Scanner CanonScan 4400F	Canon, Tokyo, Japan
Spannungsgerät Power Pac 1000	BioRad, München, Deutschland
Sterilbank Hera Save	Heraeus, Hanau, Deutschland
Stickstofftank Chronos Biosave	Messer Griesheim, Deutschland
Thermocycler Mastercycler personal	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermocycler RT-PCR MX3000P	Stratagene, La Jolla, USA
Wärmebad GFL 1004	Schütt, Göttingen, Deutschland
Wippe Duomax 1030	Heidolph, Schwabach, Deutschland

2.1.2 Software

AnalySIS	Olympus SIS, Münster, Deutschland
MxPro QPCR Software	Stratagene, La Jolla, USA
MS Office	Microsoft, Redmond, USA
Prism	GraphPad Software, La Jolla, USA
Quantity One Basic	BioRad, München, Deutschland
SigmaStat	Systat, Wuppertal, Deutschland

2.1.3 Gebrauchsmaterialien

Chamber Slides 8 Well/0,8 cm ² pro Well	Nalge Nunc, Rochester, USA
Combitips plus 10 ml, steril	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Falcon 15-ml-Röhrchen, steril	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Falcon 50-ml-Röhrchen, steril	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Falcon 7105 Bottle Top Filter, steril	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Falcon Zellkulturflasche mit Luftfilter T75	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Eindeckgläser	Thermo, Braunschweig, Deutschland
Filterpapier 2 mm	BioRad, München, Deutschland
Filterpapier Microscience	Schleicher & Schell, Dassel, Deutschland
Glaswaren	Schott, Mainz, Deutschland
Mehrkanalpipette Dispenser Multipipette 4780	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Migrationskammer 48 Well/8 mm ² Filterfläche	Neuro Probe, Gaithersburg, USA
Mikroliter Pipetten 10, 100, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikrotiterplatten Falcon Microtest 96	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Neubauer-Zählkammer	Saaringia, Saarlouis, Deutschland
Objektträger Super Frost	Thermo, Braunschweig, Deutschland
Parafilm „M“	Pechiney, Chicago, USA
Pasteurkapillarpipetten	WU, Mainz, Deutschland
Pasteurpipetten	Brand, Gießen, Deutschland
Petrischalen Cellstar	Greiner, Solingen, Deutschland
Pipetten 2, 5, 10, 25 ml	Greiner, Solingen, Deutschland
Pipettenspitzen 10, 100, 1000 µl	Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland
Platte Falcon 6-Well	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Reagenzgefäß 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Röntgenfilm FujiFilm Super RX	FujiFilm, Tokyo, Japan
Skalpelle	pfm, Köln, Deutschland
Zellschaber	Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland

2.1.4 Chemikalien

Accutase	PAA, Pasching, Österreich
Aceton	Merck, Darmstadt, Deutschland
Acrylamid (bis 30%)	BioRad, München, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Fluka, Buchs, Schweiz
beta-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Paesel & Lorei, Hanau, Deutschland
Bradford-Reagenz	BioRad, München, Deutschland
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Citratpuffer REAL Target Retrieval Solution	Dako, Glostrup, Dänemark
Coomassie-Brillantblau	BioRad, München, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
DMEM	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Dulbecco's PBS	PAA, Pasching, Österreich
Eindeckmedium Immu-Mount	Thermo, Braunschweig, Deutschland
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum, US-Standard	Invitrogen, Carlsbad, USA
Glycerol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Glycin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Kaisers Glyceringelatine	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
L-Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
L-Glutamin 200 nM	PAA, Pasching, Österreich
Laemmler Sample Buffer	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt, Deutschland
Mastermix iQ SYBR Green Supermix	BioRad, München, Deutschland
Mayers Hämatoxylin-Lösung	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Metashield Mounting Medium mit DAPI	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Natronlauge (NaOH) 1 M	Merck, Darmstadt, Deutschland
Nitrocellulosemembran Hybond-ECL	Amersham, Freiburg, Deutschland
Nucleasefreies Wasser (NFW)	Ambion, Cambridgeshire, UK
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom, Berlin, Deutschland

Phenylmethansulfonsäurefluorid (PMSF)	Boehringer, Mannheim, Deutschland
Plasmocin 25 ng/ml	InvivoGen, Toulouse, Frankreich
Ponceau S	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Quantum 286	PAA, Pasching, Österreich
Rainbow Marker RPN800E	Amersham, Freiburg, Deutschland
RNAse H	Invitrogen, Carlsbad, USA
RNAse out	Invitrogen, Carlsbad, USA
Roti-Blue 5x-Konzentrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
ROX Passive Reference Dye	BioRad, München, Deutschland
RPMI-1640	Invitrogen, Carlsbad, USA
Salzsäure (HCl) 1 M	Merck, Darmstadt, Deutschland
Superscript	Invitrogen, Carlsbad, USA
Tergitol (NP-40)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tris-Base	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Trypsin-EDTA 1x	PAA, Pasching, Österreich
Tween 20%	Boehringer, Mannheim, Deutschland

Alle Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad „pro analysi“.

2.1.5 Kitsysteme

3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC)	Dako, Glostrup, Dänemark
Annexin-V-FLUOS Staining Kit	Roche, Penzberg, Deutschland
Dako EnVision System	Dako, Glostrup, Dänemark
RNeasy Mini Kit	Quiagen, Hilden, Deutschland
Vectastain Elite ABC Kit	Vectorlabs, Burlingame, USA
Western Lightning plus ECL	Perkin Elmer, Waltham, USA

2.1.6 Allgemeine Puffer und Lösungen

10x PBS

KH ₂ PO ₄	1,44 g
Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	7,59 g
NaCl	90,00 g
ddH ₂ O	1000 ml

PBS Tween

1x PBS	999 ml
Tween 20%	1 ml

Blocklösung

BSA	1 g
ddH ₂ O	100 ml

Peroxidaseblock

H ₂ O ₂ 30%	50 ml
ddH ₂ O	450 ml

Entfärbelösung für die Immunhistochemie

NH ₃ 25%	2,6 ml
ddH ₂ O	997,4 ml

Lysispuffer für die mRNA-Isolation

beta-Mercaptoethanol	10 µl
RLT-Puffer RNeasy Mini Kit	700 µl

DNA-Verdau

RNAse-freie DNase I	10 µl
RDD-Puffer	70 µl

Oligonukleotid-Mischung für die Umschreibung der mRNA in cDNA

Nukleasefreies Wasser (NFW)	5 µl
dNTP-Mix 10 mM	1 µl
Oligo-dt	1 µl

Ansatz für die rtPCR

Mastermix	12,5 µl
Vorwärtsprimer 1:50	0,5 µl
Rückwärtsprimer 1:50	0,5 µl
ROX 1:50	0,5 µl
Nukleasefreies Wasser (NFW)	11 µl

Lysispuffer für den Western Blot

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	100 ml
3% PMSF in Isopropanol	0,21 ml

Transferpuffer

Tris-Base	3,03 g
Glycin	14,4 g
Methanol	200 ml
ddH ₂ O	1000 ml

Lösung für das Membranstripping, pH 7,5

Tris	0,5 g
SDS 10%	10 ml
beta-Mercaptoethanol	350 µl
ddH ₂ O	50 ml

2.1.7 Antikörper

Biotinyliertes Kaninchen-anti-Ziege monoklonal IgG	Dako, Glostrup, Dänemark
FITC-konjugiertes Esel-anti-Maus monoklonal IgG	Jackson IR, West Grove, USA
FITC-konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen monoklonal IgG	Jackson IR, West Grove, USA
FITC-konjugiertes Ziege-anti-Maus monoklonal IgG	Jackson IR, West Grove, USA
HRP-konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen monoklonal IgG	Dako, Glostrup, Dänemark
Kaninchen-anti-Mensch-alpha-SMA monoklonal IgG	Novus Biologicals, Littleton, USA
Kaninchen-anti-Mensch-AQP-1 polyklonal IgG	Alpha Diagnostic, San Antonio, USA
Kaninchen-anti-Mensch-AQP-2 monoklonal IgG	EMD Chemicals, Gibbstown, USA
Kaninchen-anti-Mensch-beta-Aktin polyklonal IgG	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Kaninchen-anti-Mensch-FSP-1 (S100A4) polyklonal IgG	Atlas Antibodies, Stockholm, Schweden
Kaninchen-anti-Mensch-pSmad1/5/8 polyklonal IgG	Cell Signaling, Danvers, USA
Kaninchen-anti-Mensch-pSmad2 monoklonal IgG	Cell Signaling, Danvers, USA
Kaninchen-anti-Mensch-ZO-1 polyklonal IgG	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Maus-anti-Mensch-Calbindin-D28k monoklonal IgG	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Maus-anti-Mensch-E-Cadherin monoklonal IgG	Santa Cruz, Santa Cruz, USA

Maus-anti-Mensch-Vimentin monoklonal IgG	Dako, Glostrup, Dänemark
RR-konjugiertes Maus-anti-Ziege monoklonal IgG	Jackson IR, West Grove, USA
Ziege-anti-Mensch-BMP-5 polyklonal IgG	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Ziege-anti-Mensch-BMP-7 polyklonal IgG	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Ziege-anti-Mensch-Kollagen Typ1 polyklonal IgG	Southern Biotech, Birmingham, USA

2.1.8 Stimulanzen

AT-2	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
rhBMP-5	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
rhBMP-7	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
rhTGF-beta1	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
rhTNF-alpha	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Telmisartan	Boehringer, Ingelheim, Deutschland

2.1.9 Primer für die rtPCR

alpha-SMA	PrimerDesign, Southampton, UK
BMP-5	PrimerDesign, Southampton, UK
BMP-7	PrimerDesign, Southampton, UK
BMPR-1A	PrimerDesign, Southampton, UK
BMPR-1B	PrimerDesign, Southampton, UK
BMPR-2	PrimerDesign, Southampton, UK
E-Cadherin	PrimerDesign, Southampton, UK
FSP-1	PrimerDesign, Southampton, UK
MCP-1	PrimerDesign, Southampton, UK
PPIA	PrimerDesign, Southampton, UK
Rantes	PrimerDesign, Southampton, UK
ZO-1	PrimerDesign, Southampton, UK

2.1.10 Humanes Nierengewebe

Es wurden bioptisch gewonnene Gewebeproben von 12 Patienten der Universitätsmedizin Göttingen mit klinisch und histologisch gesicherter hypertensiver Nephropathie verwendet. Ein Teil der Gewebeproben wurde hierfür in Formalin fixiert, anschließend in Paraffin eingebettet und mittels Immunhistochemie und Immunfluoreszenz analysiert (freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. med. H.-J. Gröne, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, Deutschland, zur Verfügung gestellt). Ein weiterer Teil der Gewebeproben wurde in Flüssigstickstoff eingefroren und anschließend bei -80°C

gelagert. Diese wurden nach Isolation der mRNA mittels rtPCR untersucht. Als Kontrollen galten 10 Gewebeproben aus dem gesunden Anteil von Tumornephrektomien bei Patienten mit Nierenzellkarzinomen. Eine Zustimmung der Ethikkommission der Universitätsmedizin Göttingen liegt vor (Antragsnummern 11/10/04 und 19/9/05).

2.1.11 Zelllinie HK-2

Die Zelllinie HK-2 wurde von Ryan et al. etabliert (Ryan et al. 1994). Es handelt sich um humane renale proximale Tubulusepithelzellen aus dem kortikalen Anteil einer nicht infizierten Normalniere. Diese wurden von American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA) mittels Transfektion der Gene E6 und E7 aus dem humanen Papillomavirus (HPV)-16 immortalisiert, da dieses keine signifikanten Phänotyp- und Funktionsänderungen bewirkt. HK-2-Zellen besitzen morphologische und funktionelle Charakteristika von differenzierten proximalen Tubulusepithelzellen, zum Beispiel lange und dichtstehende Mikrovilli, junctionale Komplexe und die für den Bürstensaum typischen Enzyme alkalische Phosphatase, saure Phosphatase, γ -Glutamyltransferase und Leucin-Aminopeptidase (Ryan et al. 1994). Die Kultivierung erfolgte in Quantum 286, die Stimulationen in serumfreiem DMEM. Im Abstand von 4 Wochen erfolgte die regelmäßige Kernfärbung mit dem blauen Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) zum Ausschluss einer Infektion mit Mykoplasmen.

2.2 Methoden

2.2.1 Immunfluoreszenz in humanen Gewebeproben

Nach Fixierung der Gewebeproben in wässriger Formalinlösung mit 4%igem Formaldehyd und Entwässerung mittels einer in der Konzentration aufsteigender Alkoholreihe wurden diese in Xylol inkubiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Nach Erkalten der Gewebeproben wurden Schnitte der Dicke 3 μ m mittels dem Mikrotom 2040 angefertigt, auf Objektträger plaziert und über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank getrocknet. Die so gewonnenen Paraffinschnitte wurden 2x 10 min in Xylol entparaffinisiert und mittels einer in der Konzentration abfallender Ethanolreihe (2x 2 min in 100%-, 1x 2 min in 95%-, 1x 1 min in 70%igem Ethanol) bzw. Inkubation in bidestilliertem Wasser (ddH₂O) alleine über 5 min rehydriert. Nach dreimaligem Waschen in PBS über jeweils 5 min erfolgte anschließend die Antigendemaskierung mittels Citratpuffer über 10 min bei 600 Watt in der Mikrowelle und das Abkühlen auf Raumtemperatur über 10 min. Dann wurden die freien Bindungsstellen durch Inkubation in der Blocklösung über 30 min bei Raumtemperatur zur Reduzierung von unspezifischen Bindungen abgesättigt. Anschließend erfolgte die parallele Inkubation mit den Primärantikörpern in der Blocklösung bei 4°C über Nacht (die Primärantikörper sind in Tabelle 1 näher aufgeführt). Am Folgetag wurden die Gewebeschnitte dreimalig in PBS über jeweils 5 min gewaschen. Als Sekundärantikörper dienten Rhodaminrot (RR, rot)- und Fluoresceinisothiocyanat (FITC, grün)-

markierte Fluoreszenzantikörper, welche in der Blocklösung verdünnt wurden (die zugehörigen Sekundärantikörper sind in Tabelle 1 näher aufgeführt). Die Inkubation erfolgte anschließend über jeweils 60 min bei Raumtemperatur in der Dunkelkammer. Nach dreimaligem Waschen in PBS über jeweils 5 min erfolgte abschließend die Kernfärbung und das gleichzeitige Eindecken mittels Vectashield Mounting Medium, welches den Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, blau) enthält. Bei allen Experimenten wurden Negativkontrollen durch alleinige Inkubation mit den Sekundärantikörpern angefertigt.

Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit dem Mikroskop Axiovert S100TV, der Fluoreszenzkamera ColorView und der Software AnalySIS. Die alleinige Lokalisation der Zielantigene resultierte nach Zusammenlegen der einzelnen Farbkanäle in einem roten bzw. grünen Signal, eine gemeinsame Lokalisation in einem orangefarbenen Signal.

Tabelle 1: Verwendete Antikörper für die Immunfluoreszenz in humanen Gewebeproben

Primärantikörper			zugehöriger Sekundärantikörper		
Antigen	Ursprung	Verdünnung	Ursprung	Markierung	Verdünnung
AQP-1	Kaninchen	1:50	Ziege	FITC	1:50
AQP-2	Kaninchen	1:50	Ziege	FITC	1:50
BMP-5	Ziege	1:10	Maus	RR	1:50
BMP-7	Ziege	1:10	Maus	RR	1:50
Calbindin-D28k	Maus	1:1000	Esel	FITC	1:50
THP	Kaninchen	1:50	Ziege	FITC	1:50

2.2.2 Immunhistochemie in humanen Gewebeproben

Die Paraffinschnitte wurden wie zuvor beschrieben angefertigt, 2x 10 min in Xylol entparaffinisiert und mittels einer in der Konzentration abfallender Ethanolreihe (2x 2 min in 90%-, 1x 2 min in 80%-, 1x 1 min in 70%igem Ethanol) bzw. Inkubation in ddH₂O alleine über 5 min rehydriert. Nach zweimaligem Waschen in PBS über jeweils 5 min erfolgte anschließend die Antigendemaskierung. Hierfür wurden die Gewebeschnitte mit dem in ddH₂O auf einfache Konzentration verdünnten Citratpuffer REAL Target Retrieval Solution über 10 min bei 600 Watt in der Mikrowelle behandelt. Im Anschluss wurden die Gewebeschnitte über 10 min auf Raumtemperatur abgekühlt und endogene Peroxidasen mit dem Peroxidaseblock über 15 min neutralisiert. Dann wurden die freien Bindungsstellen nach dreimaligem Waschen in PBS über jeweils 5 min durch Inkubation in der Blocklösung über 30 min bei Raumtemperatur zur Reduktion von unspezifischen Bindungen abgesättigt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in der Blocklösung bei 4°C über Nacht (die Primärantikörper sind in Tabelle 2 näher aufgeführt). Am Folgetag wurden die Gewebeschnitte nach dreimaligem Waschen in PBS über jeweils 5 min mit dem biotinylierten Sekundärantikörper in der Blocklösung über 45 min

bei Raumtemperatur inkubiert (die zugehörigen Sekundärantikörper sind in Tabelle 2 näher aufgeführt). Nach dreimaligem Waschen in PBS über jeweils 5 min erfolgte die Inkubation mit der ABC-Lösung aus dem Vectastain Elite ABC Kit über 30 min bei Raumtemperatur. Nach Bildung des Peroxidase-konjugierten Biotin-Avidin-Komplexes wurden die Gewebeschnitte anschließend mit dem Chromogen Cytomation AEC Substrate über 10-15 min inkubiert, was durch die Peroxidase zu einer Rotfärbung führte. Nach erneutem dreimaligen Waschen in PBS über jeweils 5 min erfolgte die Gegenfärbung mittels filtriertem Hämatoxylin und die anschließende Bläuung in warmem Leitungswasser über jeweils 5 min. Abschließend wurden die Gewebeschnitte durch mehrmaliges Eintauchen in der Entfärbelösung entfärbt und in dem wässrigen Eindeckmedium Immu-Mount eingedeckt. Bei allen Experimenten wurden Negativkontrollen durch alleinige Inkubation mit dem Sekundärantikörper angefertigt.

Die Aufnahme der Färbungen erfolgte mit dem Mikroskop Axiovert S100TV und der Digitalkamera C-3040, die Auswertung mit der Software AnalySIS.

Tabelle 2: Verwendete Antikörper für die Immunhistochemie in humanen Gewebeproben

Primärantikörper			zugehöriger Sekundärantikörper		
Antigen	Ursprung	Verdünnung	Ursprung	Markierung	Verdünnung
BMP-5	Ziege	1:10	Kaninchen	Biotin	1:100
BMP-7	Ziege	1:10	Kaninchen	Biotin	1:100

2.2.3 Färbung mit Hämatoxylin *in vitro*

Um den Einfluss von BMP-5 bzw. -7 auf die TG-beta1-induzierten morphologischen Veränderungen von HK-2-Zellen zu untersuchen, wurden diese nach der Stimulation mit Hämatoxylin gefärbt. Nach Aussaat von HK-2-Zellen in 8-Well-Chamber Slides zu je 10.000 Zellen pro Kammer erfolgte die Kultivierung über 24 Stunden in Quantum 286 und über 24 Stunden in dem serumfreien Hungermedium DMEM. Anschließend wurden die Zellen über 48 Stunden mit 10 ng/ml rhTGF-beta1 alleine oder in Kombination mit 10 und 100 ng/ml rhBMP-5 bzw. rhBMP-7 stimuliert, als Kontrollen dienten unstimulierte HK-2-Zellen in serumfreiem DMEM. Nach der Stimulation wurde der Zellrasen 10 min in Methanol/Aceton im Verhältnis 1:1 bei -20°C fixiert und bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Nach dreimaligem Waschen in PBS über jeweils 2 min erfolgte die Anfärbung des Zellrasens mittels filtriertem Hämatoxylin über 5 min und die anschließende Bläuung in lauwarmem Leitungswasser über 5 min. Abschließend wurden die Objektträger mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckt.

Die Aufnahme der Bilder erfolgte in Graustufen mit dem Mikroskop Axiovert S100TV, der Digitalkamera C-3040 und der Software AnalySIS.

2.2.4 Immunfluoreszenz *in vitro*

Nach Aussaat von HK-2-Zellen in 8-Well-Chamber Slides zu je 10.000 Zellen pro Kammer erfolgte die Kultivierung über 24 Stunden in Quantum 286 und über 24 Stunden in dem serumfreien Hungermedium DMEM. Anschließend wurden die Zellen über 48 Stunden mit 10 ng/ml rhTGF-beta1 alleine oder in Kombination mit 10 und 100 ng/ml rhBMP-5 bzw. rhBMP-7 stimuliert. Als Kontrollen dienten unstimulierte Zellen in serumfreiem DMEM über 48 Stunden. Nach der Stimulation wurde der Zellrasen 10 min in Methanol/Aceton im Verhältnis 1:1 bei -20°C fixiert und bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Nach dreimaligem Waschen in PBS über jeweils 2 min wurden die freien Bindungsstellen durch Inkubation in der Blocklösung über 15 min bei Raumtemperatur zur Reduktion von unspezifischen Bindungen abgesättigt, anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in der Blocklösung bei 4°C über Nacht (die Primärantikörper sind in Tabelle 3 näher aufgeführt). Am Folgetag wurde der Zellrasen nach dreimaligem Waschen in PBS über jeweils 2 min mit dem sekundären Fluoresceinisothiocyanat (FITC, grün)- bzw. Rhodaminrot (RR, rot)-markierten Fluoreszenzantikörper jeweils in der Blocklösung über 60 min bei Raumtemperatur in der Dunkelkammer inkubiert (die zugehörigen Sekundärantikörper sind in Tabelle 3 näher aufgeführt). Nach dreimaligem Waschen in PBS über jeweils 2 min erfolgte abschließend die Kernfärbung und das gleichzeitige Eindecken mittels Vectashield Mounting Medium, welches den Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, blau) enthält. Auch hier wurden Negativkontrollen durch alleinige Inkubation mit den Sekundärantikörpern angefertigt.

Die Aufnahme der Bilder erfolgte bei konstanter Belichtungszeit und einer 400-fachen Vergrößerung mit dem Mikroskop Axiovert S100TV, der Fluoreszenzkamera ColorView und der Software AnalySIS. Die Intensität der Fluoreszenz wurde mittels Schwellenwertanalyse in absoluten Grauwerten durch die Software angegeben und gegen die Zellzahl normalisiert.

Tabelle 3: Verwendete Antikörper für die Immunfluoreszenz *in vitro*

Primärantikörper			zugehöriger Sekundärantikörper		
Antigen	Ursprung	Verdünnung	Ursprung	Markierung	Verdünnung
alpha-SMA	Kaninchen	1:250	Ziege	FITC	1:100
FSP-1	Kaninchen	1:10	Ziege	FITC	1:100
Kollagen Typ1	Ziege	1:10	Kaninchen	RR	1:100
Vimentin	Maus	1:100	Ziege	FITC	1:100
ZO-1	Kaninchen	1:100	Ziege	FITC	1:100

2.2.5 real-time PCR (rtPCR)

Humanes Nierengewebe

Die biotisch gewonnenen Gewebeproben wurden in Zellysispuffer aufgenommen und mittels dem Homogenisator ULTRA-TURRAX dispergiert. Die mRNA wurde anschließend unter Verwendung des Kitsystems RNeasy isoliert.

Stimulation von HK-2-Zellen *in vitro*

Die Aussaat von HK-2-Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen der Größe T75 zu je 1.000.000 Zellen in 10 ml Quantum 268. Anschließend wurden die Zellen 24 Stunden vor der Stimulation in dem serumfreien Hungermedium DMEM inkubiert. Die Stimulation erfolgte mit den in serumfreiem DMEM verdünnten Stimulanzien (die Konzentrationen und die Stimulationsdauern sind in Tabelle 4 näher aufgeführt). Als Kontrollen dienten bei allen Experimenten die parallelen Inkubationen unstimulierter HK-2-Zellen in serumfreiem DMEM. Nach der Stimulation erfolgte nach dreimaligem Waschen in PBS über jeweils 5 min die Zellyse mittels Zellysispuffer und die anschließende Isolierung der mRNA unter Verwendung des Kitsystems RNeasy.

Tabelle 4: Auflistung der Stimulationen von HK-2-Zellen für die rtPCR

Ziel-mRNA für die rtPCR	Stimulation	ggf. Kostimulation	Stimulationsdauer
BMP-5, BMP-7	10^{-7} , 10^{-5} und 10^{-3} M AT-2		12 Stunden
BMP-5, BMP-7	10 ng/ml rhTGF-beta1		12 Stunden
BMP-5, BMP-7	20 ng/ml rhTNF-alpha		12 Stunden
BMP-7	10, 20, 30 μ M Telmisartan		12 Stunden
BMPR-1A, -1B, -2	10^{-3} M AT-2		12 Stunden
BMPR-1A, -1B, -2	100 ng/ml BMP-5		12 Stunden
BMPR-1A, -1B, -2	100 ng/ml rhTGF-beta1		12 Stunden
BMPR-1A, -1B, -2	50 ng/ml rhTNF-alpha		12 Stunden
E-Cadherin, alpha-SMA, FSP-1	10 ng/ml rhTGF-beta1	+ 100 ng/ml rhBMP-5	24 Stunden
MCP-1, Rantes	100 ng/ml rhTNF-alpha	+ 100 ng/ml rhBMP-5	24 Stunden
ZO-1, E-Cadherin, alpha-SMA, FSP-1	10 ng/ml rhTGF-beta1	+ 100 ng/ml rhBMP-7	24 Stunden

Isolation der mRNA

Die mRNA wurde nach dem Herstellerprotokoll des Kitsystems RNeasy aus dem Zellysat isoliert. Hierzu wurde die mRNA auf einer Silika-Gelmembran in einer Säule gebunden, durch mehrmaliges Waschen mit Ethanol von den übrigen Bestandteilen befreit und aufgereinigt (Chomczynski und Sacchi 1987). Zusätzlich wurde ein DNA-Verdau über 30 min bei Raumtemperatur mit DNase I

durchgeführt, um Verunreinigungen durch endogene DNA in den späteren cDNA-Proben nach der Umschreibung zu vermeiden. Abschließend wurde die mRNA mit nukleasefreiem Wasser (NFW) durch Zentrifugation aus der Membran eluiert.

Die Konzentration der mRNA wurde photometrisch bei 260 nm in einer Quarzküvette mit dem Gerät BioPhotometer plus bestimmt.

Umschreibung der mRNA in cDNA

Die Umschreibung der mRNA in cDNA erfolgte unter Verwendung des Thermocyclers Mastercycler personal. Die zuvor gewonnene mRNA wurde in der Oligonukleotid-Mischung für 10 min bei 70°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz zum Verdau endogener RNAsen und Schutz der mRNA über 5 min bei 42°C in RNase out inkubiert. Die Transkription der mRNA in cDNA erfolgte nach Zugabe der reversen Transkriptase Superscript und Inkubation über 50 min bei 42°C. Abschließend wurde die reverse Transkriptase über 15 min bei 70°C inaktiviert und die mRNA mittels RNase H über 20 min bei 37°C verdaut. Als Negativkontrollen (noRT) erfolgten Umschreibungen ohne den Inkubationsschritt mit der reversen Transskriptase zum Ausschluss einer Kontamination mit genomischer DNA.

Quantitative real-time PCR (rtPCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine von Mullis und Faloona etablierte Methode zur gezielten Amplifikation von Nukleinsäuren (Mullis und Faloona 1987). Nach Hitzedenaturierung und Dissoziation der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge kommt es beim Annealing zu einer Anlagerung spezifischer Primerpaare, welche Oligonukleotide von 10-30 Basenpaaren (bp) Länge sind. Das zur Zielsequenz komplementäre Paar aus Vorwärts- und Rückwärtsprimer bindet bei deren spezifischer Annealingtemperatur (T_a) jeweils an den Vorwärts- und Rückwärtsstrang und dient der DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* als Ausgangspunkt für die Synthese der komplementären DNA-Stränge (Chien et al. 1976, Saiki et al. 1988).

Die quantitative real-time PCR (rtPCR) ist eine von Higuchi et al. erstmalig etablierte Methode zur Quantifizierung doppelsträngiger DNA durch Bindung fluoreszierender Moleküle (Higuchi et al. 1992). Unter Verwendung des Thermocyclers Mx3000P und iQ SYBR Green Supermix kommt es zu einer Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green an ausschließlich doppelsträngige DNA, welcher proportional zur vorhandenen DNA-Menge fluoresziert (Wittwer et al. 1997). Die verwendeten Primer für die rtPCR wurden nach Abgleich mit der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, USA) und Prüfung auf deren Spezifität von der Firma PrimerDesign hergestellt (die Primer sind in Tabelle 5 näher aufgeführt).

Zur Detektion der relativen Expression wurde der Modus „Comparative Quantitation (Calibrator)“ der Herstellersoftware MxPro QPCR Software verwendet. Nach einem initialen Zyklus über 10 min bei 95°C erfolgte die Amplifikation über 15 s bei 95°C, 1 min bei der Annealingtemperatur (T_a) des Primerpaares und 30 s bei 72°C über 40 Zyklen. Abschließend erfolgte ein Zyklus über 30 s bei 95°C,

1 min bei 60°C und 30 s bei 95°C. Für alle Proben wurden jeweils Triplets sowohl für das Haushaltsgen als auch das Zielgen angefertigt und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte nur bei negativer Negativkontrolle (noRT) zum Ausschluss einer Kontamination mit genomischer DNA. Die absolute Expression wurde als Ct-Wert angegeben, welcher die Zykluszahl angibt, ab der sich das Fluoreszenzsignal deutlich vom Hintergrund abhebt, wobei der Fluoreszenzschwellenwert im parallelen linearen Bereich der einzelnen Amplifikationsblots festgelegt wurde. Zur Normalisierung wurde das Haushaltsgen Peptidylprolyl-Isomerase A (PPIA) verwendet und zur Berechnung des dCt-Wertes vom Ct-Wert des Zielgens subtrahiert (Cui et al. 2009, Radonic et al. 2004). Der ddCt-Wert, welcher sich nach Subtraktion der dCt-Werte der einzelnen Proben ergibt, ging zur Berechnung der relativen Expression in die Formel 2^{-ddCt} ein.

Tabelle 5: Verwendete Primer für die rtPCR

Ziel-mRNA	mRNA-Nummer	Primer Vorwärtsstrang Primer Rückwärtsstrang	Ta [°C]	Fragmentlänge [bp]
alpha-SMA	NM_001613	AAG CAC AGA GCA AAA GAG GAA T ATG TCG TCC CAG TTG GTG AT	57,0 57,0	76
BMP-5	NM_021073	ATC CTC GTC GCA TAC AGT TAT C TGT CAG CAT CAT TCA GAA AGT TG	56,4 56,4	99
BMP-7	NM_001719	CCT CCA TTG CTC GCC TTG TAT GCT GCT CAT GTT TCC TAA TAC	55,9 55,8	114
BMPR-1A	NM_004329	GGA CAT TGC TTT GCC ATC ATA G GGG CTT TTG GAG AAT CTT TGC	56,6 56,3	112
BMPR-1B	NM_001203	AGG TAA TTT GCT CTT GTG TTG TAA G TTT CTT TGT GCT TCT GAG ATT GG	57,2 26,3	120
BMPR-2	NM_001204	CAA AGA TAG GTC CCA GTT TAA CAC TCT CTA TGG AAA TGA AAT AAC AAG GC	56,4 57,1	117
E-Cadherin	NM_00436	CAT GAG TGT CCC CCG GTA TC CAG TAT CAG CCG CTT TCA GA	57,6 55,7	89
FSP-1	NM_002961	TCT TTC TTG GTT TGA TCC TGA CT AGT TCT GAC TTG TTG AGC TTG A	56,4 56,4	130
MCP-1	NM_002982	ACC GAG AGG CTG AGA CTA AC AAT GAA GGT GGC TGC TAT GAG	56,5 56,3	122
PPIA	NM_021130	TGG GCA ACA TAG TGA GAC G TGT ACA GTG GCA TGA TAA TAG C	54,9 54,6	139
Rantes	NM_002985	AAC CCA GCA GTC GTC TTT GTC AGC AAG CAG AAA CAG GCA AAT	59,1 57,6	155
TNF-alpha	NM_000594	AGG TTC TCT TCC TCTCAC ATA C ATC ATG CTT TCA GTG CTC ATG	55,2 55,2	82
ZO-1	NM_003257	AAA CAA GCC AGC AGA GAC C CGC AGA CGA TGT TCA TAG TTT C	55,7 56,4	95

2.2.6 Western Blot

Stimulation und Proteinextraktion

Nach Aussaat von HK-2-Zellen in Zellkulturflaschen der Größe T75 zu je 1.000.000 Zellen in 10 ml erfolgte die Kultivierung über 24 Stunden in Quantum 268 und über 24 Stunden in dem serumfreien Hungermedium DMEM.

Der Effekt des RAAS auf den phosphorylierten Smad-Komplex pSmad1/5/8 wurde nach Stimulation von HK-2-Zellen mit 10^{-3} M AT-2 über 36 Stunden untersucht.

Um den Einfluss von BMP-7 auf die TGF-beta1-induzierte Phosphorylierung von Smad2 zu ermitteln, wurden HK-2-Zellen mit 10 ng/ml rhTGF-beta1 alleine oder in Kombination mit 100 ng/ml rhBMP-7 über 36 Stunden stimuliert.

Nach Waschen des Zellrasens mit PBS wurde dieser mit Accutase trypsiniert und erneut zweimalig in PBS gewaschen. Nach Zentrifugation erfolgte die Zellyse mittels Zellysispuffer über 30 min auf Eis und das regelmäßige vortexen alle 10 min. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und diente als Proteinlösung für den Western Blot.

Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte nach der von Bradford etablierten Methode durch Verdünnung von 50 µl der zuvor gewonnenen Proteinlösung mit 2,45 ml Bradford-Reagenz und Inkubation über 10 min (Bradford 1976). Hierbei bilden sich proportional zur Proteinkonzentration Komplexe mit dem Farbstoff Coomassie-Brillantblau, welche photometrisch bei 595 nm in einer Quarzküvette mit dem Gerät BioPhotometer plus gemessen wurden. Als Leerwert galt die alleinige Messung von 50 µl Lysispuffer in 2,45 ml Bradford-Reagenz. Die Proteinkonzentration der Probe kann nach Erstellen der Standardkurve mit Messung von in der Konzentration ansteigendem bovinem Serumalbumin (BSA) in Bradford-Reagenz bestimmt werden.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung der Proteine nach Molekulargewicht erfolgte mittels eindimensionaler Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach der von Laemmli etablierten Methode (Laemmli 1970). Es handelt sich hierbei um ein denaturierendes Verfahren, da durch die Behandlung mit dem anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine verloren gehen. Darüber hinaus lagert sich SDS an die Proteine an und verdeckt deren Eigenladung, so dass alle Proteine gleichmäßig negativ geladen sind. Die anschließende Trennung erfolgt anhand der relativen Größe der Polypeptidketten im Polyacrylamidgel.

Nach Ausfällen der Proteine in Aceton erfolgte die Zugabe von SDS im Überschuss in verschiedenen Konzentrationen (10, 25, 50, 100, 200 µg). Nach Zugabe von beta-Mercaptoethanol zum Probenpuffer und Inkubation der Proben bei 95°C im Heizblock wurden die Proben durch Aufbrechen der Disulfidbrücken denaturiert. Anschließend wurden 25 µg Proteinlösung je Well im Sammelgel mit 5%

Polyacrylamid konzentriert. Die Auftrennung erfolgte im Trenngel mit 15% Polyacrylamid in der mit Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammer Mini-Protean und Verwendung des Spannungsgerätes Power Pac 1000. Initial wurde eine Gleichstromspannung von 80 V über 15 min, anschließend von 120 V über 3 bis 4 Stunden angelegt. Als Leiter für das Molekulargewicht diente ein gefärbtes Proteingemisch bekannter Molekulargewichtsgrößen (Rainbow Marker).

Proteintransfer

Die im Trenngel aufgetrennten Proteine wurden mittels Tankblot-Verfahren in dem vertikalen Puffertank Mini-Protean nach Anlegen einer Gleichstromspannung mit dem Spannungsgerät Power Pac 1000 auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Hierzu erfolgte nach dem Herstellerprotokoll das Einweichen der Membran, des Filterpapiers und der Vliesmatten für 10 min in Transferpuffer. Anschließend wurden in der Reihenfolge eine Vliesmatte, Filterpapier, das Gel, die Membran, Filterpapier und eine weitere Vliesmatte geschichtet und in die Kassette eingelegt. Der Transfer erfolgte nach Anlegen einer Gleichstromspannung von 30 V bei 4°C über Nacht. Als Kontrolle der Transfereffizienz diente der vorgefärbte Molekulargewichtsmarker (Rainbow Marker).

Western Blot

Nach dreimaligem Waschen in PBS Tween über jeweils 10 min und Absättigung unspezifischer Bindungsstellen in 5%iger Magermilch über 3 Stunden bei Raumtemperatur erfolgte anschließend die Inkubation mit dem Primärantikörper in 5%iger Magermilch über Nacht bei 4°C (die Primärantikörper sind in Tabelle 6 näher aufgeführt). Am Folgetag wurde die Membran dreimalig in PBS Tween über jeweils 10 min gewaschen und mit dem Horseradish-Peroxidase (HRP)-konjugierten Sekundärantikörper in der Verdünnung 1:2000 in 5%iger Magermilch über 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert (die zugehörigen Sekundärantikörper sind in Tabelle 6 näher aufgeführt). Nach dreimaligem Waschen in PBS Tween über jeweils 10 min erfolgte die Detektion nach Verwendung des Kitsystems Western Lightning plus ECL. Die Peroxidase oxidiert hierbei das Substrat Lumigen PS-3 zu einem Acridiniumester, welcher eine intensive Chemilumineszenz mit einem Emissionsmaximum bei 430 nm erzeugt. Nach Exposition des Autoradiographiefilms Super Rx mit der Membran über 1 bis 10 min erfolgte die Entwicklung des Autoradiographiefilms mit dem Automaten Kodak-X-Omat.

Für alle Experimente erfolgte die Anfärbung der Membran mit der Positivkontrolle beta-Aktin zur internen Normalisierung. Hierzu wurde die Membran über 50 min bei 50°C in der Lösung für Membranstripping auf einer Wippe inkubiert. Anschließend erfolgte nach dreimaligem Waschen in PBS Tween über jeweils 10 min die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen in 5%iger Magermilch über 3 Stunden bei Raumtemperatur und die Inkubation mit dem Primärantikörper beta-Aktin in 5%iger Magermilch über Nacht bei 4°C (der Antikörper ist in Tabelle 6 näher aufgeführt). Am Folgetag wurde die Membran dreimalig in PBS Tween über jeweils 10 min gewaschen und mit dem Horseradish-Peroxidase (HRP)-konjugierten Sekundärantikörper in 5%iger Magermilch über 1 Stunde

bei Raumtemperatur inkubiert (der zugehörige Sekundärantikörper ist in Tabelle 6 näher aufgeführt). Nach dreimaligem Waschen in PBS Tween über jeweils 10 min erfolgte die Detektion unter Verwendung des Kitsystems Western Lightning plus ECL und Exposition des Autoradiographiefilms Super RX mit der Membran über 1 bis 10 min mittels dem Automaten Kodak-X-Omat.

Die Aufnahme des Autoradiographiefilms erfolgte mit dem Scanner CanonScan 4400F, die densitometrische Auswertung der Banden wurde mit Hilfe des Programms Quantity One Basic durchgeführt.

Tabelle 6: Verwendete Antikörper für den Western Blot

Primärantikörper			zugehöriger Sekundärantikörper		
Antigen (kD)	Ursprung	Verdünnung	Ursprung	Markierung	Verdünnung
beta-Aktin (43)	Kaninchen	1:3000	Ziege	HRP	1:2000
pSmad1/5/8 (60)	Kaninchen	1:1000	Ziege	HRP	1:2000
pSmad2 (60)	Kaninchen	1:1000	Ziege	HRP	1:2000

2.2.7 Apoptose-Assay mittels FACS-Analyse

Der Einfluss von BMP-5 und -7 auf die TNF-alpha-induzierte Apoptose in HK-2-Zellen wurde mittels Verwendung des Apoptose-Kitsystems Annexin-V FLUOS Staining Kit und durchflusszytometrischer Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)-Analyse mit dem Gerät FACSCalibur untersucht. Bei apoptotischen Prozessen kommt es zu einer Translokation von Phosphatidylserin auf die Außenseite der Zellmembran, welches im Regelfall nur an der zytoplasmatischen Innenseite lokalisiert ist (Vermes et al. 1995). Annexin-V ist ein Ca^{2+} -abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein mit einer hohen Affinität für Phosphatidylserin, so dass dieses zur Detektion von apoptotischen Zellen geeignet ist. Durch den Verlust der Membranintegrität kann Annexin-V auch bei nekrotischen Zellen an die zytoplasmatische Innenseite binden. Eine Differenzierung gelingt nach Identifikation nekrotischer Zellen durch Propidiumiodid, welches nur permeabilisierte Membranen nekrotischer Zellen passieren kann und an die DNA im Zellkern bindet. Somit imponieren apoptotische Zellen als Annexin-V-positive und Propidiumiodid-negative Zellpopulation. Dagegen stellen sich nekrotische Zellen als Annexin-V- und Propidiumiodid-positive Zellpopulation dar.

Nach Aussaat von HK-2-Zellen in Zellkulturflaschen der Größe T75 zu je 3.000.000 Zellen erfolgte die Kultivierung über 24 Stunden in Quantum 286 und über 24 Stunden in dem serumfreien Hungermedium DMEM. Anschließend erfolgte die Stimulation mit 20 ng/ml rhTNF-alpha alleine oder in Kombination mit 1, 10 und 100 ng/ml rhBMP-5 bzw. -7 über 48 Stunden. Als Kontrollen dienten bei allen Experimenten parallele Inkubationen unstimulierter HK-2-Zellen in serumfreiem DMEM. Anschließend wurden die Zellen in PBS gewaschen, trypsiniert und nach Zentrifugation in PBS aufgenommen. Die Anfärbung mittels in Inkubationspuffer gelöstem, Fluoresceinisothiocyanat (FITC,

grün)-markiertem Annexin-V bzw. Rhodaminrot (RR, rot)-markiertem Propidiumiodid erfolgte nach dem Herstellerprotokoll über 15 min im Dunkeln. Als Negativkontrolle diente für jeden Stimulationsansatz die Aufnahme in alleinigem Inkubationspuffer.

Die Auswertung erfolgte mittels durchflusszytometrischer FACS-Analyse mit dem Zytometer FACSCalibur, apoptotische Zellen präsentierten sich als Annexin-V-positive und Propidiumiodid-negative Zellpopulation.

2.2.8 Statistische Auswertung

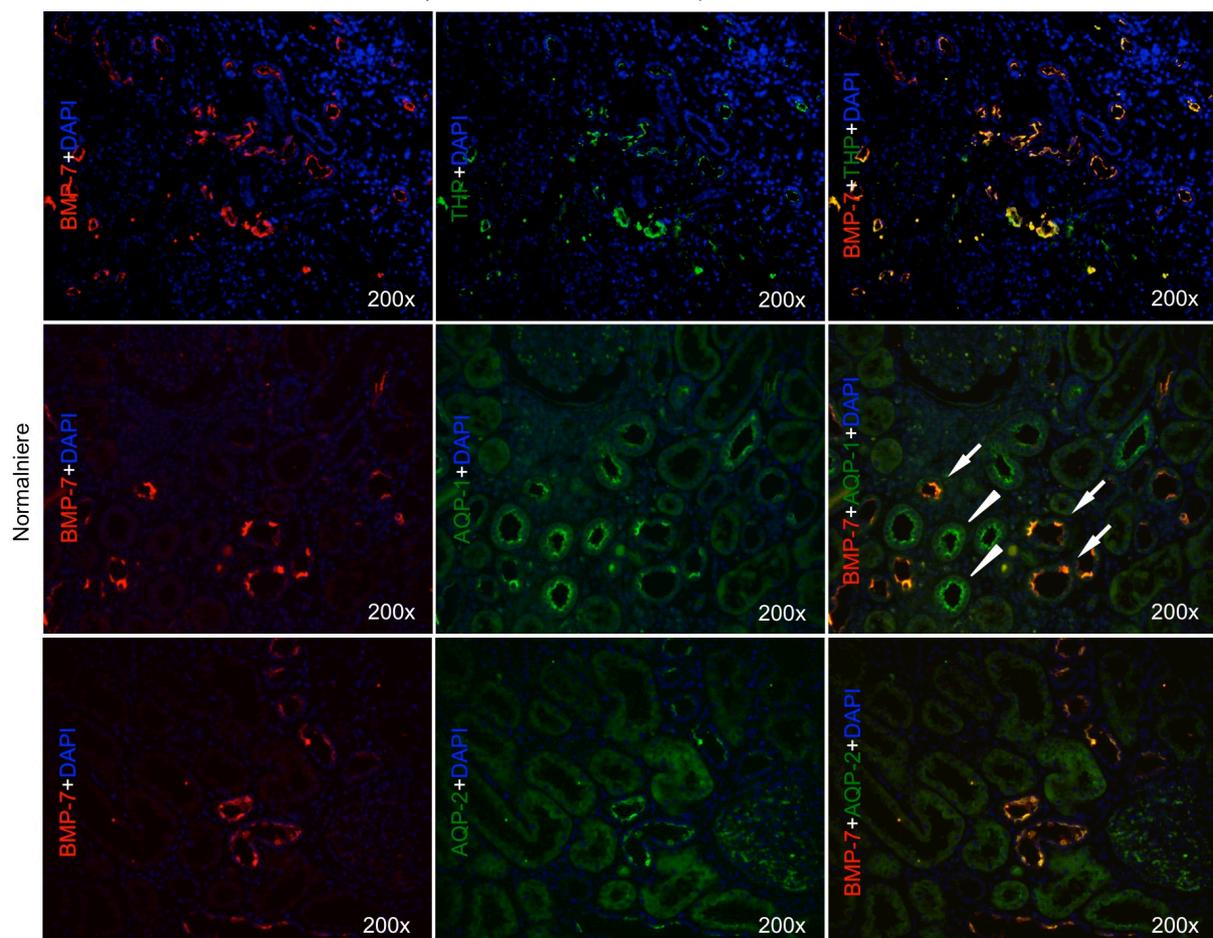
Die statistische Auswertung erfolgte mit freundlicher Unterstützung von Frau Dipl. Math. Katharina Lange (Abteilung Medizinische Statistik, Universitätsmedizin Göttingen, Göttingen, Deutschland) und Verwendung der Programme SigmaStat, MS Office und Prism. Die Ergebnisse wurden nach mindestens dreimaliger Durchführung der Experimente als Mittelwert mit Standardabweichung und Signifikanzniveau angegeben, welches mittels studentischem t-Test ermittelt wurde. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert kleiner 0,05 definiert. Ein $p < 0,05$ wurde mit *, $p < 0,01$ mit ** und $p < 0,001$ mit *** in den einzelnen Graphen gekennzeichnet, welche mit dem Programm Prism erstellt wurden.

3. Ergebnisse

3.1 Lokalisation der Expression von BMP-7 in der humanen Normalniere

Die Lokalisation von BMP-7 in der humanen Normalniere wurde mittels Doppelimmunfluoreszenzfärbungen untersucht. Diese ergaben eine BMP-7-Expression in THP-positiven Abschnitten des dicken aufsteigenden Astes der Henle-Schleife und des distalen Tubulus. Bestätigt wurde dies durch AQP-1-positive Tubulusabschnitte mit kuboiden Epithelzellen und weitem Lumen als Ausdruck des distalen Tubulussystems (Pfeil). In AQP-1-positiven proximalen Tubulusabschnitten mit kuboiden Epithelzellen und engem Lumen (Dreieck) fand sich dagegen eine geringere BMP-7-Expression. Des Weiteren zeigte sich eine Expression von BMP-7 in AQP-2-positiven Sammelrohrabschnitten. In glomerulären oder interstitiellen Nierenkompartimenten zeigte sich keine vermehrte Expression.

Abbildung 13: Doppelimmunfluoreszenz auf BMP-7 mit THP, AQP-1 und -2 in der Normalniere (Pfeil: distale Tubulusabschnitte, Dreieck: proximale Tubulusabschnitte)

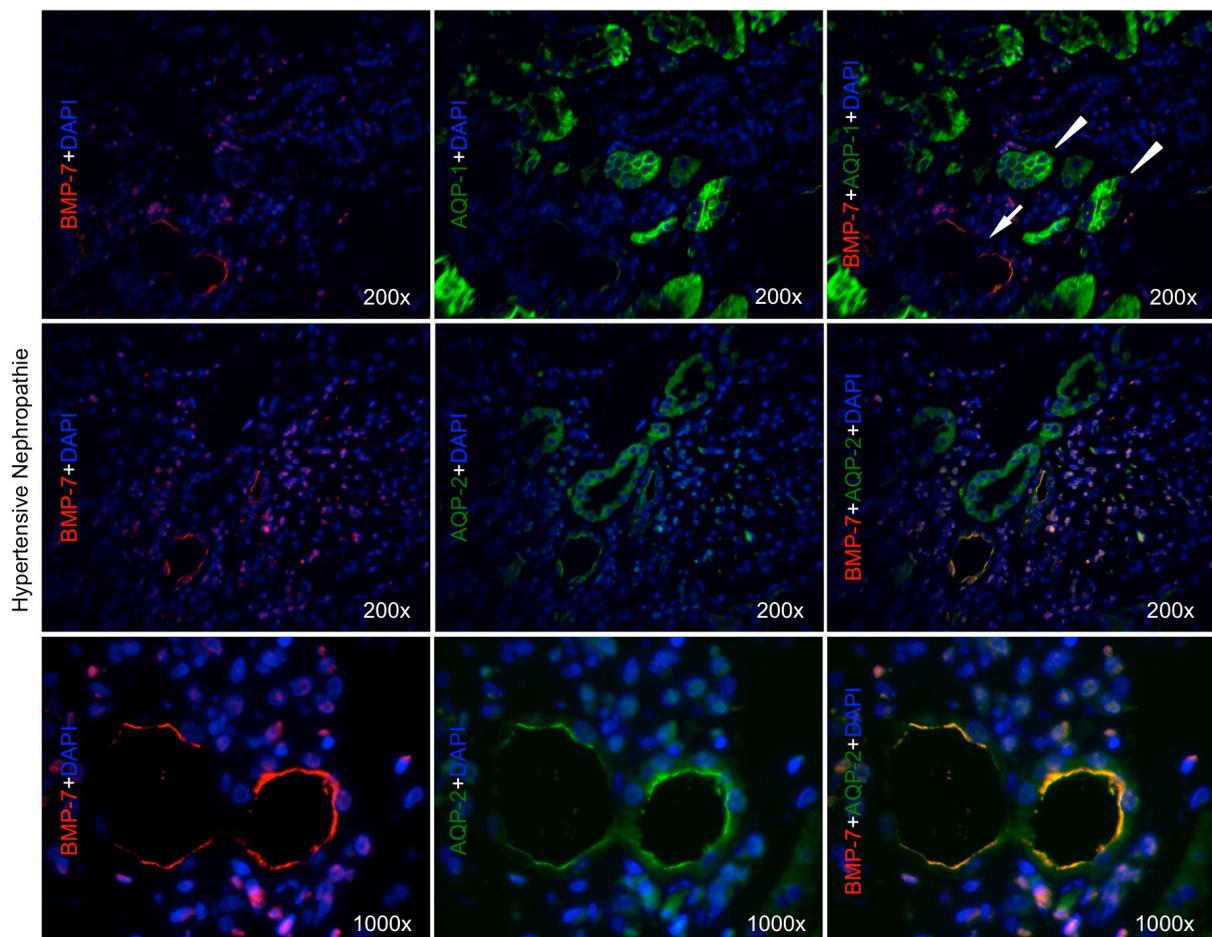


3.2 Expression von BMP-7 bei der hypertensiven Nephropathie

3.2.1 Unveränderte Lokalisation von BMP-7

Die Doppelimmunfluoreszenzfärbungen auf BMP-7 und die tubulären Marker AQP-1 und -2 zeigten eine gegenüber der Normalniere unveränderte Lokalisation von BMP-7 in AQP-1-positiven Tubulusabschnitten mit kuboiden Epithelzellen und weitem Lumen als Ausdruck des distalen Tubulussystems (Pfeil) bzw. in AQP-2-positiven Sammelrohrabschnitten. In AQP-1-positiven proximalen Tubulusabschnitten mit kuboiden Epithelzellen und engem Lumen (Dreieck) fand sich dagegen eine geringere Expression. In glomerulären oder interstitiellen Anteilen wurde BMP-7 nur vereinzelt exprimiert. Somit ergab sich hinsichtlich der Lokalisation von BMP-7 bei der hypertensiven Nephropathie verglichen mit der Normalniere kein Unterschied.

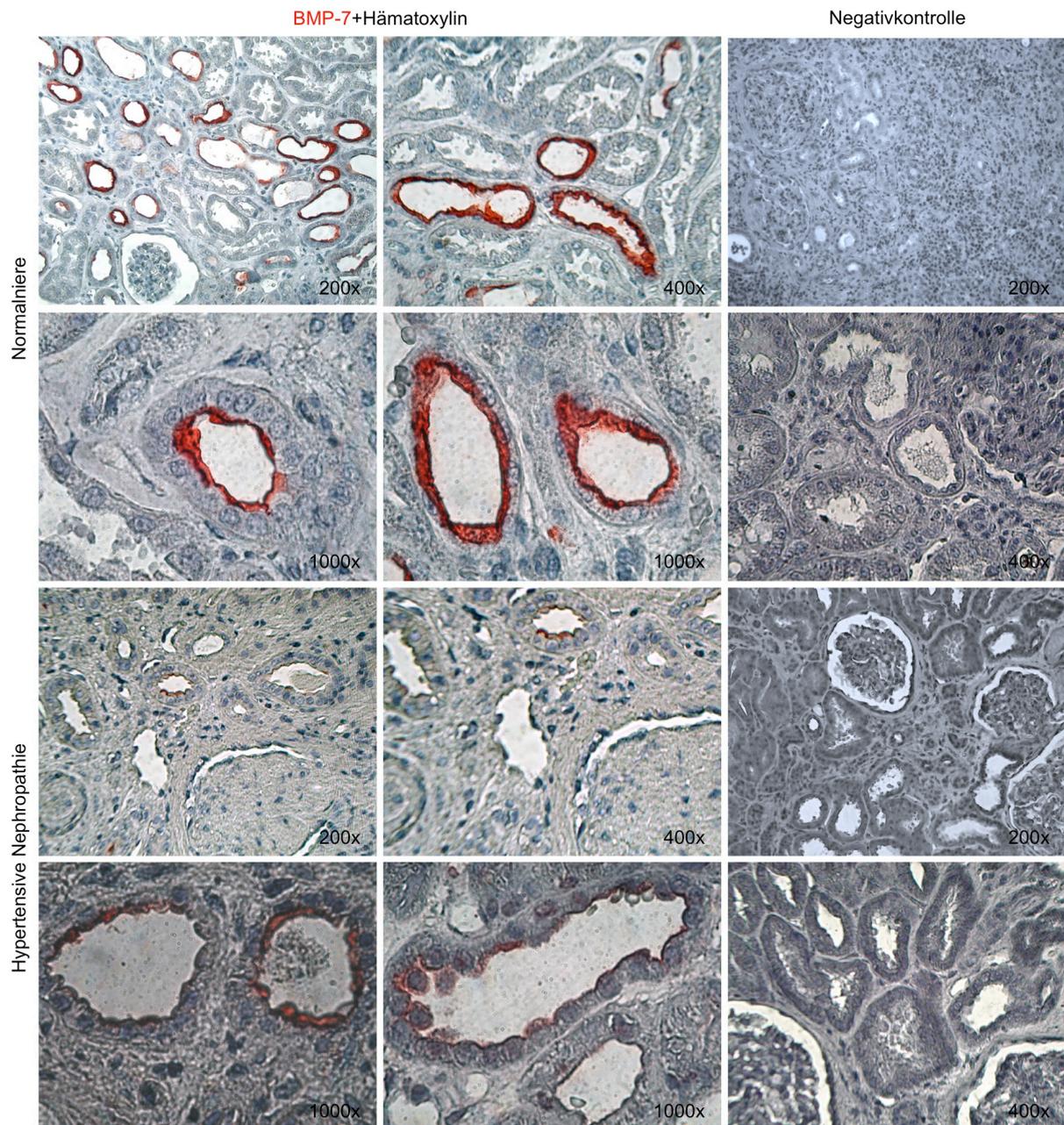
Abbildung 14: Doppelimmunfluoreszenz auf BMP-7 mit AQP-1 und -2 bei der hypertensiven Nephropathie (Pfeil: distale Tubulusabschnitte, Dreieck: proximale Tubulusabschnitte)



3.2.2 Verminderte Expression von BMP-7

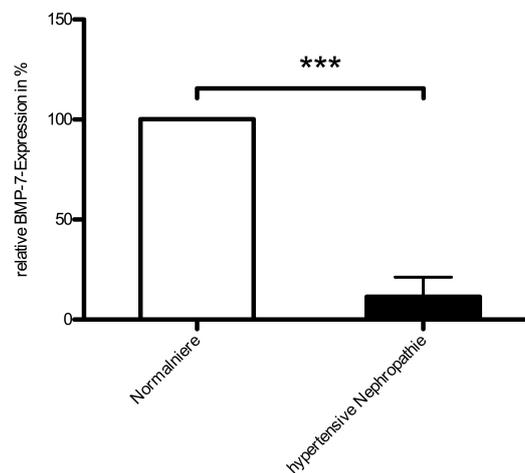
Die quantitativen Veränderungen der BMP-7-Expression bei der hypertensiven Nephropathie wurden mittels Immunhistochemie und rtPCR untersucht. Die Immunhistochemie auf BMP-7 ergab eine unverändert luminale, aber deutlich reduzierte Expression von BMP-7 im Tubulusepithel der hypertensiven Nephropathie gegenüber der Normalniere.

Abbildung 15: Immunhistochemie auf BMP-7 in der Normalniere und bei der hypertensiven Nephropathie



Bestätigt wurde dies auf mRNA-Ebene durch die rtPCR, welche eine gegenüber der Normalniere (100,0%) signifikant verminderte Expression von BMP-7 bei der hypertensiven Nephropathie ($11,5 \pm 9,8\%$, $p < 0,001$) ergab.

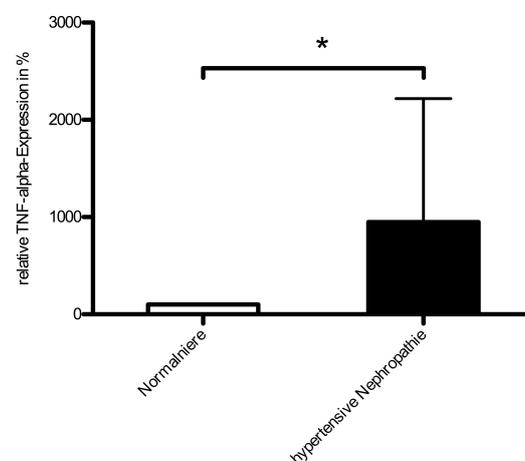
Abbildung 16: rtPCR auf BMP-7 in der Normalniere und bei der hypertensiven Nephropathie (Mittelwert, Standardabweichung, $***=p < 0,001$)



3.2.3 Vermehrte Expression von TNF-alpha und TGF-beta1

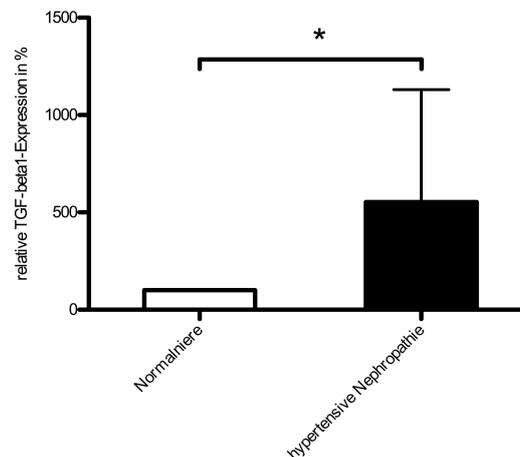
Die Veränderungen in der Expression der inflammatorischen und pro-fibrotischen Faktoren TNF-alpha und TGF-beta1 wurden mittels rtPCR ermittelt. Hier zeigte sich gegenüber der Normalniere (100,0%) eine signifikant erhöhte Expression von TNF-alpha ($949,9 \pm 1268\%$, $p = 0,021$) bei der hypertensiven Nephropathie.

Abbildung 17: rtPCR auf TNF-alpha in der Normalniere und bei der hypertensiven Nephropathie (Mittelwert, Standardabweichung, $*=p < 0,05$)



Darüber hinaus fand sich eine gegenüber der Normalniere (100,0%) signifikant erhöhte Expression von TGF-beta1 bei der hypertensiven Nephropathie ($553,3 \pm 576,9\%$, $p=0,026$).

Abbildung 18: rtPCR auf TGF-beta1 in der Normalniere und bei der hypertensiven Nephropathie (Mittelwert, Standardabweichung, $*=p<0,05$)



Somit werden die inflammatorischen und pro-fibrotischen Faktoren TNF-alpha und TGF-beta1 bei der hypertensiven Nephropathie vermehrt exprimiert.

3.3 Regulation von BMP-7 und dessen Rezeptoren *in vitro*

3.3.1 Einfluss des RAAS auf die Expression und intrazelluläre Aktivität von BMP-7

Der Einfluss des RAAS auf die Expression von BMP-7 wurde nach Stimulation von HK-2-Zellen mit AT-2 und dessen Rezeptor-Antagonisten Telmisartan mittels rtPCR untersucht. Hier zeigte sich eine dosisabhängig verminderte Expression von BMP-7 nach Stimulation mit 10^{-7} ($32,0 \pm 27,6\%$), 10^{-5} ($13,7 \pm 26,7\%$) und 10^{-3} M AT-2 ($15,3 \pm 24,2\%$, $p<0,001$). Die Stimulation mit 10 ($145,8 \pm 102,9\%$), 20 ($192,9 \pm 211,9\%$) und 30 μ M Telmisartan ($161,9 \pm 114,3\%$, $p=0,007$) führte zu einer erhöhten Expression von BMP-7, jeweils gegenüber den unstimulierten Kontrollen (100,0%).

Abbildung 19: rtPCR auf BMP-7 nach Stimulation von HK-2-Zellen mit AT-2 über 12 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, ***= $p < 0,001$)

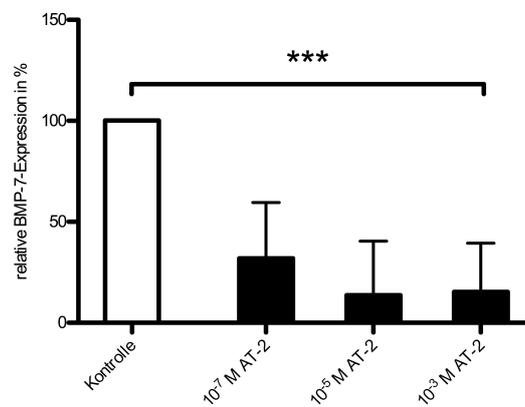
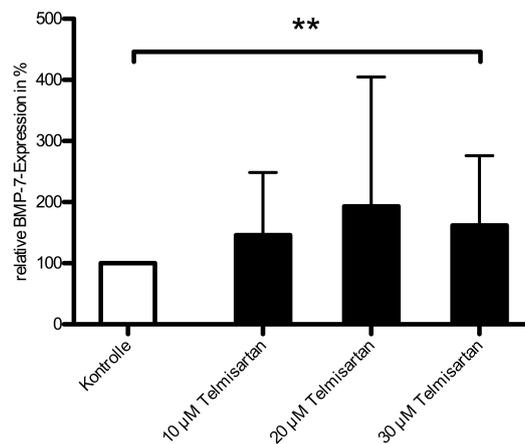
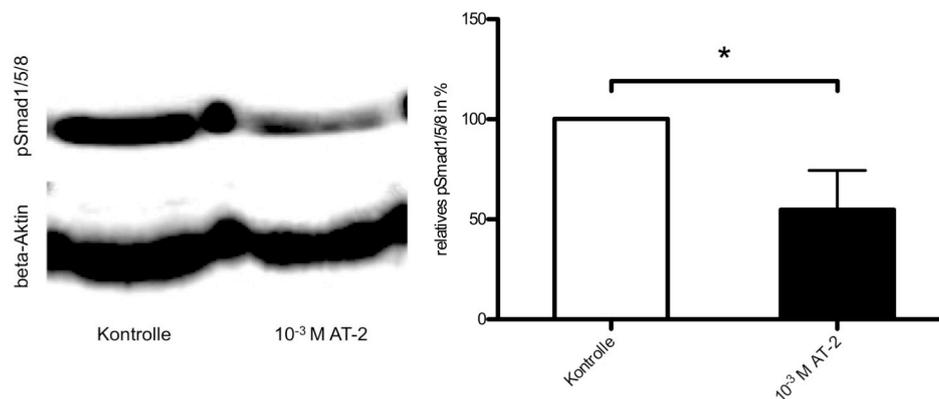


Abbildung 20: rtPCR auf BMP-7 nach Stimulation von HK-2-Zellen mit Telmisartan über 12 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, **= $p < 0,01$)



Der Effekt des RAAS auf die intrazelluläre Aktivierung der BMP-7-Signalkaskade wurde mittels Western Blot auf den phosphorylierten Smad-Komplex pSmad1/5/8 untersucht. Hier zeigte die Stimulation von HK-2-Zellen mit 10^{-3} M AT-2 passend zur verminderten BMP-7-Expression signifikant weniger pSmad1/5/8 ($54,8\% \pm 9,8\%$, $p=0,030$) als Ausdruck einer verminderten intrazellulären Aktivierung der BMP-7-Signalkaskade.

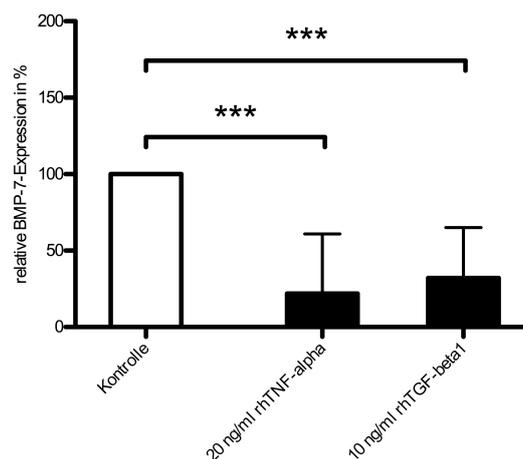
Abbildung 21: Western Blot auf pSmad1/5/8 mit densitometrischer Auswertung nach Stimulation von HK-2-Zellen mit AT-2 über 36 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, $*=p<0,05$)



3.3.2 Verminderte Expression von BMP-7 nach Stimulation mit TNF-alpha und TGF-beta1

Der Einfluss der inflammatorischen bzw. pro-fibrotischen Zytokine TNF-alpha und TGF-beta1 auf die Expression von BMP-7 wurde nach Stimulation von HK-2-Zellen mittels rtPCR bestimmt. Nach Stimulation mit 20 ng/ml rhTNF-alpha kam es zu einer signifikanten Reduktion der Expression von BMP-7 ($21,9\pm 39,0\%$, $p<0,001$). Auch die Stimulation mit 10 ng/ml rhTGF-beta1 zeigte eine signifikante Reduktion der Expression von BMP-7 ($32,1\pm 33,0\%$, $p<0,001$), beides verglichen mit unstimulierten Kontrollen (100,0%).

Abbildung 22: rtPCR auf BMP-7 nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TNF-alpha und TGF-beta1 über 12 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, $***=p<0,001$)



3.3.3 Regulation der BMP-Rezeptoren BMPR-1A, -1B und -2

Der Einfluss von AT-2, TNF-alpha und TGF-beta1 auf die Expression der BMP-Rezeptoren BMPR-1A, -1B und -2 wurde nach Stimulation von HK-2-Zellen mittels rtPCR ermittelt. Die Stimulation mit 10^{-3} M AT-2 führte zu einer Reduktion der Expression der Rezeptoren BMPR-1A ($57,0 \pm 7,3\%$, $p < 0,001$) und -1B ($49,7 \pm 6,4\%$, $p < 0,001$) und hatte keinen Effekt auf BMPR-2 ($90,6 \pm 23,2\%$, $p = 0,258$). Die Stimulation mit 50 ng/ml rhTNF-alpha führte zu einer signifikanten Reduktion der Expression der Rezeptoren BMPR-1B ($76,1 \pm 11,7\%$, $p < 0,001$) und -2 ($60,8 \pm 15,9\%$, $p < 0,001$) und hatte keinen Einfluss auf die Expression von BMPR-1A ($98,9 \pm 31,8\%$, $p = 0,922$). Die Stimulation mit 100 ng/ml rhTGF-beta1 führte zu einer signifikant reduzierten Expression der Rezeptoren BMPR-1A ($61,9 \pm 19,0\%$, $p = 0,004$) und -2 ($80,0 \pm 22,2\%$, $p = 0,027$), die Expression von BMPR-1B blieb unverändert ($105,7 \pm 27,9\%$, $p = 0,560$).

Abbildung 23: rtPCR auf BMPR-1A, -1B und -2 nach Stimulation von HK-2-Zellen mit AT-2 über 12 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, ***= $p < 0,001$)

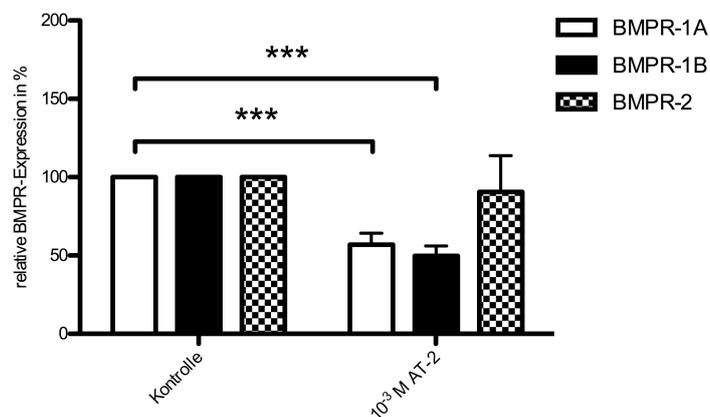


Abbildung 24: rtPCR auf BMPR-1A, -1B und -2 nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TNF-alpha über 12 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, ***= $p < 0,001$)

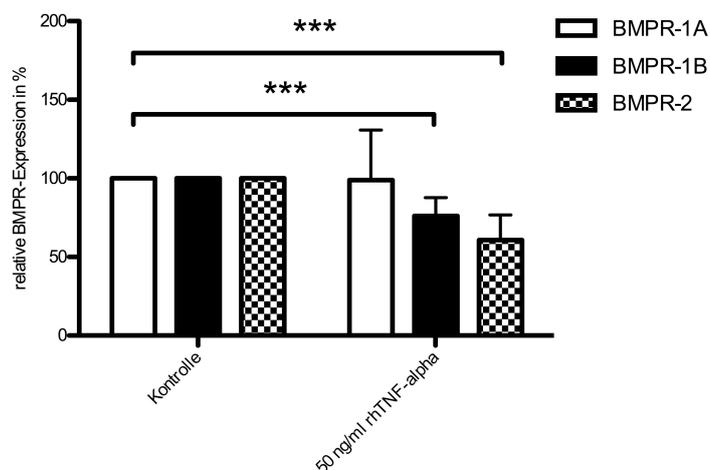
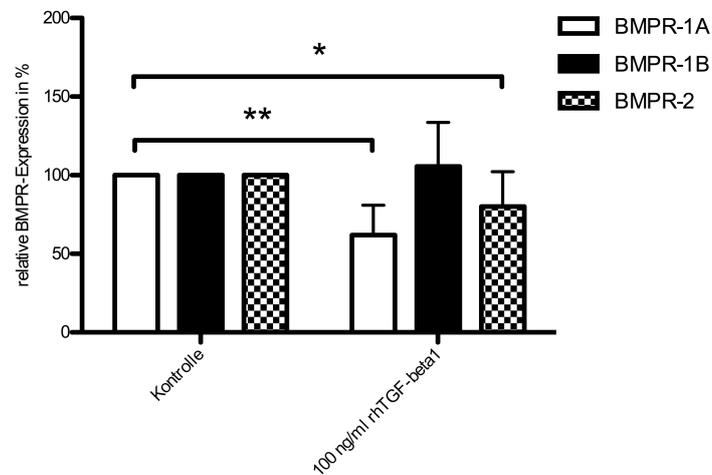


Abbildung 25: rtPCR auf BMPR-1A, -1B und -2 nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta1 über 12 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, $*=p<0,05$, $**=p<0,01$)

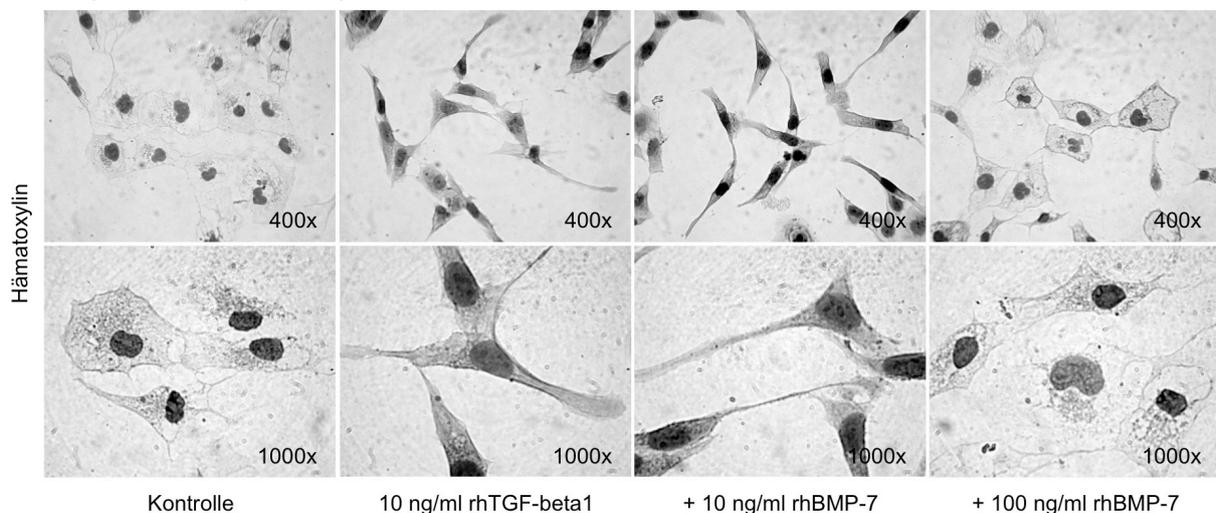


3.4 Funktionen von BMP-7 *in vitro*

3.4.1 BMP-7 hat TGF-beta1-neutralisierende Effekte in HK-2-Zellen

Der Einfluss von BMP-7 auf die TGF-beta1-induzierte epithelial-mesenchymale Transition (EMT) wurde nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta1 allein oder in Kombination mit BMP-7 mittels Hämatoxylin-Färbung, Doppelimmunfluoreszenz und rtPCR untersucht. Die Hämatoxylin-Färbung zeigte nach Stimulation von HK-2-Zellen mit 10 ng/ml rhTGF-beta1 gegenüber der Kontrolle mit kuboiden Zellen eine spindelförmige Morphologie mit Zellausläufern. Dieser Effekt konnte dosisabhängig durch die Kostimulation mit 10 bzw. 100 ng/ml rhBMP-7 teilweise verhindert werden.

Abbildung 26: Hämatoxylinfärbung nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta1 und BMP-7 über 48 Stunden



Die Immunfluoreszenz ergab nach Stimulation mit 10 ng/ml rhTGF-beta1 eine gegenüber unstimulierten Kontrollen verminderte Expression des epithelialen Markers ZO-1 ($61,6 \pm 2,8\%$) sowie eine vermehrte Expression der mesenchymalen Marker alpha-SMA ($918,2 \pm 99,1\%$), Vimentin ($1631 \pm 659,3\%$) und Kollagen Typ1 ($651,4 \pm 41,2\%$). Die Kostimulation mit 10 bzw. 100 ng/ml rhBMP-7 konnte die TGF-beta1-induzierten Veränderungen im Expressionsmuster teilweise verhindern, es zeigte sich eine dosisabhängig erhöhte Expression des epithelialen Markers ZO-1 ($67,6 \pm 7,5\%$ bzw. $99,1 \pm 13,3\%$, $p=0,009$), sowie eine dosisabhängig verminderte Expression der mesenchymalen Marker alpha-SMA ($675,6 \pm 72,1$) bzw. $346,1 \pm 40,1\%$, $p<0,001$), Vimentin ($755,7 \pm 203,3\%$ bzw. $147,2 \pm 77,2\%$, $p=0,006$) und Kollagen Typ1 ($621,3 \pm 38,2\%$ bzw. $129,5 \pm 8,0\%$, $p=0,003$), jeweils verglichen mit der alleinigen Stimulation mit 10ng/ml rhTGF-beta1. Die Stimulation mit 10 bzw. 100 ng/ml rhBMP-7 alleine hatte keinen Einfluss auf die Expression von ZO-1 ($101,1 \pm 7,2\%$ bzw. $97,9 \pm 12,6\%$), alpha-SMA ($105,0 \pm 15,7\%$ bzw. $108,9 \pm 11,8\%$), Vimentin ($123,7 \pm 52,9\%$ bzw. $144,2 \pm 72,7\%$) oder Kollagen Typ1 ($97,7 \pm 4,5\%$ bzw. $100,9 \pm 4,0\%$) in der Immunfluoreszenz (Bilder sind nicht gezeigt).

Abbildung 27: Immunfluoreszenz auf ZO-1 mit Schwellenwertanalyse nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta1 und BMP-7 über 48 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, $**=p<0,01$)

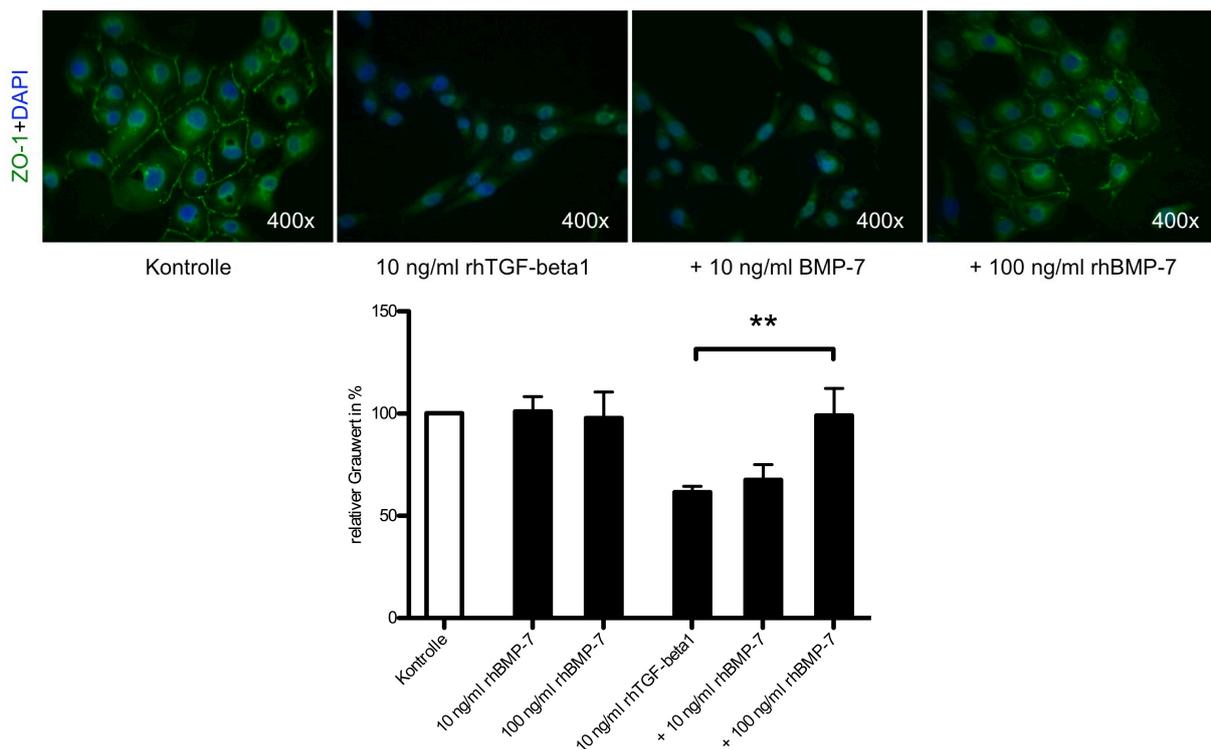


Abbildung 28: Immunfluoreszenz auf alpha-SMA mit Schwellenwertanalyse nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta1 und BMP-7 über 48 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, ***= $p < 0,001$)

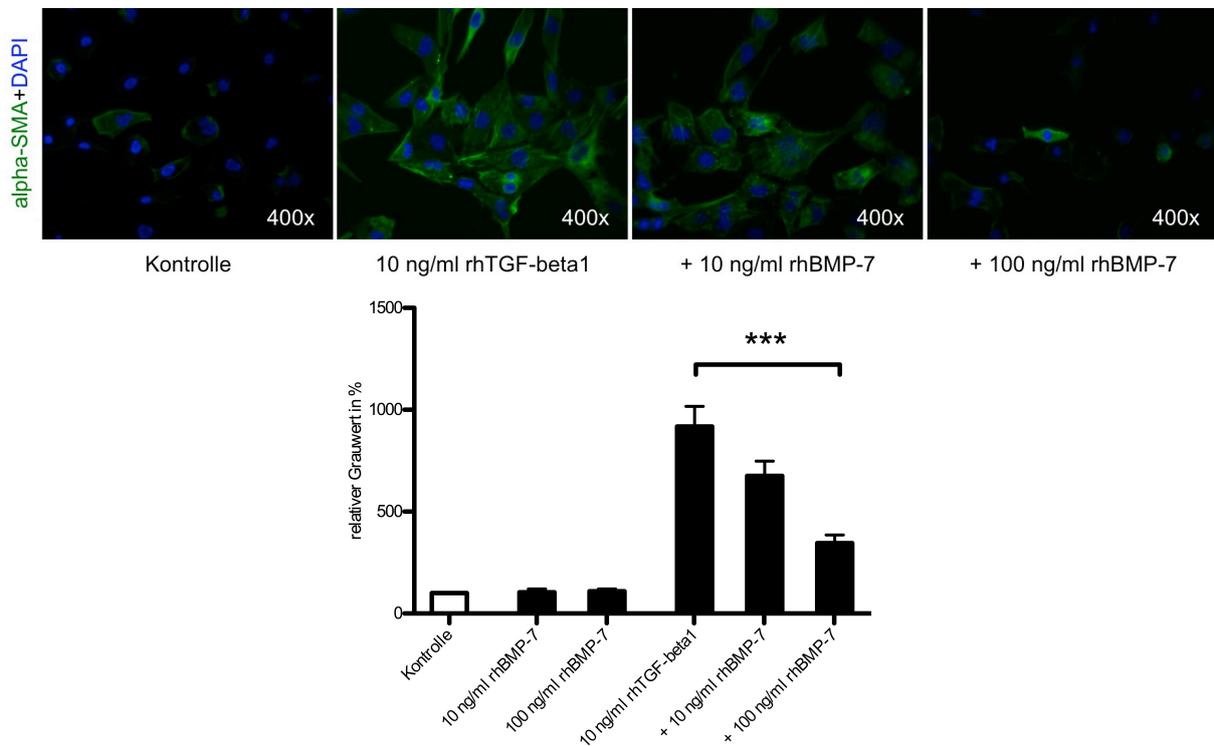


Abbildung 29: Immunfluoreszenz auf Vimentin mit Schwellenwertanalyse nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta1 und BMP-7 über 48 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, **= $p < 0,01$)

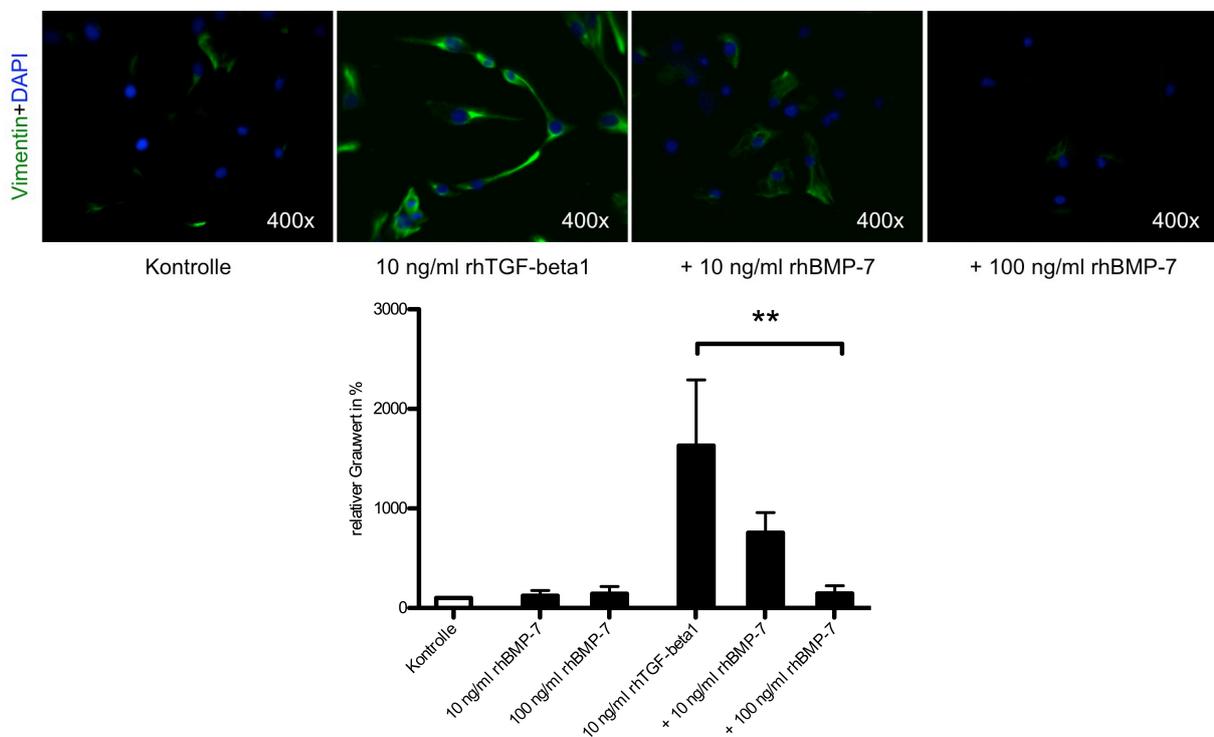
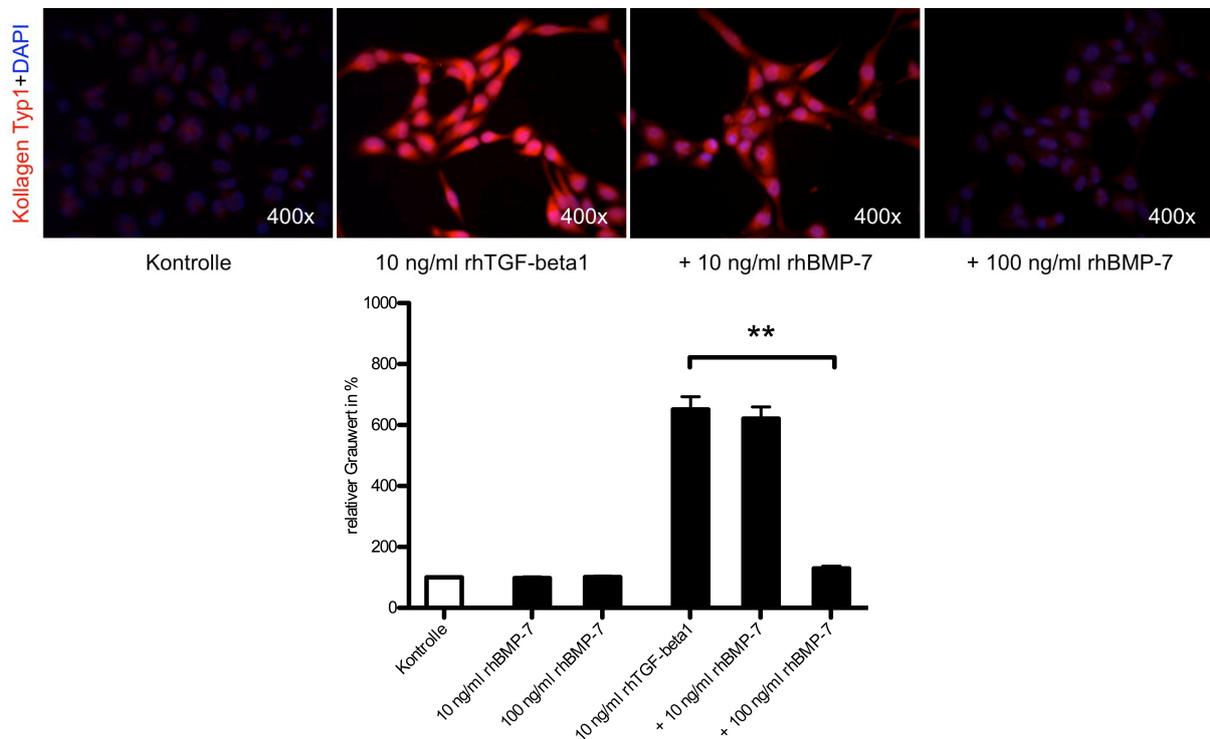


Abbildung 30: Immunfluoreszenz auf Kollagen Typ1 mit Schwellenwertanalyse nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta1 und BMP-7 über 48 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, **= $p < 0,01$)



Die Effekte von BMP-7 auf die TGF-beta1-induzierte EMT in der Immunfluoreszenz wurde durch die rtPCR bestätigt, es zeigte sich nach Stimulation mit 10 ng/ml rhTGF-beta1 eine verminderte Expression der epithelialen Marker ZO-1 ($55,0 \pm 22,0\%$) und E-Cadherin ($41,5 \pm 11,4\%$), sowie eine vermehrte Expression der mesenchymalen Marker alpha-SMA ($255,1 \pm 54,3\%$) und FSP-1 ($174,2 \pm 29,8\%$). Die Kostimulation mit 100 ng/ml rhBMP-7 antagonisierte diesen Effekt, es kam zu einer signifikant erhöhten Expression der epithelialen Marker ZO-1 ($83,0 \pm 13,6\%$, $p < 0,001$) und E-Cadherin ($66,3 \pm 13,6\%$, $p < 0,001$) bzw. einer signifikant verminderten Expression der mesenchymalen Marker alpha-SMA ($194,1 \pm 41,7\%$, $p < 0,001$) und FSP-1 ($152,1 \pm 34,8\%$, $p = 0,017$). Auch in der rtPCR zeigte die alleinige Stimulation mit 100 ng/ml rhBMP-7 keinen Einfluss auf die Expression von ZO-1 ($103,2 \pm 24,0\%$), E-Cadherin ($87,1 \pm 8,6\%$), alpha-SMA ($105,5 \pm 15,2\%$) oder FSP-1 ($83,5 \pm 10,4\%$).

Abbildung 31: rtPCR auf ZO-1 nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta1 und BMP-7 über 24 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, ***=p<0,001)

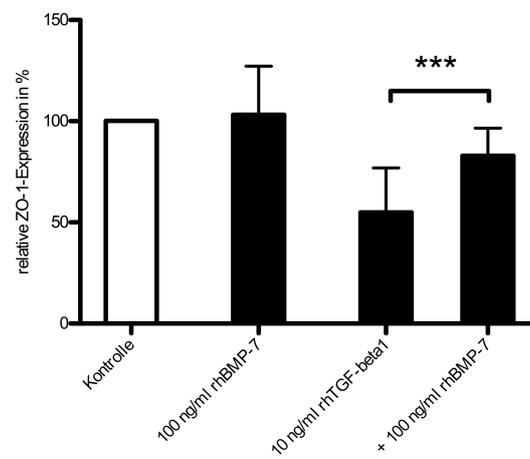


Abbildung 32: rtPCR auf E-Cadherin nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta1 und BMP-7 über 24 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, ***=p<0,001)

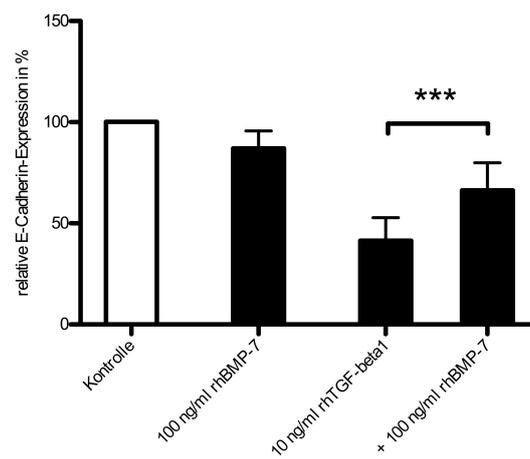


Abbildung 33: rtPCR auf alpha-SMA nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta1 und BMP-7 über 24 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, ***=p<0,001)

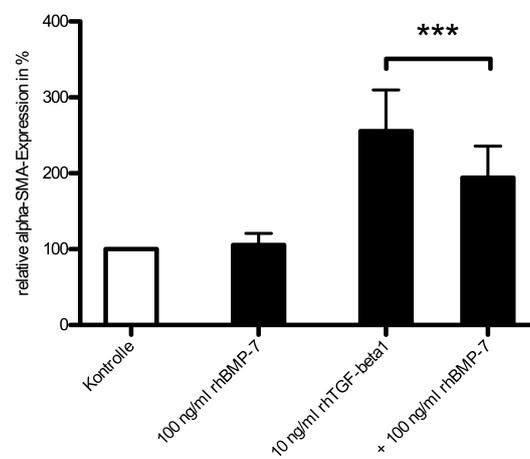
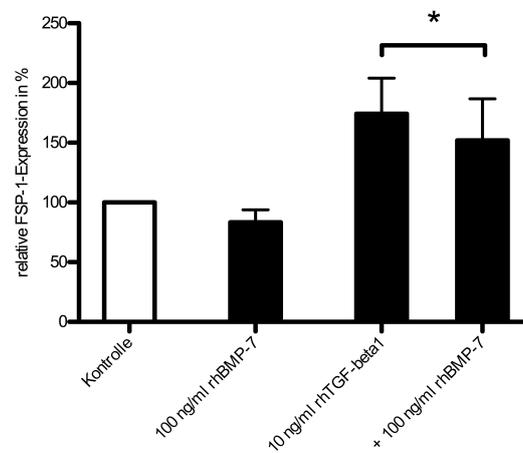
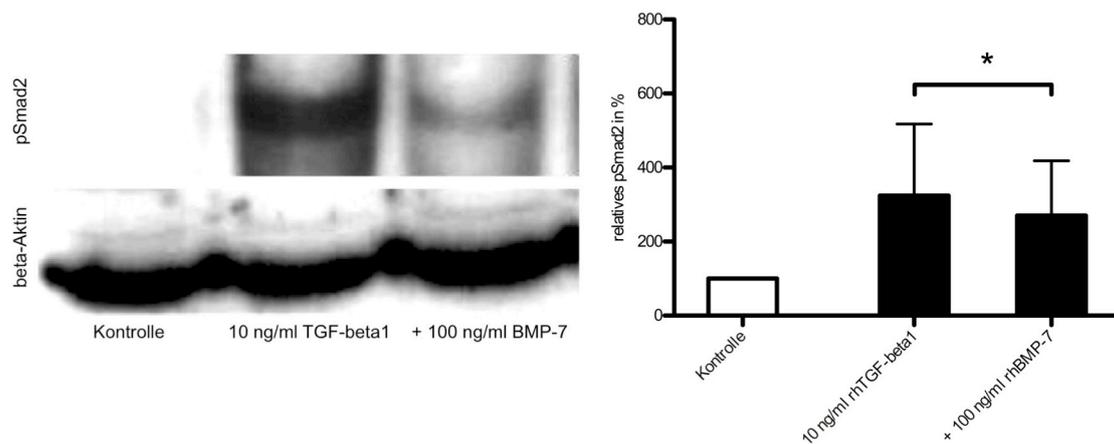


Abbildung 34: rtPCR auf FSP-1 nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta1 und BMP-7 über 24 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, $*=p<0,05$)



Der Einfluss von BMP-7 auf die TGF-beta1-induzierte Phosphorylierung von Smad2 wurde mittels Western Blot auf pSmad2 nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta1 alleine oder in Kombination mit BMP-7 untersucht. Hier zeigte sich gegenüber der Kontrolle ein höheres pSmad2 nach Stimulation mit 10 ng/ml rhTGF-beta1 als Ausdruck der vermehrten intrazellulären Aktivität der TGF-beta1-Signalkaskade ($259,6\pm 57,2\%$). Dieser Effekt konnte durch die Kostimulation mit 100 ng/ml rhBMP-7 signifikant reduziert werden ($221,4\pm 60,6\%$, $p=0,041$).

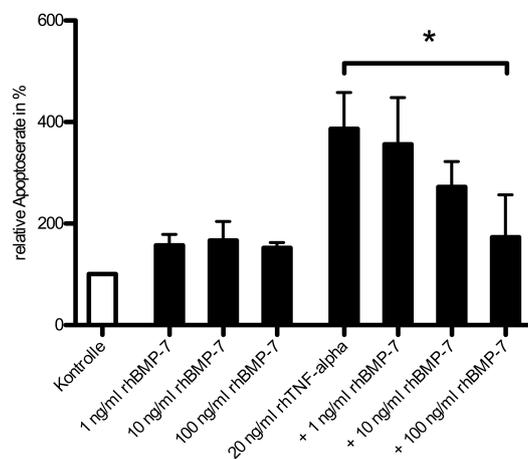
Abbildung 35: Western Blot auf pSmad2 mit densitometrischer Auswertung nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta1 und BMP-7 über 36 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, $*=p<0,05$)



3.4.2 BMP-7 hat TNF-alpha-neutralisierende Effekte in HK-2-Zellen

Um den Einfluss von BMP-7 auf das Zellsterben zu untersuchen, wurden HK-2-Zellen mit TNF-alpha allein oder in Kombination mit BMP-7 stimuliert. Die Stimulation mit 20 ng/ml rhTNF-alpha führte zu einer erhöhten Anzahl apoptotischer Zellen ($386,6 \pm 71,5\%$), detektiert als Annexin-V-positive und Propidiumiodid-negative Zellpopulation in der FACS-Analyse. Dieser Effekt konnte durch die Kostimulation mit 1 ($356,1 \pm 92,3\%$), 10 ($272,0 \pm 50,0\%$) und 100 ng/ml rhBMP-7 ($173,2 \pm 83,8\%$, $p=0,028$) dosisabhängig reduziert werden. Die Stimulation mit 1 ($157,3 \pm 21,3\%$), 10 ($166,7 \pm 37,5\%$) oder 100 ng/ml rhBMP-7 ($152,3 \pm 10,2\%$) alleine hatte keinen Effekt auf die Anzahl apoptotischer Zellen.

Abbildung 36: FACS-Analyse auf Annexin-V nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TNF-alpha und BMP-7 über 48 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, $*=p<0,05$)

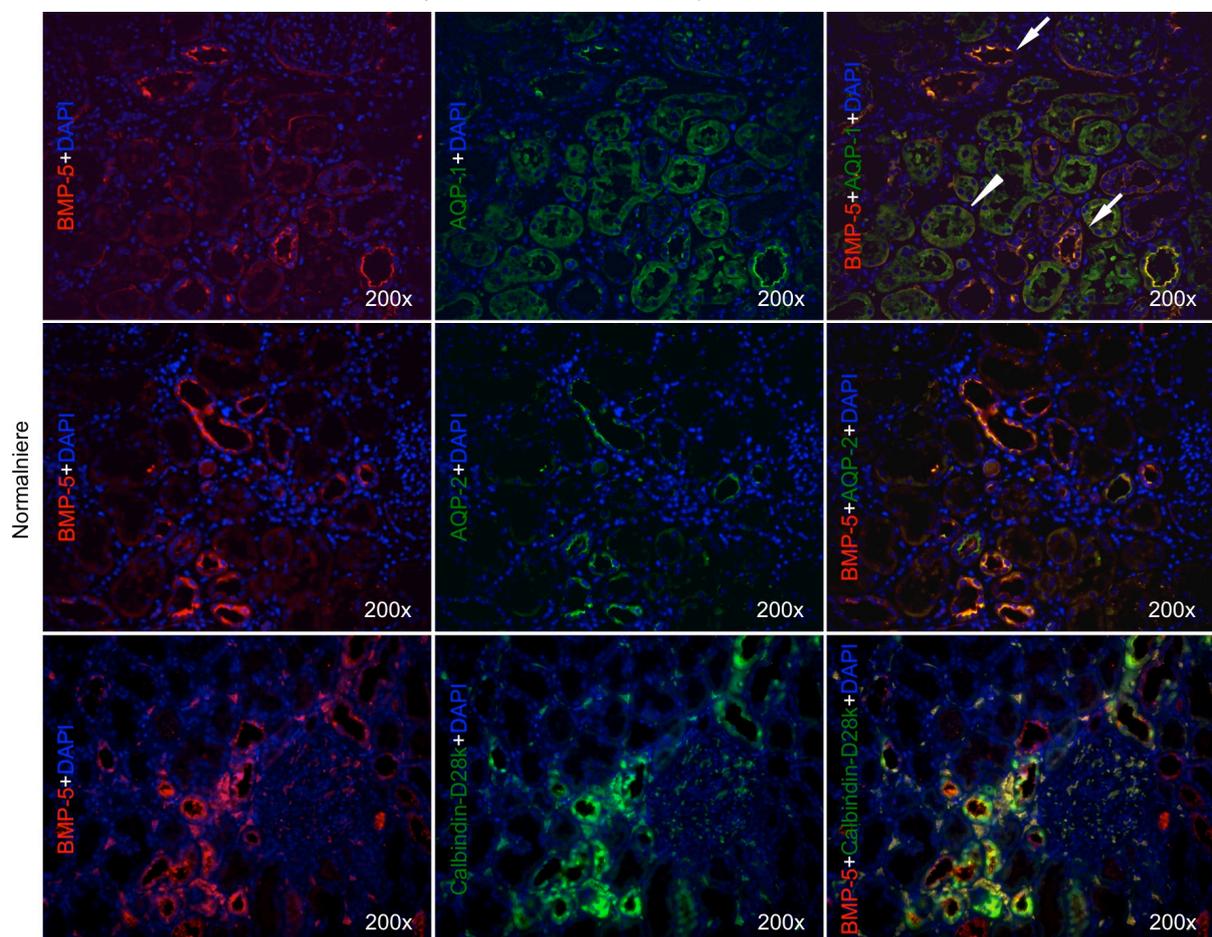


Somit zeigt BMP-7 in HK-2-Zellen TNF-alpha-neutralisierende Effekte *in vitro*.

3.5 BMP-5-Expression in der humanen Normalniere

Die Lokalisation der Expression von BMP-5 in der humanen Normalniere wurde mittels Doppelimmunfluoreszenzfärbungen auf BMP-5 und die tubulären Marker AQP-1, -2 und Calbindin-D28k untersucht. Diese ergaben eine BMP-5-Expression in AQP-1-positiven Tubulusabschnitten mit kuboiden Epithelzellen und weitem Lumen als Ausdruck des distalen Tubulussystems (Pfeil), in AQP-1-positiven proximalen Tubulusabschnitten mit kuboiden Epithelzellen und engem Lumen zeigte sich dagegen eine geringere BMP-5-Expression (Dreieck). Des Weiteren fand sich BMP-5 in AQP-2-positiven Sammelrohrabschnitten. Analog hierzu zeigte sich eine BMP-5-Expression in Calbindin-D28k-positiven Abschnitten des distalen Tubulusepithels und Sammelrohrs.

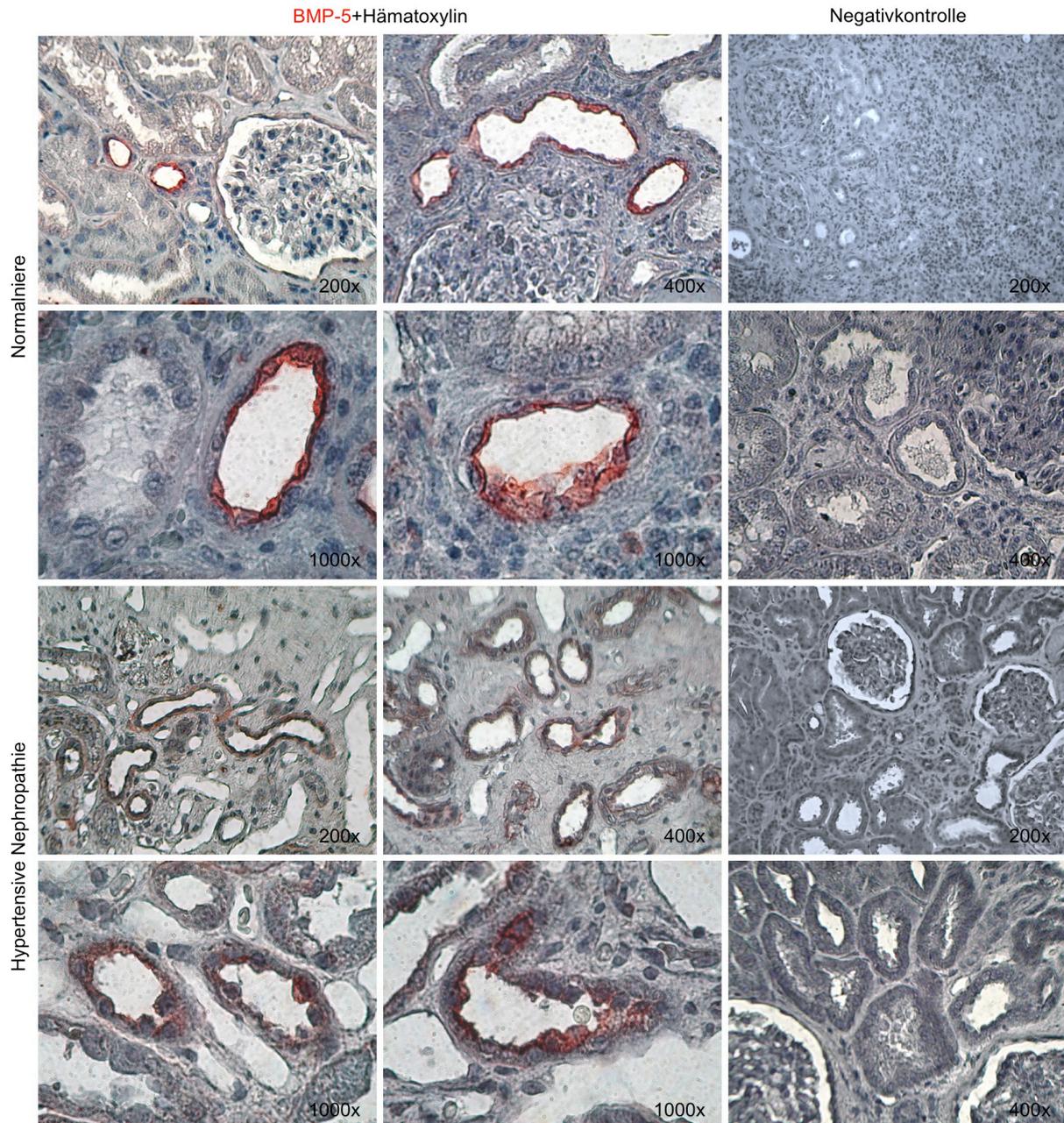
Abbildung 37: Doppelimmunfluoreszenz auf BMP-5 mit AQP-1, -2 und Calbindin-D28k in der Normalniere (Pfeil: distale Tubulusabschnitte, Dreieck: proximale Tubulusabschnitte)



3.6 Verminderte Expression von BMP-5 bei der hypertensiven Nephropathie

Die quantitativen Veränderungen der BMP-5-Expression bei der hypertensiven Nephropathie wurden mittels Immunhistochemie untersucht. Diese zeigte eine unverändert luminale, aber deutlich reduzierte Expression von BMP-5 im Tubulusepithel der hypertensiven Nephropathie. Glomerulär oder interstitiell ergab sich dagegen kein Anhalt für eine Expression von BMP-5.

Abbildung 38: Immunhistochemie auf BMP-5 in der Normalniere und bei der hypertensiven Nephropathie

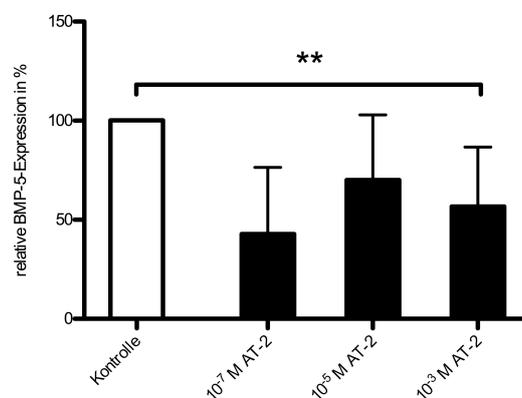


3.7 Regulation von BMP-5 *in vitro*

3.7.1 Einfluss des RAAS auf die Expression von BMP-5

Der Einfluss des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) auf die Expression von BMP-5 wurde mittels rtPCR nach Stimulation von HK-2-Zellen mit AT-2 untersucht. Hier zeigte sich eine für die höchste Konzentration signifikante Reduktion der BMP-5-Expression nach Stimulation mit 10^{-7} ($42,9 \pm 33,6\%$), 10^{-5} ($70,1 \pm 12,4\%$) und 10^{-3} M AT-2 ($56,7 \pm 11,4\%$, $p=0,009$).

Abbildung 39: rtPCR auf BMP-5 nach Stimulation von HK-2-Zellen mit AT-2 über 12 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, $**=p<0,01$)



3.7.2 Einfluss von TNF-alpha und TGF-beta1 auf die Expression von BMP-5

Der Effekt von TNF-alpha und TGF-beta1 auf die Expression von BMP-5 wurde nach Stimulation von HK-2-Zellen mittels rtPCR untersucht. Hier zeigte sich eine dosisabhängige Reduktion der Expression von BMP-5 nach Stimulation mit 1 ($50,6 \pm 4,3\%$), 20 ($53,3 \pm 9,9\%$) und 50 ng/ml rhTNF-alpha ($43,6 \pm 9,8\%$, $p=0,009$). Auch TGF-beta1 zeigte eine für die höchste Konzentration signifikante Reduktion der Expression von BMP-5 nach Stimulation mit 1 ($68,0 \pm 15,6\%$), 10 ($53,4 \pm 21,1\%$) und 100 ng/ml rhTGF-beta1 ($14,5 \pm 11,7\%$, $p<0,001$).

Abbildung 40: rtPCR auf BMP-5 nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TNF-alpha über 12 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, **= $p < 0,01$)

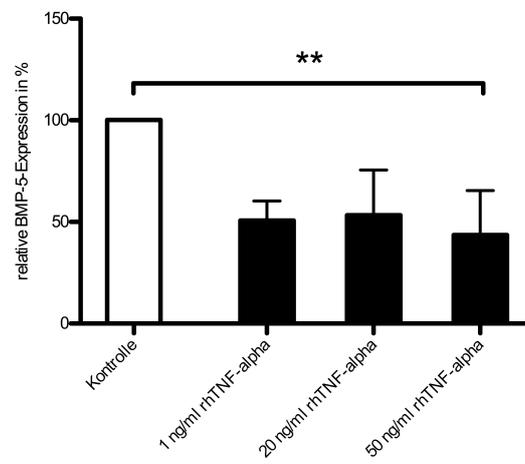
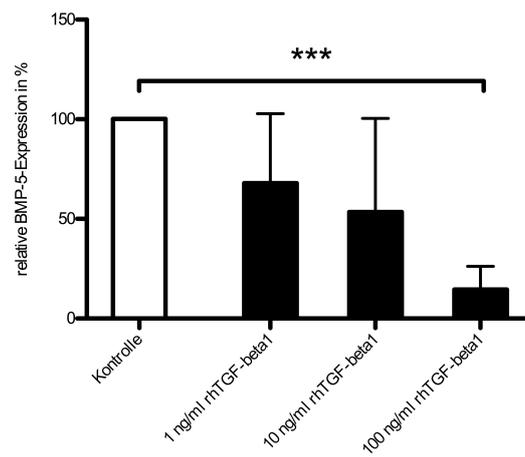


Abbildung 41: rtPCR auf BMP-5 nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta über 12 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, ***= $p < 0,001$)

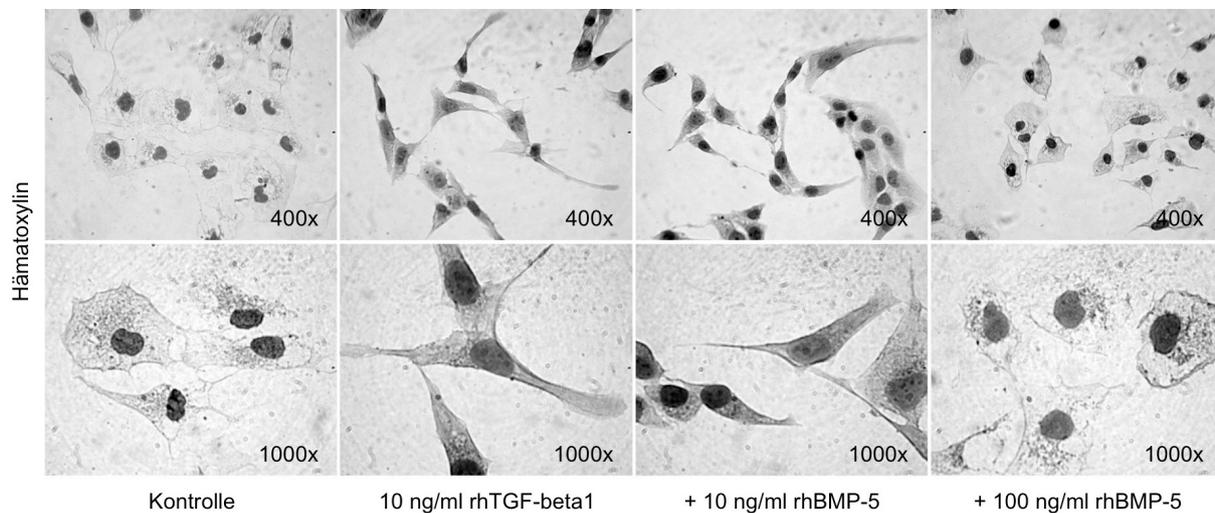


3.8 Funktionen von BMP-5 *in vitro*

3.8.1 BMP-5 hat TGF-beta1-neutralisierende Effekte

Der Einfluss von BMP-5 auf die TGF-beta1-induzierte epithelial-mesenchymale Transition (EMT) wurde nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta1 allein oder in Kombination mit BMP-5 mittels Hämatoxylin-Färbung, Doppelimmunfluoreszenz und rtPCR untersucht. Die Hämatoxylin-Färbung zeigte nach Stimulation von HK-2-Zellen mit 10 ng/ml rhTGF-beta1 gegenüber der Kontrolle eine spindelförmige Morphologie mit Zellausläufern als Ausdruck der EMT. Dieser Effekt konnte durch die Kostimulation mit 10 bzw. 100 ng/ml BMP-5 teilweise und dosisabhängig reduziert werden.

Abbildung 42: Hämatoxylinfärbung nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta1 und BMP-5 über 48 Stunden



Die Immunfluoreszenz ergab nach Stimulation mit 10 ng/ml rhTGF-beta1 gegenüber unstimulierten Kontrollen eine verminderte Expression des epithelialen Markers ZO-1 ($61,6 \pm 2,8\%$), sowie eine vermehrte Expression der mesenchymalen Marker alpha-SMA ($918,2 \pm 99,1\%$), Vimentin ($1631 \pm 659,3\%$), Kollagen Typ1 ($651,4 \pm 41,2\%$) und FSP-1 ($1128 \pm 439,1\%$). Die Kostimulation mit 10 bzw. 100 ng/ml rhBMP-5 konnte die TGF-beta1-induzierten Veränderungen in Morphologie und Expressionsmuster teilweise verhindern, es zeigte sich eine dosisabhängig erhöhte Expression des epithelialen Markers ZO-1 ($90,8 \pm 2,2\%$ bzw. $114,3 \pm 38,9\%$, $p=0,039$), sowie eine dosisabhängig verminderte Expression der mesenchymalen Marker alpha-SMA ($539,8 \pm 44,5\%$ bzw. $179,1 \pm 9,7\%$, $p<0,001$), Vimentin ($616,9 \pm 148,1\%$ bzw. $180,4 \pm 53,9\%$, $p=0,028$), Kollagen Typ1 ($469,2 \pm 13,5\%$ bzw. $115,9 \pm 3,1\%$, $p=0,003$) und FSP-1 ($588,1 \pm 157,4\%$ bzw. $175,1 \pm 48,9\%$, $p=0,047$), jeweils verglichen mit der alleinigen Stimulation mit 10 ng/ml rhTGF-beta1. Die Stimulation mit 10 bzw. 100 ng/ml rhBMP-5 alleine hatte keinen Einfluss auf die Expression von ZO-1 ($95,9 \pm 22,8\%$ bzw. $96,5 \pm 8,3\%$), alpha-SMA ($114,4 \pm 10,6\%$ bzw. $105,8 \pm 7,6\%$), Vimentin ($105,5 \pm 25,8\%$ bzw. $221,1 \pm 254,5\%$), Kollagen Typ1 ($98,9 \pm 1,4\%$ bzw. $103,1 \pm 18,0\%$) oder FSP-1 ($148,5 \pm 48,0\%$ bzw. $100,2 \pm 43,8\%$) in der Immunfluoreszenz (Bilder sind nicht gezeigt).

Abbildung 43: Immunfluoreszenz auf ZO-1 mit Schwellenwertanalyse nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta1 und BMP-5 über 48 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, $*=p<0,05$)

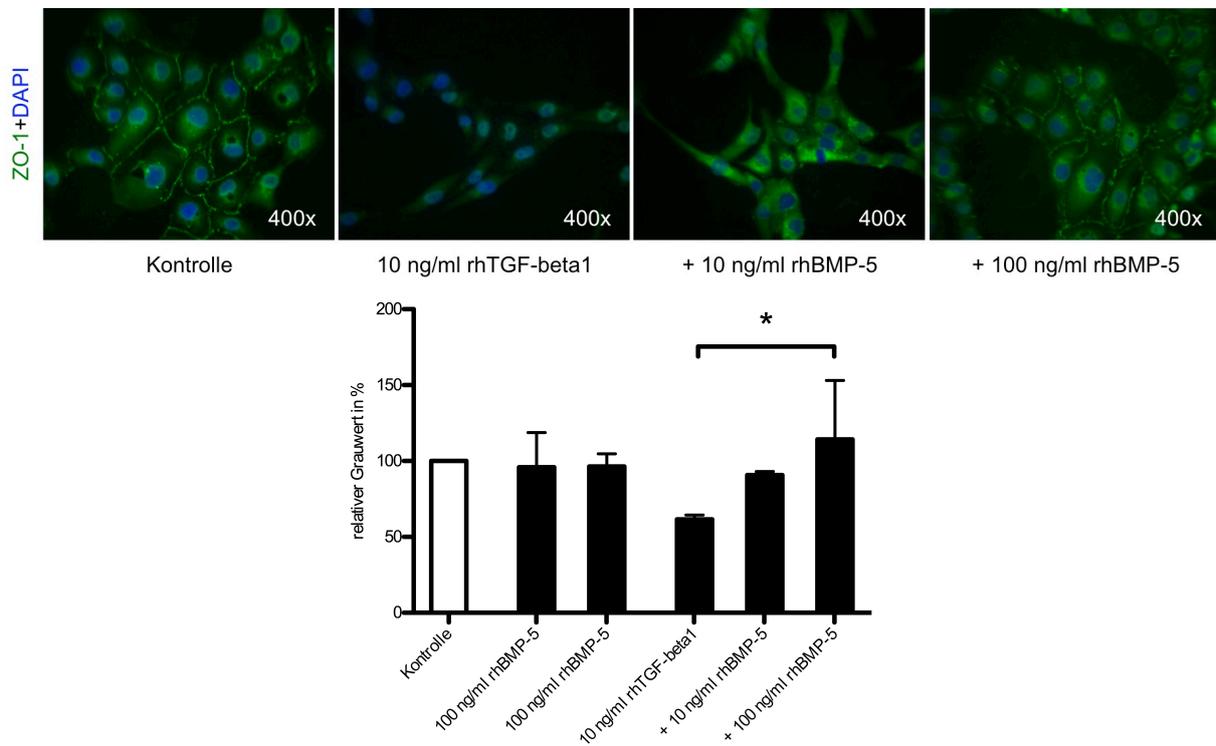


Abbildung 44: Immunfluoreszenz auf alpha-SMA mit Schwellenwertanalyse nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta1 und BMP-5 über 48 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, $***=p<0,001$)

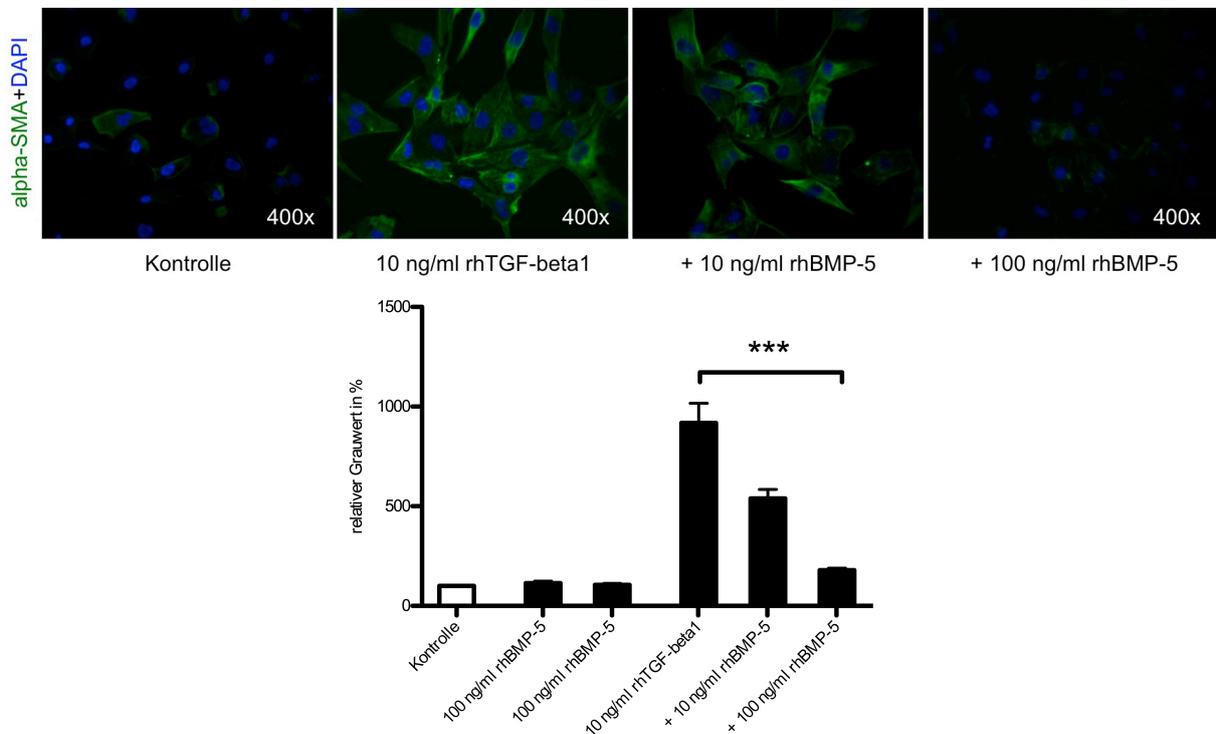


Abbildung 45: Immunfluoreszenz auf Vimentin mit Schwellenwertanalyse nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta1 und BMP-5 über 48 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, $*=p<0,05$)

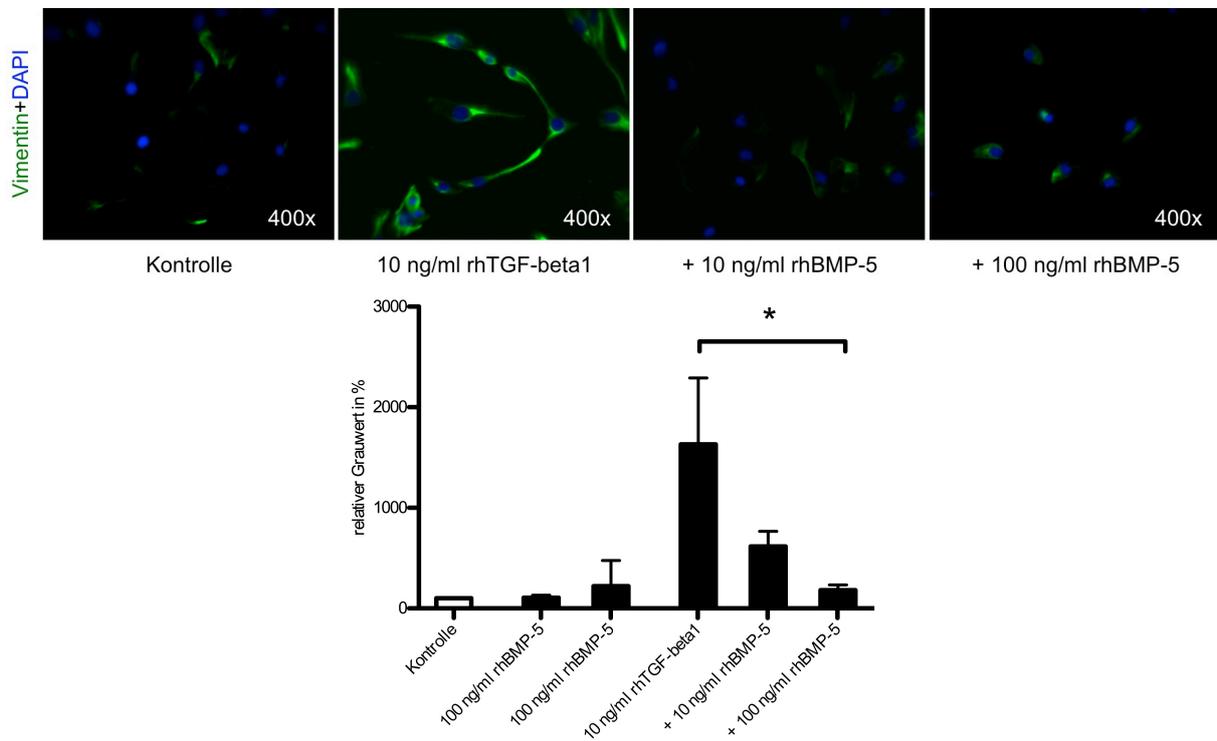


Abbildung 46: Immunfluoreszenz auf Kollagen Typ1 mit Schwellenwertanalyse nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta1 und BMP-5 über 48 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, $**=p<0,01$)

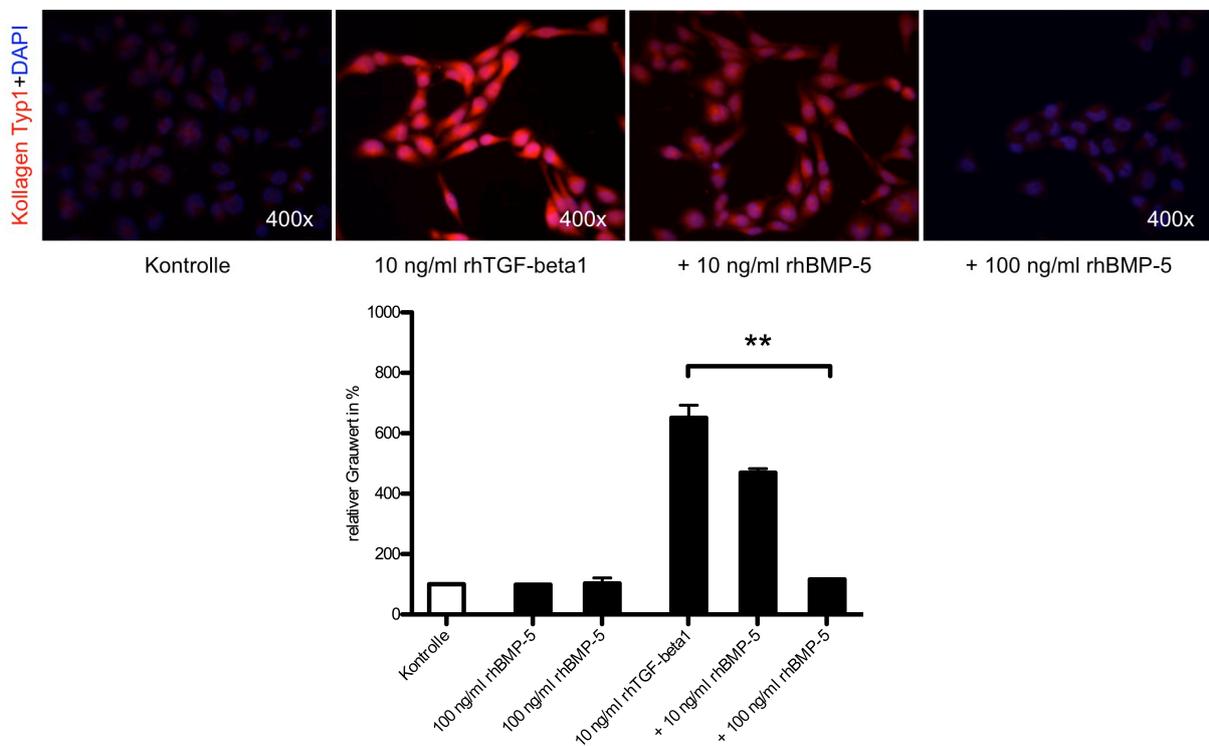
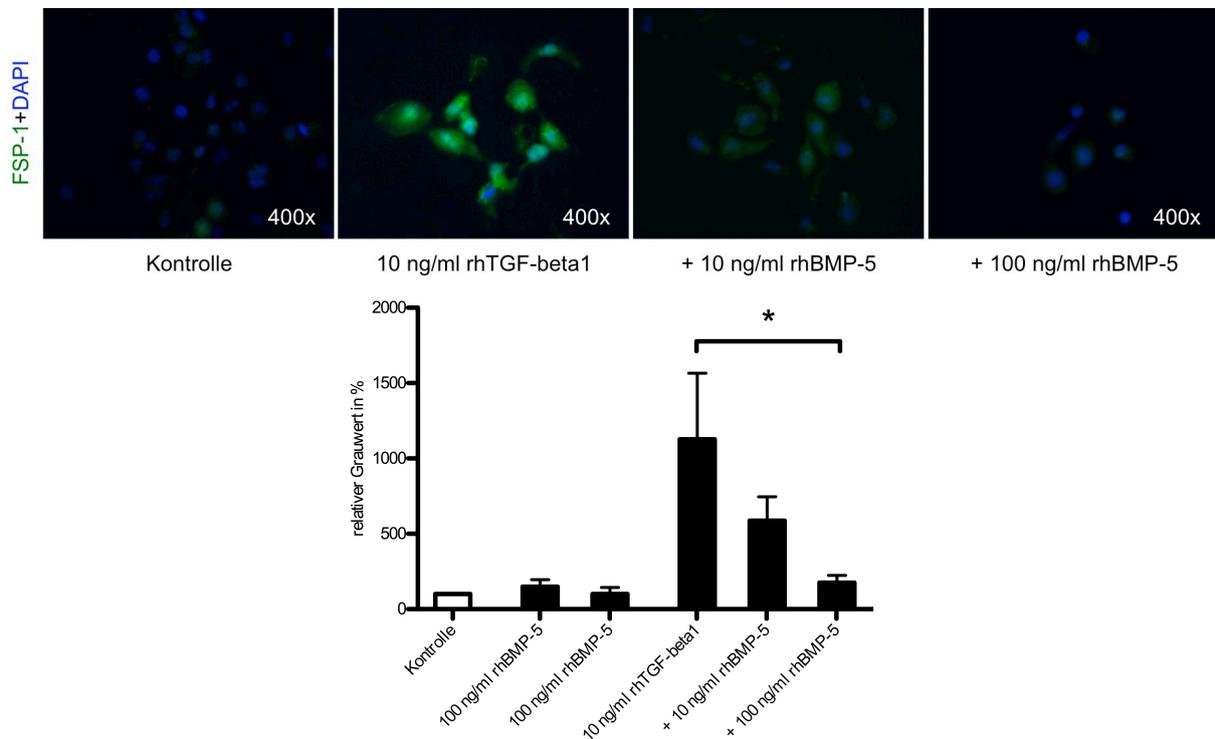


Abbildung 47: Immunfluoreszenz auf FSP-1 mit Schwellenwertanalyse nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta1 und BMP-5 über 48 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, $*=p<0,05$)



Die antagonisierenden Effekte von BMP-5 auf die TGF-beta1-induzierte EMT in HK-2-Zellen wurden durch die rtPCR bestätigt. Es zeigte sich nach Stimulation mit 10 ng/ml rhTGF-beta1 eine verminderte Expression des epithelialen Markers E-Cadherin ($45,3\pm 14,8\%$), sowie eine vermehrte Expression der mesenchymalen Marker alpha-SMA ($244,0\pm 56,7\%$) und FSP-1 ($136,2\pm 46,7\%$). Die Kostimulation mit 100 ng/ml rhBMP-5 antagonisierte diesen Effekt, es kam zu einer signifikant erhöhten Expression des epithelialen Markers E-Cadherin ($79,2\pm 28,8\%$, $p=0,004$) bzw. einer signifikant verminderten Expression der mesenchymalen Marker alpha-SMA ($115,7\pm 49,3\%$, $p=0,003$) und FSP-1 ($99,3\pm 21,0\%$, $p=0,042$). Die Stimulation mit 100 ng/ml rhBMP-5 alleine hatte keinen Einfluss auf die Expression von E-Cadherin ($138,8\pm 49,6\%$), alpha-SMA ($99,4\pm 17,7\%$) oder FSP-1 ($79,7\pm 22,9\%$) in der rtPCR.

Abbildung 48: rtPCR auf E-Cadherin nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta1 und BMP-5 über 24 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, **= $p < 0,01$)

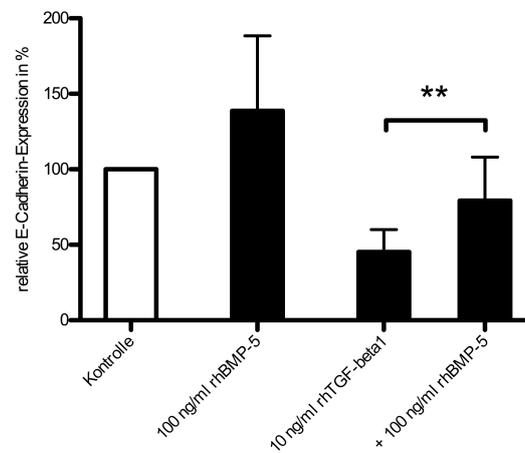


Abbildung 49: rtPCR auf alpha-SMA nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta1 und BMP-5 über 24 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, **= $p < 0,01$)

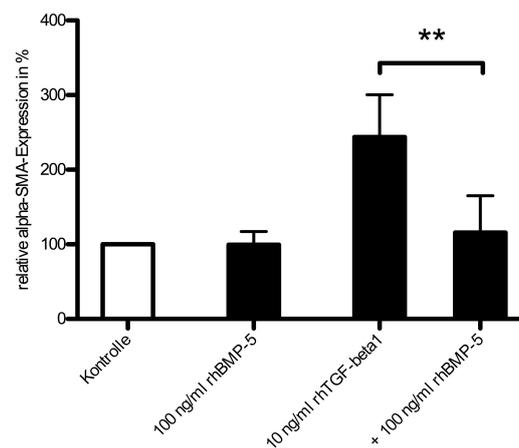
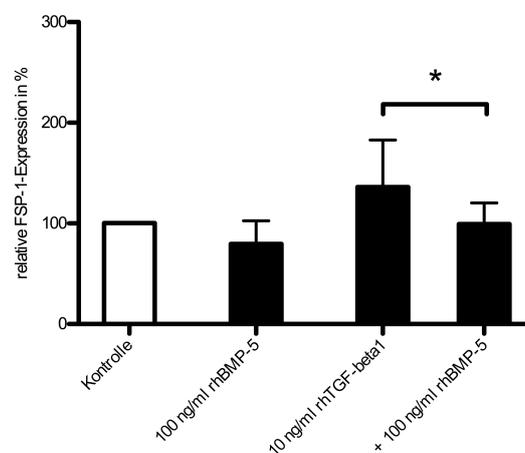


Abbildung 50: rtPCR auf FSP-1 nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta1 und BMP-5 über 24 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, *= $p < 0,05$)

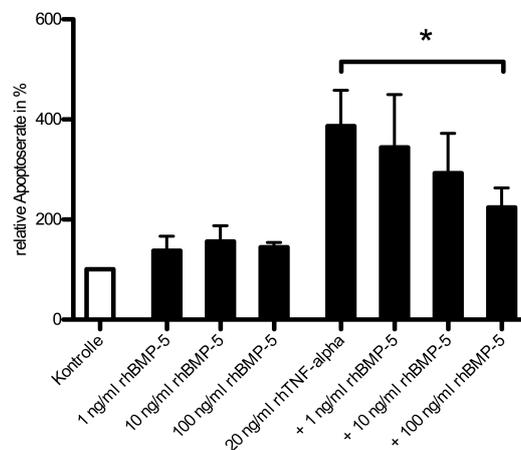


Somit verringert BMP-5 die TGF-beta1-induzierten Effekte in HK-2-Zellen mit Reduktion der EMT.

3.8.2 BMP-5 hat TNF-alpha-neutralisierende Effekte

Um den Einfluss von BMP-5 auf das Zellsterben zu untersuchen, wurden HK-2-Zellen mit TNF-alpha allein oder in Kombination mit BMP-5 stimuliert. Die Stimulation mit 20 ng/ml rhTNF-alpha führte zu einer erhöhten Anzahl apoptotischer Zellen (386,6±71,5%), detektiert als Annexin-V-positive und Propidiumiodid-negative Zellpopulation im FACScan. Dieser Effekt konnte durch die Kostimulation mit 1 (344,2±105,6%), 10 (292,9±79,3%) und 100 ng/ml rhBMP-5 (224,1±39,2%, $p=0,015$) dosisabhängig reduziert werden. Die Stimulation mit 1 (137,8±29,1%), 10 (156,1±31,5%) und 100 ng/ml rhBMP-5 (144,6±9,6%) alleine hatte keinen Effekt auf die Anzahl apoptotischer Zellen.

Abbildung 51: FACS-Analyse auf Annexin-V nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TNF-alpha und BMP-5 über 48 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, $*=p<0,05$)



Der Einfluss von BMP-5 auf die TNF-alpha-induzierte Expression der für die Migration inflammatorischer Zellen wichtigen Chemokine MCP-1 und Rantes wurde nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TNF-alpha allein oder in Kombination mit BMP-5 untersucht. Die Stimulation mit 100 ng/ml rhTNF-alpha führte zu einer erhöhten Expression von MCP-1 (369,0±184,8%) und Rantes (435,8±217,5%). Durch Kostimulation mit 100 ng/ml rhBMP-5 konnte die Expression von MCP-1 (183,5±51,1%, $p=0,032$) und Rantes (192,5±52,0%, $p=0,033$) signifikant reduziert werden. Die alleinige Stimulation mit 100 ng/ml BMP-5 hatte keinen Effekt auf die Expression von MCP-1 (111,8±72,2%) und Rantes (101,2±16,7%).

Abbildung 52: rtPCR auf MCP-1 nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TNF-alpha und BMP-5 über 24 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, $*=p<0,05$)

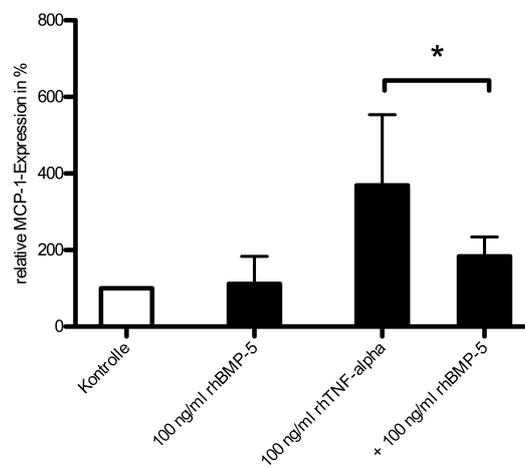
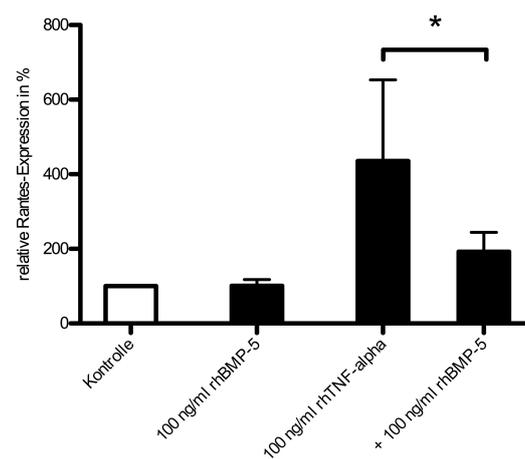


Abbildung 53: rtPCR auf Rantes nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TNF-alpha und BMP-5 über 24 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, $*=p<0,05$)



Somit zeigt BMP-5 in HK-2-Zellen TNF-alpha-neutralisierende Effekte mit Reduktion der TNF-alpha-induzierten Apoptose und verminderter Expression von MCP-1 und Rantes *in vitro*.

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden das für die Nephrogenese wichtige und im Tiermodell des akuten und chronischen Nierenversagens protektive BMP-7 sowie das eng verwandte BMP-5 in der adulten humanen Normalniere und bei der hypertensiven Nephropathie untersucht. Die Regulation und die Funktion dieser morphogenen Wachstumsfaktoren wurden zudem *in vitro* in humanen proximalen Tubulusepithelzellen ermittelt.

4.1 Regulation und Funktionen von BMP-7

4.1.1 BMP-7 in der adulten Normalniere und bei der hypertensiven Nephropathie

BMP-7 ist als Morphogen an der Nierenentwicklung beteiligt und hat eine zentrale Bedeutung in der Regulation von Gewebedifferenzierung, -wachstum und -regeneration (Ducy und Karsenty 2000, Hogan 1996, Kazama et al. 2008). In verschiedenen Tiermodellen des akuten und chronischen Nierenversagens wurden die Regulation und die Funktion von BMP-7 näher untersucht, doch Ergebnisse aus humanen Geweben liegen nur wenige bzw. keine bei der hypertensiven Nephropathie vor. In Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe konnte BMP-7 in der humanen Niere nachgewiesen werden, es zeigte sich eine insbesondere luminale Expression von BMP-7 im Tubulusepithel der adulten Normalniere (Bramlage et al. 2010).

In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Anfärbung der einzelnen tubuloepithelialen Abschnitte eine Expression von BMP-7 im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife, dem distalen Tubulusepithel und in Sammelrohrabschnitten der adulten humanen Normalniere nachgewiesen werden, im proximalen Tubulusepithel fand sich eine geringere Expression von BMP-7. Diese Ergebnisse sind übereinstimmend mit tierexperimentellen Daten sowie Ergebnissen von Wetzel et al. aus der humanen Normalniere, welche ein ähnliches tubuloepitheliales Expressionsmuster von BMP-7 zeigen konnten (Ozkaynak et al. 1991, Wetzel et al. 2006). Des Weiteren wurde im Tiermodell eine Expression von BMP-7 in anderen Kompartimenten wie glomerulären Zellen und renalen Arterien beschrieben (Simon et al. 1999, Wang SN et al. 2001). Vorarbeiten konnten zeigen, dass glomeruläre Strukturen der humanen Normalniere eine geringe Expression von BMP-7 aufweisen (Bramlage et al. 2010). Wetzel et al. konnten dies nicht bestätigen, glomerulär fand sich keine Expression von BMP-7 (Wetzel et al. 2006). Dies unterstreicht die Relevanz von Studien an humanem Gewebe, um die Übertragbarkeit tierexperimenteller Beobachtungen auf den Menschen zu klären.

Bei der humanen hypertensiven Nephropathie zeigte sich in dieser Arbeit eine zur adulten Normalniere vergleichbar luminale Expression von BMP-7 im distalen Tubulusepithel und in Sammelrohrabschnitten, im proximalen Tubulusepithel fand sich auch bei der hypertensiven Nephropathie eine geringere Expression von BMP-7. Auch wenn sich in dieser Arbeit kein Anhalt für

einen Unterschied hinsichtlich der Lokalisation von BMP-7 ergab, so konnte bei der hypertensiven Nephropathie eine verminderte Expression von BMP-7 sowohl auf Protein- wie auch auf mRNA-Ebene gegenüber der Normalniere nachgewiesen werden. Dies ist vereinbar mit Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe, welche eine quantitative Veränderung im Tubulointerstitium der hypertensiven Nephropathie mit einer verminderten Expression von BMP-7 aufzeigen konnten (Bramlage et al. 2010). Die verminderte Expression von BMP-7 bei der hypertensiven Nephropathie war mit einer Induktion von pro-inflammatorischen und pro-fibrotischen Faktoren verbunden, in der vorliegenden Arbeit konnte eine vermehrte Expression von TNF-alpha und TGF-beta1 gegenüber der Normalniere nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sind übereinstimmend mit tierexperimentellen Daten, welche in verschiedenen Modellen des akuten und chronischen Nierenversagens eine verminderte Expression von BMP-7 bzw. Induktion von TNF-alpha und TGF-beta1 nachweisen konnten (Biyikli et al. 2005, Klahr 2003, Lee und Kalluri 2010, Mitu und Hirschberg 2008, Simon et al. 1999, Vukicevic et al. 1998). Des Weiteren sind diese mit Daten von Wang SN et al. aus Patienten mit einer fortgeschrittenen diabetischer Nephropathie vereinbar, welche einen progredienten Verlust der endogenen Expression von BMP-7 in der Niere aufwiesen (Wang SN et al. 2001). Kontroverse Ergebnisse lieferten dagegen Rudnicki et al., welche eine vermehrte Expression von BMP-7 in proximalen Tubulusepithelzellen von Patienten mit beginnender Niereninsuffizienz und Proteinurie nachweisen konnten (Rudnicki et al. 2007). Dies könnte die Induktion von Schutz- und Regenerationsmechanismen in der frühen Phase der Nierenschädigung bedeuten, welche mit einer vermehrten Expression nephroprotektiver Faktoren wie BMP-7 assoziiert sind. Anzumerken ist allerdings, dass sich Rudnicki et al. nicht auf eine bestimmte Grunderkrankung bezogen, welche zu der Nierenschädigung führte. Auch wenn die Endstrecke nahezu aller progredienten Nierenerkrankungen die Fibrose darstellt, so sind verschiedene Pathomechanismen gerade in der Frühphase beteiligt und erschweren einen Vergleich zu diesem Zeitpunkt.

4.1.2 BMP-7 und EMT *in vitro*

Es bestehen kontroverse Daten über die Expression von BMP-7 in proximalen Tubulusepithelzellen. Einerseits konnten Wetzel et al. keine Expression von BMP-7 in primären oder immortalisierten proximalen Tubulusepithelzellen detektieren, Rudnicki et al. dagegen gelang dieser Nachweis (Rudnicki et al. 2007, Wetzel et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte eine, wenn auch niedrige Expression von BMP-7 im proximalen Tubulusepithel der humanen Normalniere bzw. den immortalisierten humanen proximalen Tubulusepithelzellen HK-2 nachgewiesen werden. Des Weiteren konnten Kitten et al. eine Expression der BMP-Rezeptoren in HK-2-Zellen nachweisen, so dass diese durch BMPs stimuliert werden können (Kitten et al. 1999). Da keine weiteren immortalisierten humanen Tubuluszelllinien verfügbar sind, wurden diese für anschließende Stimulationsversuche verwendet.

Als Ursprung aktivierter Fibroblasten bei der tubulointerstitiellen Fibrose werden sowohl residente Fibroblasten wie auch ursprünglich epitheliale Zellen diskutiert, welche durch den Vorgang der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) in das Interstitium auswandern und extrazelluläre Matrixproteine bilden (Kalluri und Weinberg 2009, Zeisberg M und Duffield 2010). Wichtige Mediatoren dieser Prozesse, welche in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, sind AT-2 als Bestandteil des intrarenalen RAAS und TGF-beta1 (Burns et al. 2010, Kalluri und Weinberg 2009, Strutz und Zeisberg M 2006, Strutz et al. 2002). Der Einfluss des RAAS auf die Expression und Aktivität von BMP-7 wurde nach Stimulation von HK-2-Zellen mit AT-2 und dessen Rezeptorantagonisten Telmisartan untersucht. Die Stimulation mit AT-2 führte zu einer verminderten Expression von BMP-7 und dessen intrazellulärer Aktivität mit Reduktion von pSmad1/5/8. Des Weiteren konnte ein Effekt des RAAS auf die BMP-Rezeptorexpression nachgewiesen werden, da die Stimulation mit AT-2 zu einer Reduktion von BMPR-1A und -1B führte. Dies könnte neben einem direkten Einfluss auf die Expression von BMP-7 bedeuten, dass AT-2 als Bestandteil des RAAS auch über eine verminderte Expression der BMP-Rezeptoren antagonisierende Effekte aufweist. Hinsichtlich dessen Rezeptorantagonisten Telmisartan konnten andere Arbeitsgruppen eine anti-inflammatorische Wirkung mit Reduktion der TNF-alpha-vermittelten Expression von Interleukin-6 bzw. verminderten Expression von MCP-1 und dessen Rezeptor CCR2 nachweisen (Dai et al. 2007, Tian et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich nach Stimulation von HK-2-Zellen mit Telmisartan eine Induktion der Expression von BMP-7 *in vitro*. Inwieweit diese Prozesse bei der protektiven Wirkung dieser Substanzklasse bei der hypertensiven Nephropathie beteiligt sind, müssen zukünftige Studien gerade im Tiermodell klären.

TGF-beta1 ist ein weiterer Mediator der tubulointerstitiellen Fibrose und reguliert über die Aktivierung der intrazellulären Smad-Signalkaskade eine Vielzahl von Genen und damit Wachstum, Differenzierung und Proliferation (Border und Noble 1994). Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass BMP-7 ein wichtiger Gegenspieler TGF-beta1-vermittelter Effekte darstellt und die tubulointerstitielle Fibrosierung antagonisieren kann (Zeisberg M 2006, Bechtel und Zeisberg M 2009). Die protektive Wirkung von BMP-7 auf das Tubulusepithel wird wesentlich über den proximalen Tubulus vermittelt, da insbesondere hier die intrazelluläre Smad-Signalkaskade aktiviert werden kann (Motazed et al. 2008). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte ein Effekt in proximalen Tubulusepithelzellen nachgewiesen werden, die Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta1 wirkte hemmend auf die Expression von BMP-7 selbst und dessen Rezeptoren BMPR-1A und -2. Des Weiteren induzierte TGF-beta1 in HK-2-Zellen die EMT mit typischer spindelförmiger Veränderung der Zellmorphologie, verminderter Expression epithelialer und Induktion mesenchymaler Gene. Der antagonisierende Effekt von BMP-7 auf die TGF-beta1-induzierte EMT konnte von Zeisberg M et al. in murinen Tubulusepithelzellen nachgewiesen werden, in humanen Zelllinien dagegen liegen nur wenige kontroverse Daten hierzu vor (Zeisberg M et al. 2003). So konnten Veerasamy et al. bzw. Xu et al. zeigen, dass BMP-7 die EMT in HK-2-Zellen verhindern kann, dagegen gelang dieser Nachweis Dudas et al. nicht (Dudas et al. 2008, Veerasamy et al. 2009, Xu et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit konnte ein antagonisierender Effekt von BMP-7 auf die EMT in HK-2-Zellen nachgewiesen

werden. So zeigte die Kostimulation von HK-2-Zellen mit BMP-7 eine teilweise Antagonisierung TGF-beta1-vermittelter Effekte mit reduzierten Veränderungen in der Zellmorphologie und dem Expressionsmuster. Die Konsequenz einer verminderten Wirkung von TGF-beta1 an der Zielzelle konnte in dieser Arbeit durch eine verglichen zur alleinigen Stimulation mit TGF-beta1 reduzierten Phosphorylierung von Smad2 zu pSmad2 nach Kostimulation mit BMP-7 nachgewiesen werden. Insgesamt zeigten sich signifikante Effekte von BMP-7 in HK-2-Zellen nur bei Verwendung hoher Konzentrationen und Stimulation mit 100ng/ml rhBMP-7. Zum Einen könnte dies bedeuten, dass die verwendete Zelllinie HK-2 nicht so reagibel wie murine proximale Tubulusepithelzellen ist und für vergleichbare Effekte höhere Konzentrationen von BMP-7 notwendig sind. Zum Anderen könnte der Prozess der EMT im Menschen eine geringere Relevanz für die Entstehung der tubulointerstitiellen Fibrose als im Tiermodell einnehmen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass tierexperimentelle Daten über BMP-7 auf die adulte humane Normalniere bzw. die hypertensive Nephropathie teilweise übertragbar sind und BMP-7 ähnliche Effekte in den humanen proximalen Tubulusepithelzellen HK-2 *in vitro* zeigt.

4.1.3 BMP-7 und inflammatorische Prozesse

Inflammatorische Prozesse stehen gerade in der akuten Phase der Nierenschädigung im Vordergrund, wobei ein zentraler Mechanismus die Induktion inflammatorischer Zytokine wie TNF-alpha darstellt (Müller et al. 1992, Sean Eardley und Cockwell 2005). TNF-alpha reguliert über die Induktion verschiedener Gene die inflammatorische Reaktion und Migration von Entzündungszellen (Rovin et al. 1995, Leonard und Yoshimura 1990, Luster 1998, Nelson et al. 1993, Rollins et al. 1991, Schall et al. 1990, Zoja et al. 1998). Ein wichtiger Gegenspieler der inflammatorischen Reaktion ist BMP-7, welches im Tiermodell des akuten Nierenversagens protektive Effekte auf das Tubulusepithel vermittelt und zu einer verminderten inflammatorischen Reaktion führt (Vukicevic et al. 1998, Yanagita 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Stimulation von HK-2-Zellen mit TNF-alpha zu einer verminderten Expression von BMP-7 und dessen Rezeptoren BMPR-1B und -2 führt. Diese Prozesse könnten Ausdruck einer erhöhten Vulnerabilität von Tubulusepithelzellen gegenüber inflammatorischen Prozessen sein. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass BMP-7 protektive Effekte mit Hemmung der TNF-alpha-induzierten Apoptose *in vitro* aufweist. Die Hemmung der TNF-alpha vermittelten Apoptose in Tubulusepithelzellen könnte Ausdruck antagonistischer Effekte von BMP-7 auf die Induktion inflammatorischer Prozesse sein und bedeuten, dass tierexperimentelle Daten über BMP-7 in Modellen akuter Nierenschädigungen teilweise auf den Menschen übertragbar sind.

4.2 Regulation und Funktionen von BMP-5

4.2.1 BMP-5 in der adulten Normalniere und bei der hypertensiven Nephropathie

Das dem BMP-7 eng verwandte BMP-5 ist ebenso an der Nephrogenese beteiligt und soll teilweise die Funktionen von BMP-7 in BMP-7-defizienten Mäusen übernehmen können (Dudley und Robertson 1997, King et al. 1994, Oxburgh et al. 2005, Ozkaynak et al. 1992). Allerdings gibt es bislang nahezu keine Daten über BMP-5 in der adulten Niere oder dessen Regulation und Funktion bei Nierenerkrankungen. In Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe ergab sich eine tubulointerstitielle Expression, glomerulär fand sich dagegen keine Expression von BMP-5 (Bramlage et al. 2011). Bestätigt wurde dies in der vorliegenden Arbeit mit Nachweis einer Expression von BMP-5 im distalen Tubulusepithel und Abschnitten des Sammelrohrs. In proximalen Tubulusepithelzellen zeigte sich eine geringere Expression von BMP-5. Bei der humanen hypertensiven Nephropathie konnte eine zur adulten Normalniere verminderte Expression von BMP-5 bei vergleichbar luminaler Lokalisation nachgewiesen werden. Auch hier ergab sich kein Anhalt für eine glomeruläre oder interstitielle Expression von BMP-5.

Somit konnte in der vorliegenden Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass BMP-5 ein ähnliches Expressionsmuster wie BMP-7 in der adulten humanen Normalniere aufweist. Einziger Unterschied scheint das komplette Fehlen von BMP-5 in glomerulären Strukturen der humanen Niere zu sein, für BMP-7 konnte in Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe dagegen eine geringe Expression in den Glomeruli nachgewiesen werden (Bramlage et al. 2010, Bramlage et al. 2011). Des Weiteren wurde bestätigt, dass BMP-5 bei der hypertensiven Nephropathie gegenüber der Normalniere vermindert exprimiert wird und somit vergleichbaren Regulationsmechanismen wie BMP-7 unterliegen könnte.

4.2.2 BMP-5 und EMT *in vitro*

Wichtige Mediatoren der Fibrogenese sind AT-2 und TGF-beta1, welche bei der hypertensiven Nephropathie vermehrt exprimiert werden (Burns et al. 2010, Kalluri und Weinberg 2009, Strutz und Zeisberg M 2006, Strutz et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von Tubulusepithelzellen mit AT-2 und TGF-beta1 zu einer verminderten Expression von BMP-5 führt.

Über die Funktion von BMP-5 in der adulten Niere und speziell tubuloepithelialen Zellen ist bisher nur wenig bekannt. An BMP-5-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass diese eine verminderte Anzahl epithelialer Stammzellen in der Haut und ein erhöhtes Risiko für Hauttumoren aufweisen (Kangsamaksin und Morris 2010). Johnsen et al. konnten in Nebennierenkarzinomzellen nachweisen, dass die Stimulation mit BMP-5 zu einer verminderten Proliferations- und Mitoserate von Krebszellen führt (Johnsen et al. 2009). Diese Beobachtungen könnten einen hemmenden Effekt von BMP-5 auf die Dedifferenzierung epithelialer Zellen bedeuten, welche auch bei Prozessen der epithelial-mesenchymale Transition (EMT) eine zentrale Rolle spielt. In dieser Arbeit konnte ein Einfluss von

BMP-5 auf die EMT in adulten Tubulusepithelzellen nachgewiesen werden, da BMP-5 *in vitro* TGF-beta1-vermittelte Effekte mit Veränderungen in Zellmorphologie und Expressionsmuster teilweise antagonisieren konnte.

Somit konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden, dass BMP-5 durch AT-2 und TGF-beta1 vermindert exprimiert wird und ähnliche Effekte wie das eng verwandte BMP-7 in humanen Tubulusepithelzellen aufweist. Diese Beobachtungen könnten die teilweise Kompensation des Funktionsverlustes von BMP-7 in BMP-7-defizienten Mäusen durch BMP-5 erklären (Oxburgh et al. 2005). Die Übertragbarkeit dieser antagonisierenden Effekte *in vitro* auf Tiermodelle progredienter Fibrosierung sollte Gegenstand zukünftiger Studien sein, um Kenntnisse über die Regulation und die Funktion von BMP-5 in der adulten Niere zu erlangen.

4.2.3 BMP-5 und inflammatorische Prozesse

Ein wichtiger Gegenspieler inflammatorischer Prozesse in Tiermodellen des akuten Nierenversagens, welche insbesondere durch das zuvor erwähnte TNF-alpha vermittelt werden, stellt BMP-7 mit protektiver Wirkung auf das Tubulusepithel dar (Vukicevic et al. 1998, Yanagita 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Stimulation von HK-2-Zellen mit TNF-alpha zu einer verminderten Expression von BMP-5 führt. Des Weiteren zeigte sich, dass BMP-5 ähnlich protektive Effekte wie BMP-7 in Tubulusepithelzellen *in vitro* mit Hemmung der TNF-alpha-induzierten Apoptose aufweist. Die TNF-alpha-vermittelte Induktion inflammatorischer Chemokine in tubuloepithelialen Zellen konnte durch BMP-5 teilweise antagonisiert werden, es ergab sich nach Kostimulation eine verminderte Expression von MCP-1 und Rantes, welche wichtige Mediatoren der Entzündungsreaktion und der Migration von inflammatorischen Zellen darstellen. Hinsichtlich einer funktionellen Konsequenz für die Migration inflammatorischer Zellen konnten Vorarbeiten zeigen, dass BMP-5 die TNF-alpha-vermittelte Migration mononukleärer Zellen antagonisieren kann (Bramlage et al. 2011).

Somit konnte erstmalig auch bei inflammatorischen Prozessen nachgewiesen werden, dass BMP-5 durch TNF-alpha vermindert exprimiert wird und *in vitro* ähnliche Effekte wie BMP-7 aufweist. Dies könnte eine vermehrte Vulnerabilität tubuloepithelialer Zellen gegenüber inflammatorischen Prozessen bedeuten und dessen protektives und regeneratisches Potential unterstreichen. Erneut müssen zukünftige Studien die Übertragbarkeit dieser Beobachtungen *in vitro* auf Tiermodelle akuter Nierenschädigung klären, um Kenntnisse über die Regulation und die Funktion von BMP-5 bei inflammatorischen Prozessen der Niere zu erlangen.

4.3 Verbindung zwischen Inflammation und Fibrose

Die Inflammation und die Fibrose sind eng miteinander verbunden, fortgeschrittene Stadien chronischer Nierenerkrankungen sind durch eine andauernde interstitielle Inflammation, Migration von Entzündungszellen und Fibrosierung charakterisiert (Guijarro und Egido 2001, Krensky und Ahn 2007, Lange-Sperandio et al. 2007, Segerer et al. 2000). So lassen sich bei Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen inflammatorische Proteine wie das C-reaktive Protein (CRP), die Interleukine (IL)-1 und -6 oder TNF-alpha vermehrt im Plasma nachweisen (Lee und Kalluri 2010). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte bei der hypertensiven Nephropathie gezeigt werden, dass sowohl das inflammatorische Zytokin TNF-alpha wie auch der pro-fibrotische Faktor TGF-beta1 vermehrt exprimiert werden und diese Prozesse somit miteinander assoziiert sind.

Die Aktivierung des RAAS ist ein wichtiger Pathomechanismus bei der Entstehung der tubulointerstitiellen Fibrose, da dessen Hauptmediator AT-2 entzündliche Prozesse wie vaskuläre Inflammation, endotheliale Dysfunktion und Induktion von Adhäsionsmolekülen induzieren kann (Ruiz-Ortega und Egido 1997, Ruiz-Ortega et al. 2006, Sironi et al. 2005). Die Folge ist eine Migration neutrophiler Granulozyten, eine Endozytose des geschädigten Gewebes, die Sekretion inflammatorischer bzw. pro-fibrotischer Zytokine und eine Induktion apoptotischer Prozesse. Anschließend infiltrieren Makrophagen das Gewebe, welche als vorrangige Zellen der Expression des fibrogenen TGF-beta1 identifiziert wurden (Bataller und Brenner 2005). TGF-beta1 gilt als Hauptmediator der Fibrose in der Niere und anderen Organen (Border und Noble 1994). So induziert TGF-beta1 in zellulären Modellen der Fibrosierung die Proliferation von renalen Fibroblasten oder die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) in epithelialen Zellen (Strutz et al. 2002). Die Folge einer Überexpression von TGF-beta1 *in vivo* ist die Entwicklung einer tubulointerstitiellen Fibrose mit Niereninsuffizienz, welche Kopp et al. in transgenen Mäusen nachweisen konnten (Kopp et al. 1996). Somit ist die Fibrose der Niere ein komplexer Prozess, an welchem verschiedenste inflammatorische Mechanismen mit einem Netzwerk aus Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmolekülen und Entzündungszellen beteiligt sind. In vielen Studien wurde die Rolle von fibrogenen Faktoren wie AT-2 oder TGF-beta1 in späteren Stadien der Nierenfibrose untersucht, doch die genauen Mechanismen in der Frühphase der Inflammation sind bislang wenig verstanden. So konzentrieren sich aktuelle Therapieansätze auf die Verlangsamung der progredienten Fibrose durch beispielsweise eine medikamentöse Therapie mit RAAS-Inhibitoren und eine bestmögliche Behandlung von Begleiterkrankungen. In der entzündlichen Frühphase stehen dagegen derzeit nur wenige und unspezifische Therapieoptionen zur Verfügung, die Behandlung inflammatorischer Glomerulonephritiden beispielsweise konzentriert sich auf eine unspezifische Immunsuppression oder die Elimination von inflammatorischen Zytokinen wie TNF-alpha (Khan et al. 2005). Die für die Nephrogenese wichtigen Morphogene BMP-5 und -7 sind hierbei spannende Proteine, welche auch in der adulten Niere exprimiert werden und protektive Effekte in Tubulusepithelzellen bei inflammatorischen Prozessen *in vitro* zeigen. Es bleibt zu klären, ob diese Beobachtungen *in vivo* übertragbar sind und auch beim Menschen ähnliche Wirkungen beobachtet werden können. Die

klinische Anwendung von BMP-7 wurde lange durch Bedenken verzögert, es könne zu extraossären Knochenneubildungen führen. Sampath et al. konnten zeigen, dass die subkutane Applikation von BMP-7 in Ratten zu ektopen Ossifikationsherden führt, bei intravenöser oder intraperitonealer Verabreichung von BMP-7 wurde dies allerdings nie beschrieben (Bechtel und Zeisberg M 2009, Sampath et al. 1992). Erneut müssen zukünftige Studien sowohl die Wirkungen wie auch die Nebenwirkungen von BMP-5 und -7 *in vivo* aufzeigen, um Erkenntnisse über deren Einfluss auf inflammatorische und fibrotische Prozesse bei der hypertensiven Nephropathie zu erlangen und eine Grundlage für die Entwicklung und den Einsatz von gezielten Therapeutika zu schaffen. Jedoch wird die systemische Applikation auf Grund der schwierigen Pharmakokinetik und der Instabilität der Proteine erschwert, so dass eine denkbare Alternative zu rekombinanten Proteinen synthetisch hergestellte Peptide (sog. small molecules) sein könnten, welche die Funktion der BMPs kopieren (Bechtel und Zeisberg M 2009). So befindet sich das erste synthetische BMP-Analogon THR-184 in einer klinischen Phase 1-Studie bei Patienten mit akutem Nierenversagen nach operativen Eingriffen, THR-123 wird derzeit präklinisch getestet und soll bei chronischer Niereninsuffizienz im Rahmen einer diabetischen Nephropathie eingesetzt werden (Thrasos Therapeutics 2011). Da in der vorliegenden Arbeit eine verminderte Expression von BMP-5 und -7 bei der hypertensiven Nephropathie sowie zahlreiche protektive Effekte dieser Proteine auf Tubulusepithelzellen *in vitro* nachgewiesen wurden, könnten diese synthetischen BMP-Analoga auch eine therapeutische Wirkung bei der hypertensiven Nephropathie aufweisen und vielversprechende Möglichkeiten in deren Behandlung eröffnen.

5. Zusammenfassung

Das für die Nierenentwicklung wichtige BMP-7 wirkt in verschiedenen Tiermodellen des akuten und des chronischen Nierenversagens protektiv und regenerativ, das eng verwandte BMP-5 ist ebenso an der Nephrogenese beteiligt. Deren Rolle in der humanen Niere, insbesondere bei der hypertensiven Nephropathie, wurde bisher nicht beschrieben. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Expression, die Regulation und die Funktion von BMP-5 und -7 in der humanen Niere, bei der hypertensiven Nephropathie und der menschlichen Zelllinie HK-2 zu untersuchen.

Es konnte gezeigt werden, dass BMP-7 in der humanen Normalniere im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife, dem distalen Tubulusepithel und in Sammelrohrabschnitten exprimiert wird. Die hypertensive Nephropathie zeigte bei unveränderter Lokalisation eine gegenüber der gesunden Niere verminderte Expression von BMP-7 ($11,5 \pm 9,8\%$, $p < 0,001$). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die pro-inflammatorischen bzw. pro-fibrotischen Faktoren TNF-alpha und TGF-beta1 bei der hypertensiven Nephropathie vermehrt exprimiert werden ($949,9 \pm 1268\%$, $p = 0,021$ und $553,3 \pm 576,9\%$, $p = 0,026$).

AT-2 als Teil des RAAS und als wichtiger Pathomechanismus bei der hypertensiven Nephropathie hatte in HK-2-Zellen direkten Einfluss auf BMP-7 mit einer verminderten Expression ($15,3 \pm 24,2\%$, $p < 0,001$) und einer Reduktion der intrazellulären Aktivität von pSmad1/5/8 ($54,8 \pm 9,8\%$, $p = 0,030$). Des Weiteren konnte ein Effekt von AT-2 auf die Expression der BMP-Rezeptoren nachgewiesen werden, nach Stimulation zeigte sich eine Reduktion von BMPR-1A ($57,0 \pm 7,3\%$, $p < 0,001$) und -1B ($49,7 \pm 6,4\%$, $p < 0,001$).

Die bei der hypertensiven Nephropathie vermehrt exprimierten pro-inflammatorischen bzw. pro-fibrotischen Zytokine TNF-alpha und TGF-beta1 führten nach Stimulation von HK-2-Zellen zu einer verminderten Expression von BMP-7 ($21,9 \pm 39,0\%$, $p < 0,001$ und $32,1 \pm 33,0\%$, $p < 0,001$). Darüber hinaus hatten sowohl TNF-alpha mit einer Reduktion von BMPR-1B ($76,1 \pm 11,7\%$, $p < 0,001$) und -2 ($60,8 \pm 15,9\%$, $p < 0,001$) als auch TGF-beta1 mit einer Reduktion von BMPR-1A ($61,9 \pm 19,0\%$, $p = 0,004$) und -2 ($80,0 \pm 22,2\%$, $p = 0,027$) einen Einfluss auf die Expression der BMP-Rezeptoren.

BMP-7 zeigte antagonisierende Effekte auf die TGF-beta1-vermittelte epithelial-mesenchymale Transition (EMT) mit Reduktion der morphologischen Veränderungen sowie einer dosisabhängig erhöhten Expression der epithelialen Marker ZO-1 ($55,0 \pm 22,0\%$ vs. $83,0 \pm 13,6\%$, $p < 0,001$) und E-Cadherin ($41,5 \pm 11,4\%$ vs. $66,3 \pm 13,6\%$, $p < 0,001$) bzw. einer dosisabhängig verminderten Expression der mesenchymalen Marker alpha-SMA ($255,1 \pm 54,3\%$ vs. $194,1 \pm 41,7\%$, $p < 0,001$) und FSP-1 ($174,2 \pm 29,8\%$ vs. $152,1 \pm 34,8\%$, $p = 0,017$). Die Antagonisierung dieser Effekte durch BMP-7 war mit einer verminderten intrazellulären Aktivität der TGF-beta1-Signalkaskade über pSmad2 ($259,6 \pm 57,2\%$ vs. $221,4 \pm 60,6\%$, $p = 0,041$) verbunden. Des Weiteren konnte die TNF-alpha-induzierte Apoptose in humanen Tubulusepithelzellen *in vitro* durch BMP-7 teilweise antagonisiert werden ($386,6 \pm 71,5\%$ vs. $173,2 \pm 83,8\%$, $p = 0,028$).

Ähnlichen Regulationsmechanismen unterlag das eng verwandte BMP-5. Es konnte gezeigt werden, dass BMP-5 hauptsächlich im distalen Tubulusepithel und Abschnitten des Sammelrohrs der humanen Niere exprimiert wird und die hypertensive Nephropathie bei unveränderter Lokalisation mit einer reduzierten Expression einhergeht.

Das RAAS hatte einen direkten Einfluss auf BMP-5, nach Stimulation von HK-2-Zellen mit AT-2 zeigte sich eine verminderte Expression von BMP-5 ($56,7 \pm 11,4\%$, $p=0,009$).

Die pro-inflammatorischen bzw. pro-fibrotischen Faktoren TNF-alpha und TGF-beta1 führten *in vitro* zu einer verminderten Expression von BMP-5 ($43,6 \pm 9,8\%$, $p=0,009$ und $14,5 \pm 11,7\%$, $p<0,001$).

BMP-5 vermittelte ähnlich wie BMP-7 hemmende Effekte auf die TGF-beta1-induzierte epithelial-mesenchymale Transition (EMT), die Stimulation führte zu einer Reduktion der morphologischen Veränderungen sowie zu einer dosisabhängig erhöhten Expression des epithelialen Markers E-Cadherin ($45,3 \pm 14,8\%$ vs. $79,2 \pm 28,8\%$, $p=0,004$) bzw. einer dosisabhängig verminderten Expression der mesenchymalen Marker alpha-SMA ($244,0 \pm 56,7\%$ vs. $115,7 \pm 49,3\%$, $p=0,003$) und FSP-1 ($136,2 \pm 46,7\%$ vs. $99,3 \pm 21,0\%$, $p=0,042$). Auch die TNF-alpha-vermittelte Apoptose in humanen Tubulusepithelzellen konnte durch BMP-5 teilweise antagonisiert werden ($386,6 \pm 71,5\%$ vs. $224,1 \pm 39,2\%$, $p=0,015$). Darüber hinaus zeigte BMP-5 eine Reduktion der TNF-alpha-induzierten Expression der pro-inflammatorischen und für die Migration von Entzündungszellen wichtigen Zytokine MCP-1 ($369,0 \pm 184,8\%$ vs. $183,5 \pm 51,1\%$, $p=0,032$) und Rantes ($435,8 \pm 217,5\%$ vs. $192,5 \pm 52,0\%$, $p=0,033$).

Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl BMP-5 als auch -7 bei der hypertensiven Nephropathie vermindert exprimiert werden und dies einen Verlust von protektivem und regenerativem Potential bedeuten könnte. Zukünftige Studien müssen speziell bei der hypertensiven Nephropathie die Regulation und die Funktion dieser Proteine untersuchen, um Kenntnisse über deren therapeutisches Potential in dieser Erkrankung zu erlangen. Ähnlich wie im Tiermodell für BMP-7 nachgewiesene Wirkungen antagonisieren BMP-5 und -7 in humanen HK-2-Zellen schädliche Effekte durch AT-2, TNF-alpha und TGF-beta1 *in vitro*, so dass diese auch beim Menschen protektive und regenerative Effekte in der Niere vermitteln könnten.

6. Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

ALK3	Activin Receptor-like Kinase 3
ALK6	Activin Receptor-like Kinase 6
alpha-SMA	alpha-Smooth Muscle Actin
AQP-1	Aquaporin-1
AQP-2	Aquaporin-2
AT-2	Angiotensin-2
BMP-5	Bone Morphogenetic Protein-5
BMP-7	Bone Morphogenetic Protein-7
BMPR-1A	Bone Morphogenetic Protein Receptor-1A
BMPR-1B	Bone Morphogenetic Protein Receptor-1B
BMPR-2	Bone Morphogenetic Protein Receptor-2
bp	Basenpaare
BrdU	5-Bromo-2'-Deoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
cDNA	Desoxyribonukleinsäure
Ct	Cycle threshold
dCT	delta-CT
ddCT	delta delta-CT
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HK-2	human kidney-2
HPV-16	humanes Papillomavirus-16
HRP	Horseradish-Peroxidase
kDa	Kilodalton
min	Minute
mRNA	messenger RNA
NFW	nukleasefreies Wasser
Nm	Nanometer
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung

PCR	Polymerase Chain Reaction
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PPIA	Peptidylprolyl-Isomerase A
rhBMP-5	rekombinantes humanes BMP-5
rhBMP-7	rekombinantes humanes BMP-7
rhTGF-beta1	rekombinantes humanes TGF-beta1
rhTNF-alpha	rekombinantes humanes TNF-alpha
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RR	Rhodaminrot
rtPCR	real-time PCR
s	Sekunde
sog.	sogenannt
Ta	Annealingtemperatur
TGF-beta1	Transforming Growth Factor-beta1
THP	Tamm Horsfall Protein
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor-alpha
vs.	versus

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Inzidenz der Ursachen für eine neu aufgetretene terminale Niereninsuffizienz bei lebenden Dialysepatienten in Nierenersatztherapie im Jahre 2006 (modifiziert nach Frei und Schober-Halstenberg 2008, Seite 35)	1
Abbildung 2:	TGF-beta-Superfamilie (modifiziert nach Ducy und Karsenty 2000, Seite 2208)	4
Abbildung 3:	TGF-beta1-Signalkaskade	6
Abbildung 4:	Aktivierung von BMP-7 (modifiziert nach Bramlage und Müller 2010, Seite 528)	6
Abbildung 5:	Intrazelluläre Signalkaskade von BMP-7 (modifiziert nach Bramlage und Müller 2010, Seite 528)	7
Abbildung 6:	Modulatorische Faktoren von BMP-7 (modifiziert nach Bechtel und Zeisberg M 2009, Seite 1690)	8

Abbildung 7:	60A-Superfamilie (modifiziert nach Ducy und Karsenty 2000, Seite 2208)	10
Abbildung 8:	Alignment der Aminossequenz der reifen Domäne von BMP-7 (oben) und BMP-5 (unten), Übereinstimmungen in Schwarz	10
Abbildung 9:	Modulatorische Faktoren von BMP-5	10
Abbildung 10:	Intrazelluläre Signalkaskade von TNF-alpha	12
Abbildung 11:	RAAS-Signalkaskade	13
Abbildung 12:	Wirkmechanismus der RAAS-Inhibitoren	14
Abbildung 13:	Doppelimmunfluoreszenz auf BMP-7 mit THP, AQP-1 und -2 in der Normalniere (Pfeil: distale Tubulusabschnitte, Dreieck: proximale Tubulusabschnitte)	34
Abbildung 14:	Doppelimmunfluoreszenz auf BMP-7 mit AQP-1 und -2 bei der hypertensiven Nephropathie (Pfeil: distale Tubulusabschnitte, Dreieck: proximale Tubulusabschnitte)	35
Abbildung 15:	Immunhistochemie auf BMP-7 in der Normalniere und bei der hypertensiven Nephropathie	36
Abbildung 16:	rtPCR auf BMP-7 in der Normalniere und bei der hypertensiven Nephropathie (Mittelwert, Standardabweichung, ***=p<0,001)	37
Abbildung 17:	rtPCR auf TNF-alpha in der Normalniere und bei der hypertensiven Nephropathie (Mittelwert, Standardabweichung, *=p<0,05)	37
Abbildung 18:	rtPCR auf TGF-beta1 in der Normalniere und bei der hypertensiven Nephropathie (Mittelwert, Standardabweichung, ***=p<0,001)	39
Abbildung 19:	rtPCR auf BMP-7 nach Stimulation von HK-2-Zellen mit AT-2 über 12 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, ***=p<0,001)	39
Abbildung 20:	rtPCR auf BMP-7 nach Stimulation von HK-2-Zellen mit Telmisartan über 12 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, **=p<0,01)	39

Abbildung 21: Western Blot auf pSmad1/5/8 mit densitometrischer Auswertung nach Stimulation von HK-2-Zellen mit AT-2 über 36 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, $*=p<0,05$)	40
Abbildung 22: rtPCR auf BMP-7 nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TNF-alpha und TGF-beta1 über 12 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, $***=p<0,001$)	40
Abbildung 23: rtPCR auf BMPR-1A, -1B und -2 nach Stimulation von HK-2-Zellen mit AT-2 über 12 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, $***=p<0,001$)	41
Abbildung 24: rtPCR auf BMPR-1A, -1B und -2 nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TNF-alpha über 12 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, $***=p<0,001$)	41
Abbildung 25: rtPCR auf BMPR-1A, -1B und -2 nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta1 über 12 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, $***=p<0,001$)	42
Abbildung 26: Hämatoxylinfärbung nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta1 und BMP-7 über 48 Stunden	42
Abbildung 27: Immunfluoreszenz auf ZO-1 mit Schwellenwertanalyse nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta1 und BMP-7 über 48 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, $**=p<0,01$)	43
Abbildung 28: Immunfluoreszenz auf alpha-SMA mit Schwellenwertanalyse nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta1 und BMP-7 über 48 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, $***=p<0,001$)	44
Abbildung 29: Immunfluoreszenz auf Vimentin mit Schwellenwertanalyse nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta1 und BMP-7 über 48 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, $**=p<0,01$)	44
Abbildung 30: Immunfluoreszenz auf Kollagen Typ1 mit Schwellenwertanalyse nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta1 und BMP-7 über 48 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, $**=p<0,01$)	45
Abbildung 31: rtPCR auf ZO-1 nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta1 und BMP-7 über 24 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, $***=p<0,001$)	46

Abbildung 32: rtPCR auf E-Cadherin nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta1 und BMP-7 über 24 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, ***=p<0,001)	46
Abbildung 33: rtPCR auf alpha-SMA nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta1 und BMP-7 über 24 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, ***=p<0,001)	46
Abbildung 34: rtPCR auf FSP-1 nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta1 und BMP-7 über 24 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, *=p<0,05)	47
Abbildung 35: Western Blot auf pSmad2 mit densitometrischer Auswertung nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta1 und BMP-7 über 36 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, *=p<0,05)	47
Abbildung 36: FACS-Analyse auf Annexin-V nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TNF-alpha und BMP-7 über 48 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, *=p<0,05)	48
Abbildung 37: Doppelimmunfluoreszenz auf BMP-5 mit AQP-1, -2 und Calbindin-D28k in der Normalniere (Pfeil: distale Tubulusabschnitte, Dreieck: proximale Tubulusabschnitte)	49
Abbildung 38: Immunhistochemie auf BMP-5 in der Normalniere und bei der hypertensiven Nephropathie	50
Abbildung 39: rtPCR auf BMP-5 nach Stimulation von HK-2-Zellen mit AT-2 über 12 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, **=p<0,01)	51
Abbildung 40: rtPCR auf BMP-5 nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TNF-alpha über 12 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, **=p<0,01)	52
Abbildung 41: rtPCR auf BMP-5 nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta1 über 12 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, ***=p<0,001)	52
Abbildung 42: Hämatoxylinfärbung nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta1 und BMP-5 über 48 Stunden	53
Abbildung 43: Immunfluoreszenz auf ZO-1 mit Schwellenwertanalyse nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta1 und BMP-5 über 48 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, *=p<0,05)	54

Abbildung 44: Immunfluoreszenz auf alpha-SMA mit Schwellenwertanalyse nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta1 und BMP-5 über 48 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, ***= $p < 0,001$)	54
Abbildung 45: Immunfluoreszenz auf Vimentin mit Schwellenwertanalyse nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta1 und BMP-5 über 48 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, *= $p < 0,05$)	55
Abbildung 46: Immunfluoreszenz auf Kollagen Typ1 mit Schwellenwertanalyse nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta1 und BMP-5 über 48 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, **= $p < 0,01$)	55
Abbildung 47: Immunfluoreszenz auf FSP-1 mit Schwellenwertanalyse nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta1 und BMP-5 über 48 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, *= $p < 0,05$)	56
Abbildung 48: rtPCR auf E-Cadherin nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta1 und BMP-5 über 24 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, **= $p < 0,01$)	57
Abbildung 49: rtPCR auf alpha-SMA nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta1 und BMP-5 über 24 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, **= $p < 0,01$)	57
Abbildung 50: rtPCR auf FSP-1 nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TGF-beta1 und BMP-5 über 24 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, *= $p < 0,05$)	57
Abbildung 51: FACS-Analyse auf Annexin-V nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TNF-alpha und BMP-5 über 48 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, *= $p < 0,05$)	58
Abbildung 52: rtPCR auf MCP-1 nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TNF-alpha und BMP-5 über 24 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, *= $p < 0,05$)	59
Abbildung 53: rtPCR auf Rantes nach Stimulation von HK-2-Zellen mit TNF-alpha und BMP-5 über 24 Stunden (Mittelwert, Standardabweichung, *= $p < 0,05$)	59

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verwendete Antikörper für die Immunfluoreszenz in humanen Gewebeproben	24
Tabelle 2:	Verwendete Antikörper für die Immunhistochemie in humanen Gewebeproben	25
Tabelle 3:	Verwendete Antikörper für die Immunfluoreszenz <i>in vitro</i>	26
Tabelle 4:	Auflistung der Stimulationen von HK-2-Zellen für die rtPCR	27
Tabelle 5:	Verwendete Primer für die rtPCR	29
Tabelle 6:	Verwendete Antikörper für den Western Blot	32

7. Literaturverzeichnis

Bataller R, Brenner DA (2005): Liver fibrosis. *J Clin Invest* 115, 209-218.

Bechtel W, Zeisberg M (2009): Bone Morphogenic Protein-7 (BMP7) and the kidneys: insights into the future anagement of chronic kidney diseases. *Dtsch Med Wochenschr* 134, 1688-1691.

Beck HN, Drahushuk K, Jacoby DB, Higgins D, Lein PJ (2001): Bone morphogenetic protein-5 (BMP-5) promotes dendritic growth in cultured sympathetic neurons. *BMC Neurosci* 2, 12.

Bhardwaj A, Sethi G, Vadhan-Raj S, Bueso-Ramos C, Takada Y, Gaur U, Nair AS, Shishodia S, Aggarwal BB (2007): Resveratrol inhibits proliferation, induces apoptosis, and overcomes chemoresistance through down-regulation of STAT3 and nuclear factor-kappaB-regulated antiapoptotic and cell survival gene products in human multiple myeloma cells. *Blood* 109, 2293-2302.

Biyikli NK, Tugtepe H, Cakalagaoglu F, Ilki A, Alpay H (2005): Downregulation of the expression of bone morphogenetic protein 7 in experimental pyelonephritis. *Pediatr Nephrol* 20, 1230-1236.

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.

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

Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.

Bramlage CP, Müller GA (2010): Bone Morphogenetic Protein-7 (BMP-7). *Der Nephrologe* 6, 528-530.

Bramlage CP, Tampe B, Koziolk M, Maatouk I, Bevanda J, Bramlage P, Ahrens K, Lange K, Schmid H, Cohen CD, Kretzler M, Müller GA (2010): Bone Morphogenetic Protein (BMP)-7 expression is decreased in human hypertensive nephrosclerosis. *BMC Nephrol* 11, 31.

Bramlage CP, Müller GA, Tampe B, Bevanda J, Maatouk I, Koziolk M, Lange K, Ahrens K, Schmid H, Cohen CD, Bramlage P, Kretzler M, Strutz F (2011): The role of bone morphogenetic protein-5 (BMP-5) in human nephrosclerosis. *J Nephrol* 24, 647-655.

Burns WC, Velkoska E, Dean R, Burrell LM, Thomas MC (2010): Angiotensin II mediates epithelial-to-mesenchymal transformation in tubular cells by ANG 1-7/MAS-1-dependent pathways. *Am J Physiol Renal Physiol* 299, 585-593.

Celeste AJ, Iannazzi JA, Taylor RC, Hewick RM, Rosen V, Wang EA, Wozney JM (1990): Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci* 87, 9843-9847.

Chien A, Edgar DB, and Trela JM (1976): Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* 127, 1550-1557.

Chomczynski P, Sacchi N (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159.

Chuang MJ, Sun KH, Tang SJ, Deng MW, Wu YH, Sung JS, Cha TL, Sun GH (2008): Tumor-derived tumor necrosis factor-alpha promotes progression and epithelial-mesenchymal transition in renal cell carcinoma cells. *Cancer Sci* 99, 905-913.

Cui X, Zhou J, Qiu J, Johnson MR, Mrug M (2009): Validation of endogenous internal real-time PCR controls in renal tissues. *Am J Nephrol* 30, 413-417.

Dai Q, Xu M, Yao M, Sun B (2007): Angiotensin AT1 receptor antagonists exert anti-inflammatory effects in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 152, 1042-1048.

Derynck R, Gelbart WM, Harland RM, Heldin CH, Kern SE, Massagué J, Melton DA, Mlodzik M, Padgett RW, Roberts AB, Smith J, Thomsen GH, Vogelstein B, Wang XF (1996): Nomenclature: vertebrate mediators of TGFbeta family signals. *Cell* 87, 173.

Donnahoo KK, Meng X, Ayala A, Cain MP, Harken AH, Meldrum DR (1999): Early kidney TNF-alpha expression mediates neutrophil infiltration and injury after renal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 277, 922-929.

Ducy P, Karsenty G (2000): The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney Int* 57, 2207-2214.

Dudas PL, Argentieri RL, Farrell FX (2009): BMP-7 fails to attenuate TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition in human proximal tubule epithelial cells. *Nephrol Dial Transplant* 24, 1406-1416.

Dudley AT, Robertson EJ (1997): Overlapping expression domains of bone morphogenetic protein family members potentially account for limited tissue defects in BMP7 deficient embryos. *Dev Dyn* 208, 349-362.

Dudley AT, Lyons KM, Robertson EJ (1995): A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes Dev* 9, 2795-807.

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

Eknoyan G, Lameire N, Barsoum R, Eckardt KU, Levin A, Levin N, Locatelli F, MacLeod A, Vanholder R, Walker R, Wang H (2004): The burden of kidney disease: improving global outcomes. *Kidney Int* 66, 1310-1314.

Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S (1998): A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50.

Floege J, Grone HJ (1995): Progression of renal failure: what is the role of cytokines? *Nephrol Dial Transplant* 10, 1575-1586.

Frei U, Schober-Halstenberg HJ (2008): Nierenersatztherapie in Deutschland, Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2006/2007, QUASI Niere.

Godin RE, Robertson EJ, Dudley AT (1999): Role of BMP family members during kidney development. *Int J Dev Biol* 43, 405-411.

Gould SE, Day M, Jones SS, Dorai H (2002): BMP-7 regulates chemokine, cytokine, and hemodynamic gene expression in proximal tubule cells. *Kidney Int* 61, 51-60.

Guijarro C, Egido J (2001): Transcription factor-kappa B (NF-kappa B) and renal disease. *Kidney Int* 59, 415-424.

Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P (1997): TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390, 465-471.

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R (1992): Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 10, 413-417.

Hogan BL (1996): Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev* 6, 432-438.

Holdsworth SR, Summers SA (2008): Role of mast cells in progressive renal diseases. *J Am Soc Nephrol* 19, 2254-2261.

Hsu CY, Iribarren C, McCulloch CE, Darbinian J, Go AS (2009): Risk factors for end-stage renal disease: 25-year follow-up. *Arch Intern Med* 169, 342-350.

Hugo C (2003): The thrombospondin 1-TGF-beta axis in fibrotic renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 18, 1241-1245.

Jaroszewski L, Rychlewski L, Li Z, Li W, Godzik A (2005): FFAS03: a server for profile-profile sequence alignments. *Nucleic Acids Res* 33, 284-288.

John R, Nelson PJ (2007): Dendritic cells in the kidney. *J Am Soc Nephrol* 18, 2628-2635.

Johnsen IK, Kappler R, Auernhammer CJ, Beuschlein F (2009): Bone morphogenetic proteins 2 and 5 are down-regulated in adrenocortical carcinoma and modulate adrenal cell proliferation and steroidogenesis. *Cancer Res* 69, 5784-5792.

Johnson RJ, Alpers CE, Yoshimura A, Lombardi D, Pritzl P, Floege J, Schwartz SM (1992): Renal injury from angiotensin II-mediated hypertension. *Hypertension* 19, 464-474.

Jones CL, Buch S, Post M, McCulloch L, Liu E, Eddy AA (1992): Renal extracellular matrix accumulation in acute puromycin aminonucleoside nephrosis in rats. *Am J Pathol* 141, 1381-1396.

Juncos LA, Garvin J, Carretero OA und Ito S (1995): Flow modulates myogenic responses in isolated microperfused rabbit afferent arterioles via endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest* 95, 2741-2748.

Kagami S, Border WA, Miller DE, Noble NA (1994): Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor-beta expression in rat glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 93, 2431-2437.

Kalluri R, Weinberg RA (2009): The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119, 1420-1428.

Kangsamaksin T, Morris RJ (2011): Bone morphogenetic protein 5 regulates the number of keratinocyte stem cells from the skin of mice. *J Invest Dermatol* 131, 580-585.

Kazama I, Mahoney Z, Miner JH, Graf D, Economides AN, Kreidberg JA (2008): Podocyte-derived BMP7 is critical for nephron development. *J Am Soc Nephrol* 19, 2181-2191.

Khan SB, Cook HT, Bhangal G, Smith J, Tam FW, Pusey CD (2005): Antibody blockade of TNF-alpha reduces inflammation and scarring in experimental crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int* 67, 1812-1820.

King JA, Marker PC, Seung KJ, Kingsley DM (1994): BMP5 and the molecular, skeletal, and soft-tissue alterations in short ear mice. *Dev Biol* 166, 112-122.

Kingsley DM, Bland AE, Grubber JM, Marker PC, Russell LB, Copeland NG, Jenkins NA (1992): The mouse short ear skeletal morphogenesis locus is associated with defects in a bone morphogenetic member of the TGF beta superfamily. *Cell* 71, 399-410.

Kitten AM, Kreisberg JI, Olson MS (1999): Expression of osteogenic protein-1 mRNA in cultured kidney cells. *J Cell Physiol* 181, 410-415.

Klahr S (2003): The bone morphogenetic proteins (BMPs). Their role in renal fibrosis and renal function. *J Nephrol* 16, 179-185.

Klahr S, Morrissey J (1998): Angiotensin II and gene expression in the kidney. *Am J Kidney Dis* 31, 171-176.

Kondo S, Kagami S, Kido H, Strutz F, Muller GA und Kuroda Y (2001): Role of mast cell tryptase in renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 12, 1668-76.

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

Krensky AM, Ahn YT (2007): Mechanisms of disease: regulation of RANTES (CCL5) in renal disease. *Nat Clin Pract Nephrol* 3, 164-170.

Kuncio GS, Neilson EG, Haverly T (1991): Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *Kidney Int* 39, 550-556.

Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lange-Sperandio B, Trautmann A, Eickelberg O, Jayachandran A, Oberle S, Schmidutz F, Rodenbeck B, Hömme M, Horuk R, Schaefer F (2007): Leukocytes induce epithelial to mesenchymal transition after unilateral ureteral obstruction in neonatal mice. *Am J Pathol* 171, 861-871.

Lee SB, Kalluri R (2010): Mechanistic connection between inflammation and fibrosis. *Kidney Int* 119, 22-26.

Leonard EJ, Yoshimura T (1990): Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Immunol Today* 11, 97-101.

Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC (1998): Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 396, 580-584.

Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F (1993): GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 260, 1130-1132.

Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X (1997): DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89, 175-184.

Luo G, Hofmann C, Bronckers AL, Sohocki M, Bradley A, Karsenty G (1995): BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes Dev* 9, 2808-2820.

Luster AD (1998): Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 338, 436-45.

Maric I, Poljak L, Zoricic S, Bobinac D, Bosukonda D, Sampath KT, Vukicevic S (2003): Bone morphogenetic protein-7 reduces the severity of colon tissue damage and accelerates the healing of inflammatory bowel disease in rats. *J Cell Physiol* 196, 258-264.

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

Massagué J (1992): Receptors for the TGF-beta family. *Cell* 69, 1067-1070.

Meno C, Saijoh Y, Fujii H, Ikeda M, Yokoyama T, Yokoyama M, Toyoda Y, Hamada H (1996): Left-right asymmetric expression of the TGF beta-family member lefty in mouse embryos. *Nature* 381, 151-155.

- Mitu G, Hirschberg R (2008): Bone morphogenetic protein-7 (BMP7) in chronic kidney disease. *Front Biosci* 13, 4726-4739.
- Moses HL, Yang EY, Pietenpol JA (1990): TGF-beta stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights. *Cell* 63, 245-247.
- Motazed R, Colville-Nash P, Kwan JT, Dockrell ME (2008): BMP-7 and proximal tubule epithelial cells: activation of multiple signaling pathways reveals a novel anti-fibrotic mechanism. *Pharm Res* 25, 2440-2446.
- Müller GA, Markovic-Lipkovski J, Frank J und Rodemann HP (1992): The role of interstitial cells in the progression of renal diseases. *J Am Soc Nephrol* 2, 198-205.
- Mullis KB, Faloona FA (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155, 335-350.
- Nelson PJ, Kim HT, Manning WC, Goralski TJ, Krensky AM (1993): Genomic organization and transcriptional regulation of the RANTES chemokine gene. *J Immunol* 151, 2601-2612.
- Ng YY, Huang TP, Yang WC, Chen ZP, Yang AH, Mu W, Nikolic-Paterson DJ, Atkins RC, Lan HY (1998): Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in progressive tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats. *Kidney Int* 54, 864-876.
- Norton JD (2000): ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis. *J Cell Sci* 113, 3897-3905.
- Orth K, Chinnaiyan AM, Garg M, Froelich CJ, Dixit VM (1996): The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A. *J Biol Chem* 271, 16443-16446.
- Oxburgh L, Dudley AT, Godin RE, Koonce CH, Islam A, Anderson DC, Bikoff EK, Robertson EJ (2005): BMP4 substitutes for loss of BMP7 during kidney development. *Dev Biol* 286, 637-46.
- Ozkaynak E, Rueger DC, Drier EA, Corbett C, Ridge RJ, Sampath TK und Oppermann H (1990): OP-1 cDNA encodes an osteogenic protein in the TGF-beta family. *EMBO J* 9, 2085-2093.
- Ozkaynak E, Schnegelsberg PN, Oppermann H (1991): Murine osteogenic protein (OP-1): high levels of mRNA in kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 179, 116-123.

Ozkaynak E, Schnegelsberg PN, Jin DF, Clifford GM, Warren FD, Drier EA, Oppermann H (1992): Osteogenic protein-2. A new member of the transforming growth factor-beta superfamily expressed early in embryogenesis. *J Biol Chem* 267, 25220-25227.

Panzer U, Steinmetz OM, Stahl RA, Wolf G (2006): Kidney diseases and chemokines. *Current Drug Targets* 54, 1570-1580.

Peters H, Border WA, Noble NA (1998): Targeting TGF-beta overexpression in renal disease: maximizing the antifibrotic action of angiotensin II blockade. *Kidney Int* 54, 1570-1580.

Piscione TD, Yager TD, Gupta IR, Grinfeld B, Pei Y, Attisano L, Wrana JL, Rosenblum ND (1997): BMP-2 and OP-1 exert direct and opposite effects on renal branching morphogenesis. *Am J Physiol* 273, 961-975.

Radonic A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A (2004): Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 313, 856-862.

Riccioni G, Vitulano N, Zanasi A, Bellocchi F und d'Orazio N (2010): Aliskiren: beyond blood pressure reduction. *Expert Opin Investig Drugs* 19, 1265-1274.

Rollins BJ, Walz A, Baggiolini M (1991): Recombinant human MCP-1/JE induces chemotaxis, calcium flux, and the respiratory burst in human monocytes. *Blood* 78, 1112-1116.

Rovin BH, Dickerson JA, Tan LC, Hebert CA (1995): Activation of nuclear factor-kappa B correlates with MCP-1 expression by human mesangial cells. *Kidney Int* 48, 1263-1271.

Rudnicki M, Eder S, Perco P, Enrich J, Scheiber K, Koppelstätter C, Schratzberger G, Mayer B, Oberbauer R, Meyer TW, Mayer G (2007): Gene expression profiles of human proximal tubular epithelial cells in proteinuric nephropathies. *Kidney Int* 71, 325-335.

Ruiz-Ortega M und Egido J (1997): Angiotensin II modulates cell growth-related events and synthesis of matrix proteins in renal interstitial fibroblasts. *Kidney Int* 52, 1497-1510.

Ruiz-Ortega M, Rupérez M, Esteban V, Rodríguez-Vita J, Sánchez-López E, Carvajal G, Egido J (2006): Angiotensin II: a key factor in the inflammatory and fibrotic response in kidney diseases. *Nephrol Dial Transplant* 21, 16-20.

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

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.

Sampath TK, Maliakal JC, Hauschka PV, Jones WK, Sasak H, Tucker RF, White KH, Coughlin JE, Tucker MM, Pang RH, Corbett C, Özkaynak E, Oppermann H, Rueger DC (1992): Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation *in vivo* with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation *in vitro*. *J Biol Chem* 267, 20352-20362.

Schaefer L, Macakova K, Raslik I, Micegova M, Gröne HJ, Schönherr E, Robenek H, Echtermeyer FG, Grässel S, Bruckner P, Schaefer RM, Iozzo RV, Kresse H (2002): Absence of decorin adversely influences tubulointerstitial fibrosis of the obstructed kidney by enhanced apoptosis and increased inflammatory reaction. *Am J Pathol* 160, 1181-1191.

Schall TJ, Bacon K, Toy KJ, Goeddel DV (1990): Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* 347, 669-671.

Sean Eardley K, Cockwell P (2005): Macrophages and progressive tubulointerstitial disease. *Kidney Int* 68, 437-455.

Seegerer S, Nelson PJ, Schlöndorff D (2000): Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *J Am Soc Nephrol* 11, 152-176.

Sikder HA, Devlin MK, Dunlap S, Ryu B, and Alani RM (2003): Id proteins in cell growth and tumorigenesis. *Cancer Cell* 3, 525-530.

Simon M, Maresh JG, Harris SE, Hernandez JD, Arar M, Olson MS, Abboud HE (1999): Expression of bone morphogenetic protein-7 mRNA in normal and ischemic adult rat kidney. *Am J Physiol* 276, 382-389.

Sironi L, Nobili E, Gianella A, Gelosa P, Tremoli E (2005): Anti-inflammatory properties of drugs acting on the renin-angiotensin system. *Drugs Today* 41, 609-622.

Solloway MJ, Robertson EJ (1999): Early embryonic lethality in Bmp5;Bmp7 double mutant mice suggests functional redundancy within the 60A subgroup. *Development* 126, 1753-1768.

Sterzel RB, Hartner A, Hilgers KF, Bressan GM (2001): Contribution of the mesangium to elastic strength and anchorage of the glomerular capillary tuft. *Contrib Nephrol* 131, 132-141.

Stewart RJ, Marsden PA (1995): Biologic control of the tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling cascade. *Am J Kidney Dis* 25, 954-966.

Strutz F, Müller GA (1999): Interstitial pathomechanisms underlying progressive tubulointerstitial damage. *Kidney Blood Press Res* 22, 71-80.

Strutz F, Neilson EG (1994): The role of lymphocytes in the progression of interstitial disease. *Kidney Int Suppl* 45, S106-10.

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

Strutz F, Okada H, Lo CW, Danoff T, Carone RL, Tomaszewski JE, Neilson EG (1995): Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J Cell Biol* 130, 393-405.

Strutz F, Zeisberg M, Renziehausen A, Raschke B, Becker V, van Kooten C, Müller G (2001): TGF-beta 1 induces proliferation in human renal fibroblasts via induction of basic fibroblast growth factor (FGF-2). *Kidney Int* 59, 579-592.

Strutz F, Zeisberg M, Ziyadeh FN, Yang CQ, Kalluri R, Müller GA, Neilson EG (2002): Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. *Kidney Int* 61, 1714-1728.

Sugimoto H, Grahovac G, Zeisberg M, Kalluri R (2007): Renal fibrosis and glomerulosclerosis in a new mouse model of diabetic nephropathy and its regression by bone morphogenic protein-7 and advanced glycation end product inhibitors. *Diabetes* 56, 1825-1833.

Takahashi A, Alnemri ES, Lazebnik YA, Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Moir RD, Goldman RD, Poirier GG, Kaufmann SH, Earnshaw WC (1996): Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: multiple interleukin 1 beta-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis. *Proc Natl Acad Sci* 93, 8395-8400.

Tamaki K, Souchelnytskyi S, Itoh S, Nakao A, Sampath K, Heldin CH, ten Dijke P (1998): Intracellular signaling of osteogenic protein-1 through Smad5 activation. *J Cell Physiol* 177, 355-363.

Thiery JP (2002): Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2, 442-454.

Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA (2009): Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871-890.

Thornberry NA, Lazebnik Y (1998): Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316.

Thrasos Therapeutics, 2000 Peel Street, Montreal, Kanada: www.thrasos.com. Abrufdatum 2011.

Tian Q, Miyazaki R, Ichiki T, Imayama I, Inanaga K, Ohtsubo H, Yano K, Takeda K, Sunagawa K (2009): Inhibition of tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-6 expression by telmisartan through cross-talk of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma with nuclear factor kappaB and CCAAT/enhancer-binding protein-beta. *Hypertension* 53, 798-804.

Turgut F, Balogun RA, Abdel-Rahman EM (2010): Renin-angiotensin-aldosterone system blockade effects on the kidney in the elderly: benefits and limitations. *Clin J Am Soc Nephrol* 5, 1330-1339.

Urist MR (1965): Bone: formation by autoinduction. *Science* 150, 893-899.

Urist MR, DeLange RJ und Finerman GA (1983): Bone cell differentiation and growth factors. *Science* 220, 680-686.

Veerasamy M, Nguyen TQ, Motazed R, Pearson AL, Goldschmeding R, Dockrell ME (2009): Differential regulation of E-cadherin and alpha-smooth muscle actin by BMP 7 in human renal proximal tubule epithelial cells and its implication in renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 297, 1238-1248.

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C (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.

Vielhauer V, Berning E, Eis V, Kretzler M, Segerer S, Strutz F, Horuk R, Gröne HJ, Schlöndorff D, Anders HJ (2004): CCR1 blockade reduces interstitial inflammation and fibrosis in mice with glomerulosclerosis and nephrotic syndrome. *Kidney Int* 66, 2264-2278.

Vukicevic S, Basic V, Rogic D, Basic N, Shih MS, Shepard A, Jin D, Dattatreya Murty B, Jones W, Dorai H, Ryan S, Griffiths D, Maliakal J, Jelic M, Pastorcic M, Stavljenic A, Sampath TK (1998): Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) reduces severity of injury after ischemic acute renal failure in rat. *J Clin Invest* 102, 202-214.

Wang S, Chen Q, Simon TC, Strebeck F, Chaudhary L, Morrissey J, Liapis H, Klahr S, Hruska KA (2003): Bone morphogenetic protein-7 (BMP-7), a novel therapy for diabetic nephropathy. *Kidney Int* 63, 2037-2049.

Wang SN, LaPage J, Hirschberg R (2001): Loss of tubular bone morphogenetic protein-7 in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 12, 2392–2399.

Wardle EN (1993): Cytokines: an overview. *Eur J Med* 2, 417-423.

Wetzel P, Haag J, Câmpean V, Goldschmeding R, Atalla A, Amann K, Aigner T (2006): Bone morphogenetic protein-7 expression and activity in the human adult normal kidney is predominantly localized to the distal nephron. *Kidney Int* 70, 717-723.

Wiederkehr M, Toto R, Fenves AZ und Ram CV (2005): Hypertension and the kidney. *Semin Nephrol* 25, 236-45.

Wittwer CT, Hermann MG, Moss AA, Rasmussen RP (1997): Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22, 130-131.

Wolf G, Ritz E (2005): Combination therapy with ACE inhibitors and angiotensin II receptor blockers to halt progression of chronic renal disease: pathophysiology and indications. *Kidney Int* 67, 799-812.

Wolf G, Kalluri R, Ziyadeh FN, Neilson EG und Stahl RA (1999): Angiotensin II induces alpha3(IV) collagen expression in cultured murine proximal tubular cells. *Proc Assoc Am Physicians* 111, 357-364.

Xu Y, Wan J, Jiang D, Wu X (2009): BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition in human renal proximal tubular epithelial cells. *J Nephrol* 22, 403-410.

Yanagita M (2007): Balance between bone morphogenetic proteins and their antagonists in kidney injury. *Ther Apher Dial* 1, 38-43.

Yang J, Weinberg RA (2008): Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell* 14, 818-829.

Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA (2004): Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117, 927-939.

Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, Chandraker A, Yuan X, Pu WT, Roberts AB, Neilson EG, Sayegh MH, Izumo S, Kalluri R (2007): Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med* 13, 952-61.

Zeisberg M (2006): Bone morphogenic protein-7 and the kidney: current concepts and open questions. *Nephrol Dial Transplant* 21, 568-573.

Zeisberg M, Duffield JS (2010): Resolved: EMT produces fibroblasts in the kidney. *J Am Soc Nephrol* 21, 1247-1253.

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

Zeisberg M, Kalluri R (2004b): Experimental strategies to reverse chronic renal disease. *Blood Purif* 22, 440-445.

Zeisberg M, Neilson EG (2009): Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest* 119, 1429-1437.

Zeisberg M, Neilson EG (2010): Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 21, 1819-1834.

Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, Mammoto T, Charytan D, Strutz F, Kalluri R (2003): BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med* 9, 964-968.

Zeisberg M, Müller GA, Kalluri R (2004): Are there endogenous molecules that protect kidneys from injury? The case for bone morphogenic protein-7 (BMP-7). *Nephrol Dial Transplant* 19, 759-761.

Zeisberg M, Shah AA, Kalluri R (2005): Bone morphogenic protein-7 induces mesenchymal to epithelial transition in adult renal fibroblasts and facilitates regeneration of injured kidney. *J Biol Chem* 280, 8094-8100.

Zhao GQ (2003): Consequences of knocking out BMP signaling in the mouse. *Genesis* 35, 43-56.

Zhong J, Guo D, Chen CB, Wang W, Schuster M, Loibner H, Penninger JM, Scholey JW, Kassiri Z, Oudit GY (2010): Prevention of Angiotensin II-Mediated Renal Oxidative Stress, Inflammation, and Fibrosis by Angiotensin-Converting Enzyme 2. *Hypertension* 57, 314-322.

Zhou X, Sasaki H, Lowe L, Hogan BL, Kuehn MR (1993): Nodal is a novel TGF-beta-like gene expressed in the mouse node during gastrulation. *Nature* 361, 543-547.

Zoja C, Donadelli R, Colleoni S, Figliuzzi M, Bonazzola S, Morigi M, Remuzzi G (1998): Protein overload stimulates RANTES production by proximal tubular cells depending on NF-kappa B activation. *Kidney Int* 53, 1608-1615.

Zuk A, Matlin KS, Hay ED (1989): Type I collagen gel induces Madin-Darby canine kidney cells to become fusiform in shape and lose apical-basal polarity. *J Cell Biol* 108, 903-919.

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. F. Strutz für die intensive und konstante Betreuung meiner Promotion und das Erlangen methodischer Kenntnisse im experimentellen Arbeiten. Des Weiteren bedanke ich mich für die Herstellung des Kontaktes zu Herrn Prof. Dr. med. M. Zeisberg, welcher mir zwei Forschungsaufenthalte ermöglichte und Grundlage für mein zukünftiges wissenschaftliches Arbeiten ist.

Des Weiteren gilt der Dank meinem Betreuer Dr. med. C. Bramlage für die Überlassung des Themas. Er stand mir mit Rat und Tat zu jeder Tages- und Nachtzeit zur Seite und hat mein wissenschaftliches Denken und Arbeiten wesentlich geprägt.

Herrn Prof. Dr. med. G. A. Müller danke ich für die Möglichkeit, in seiner Abteilung Nephrologie und Rheumatologie zu promovieren und heute unter seiner Führung ärztlich wie auch wissenschaftlich tätig zu sein.

Den medizinisch-technischen Assistentinnen Christina Stanischa, Anika Krüger und Gabi Wolf danke ich für die gute Einarbeitung und die stetige Hilfe bei den Experimenten auch außerhalb ihrer Arbeitszeiten.

Meinen Eltern Werner und Larissa Tampe danke ich für die Unterstützung und die liebevolle Begleitung während meines Studiums und für die manchmal strengen Korrekturarbeiten an meiner Promotion.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meiner Ehefrau Dr. med. Désirée Tampe, welche mir immer verständnisvoll zur Seite stand und mit mir Höhen und Tiefen bewältigte. Nur diese Unterstützung und so manch ein Opfer machte es möglich, meine Promotion in dieser Form und in diesem Umfang abzuschließen. Heute verbinden uns hierdurch auch berufliche Interessen, so dass wir täglich sowohl klinisch wie auch wissenschaftlich Seite an Seite als Kollegen arbeiten.