

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

---

**Proteomische Analyse eines in-vitro-Modells für die interstitielle renale  
Fibrose: Der osmotische Stress als Fibrose-triggernder Faktor**

**INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades**

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

**vorgelegt von  
Loubna Lahrichi  
aus  
Casablanca/Marokko**

**Göttingen 2011**

**Dekan:**

**Prof. Dr. C. Frömmel**

**I. Berichterstatter:**

**Prof. Dr. rer. nat. H. Dihazi**

**II. Berichterstatter/in:**

**Prof. Dr. H. Urlaub**

**III. Berichterstatter/in:**

**Prof. Dr. med. M. Oppermann**

**Tag der mündlichen Prüfung:**

**07. August 2012**

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>6</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>7</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>8</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>10</b>
1.1 Die Organfibrose .....	10
1.2 Die renale Fibrose und ihre Mechanismen.....	11
1.2.1 Die zelluläre Aktivations- und Schädigungsphase .....	11
1.2.2 Die fibrogene Signalphase .....	12
1.2.3 Die fibrogene Phase .....	14
1.2.3.1 Die Matrixakkumulation .....	14
1.2.3.2 Hemmung des Matrixabbaus.....	15
1.2.4 Die destruktive Phase .....	16
1.3 Endogene antifibrotische Faktoren und therapeutische Strategien bei der Nierenfibrose.....	17
1.4 Rolle des Stressses in der Entwicklung der renalen Fibrose .....	19
1.5 Das Fehlen an Modellen für die Erforschung der renalen Fibrose .....	21
1.6 Rolle der Proteomikmethoden bei der Erforschung der Fibrosemechanismen	21
1.7 Fragestellung .....	22
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>24</b>
2.1 Material .....	24
2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Antikörper .....	24
2.1.2 Geräte .....	26
2.1.3 Verbrauchsmaterial.....	27
2.1.4 Wissenschaftliche Software .....	28
2.1.5 Biologisches Material .....	29
2.2 Methoden .....	29
2.2.1 Zellkultur .....	29
2.2.2 Trypsinisierung der Zellen.....	30
2.2.3 Gewinnung des Gesamtzelllysates .....	30
2.2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	31
2.3 Die zweidimensionale Gel-Elektrophorese.....	31
2.3.1 Die erste Dimension.....	32
2.3.1.1 Die Probenvorbereitung für die erste Dimension.....	32
2.3.1.2 Die isoelektrische Fokussierung der Proteine .....	32
2.3.2 Die zweite Dimension .....	33
2.3.2.1 Herstellung der SDS-PAGE.....	33
2.3.2.2 Äquilibrierung der Gelstreifen für die SDS-PAGE.....	34
2.3.2.3 Aufsetzen des IPG-Streifens auf das Polyacrylamidgel .....	34
2.3.3 Flamingo-Färbung.....	35
2.3.4 Digitalisierung der Gele.....	35
2.3.5 Übereinstimmung und Aufbereitung der Spots .....	35

2.4 Datenanalyse .....	36
2.5 Sequenzierung der exprimierten Proteine .....	37
2.5.1 Enzymatische Proteinspaltung im frischen Gel .....	37
2.5.2 Entsalzung der Proteinproben.....	38
2.5.3 Kristallisation der Messproben mit der Matrix .....	38
2.6 Die Massenspektrometrie .....	39
2.6.1 Übersicht über die verwendeten Techniken .....	39
2.6.2 Ionisierungsprinzip .....	39
2.6.2.1 Ionisierung mittels der MALDI-Technik.....	39
2.6.2.2 Ionisierung mittels der ESI-Technik.....	40
2.6.3 Prinzip der Massentrennung .....	41
2.6.3.1 Massentrennung mit dem TOF-Instrument.....	41
2.6.3.2 Massentrennung mit dem Quadrupol-Instrument .....	41
2.6.4 Sequenzierung der Proteine .....	42
2.6.5 Die Messung mit dem MALDI-TOF .....	43
2.6.6 Proteinidentifizierung durch Peptidmassenmuster-Zuordnung.....	43
2.6.7 Proteinidentifizierung mit Hilfe der Datenbanken .....	44
2.6.8 Elektrospray-Ionisation-Instrumente .....	44
2.7 Western-Blot-Analyse .....	45
2.7.1 Vorbereitung der Proben für die SDS-Elektrophorese .....	45
2.7.2 Vorbereitung der Minigele .....	46
2.7.3 SDS-PAGE-Elektrophorese .....	47
2.7.4 Tankblotting .....	47
2.7.5 Färbung der Membran mit der Ponceau-S-Lösung.....	48
2.7.6 Färbung der Gele mit der Coomassie-Blau-Lösung.....	48
2.7.7 Inkubation mit dem Antikörper .....	48
2.7.8 Auswertung der Western-Blot-Analysen .....	50
2.7.9 Behandlung der Blotmembranen für eine weitere Verwendung .....	50
2.8 Die indirekte Immunfluoreszenzfärbung.....	50
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>52</b>
3.1 TK173- und TK188-Zelllinien als in-vitro-Modelle für die interstitielle Fibrose .	52
3.2 Die proteomische Charakterisierung der TK173- und TK188-Zelllinien mit anschließender Identifizierung von Proteinmarkern für die Zelltransformation.....	53
3.2.1 Etablierung zweier dimensionaler Proteinprofile von TK173 und TK188 mittels zweidimensionaler Gel-Elektrophorese .....	53
3.2.2 Massenspektrometrische Analyse der tryptischen Spaltprodukte .....	54
3.2.2.1 Identifizierung der Proteine aus TK173- und TK188-Zellproteom... 54	
3.2.2.2 Identifizierung der unterschiedlich exprimierten Proteine zwischen TK173- und TK188-Zellen .....	63
3.2.3 Western-Blot-Analyse und Immunfluoreszenzfärbung: Bestätigung der Ergebnisse aus der 2D-Gel-Elektrophorese .....	66
3.3 Einfluss des osmotischen Stresses auf die Morphologie und das Proteom der TK173-Zellen .....	67
3.3.1 Analyse der morphologischen Veränderungen .....	68
3.3.2 Analyse der Proteomveränderungen der TK173 unter osmotischem Stress.....	68

3.3.3	Differentiell exprimierte Proteine unter osmotischem Stress.....	70
3.4	<i>Bestätigung der Ergebnisse aus der proteomischen Analyse mittels Western-Blot-Analysen und Immunfluoreszenzfärbung.....</i>	73
3.4.1	Einfluss des osmotischen Stresses auf die Zelltransformation und Expression der Fibrosemarker .....	73
3.4.2	Bestätigung der Ergebnisse mittels der Immunfluoreszenzfärbung .....	75
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>77</b>
4.1	<i>Die Proteomik als Analyseverfahren .....</i>	77
4.1.1	Rolle in der medizinischen Forschung .....	77
4.1.2	Möglichkeiten und Grenzen der 2D-Gel-Elektrophorese.....	77
4.2	<i>Das biologische Material .....</i>	79
4.2.1	Bedeutung der in-vitro-Modelle für das Erforschen des Pathomechanismus der renalen Fibrose .....	79
4.2.2	TK173/TK188 als in-vitro-Modell für die renale Fibrose .....	79
4.3	<i>Vergleichende Proteomanalyse der TK173/TK188, ein Weg zur Identifizierung der RIF-Schlüsselproteine.....</i>	80
4.3.1	Die Strukturproteine und ihre Rolle bei der renalen Fibrose .....	80
4.3.1.1	Die Rolle der ECM-Proteine Kollagen und Fibronectin in der renalen Fibrose .....	81
4.3.1.2	Zytoskelett-Proteine in der renalen Fibrose .....	82
4.3.2	Die Rolle der ER-Proteine und der Proteine des oxidativen Stresses in der renalen Fibrose.....	84
4.3.2.1	Die Aktivierung des ER-Stresses und die Hochregulierung der ER-Stressproteine sind wichtige Aspekte der renalen Zellaktivierung.....	84
4.3.2.2	Die HSP spielen eine wichtige Rolle bei der Zelltransformation während der renalen Fibrose.....	86
4.3.2.3	Die Glucose-regulierten Proteine .....	87
4.3.2.4	Calreticulin ist ein bedeutendes Protein für die Fibrose .....	88
4.3.2.5	Protein-Disulfid-Isomerase-Hochregulierung als Teil der Zellantwort auf die Zelltransformation während der renalen Fibrose .....	89
4.3.2.6	Proteine des oxidativen Stresses und ihre Rolle bei der Entwicklung der renalen Fibrose .....	90
4.3.3	Der osmotische Stress und seine Rolle bei der Entwicklung der renalen Fibrose .....	91
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>93</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>95</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: ECM-Gleichgewicht .....	16
Abbildung 2: Destruktive Phase in der Fibrose:.....	17
Abbildung 3: Prinzip des MALDI-Prozesses .....	40
Abbildung 4: Prinzip der ESI-Massenspektrometrie .....	41
Abbildung 5: TK173- und TK188-Zellen unter Standardbedingungen. ....	53
Abbildung 6: 2D-SDS-PAGE der Proteinextrakte aus TK173 (A) und TK188 (B).....	54
Abbildung 7: Differentiell exprimierte Proteine zwischen TK173 und TK188. ....	65
Abbildung 8: Western-Blot und Immunfluoreszenzfärbung für selektierte Proteine ..	67
Abbildung 9: Lichtmikroskopische Aufnahmen von TK173,TK173-NaCl u. TK188...	68
Abbildung 10: Effekt des osmotischen Stresses auf das TK173-Proteom.....	70
Abbildung 11: Quantitative Analyse der Proteomänderung unter osmotischem Stress. .....	71
Abbildung 12: Vergleichende Western-Blot-Analyse für selektierte Proteine .....	74
Abbildung 13: Immunfluoreszenzfärbung von ER-Stress-Proteinen und Fibronectin	76

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bradford-Pipettierschema .....	31
Tabelle 2: Protokoll der isoelektrischen Fokussierung.....	33
Tabelle 3: Zusammensetzung des 12%-Trenngels pH 8,8.....	34
Tabelle 4: MALDI-TOF- und Q-TOF-Einstellungen.....	42
Tabelle 5: Zusammensetzung des 10%-Trenngels pH 8,8.....	46
Tabelle 6: Zusammensetzung des 4%-Sammelgels pH 6,8.....	46
Tabelle 7: Protokoll der SDS-PAGE-Elektrophorese.....	47
Tabelle 8: Verdünnung der Primärantikörper.....	48
Tabelle 9: Verdünnung der Sekundärantikörper.....	49
Tabelle 10: Liste aller identifizierten Proteine aus TK173- und TK188-Proteom.....	56
Tabelle 11: Die unterschiedlich exprimierten Proteine zwischen TK188 und TK173	63
Tabelle 12: Proteine nach Funktion aufgelistet und in Kategorien klassifiziert. ....	65
Tabelle 13: Differentiell exprimierte Proteine unter NaCl-Stress.....	72

## Abkürzungsverzeichnis

ACE:	Angiotensin Converting Enzyme
ACN:	Acetonitril
ACTA:	Alpha Smooth Muscle Actin
ACTH:	Adrenocorticotropes Hormon
ANGII:	Angiotensin II
APS:	Ammoniumpersulfat
bFGF:	basic Fibroblast Growth Factor
BIP:	Binding Immunoglobulin Protein
BMP-7:	Bone Morphogenetic Protein 7
BSA:	Bovine Serum Albumin
CALR:	Calreticulin
CHAPS:	3-[(3-Cholamidopropyl)-Dimethylammonio]-1-Propansulfonat
CTGF:	Connective Tissue Growth Factor
DA:	Dalton
DAPI:	Diamidinophenylindol
dd H <sub>2</sub> O :	deionisiertes destilliertes H <sub>2</sub> O
D-DMEM:	D-Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DES:	Desmin
DHB:	Dihydroxybenzoesäure
DNA:	Deoxyribonucleic Acid
2D-PAGE:	Zweidimensionale Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
DTT:	Dithiothreitol
ECM:	Extrazelluläre Matrix
EDTA:	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EGF:	Epidermal Growth Factor
EMT/EndMT:	Epithelial/Endothelial-Mesenchymale Transition
ER:	Endoplasmatisches Retikulum
ERP:	Endoplasmic Reticulum Protein
ESI:	Elektrospray-Ionisation
FCS:	Foetal Calf Serum
FIN:	Fibronectin
GBM:	Glomeruläre Basalmembran
GRP:	Glucose Regulated Protein
HGF:	Hepatocyte Growth Factor
HSP:	Hitzeschockprotein
IEF:	Isoelektrische Fokussierung
IFN- $\gamma$ :	Interferon-Gamma
IGF-1:	Insulin-like Growth Factor 1
IL:	Interleukin
IPG:	Immobilisierter pH-Gradient
KRT:	Keratin
MALDI-TOF:	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight
MCP-1:	Monocyte Chemoattractant Protein 1
MIP-1 $\beta$ :	Macrophage Inflammatory Protein 1 beta
mRNA:	messenger Ribonucleic Acid
MS:	Massenspektrometrie
MSDB:	Mass Spectrometry Protein Sequence Data Base

m/z:	Masse/Ladung
NaCl:	Natriumchlorid
NCBI:	National Center for Biotechnology Information
p:	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAI-1:	Plasminogenaktivatorinhibitor 1
PARK:	Parkin Protein
PBS:	Phosphate Buffered Saline
PDGF:	Platelet Derived Growth Factor
PDGF-BB:	Platelet Derived Growth Factor-Chain B Homodimer
PDI:	Protein-Disulfid-Isomerase
pI:	Isoelektrischer Punkt
PMF:	Peptide Mass Fingerprint
PMSF:	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPARs:	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren
ppm:	parts per million
PRDX:	Peroxiredoxin
Q-TOF:	Quadrupole-Time Of Flight
RIF:	Renale Interstitielle Fibrose
ROS:	Reaktive Sauerstoffspezies
SAP:	Serum-Amyloid-Protein
SDS:	Sodiumdodecylsulfat
SMAD:	Small Mothers Against Decapentaplegic
SOD:	Superoxid-Dismutase
SPARC:	Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine
TCA:	Trichloressigsäure
TEMED:	Tetramethylethylendiamin
TFA:	Trifluoroacetic Acid
TGF- $\beta$ 1:	Transforming Growth Factor-Beta1
TK173:	nichtfibrotische Nierenfibroblasten
TK173-NaCl:	nichtfibrotische Nierenfibroblasten unter NaCl-Stress
TK173 Std:	nichtfibrotische Nierenfibroblasten unter Standardbedingungen
TK188:	fibrotische Nierenfibroblasten
TK188 Std:	fibrotische Nierenfibroblasten unter Standardbedingungen
TNF-alpha:	Tumornekrosefaktor-alpha
Tris:	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
UCHL:	Ubiquitin Carboxyl-terminal Hydrolase L
UPR:	Unfolded Protein Response
Urea:	Harnstoff
v/v:	volume/volume
VEGF:	Vascular Endothelial Growth Factor
VIM:	Vimentin
VIN:	Vinculin
w/v:	weight/volume

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Organfibrose

Die Fibrose ist durch übermäßiges Wachstum, Verhärtung und/oder Vernarbung des Gewebes definiert. Sie ist auf eine exzessive Akkumulation der extrazellulären Matrixkomponenten zurückzuführen (Hewitson 2009). Die Fibrose ist das Endergebnis von chronischen inflammatorischen Reaktionen, induziert durch unterschiedliche Stimuli wie persistente Infektionen, autoimmune Reaktionen, allergische Antworten, chemische Schädigung, Bestrahlung und Gewebeschädigung (Wynn 2008). In vitalen Organen wie Herz, Lunge, Leber oder Niere kann die Gewebeschädigung zur Entwicklung der progressiven Fibrose führen und mit einem endgültigen Organversagen enden (Franklin 1997). Während die pathogenetischen Mechanismen der Gewebsfibrose eine gewisse Organspezifität zeigen, bleibt als gemeinsame Eigenschaft dabei die exzessive Akkumulation der extrazellulären Matrix. Diese resultiert sowohl aus der vermehrten ECM (Extrazelluläre Matrix)-Synthese, hauptsächlich durch Myofibroblasten, als auch aus dem verminderten ECM-Abbau (Powell 2000, Liu 2006). Als primäre Kollagen-produzierende Zellen spielen die Myofibroblasten nach Aktivierung eine Schlüsselrolle bei der Fibrose. Diese Zellen entwickeln sich aus residenten Mesenchymzellen oder aus Epithel- und Endothelzellen bei der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) (Liu 2004a) bzw. endothelial-mesenchymalen Transition (EndMT) (Zeisberg EM et al. 2008) sowie aus zirkulierenden Fibroblast-like-Zellen, genannt Fibrozyten. Die Myofibroblasten werden durch unterschiedliche Mechanismen aktiviert, wie mechanischen Stress (Hinz 2010), parakrine Signale aus Lymphozyten und Makrophagen und autokrine Signale aus den Myofibroblasten selbst. Zudem konnten Zytokine (IL-13 (Interleukin 13), IL-21, TGF- $\beta$  1 (*transforming growth factor-beta* 1)), Chemokine (MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein* 1), MIP-1  $\beta$  (*macrophage inflammatory protein* 1 beta)), angiogene Faktoren (VEGF (*vascular endothelial growth factor*)), Wachstumsfaktoren (PDGF (*platelet derived growth factor*)), PPARs (Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren), akute Phase-Proteine (SAP (Serum-Amyloid-Protein)), Kaspasen und Komponenten des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (ANG II) als wichtige Regulatoren der Fibrose identifiziert werden (Wynn 2008).

Anhand der identifizierten Mechanismen der Fibrose werden Therapie-Optionen von fibrotischen Erkrankungen wie idiopathische Lungenfibrose, Leberzirrhose, systemische Sklerose, kardiovaskuläre Fibrose und progressive Nierenerkrankungen erforscht.

### **1.2 Die renale Fibrose und ihre Mechanismen**

Die renale Fibrose stellt den grundlegenden Pathomechanismus aller chronisch progressiven Nierenerkrankungen dar, führend zum terminalen Nierenversagen (Boor et al. 2007a). Es besteht eine enge Korrelation zwischen dem Grad der interstitiellen Fibrose und dem Verlust der Nierenfunktion. Der fortschreitende Verlust der Nierenfunktion ist wiederum eng mit einer gesteigerten Akkumulation extrazellulärer Matrixproteine im Nierengewebe assoziiert. Unterschiedliche Wachstumsfaktoren und vasoaktive Moleküle können die Fibrose induzieren. Andere zelluläre Ereignisse können indirekt zur Fibrose beitragen. Die pathophysiologischen Wege, wie sie in experimentellen Modellen erläutert wurden, können anhand einer Kaskade dargestellt werden, welche in vier Phasen eingeteilt wird (Eddy 2000):

- Die zelluläre Aktivations- und Schädigungsphase
- Die fibrogene Signalphase
- Die fibrogene Phase
- Die destruktive Phase.

#### **1.2.1 Die zelluläre Aktivations- und Schädigungsphase**

Bei dieser Phase produzieren die tubulären Zellen Moleküle, welche die interstitielle Inflammation verbreiten und direkt zur Fibrose führen. Dies stellt die Reaktion der tubulären Zellen auf die Exposition mit bioaktiven Molekülen und toxischen Radikalen während proteinurischer Phasen bei progressiven Nierenerkrankungen dar (Remuzzi und Bertani 1998, Abbate et al. 2006). Außerdem werden reaktiv vasoaktive Moleküle wie Endothelin I und Angiotensin II produziert, die zur Ischämie und infolgedessen zur Fibrose führen (Bruzzi et al. 1997, De Jesus et al. 2005). Histologisch infiltrieren Monozyten das Interstitium induziert durch die Produktion von chemotaktischen Faktoren wie das MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein 1*) (Wada et al. 2004) und Komplementproteine wie u.a. C5 (Boor et al. 2007b). Als Quelle einiger profibrotischer Moleküle tragen die Monozyten und Makrophagen zum

Fibrose-Prozess direkt bei (Nathan 1987, Abbate et al. 2006). Die Tubuli können direkt in die Fibrose involviert sein; während proteinurischer Phasen können profibrotische Wachstumsfaktoren wie IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*) und TGF- $\beta$  in den Urin infiltrieren und die Synthese der Matrixproteine stimulieren (Wang SN et al. 1999). Als Folge der Proteinurie oder anderer schädigender Stimuli können tubuläre Zellen außerdem fibrogene Peptide und de-novo-Proteine wie Hitzeschockproteine synthetisieren, welche Gewebsreaktionen auslösen und die interstitielle Schädigung verbreiten. Neben der Makrophageninfiltration und der Stimulation der Matrixproduktion erscheinen im Interstitium Myofibroblasten, die das Protein *alpha smooth muscle actin* exprimieren (Takeji et al. 2006). Diese Zellen sind mehr fibrotisch als residente interstitielle Fibroblasten. Es wurde gezeigt, dass das Vorhandensein dieser interstitiellen Myofibroblasten mit dem Risiko der Entwicklung progressiver Nierenerkrankungen korreliert (Alpers et al. 1994, Goumenos et al. 1994, Roberts et al. 1997, Qi et al. 2006). Außerdem wurden unterschiedliche Moleküle identifiziert, welche die Transformation der residenten Fibroblasten in Myofibroblasten induzieren und zur Akkumulation der extrazellulären Matrix führen (Abbate et al. 2006). Darunter TGF- $\beta$  (Fan et al. 1999) und PDGF-BB (*platelet derived growth factor-chain B homodimer*)(Tang et al. 1996).

### **1.2.2 Die fibrogene Signalphase**

In der frühen Phase der renalen Schädigung kann die Gewebsarchitektur durch Reparaturmechanismen wiederhergestellt werden. Später führt die persistierende Schädigung zur vermehrten Expression von Molekülen, die eine Matrixakkumulation nach sich ziehen. Diese Moleküle sind Signale der fibrogenen Phase. Der wichtigste Vertreter ist TGF- $\beta$  (Darby und Hewitson 2007, Verrecchia und Mauviel 2007). Drei Isoformen wurden identifiziert, obwohl TGF- $\beta$ 1 die Isoform ist, die am meisten bei der Nierenfibrose untersucht wurde. Zahlreiche Faktoren sind dafür bekannt, die TGF- $\beta$ -Produktion zu stimulieren, einschließlich ANG II, Endothelin-1, IGF-1, *atrial natriuretic factor*, *platelet-activating factor*, Glucose, Insulin, Thromboxane, einige Medikamente sowie die Scherspannung und Ischämie. TGF- $\beta$  kann auch seine eigene Expression induzieren (Jernigan und Eddy 2000). TGF- $\beta$  existiert als latenter Komplex, der, um seine biologische Wirkung zu entfalten, zuerst aktiviert werden muss. Nach Aktivierung und Bindung an den TGF- $\beta$ -Rezeptor werden intrazelluläre Kaskaden ausgelöst (Smad-abhängig, im Speziellen Smad 2 und Smad 3 (*small mothers*

*against decapentaplegic 2/3*) und Smad-unabhängig)(Derynck und Zhang 2003). Es resultieren Ereignisse, welche die Fibrose fördern, einschließlich Transformation von Fibroblasten in Myofibroblasten, Chemotaxis von Fibroblasten und Monozyten und gesteigerter Gentranskription von Matrixproteinen und Inhibitoren von Matrixabbauenden Enzymen. Die erhöhte Expression von TGF- $\beta$  ist eine Eigenschaft von praktisch allen menschlichen und experimentellen Modellen der Nierenfibrose. Zahlreiche Studien belegen die fibrogenen Effekte von TGF- $\beta$  auf die Niere in vitro. Zudem kommt die Beobachtung, dass transgene Mäuse, die TGF- $\beta$  überexprimieren, glomeruläre und interstitielle Fibrose entwickeln (Kopp et al. 1996, Clouthier et al. 1997, Liu 2006). Zu den Molekülen der fibrogenen Signalphase zählt neben TGF- $\beta$  das CTGF (*connective tissue growth factor*) (Qi et al. 2006). Dieses Protein induziert die Fibroblastenproliferation und die Matrixproteinsynthese (Sonnylal et al. 2010). Eine große klinische Relevanz besitzt dagegen ANGII aufgrund der bereits verfügbaren hemmenden Medikamente. Im Rahmen seiner fibrogenen Wirkung stimuliert ANGII die TGF- $\beta$ -Produktion durch verschiedene Mechanismen und induziert die Hochregulierung des TGF- $\beta$ -Rezeptors (Wolf 2006). Ferner wurde beobachtet, dass Angiotensin-defiziente Mäuse weniger Fibrose entwickeln (Fern et al. 1999, Hisada et al. 1999). In-vitro-Studien ergaben, dass ANGII direkte Effekte auf die Kollagenexpression haben kann (Sakai et al. 2008), zur Ischämie beiträgt und zur Verschlimmerung der Fibrose führen kann (Ruiz-Ortega und Egido 1997, Wolf et al. 1999). Ein anderer Vertreter der fibrogenen Signalmoleküle ist das Endothelin-1, dessen Produktion durch eine Reihe von Stimuli induziert wird. Dies geschieht zum Beispiel während proteinurischer Phasen als Reaktion der tubulären Zellen auf die Proteinexposition (Zoja et al. 1995, Richter 2006). Endothelin-1 hat vasokonstriktorische Eigenschaften, die zur renalen Ischämie führen. Zudem fördert es die Fibrose durch Erhöhung der TGF- $\beta$ -Expression, direkte Stimulierung der Matrixsynthese und Hemmung der Kollagenase-Aktivität (Tostes et al. 2002). Studien zeigten, dass transgene Mäuse, die Endothelin-1 überexprimieren, interstitielle Fibrose entwickeln (Hoche et al. 1997). Zahlreiche andere Wachstumsfaktoren und Zytokine haben profibrotische Effekte in vitro. PDGF-BB ist in die Fibrose impliziert durch seine Fähigkeit, Fibroblasten in Myofibroblasten zu transformieren (Yamate 2007). Dieser Effekt wurde nicht nur in vitro beobachtet, die Behandlung von Ratten mit Rekombinant-PDGF-BB löste nämlich das Auftreten von Myofibroblasten aus und führte zur interstitiellen Fibrose (Tang et al. 1996). Zudem wurde eine erhöhte

tubuläre Expression von PDGF-Rezeptor in experimentellen (Kliem et al. 1996) und humanen Fibrose-assoziierten Nierenerkrankungen (Gesualdo et al. 1994) beobachtet. Das PDGF-System gehört zu den bestcharakterisierten Wachstumsfaktorsystemen in der normalen und kranken Niere mit einer Schlüsselrolle in der Entwicklung der renalen Fibrose (Ostendorf et al. 2011). Spezifischer PDGF-Antagonismus erzielte in experimentellen Modellen verschiedener Nierenerkrankungen diverse antifibrotische Wirkungen (Floege et al. 2008). Ein weiterer fibrogener Faktor ist bFGF (*basic fibroblast growth factor*), das hauptsächlich die Freisetzung von latentem TGF- $\beta$  stimuliert. Unter den wichtigsten Zytokinen mit profibrotischen Effekten sind das TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor-alpha) (Khan et al. 2005) und das Interleukin 1 (Vesey et al. 2002) zu erwähnen, deren Effekte jeweils in einer wahrscheinlichen Stimulierung der TGF- $\beta$ -Produktion und einer Induktion der Fibroblastenproliferation bestehen.

### **1.2.3 Die fibrogene Phase**

#### ***1.2.3.1 Die Matrixakkumulation***

Die fibrogene Phase ist durch eine Akkumulation von extrazellulärer Matrix im Interstitium charakterisiert, die aus dem Ungleichgewicht zwischen Synthese und Abbau resultiert. Erhöhte mRNA-Level in der Niere und das Erscheinen von de-novo-Proteinen, die sich normalerweise nicht im Interstitium befinden, belegen die erhöhte Synthese. Die Matrixproteine werden primär durch interstitielle Myofibroblasten, aber auch durch tubuläre Zellen produziert (Tang et al. 1997). Einige Matrixproteine sind Interstitiumproteine wie Kollagen I, III, V, VII, XV und Fibronectin, andere sind charakteristisch für die Basalmembran der Tubuli wie Kollagen IV und Laminin. Die de-novo-Proteine in der geschädigten Niere sind Splice-Varianten von Fibronectin und neue Ketten von Laminin. Andere Elemente des fibrotischen Interstitiums sind Proteoglykane, Polysaccharide und Glykoproteine. Wie die Matrixproteine dienen diese Elemente nicht nur als Strukturstütze. Hyaluronan zum Beispiel kann im Interstitium akkumulieren (Wells et al. 1990) und die interstitielle Inflammation durch Stimulierung der Produktion von profibrotischen Molekülen durch tubuläre Zellen verstärken (Beck-Schimmer et al. 1998). Ein anderes Matrixprotein, das bei renalen Erkrankungen akkumulieren kann, ist SPARC (*secreted protein acidic and rich in cysteine*) (Pichler et al. 1996), das die TGF- $\beta$ -Expression und die Synthese von Kollagen und Fibronectin stimuliert (Francki et al.

1999). Das Ausknocken des SPARC-Gens führte in Tierversuchen zur Amelioration der renalen Fibrose (Taneda et al. 2003). Ein weiterer Vertreter der Matrixproteine ist Thrombospondin, das die TGF- $\beta$ -Aktivierung in vitro und in vivo stimuliert (Crawford et al. 1998). Bei der Angiotensin-II-induzierten TGF- $\beta$ -Aktivierung wird Thrombospondin eine vermittelnde Rolle zugeschrieben (Zhou et al. 2006). Sein Erscheinen prognostiziert die Entwicklung der interstitiellen Fibrose (Hugo et al. 1998). Extrazelluläre Proteoglykane sind auch wichtige Bestandteile des fibrotischen Interstitiums, die potentielle Reservoirs für Wachstumsfaktoren wie bFGF und TGF- $\beta$  darstellen.

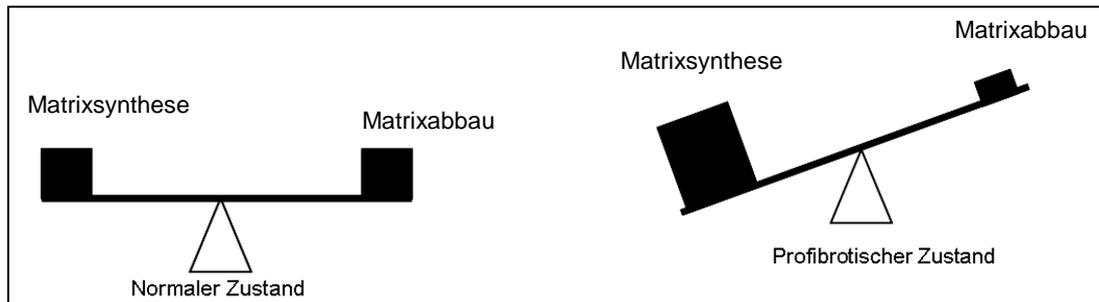
### ***1.2.3.2 Hemmung des Matrixabbaus***

Bei der fibrogenen Phase kommt es neben der erhöhten Matrixsynthese zu einer Beeinträchtigung des Matrixabbaus (Abb. 1). Dies ist die Folge der Produktion von Proteaseninhibitoren. Die Proteasen sind substratspezifisch für den Proteinabbau zuständig, sodass deren Inaktivierung zur Anhäufung von Matrixproteinen führt. Unter den wichtigsten Matrixproteasen, welche die normale Niere produziert, sind die Metalloproteinasen zu erwähnen. Diese sind Zink-abhängige Endopeptidasen, unter anderem Kollagenasen und Gelatinasen (Miyazaki et al. 2003).

Manche progressiven renalen Erkrankungen sind nur durch die Inaktivierung der Proteinlyse verursacht, während die Proteinsynthese normal bleibt. Dies zeigt, dass dieser Mechanismus eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der Fibrose spielt.

Durch ihre Protein-abbauende Wirkung ist die Serinprotease Plasmin auch ein Substrat, das an der renalen Fibrose beteiligt ist. Plasmin kann Komponenten der extrazellulären Matrix, unter anderem Fibronectin und Laminin, abbauen, sowie Metalloproteinasen aktivieren. Plasmin wird zuerst als inaktives Plasminogen synthetisiert. Dieses wird von Plasminogenaktivatoren aktiviert (Syrovets und Simmet 2004). Der Mechanismus, der bei der renalen Fibrose eine Rolle spielt, ist die Induktion von Plasminogenaktivatorinhibitor 1 (PAI-1) (Ma und Fogo 2009). Die Produktion von PAI-1 aus tubulären Zellen, Fibroblasten und Myofibroblasten wird unter anderem durch TGF- $\beta$ , EGF, PDGF, bFGF und TNF-alpha stimuliert. Durch die Hemmung des Plasmin-abhängigen ECM-Abbaus führt PAI-1 zur Akkumulation der ECM (Li X et al. 2005). In diversen experimentellen Modellen wurde eine erhöhte Expression von PAI-1 mit der interstitiellen Fibrose assoziiert (Jernigan und Eddy

2000). Mäuse, die PAI-1-defizient sind, entwickeln weniger renale Fibrose (Oda et al. 2001).



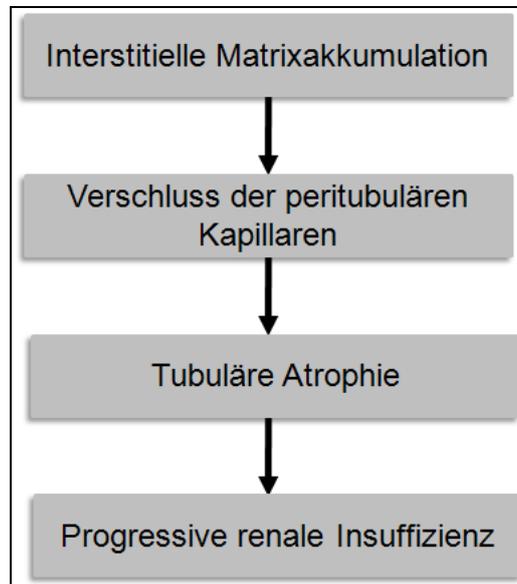
**Abbildung 1:** ECM-Gleichgewicht: Schematische Darstellung der fibrogenen Phase als Ungleichgewicht zwischen Synthese und Abbau der Matrix. (modifiziert nach Eddy (2000), S.295)

### 1.2.4 Die destruktive Phase

Die letzte Phase in der Fibrosekaskade nach der Schädigungsphase, Fibrose-signalisierenden Phase und fibrogenen Phase ist die destruktive Phase. Dabei akkumulieren die Matrixproteine immer weiter und fangen an, destruktive Effekte auf die Nierenstruktur und anschließend auf die Nierenfunktion zu haben (Abb. 2). Insbesondere die Nierentubuli, die 80% des gesamten Nierenvolumens ausmachen, sind vom destruktiven fibrotischen Prozess betroffen, bei dem sie selbst an vielen Schritten beteiligt sind. Durch die tubuläre Atrophie verlieren die Glomeruli ihre Funktion (Marcussen 1992). Tubuläre Ischämie induziert Tubularzellentod durch Apoptose und Nekrose. Die Hypoxie kann direkt die Genexpression beeinflussen, was Fibrose-induzierende Konsequenzen hat. Tubuläre Zellen, die in vitro hypoxischen Bedingungen ausgesetzt waren, zeigten verminderte Metalloproteinaseaktivität und erhöhte Kollagensynthese (Orphanides et al. 1997). In Tiermodellen induzierte die chronische Hypoxie typische fibrotische Veränderungen an tubulointerstitiellen Zellen (Fine und Norman 2008). Die fibrotische Matrix und der durch die destruktive Fibrose hervorgerufene Kapillarverschluss isolieren die Tubuli von der Sauerstoffzufuhr und führen zum apoptotischen Untergang der Zellen. Dies korreliert mit einem Verlust der Nierenfunktion (Serón et al. 1990).

Der Prozess der renalen Fibrose, erläutert anhand der Fibrosekaskade mit den vier Phasen, ist ziemlich komplex. Dabei interagieren zahlreiche zelluläre und molekulare Mediatoren. Die pathogenetische Basis der destruktiven Fibrose ist in Vitalorganen wie Niere, Leber und Lunge ziemlich ähnlich. Trotz der Komplexität des fibrotischen Prozesses versuchen Studien, therapeutische Strategien zu entwickeln mit dem Ziel

der Verlangsamung oder Prävention des Prozesses. In manchen Fällen wird sogar versucht, die renale Narbenbildung rückgängig zu machen.



**Abbildung 2:** Destruktive Phase in der Fibrose: Schematische Darstellung der verschiedenen Etappen der destruktiven Phase (modifiziert nach Eddy (2000), S.297)

### 1.3 Endogene antifibrotische Faktoren und therapeutische Strategien bei der Nierenfibrose

Um das Gleichgewichtsprinzip zu gewährleisten, setzt die Anwesenheit von fibrogenen Faktoren sicher das Vorhandensein von entgegenwirkenden Antagonisten voraus. In der Tat haben aktuelle Studien endogene antifibrotische Faktoren identifiziert, welche die fibrogene Wirkung von TGF- $\beta$  genau antagonisieren, darunter HGF (*hepatocyte growth factor*) (Yang und Liu 2002) und BMP-7 (*bone morphogenetic protein 7*) (Zeisberg et al. 2003). Deshalb könnte das Wiederherstellen des Gleichgewichtes zwischen pro- und antifibrotischen Signalen als Prinzip für die Entwicklung von therapeutischen Strategien dienen. Unter Berücksichtigung dessen besteht die Vorgehensweise einerseits in der Hemmung der TGF- $\beta$ -Kaskade und andererseits in der Steigerung der antifibrotischen Faktoren in der kranken Niere.

HGF hat sich in letzter Zeit als potenter antifibrotischer Faktor herausgestellt, sowohl in der Niere als auch in anderen Organen. Es besitzt die Fähigkeit, die Gewebsreparatur und Regeneration nach Schädigung zu fördern. Die Effekte von HGF und TGF- $\beta$  in der Niere sind genau entgegengesetzt. In vitro inhibiert HGF die

TGF- $\beta$ -vermittelte Aktivierung von Myofibroblasten und blockiert die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) (Yang und Liu 2002), welche einen kritischen Schritt der renalen Fibrose darstellt. HGF blockiert auch die intrazelluläre Smad2/3-Translokation in interstitiellen Fibroblasten (Yang et al. 2005). Es wurde gezeigt, dass die Behandlung von nephrotischen Mäusen mit Rekombinant-HGF die tubulointerstitielle Fibrose inhibiert, ein Effekt, der mit einer signifikanten Reduktion der renalen Produktion von TGF- $\beta$  und PDGF sowie der interstitiellen Myofibroblastenformation assoziiert wurde (Mizuno et al. 1998). Die Verabreichung von exogenem HGF oder seinen Genen führte zur Besserung der renalen Fibrose und Erhaltung der Nierenfunktion in verschiedenen Tiermodellen von chronischen Nierenerkrankungen wie obstruktive, diabetische und Allograft-Nephropathie (Liu 2004b). Dagegen führte das Blocken von endogenem HGF durch einen HGF-Antikörper zur Steigerung der Kollagen-Akkumulation und zur Verschlimmerung der interstitiellen Fibrose. TGF- $\beta$  kann auch die HGF-Formation inhibieren. Dies illustriert die Interaktionen zwischen diesen pro- und antifibrotischen Wachstumsfaktoren.

Ein weiterer Vertreter der antifibrotischen Faktoren ist das BMP-7. Es ist ein Mitglied der TGF- $\beta$ -Superfamilie, das der fibrogenen Wirkung von TGF- $\beta$  entgegenwirkt. Seine Expression ist in der fibrotischen Niere oft herunterreguliert. Die Gabe von exogenem BMP-7 supprimiert die renale Fibrose in experimentellen Nierenerkrankungen. In vitro antagonisiert BMP-7 TGF- $\beta$  und inhibiert die tubuläre EMT. Die Inhibition der Smad-Signale spielt dabei eine zentrale Rolle (Zeisberg et al. 2003). In Tierversuchen mit Fibrose bei unilateraler uretraler Obstruktion führte die Behandlung mit BMP-7 mit präventivem oder kurativem Ziel zur Präservierung oder zum Wiederherstellen der Nierenhistologie und -funktion. Diese BMP-7-Effekte waren etwas besser im Vergleich zu den protektiven Effekten durch einen ACE-Hemmer (Hruska et al. 2000, Morrissey et al. 2002).

Die Induktion der Expression von antifibrotischen Faktoren kann eine Strategie gegen die Entwicklung der renalen Fibrose darstellen. Die Induktion der HGF-Expression kann eine renale Protektion gewährleisten. So betrachtet, könnten die Verabreichung von HGF oder die Hochregulierung seiner Expression als Strategien bei der Behandlung der Nierenfibrose dienen. Trotz der erheblichen therapeutischen Wirksamkeit von HGF und BMP-7 in Tiermodellen hat sich dies bei der Therapie von humanen Nierenerkrankungen noch nicht bestätigt.

Weitere antifibrotische Faktoren sind das Interferon-Gamma (IFN- $\gamma$ ), *Insulin-like growth factor 1* (IGF-1) und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) zu erwähnen. IFN- $\gamma$  ist ein Zytokin, das seine Wirkung durch Inhibition der Myofibroblasten und der Kollagen-Genexpression entfaltet. Die Infusion von Rekombinant-IFN- $\gamma$  in Rattennieren führte zur Verminderung der interstitiellen Kollagen-Akkumulation (Guo et al. 1999). IGF-1 konnte bei neonatalen Ratten mit obstruktiver Uropathie zur Reduktion der Kollagen-Akkumulation führen (Chevalier et al. 2000). In einem anderen Rahmen zeigte es Fibrose-fördernde Effekte (Hirschberg 1996). TNF- $\alpha$  ist bekannt für seine mitogenen und chemotaktischen Wirkungen auf die Fibroblasten, besitzt jedoch auch antifibrotische Wirkungen wie die Stimulation der Kollagenase-Aktivität und die Inhibition der Kollagen-Genexpression. Die klinische Wirksamkeit dieser Faktoren bei der Therapie humaner Nierenerkrankungen ist bis jetzt nicht etabliert. Zurzeit gilt die Angiotensin-II-Blockade als einzige klinisch verfügbare Option einer antifibrotischen Therapie bei Nierenerkrankungen. Anhand klinischer Studien konnte eine antifibrotische Wirkung von Angiotensin-II-Rezeptorblockern (Campistol et al. 1999) und ACE-Hemmern (Sharma et al. 1999) nachgewiesen werden. Eine Kombinationstherapie beider Medikamente erzielte im Rahmen experimenteller Arbeiten eine Regression der renalen Fibrose in frühen Stadien (Wolf und Ritz 2005). Dabei erreichen beide Medikamente jedoch nur eine Verlangsamung der Progression chronischer Nierenerkrankungen. Stoppen können sie diese nicht. Im Endstadium bleibt die Dialyse oder eine Nierentransplantation der einzige Ausweg, um die funktionslose Niere zu ersetzen. Neue Therapiewege werden vom Gebiet der Stammzellforschung erhofft. Ob diese eine Regression der renalen Fibrose oder eine Regeneration einer komplett fibrotischen Niere ermöglichen kann, bleibt zu wünschen.

### **1.4 Rolle des Stresses in der Entwicklung der renalen Fibrose**

Die Exposition der Zellen gegenüber verschiedenen Stressbedingungen wie u.a. Hyperosmolarität, oxidativen Wirkstoffen, ionisierender Strahlung oder UV-Licht führt zur Aktivierung von zahlreichen Signalübertragungskaskaden. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind als Hauptmediatoren in der Stress-induzierten Signalübertragung beim oxidativen Stress impliziert und ihre unkontrollierte Produktion ist mit zellulärer Schädigung verbunden (Finkel 1998, Kamata und Hirata

1999). ROS beeinflussen u.a. zelluläre Ereignisse, welche die Akkumulation der Matrixproteine fördern und ihren Abbau hemmen, wobei TGF- $\beta$  eine Schlüsselrolle spielt (Lewis und Norman 1995, Studer et al. 1997, McCarty 1998). Damit tragen die ROS zur Entwicklung der Fibrose bei. Dies konnte am Beispiel der diabetischen Nephropathie nachgewiesen werden (Ha und Lee 2005). Beim osmotischen Stress versuchen sich die Zellen der extrazellulären Osmolaritätsänderung anzupassen und der Hyperosmolarität entgegenzuwirken, um intensiven Wasserverlust und anschließendes Schrumpfen zu verhindern. Dies geschieht durch eine Steigerung der Synthese von kleinen Molekülen, um die intra- und extrazellulären Bedingungen auszugleichen (De Nadal et al. 2002). Die Nierenzellen sind ständig sich verändernden NaCl- und Urea-Konzentrationen ausgesetzt. Der dadurch verursachte osmotische Stress führt zu zahlreichen Störungen aufgrund des hypertonen Effektes von hoher NaCl-Konzentration und der direkten Denaturierung von zellulären Molekülen durch hohe Urea-Konzentration. Die hohen NaCl- und Urea-Konzentrationen erhöhen die ROS-Bildung, hemmen die DNA-Replikation und -Transkription, hemmen die Translation, beschädigen die Proteine und führen zur Änderung und Reorganisation des Zytoskeletts. Dennoch besitzen die Zellen Anpassungsmechanismen, die ihnen das Überleben und Erhalten der Funktion ermöglichen. Dies geschieht durch die Akkumulation von organischen Osmolyten wie u.a. Sorbitol, Inositol, Betaine und Taurine, Überexpression oder Herunterregulierung von HSP (Hitzeschockproteine), metabolischen Enzymen, Zytoskelettproteinen und anderen Stressproteinen des endoplasmatischen Retikulums. Ein Versagen dieser Mechanismen führt zum apoptotischen Zelltod (Burg et al. 2007). Ferner ist es bekannt, dass der Hypertonus oder die Hyperosmolarität die Expression mancher Gene und die Aktivierung einiger Zytokine modulieren kann. Eine Arbeit von Sugiura et al (1998) zeigte tatsächlich eine signifikante Steigerung der TGF- $\beta$ -Aktivität in Rattennierenzellen unter hyperosmotischem Stress durch NaCl, Glucose oder Mannitol. Dabei begünstigt der hyperosmotische Stress die Spaltung des latenten TGF- $\beta$  in die biologisch aktive Form und stimuliert damit die Kollagensynthese in den Nierenzellen. Durch diese Effekte gewinnt der Stress, insbesondere der osmotische und der oxidative, eine Rolle bei der Entwicklung der renalen Fibrose und ihrer Progression. Weitere Arbeiten müssen folgen, um andere Wirkmechanismen zu entdecken.

### **1.5 Das Fehlen an Modellen für die Erforschung der renalen Fibrose**

Für lange Zeit waren die Mechanismen der renalen Fibrose wenig verstanden. Die Untersuchung dieses Prozesses war durch den Mangel an suffizienten Zellmodellen aus Nierenbiopsien verhindert. Die Immortalisation der Zellen konnte eine Möglichkeit bieten, die Einschränkungen der Gewinnung von Zelllinien aus primären Kulturen bei bisherigen Methoden zu überwinden.

Mit der Produktion von immortalisierten stabilen Fibroblastenzelllinien, aus Nieren mit interstitieller Fibrose und aus normalen Nieren, welche die gleichen phänotypischen und funktionellen Eigenschaften wie Originalzellen besitzen, konnten weitere Untersuchungen der zellulären und molekularen Mechanismen der renalen Fibrose ermöglicht werden.

### **1.6 Rolle der Proteomikmethoden bei der Erforschung der Fibrosemechanismen**

Proteomik ist ein relativ neues Gebiet. Es leitet sich ab vom Wort Proteom, ein Begriff, der 1995 geprägt wurde (Wasinger et al. 1995), und komplementiert das weite Feld der Genomforschung. Proteom bezeichnet die Gesamtheit aller Proteine einer Zelle unter definierten Bedingungen und zu einem definierten Zeitpunkt (Wilkins et al. 1996). Proteomics oder die Proteomik erfasst die Erforschung des Proteoms. Dabei werden Proteinextrakte hergestellt und einzelne Proteine isoliert. Nicht nur spezifische Aminosäuremuster, sondern auch chemische Veränderungen, die für die Regulierung und Funktion von Proteinen eine Rolle spielen, werden mittels der hochauflösenden Proteomikmethoden identifiziert. Um komplexe physiologische Vorgänge im Organismus zu verstehen, reicht es nicht aus, das Genom zu entschlüsseln. Es ist notwendig, die Proteine in ihrer Gesamtheit zu erfassen. Durch die Proteomikmethoden können krankheitsspezifische Proteinmuster quantitativ und qualitativ erfasst werden (Westermeier et al. 2008).

Die Proteomik ist ein vielversprechendes Gebiet, das die Entdeckung von neuen Biomarkern zur frühen Detektion, Diagnose und Therapie von Erkrankungen ermöglicht. Dazu werden zahlreiche Proteomikmethoden angewandt, darunter der Grundstein der Proteomik, die 2D-Gel-Elektrophorese, welche in verschiedenen Studien zum Einsatz kommt. Mittels der hochsensitiven Massenspektrometrie-

Methoden können zahlreiche Proteine, die sich in ihrer Expression unterscheiden und Hinweise auf metabolische Veränderungen geben, identifiziert werden (Wulfskuhle et al. 2003).

Die Proteomikmethoden finden immer mehr Anwendung bei der Erforschung der Fibrose in unterschiedlichen Organen wie Herz, Lunge, Leber und, wie in unserer Arbeit, in der Niere.

Am Herzen zum Beispiel und im Rahmen der koronaren Atherosklerose konnte mittels der 2D-Gel-Elektrophorese, Massenspektrometrie und Western-Blot die erhöhte Expression von einigen Proteinen, hauptsächlich Ferritin, festgestellt werden (You et al. 2003), die charakteristisch für die Entwicklung der Fibrose in den Herzgefäßen sind. Die identifizierten Proteine sind sehr spezifisch und können als Marker bei der Diagnose und beim Monitoring der kardialen Atherosklerose zum Einsatz kommen (Zimmerli et al. 2008). In der Lunge konnten mittels Proteomikmethoden aus der bronchoalveolären Lavage von Patienten mit zystischer Fibrose Struktur-veränderte Surfactantproteine, Protein-Aggregationen, Protein-Subeinheiten sowie ihre Abbauprodukte identifiziert werden. Dies trug zum besseren Verständnis der Pathogenese dieser Erkrankung bei (Bai et al. 2004). Bei der Leberfibrose war eine Leberbiopsie bisher für die Diagnose erforderlich. In den letzten Jahren ist es gelungen, die nichtinvasiven Proteomikmethoden, welche multiple Proteinfractionierung, multiple Proteinidentifikationen und parallele Analysen von multiplen Proben ermöglichen (Cheung et al. 2008), in der Erforschung der Leberfibrose einzusetzen. In unserer Arbeit widmen wir uns der renalen Fibrose und versuchen anhand der Proteomikmethoden zum besseren Verständnis des Pathomechanismus zu gelangen. Daraus könnten sich diagnostische und therapeutische Wege ergeben.

### **1.7 Fragestellung**

Die renale Fibrose stellt, wie bereits erwähnt, das Endstadium vieler Nierenerkrankungen dar und kann zum kompletten Verlust der Organfunktion führen. Einige zelluläre und molekulare Mechanismen der renalen Fibrose konnten bereits identifiziert werden, jedoch ist die Erforschung dieses Prozesses recht unbefriedigend, was an dem längere Zeit vorherrschenden Mangel an Versuchsmodellen lag. Das Etablieren von immortalisierten Nierenfibroblasten aus

normalen Nieren und aus Nieren mit interstitieller Fibrose ermöglichte weitere Untersuchungen.

In unserer Arbeit untersuchten wir zwei in unserer Abteilung etablierte humane Fibrose-Zellmodelle proteomisch, die TK173 (nichtfibrotische Nierenfibroblasten) und die TK188 (fibrotische Nierenfibroblasten) mit der Zielsetzung:

- Darstellung des Proteoms der TK173- sowie der TK188-Zelllinie mit Hilfe von zweidimensionaler Gel-Elektrophorese.
- Massenspektrometrische Analyse und computergestützte Auswertung der Daten mit Vergleich des Proteinmusters der beiden Zelllinien.
- Feststellung von Proteinen mit unterschiedlicher Expression in der fibrotischen Zelllinie TK188 im Vergleich zur nichtfibrotischen Zelllinie TK173 und ihre Identifizierung mit Hilfe von Proteomikmethoden.
- Bestätigung der Proteinexpressionsunterschiede zwischen TK173 und TK188 mittels Western-Blot und Immunfluoreszenzfärbung
- Darstellung der Rolle des osmotischen Stresses in der Progression der renalen Fibrose durch Vergleich der Proteome von TK173-Zelllinie unter hyperosmotischen Bedingungen mit TK173 Std (unter Standardbedingungen) und TK188 Std (unter Standardbedingungen).
- Bestätigung der ausgewählten Ergebnisse durch Western-Blot-Analysen und Immunfluoreszenzfärbung.
- Diskussion einer möglichen Beteiligung der differentiell exprimierten Proteine an Mechanismen, die der Entwicklung der renalen Fibrose zugrunde liegen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Antikörper

##### Chemikalien

2,5-Dihydroxybenzoesäure-Matrix	Sigma-Aldrich, Steinheim
30%-Acrylamid/Bisacrylamid	Bio-Rad, München
Aceton	Merck, Darmstadt
Acetonitril	Amersham Biosciences, Freiburg
Ameisensäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumbicarbonat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumperoxiddisulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampholyte 3/10	Bio-Rad, München
Bradford-Reagens	Bio-Rad, München
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Butanol	Merck, Darmstadt
CHAPS	Merck, Darmstadt
Chemilumineszenzfarbstoff	Perkin Elmer Inc, Boston, MA, USA
D-MEM-Medium	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Fetales Kälberserum	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Flamingo <sup>®</sup> -Färbelösung	Bio-Rad, München
L-Glutamin	PAA, Pasching, Österreich
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Iodacetamid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
Mercaptoethanol	Bio-Rad, München

## Material und Methoden

---

Methanol	Roth, Karlsruhe
Mineralöl	Bio-Rad, München
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
NP 40	Sigma-Aldrich, Steinheim
PBS	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin	PAA, Pasching, Österreich
PMSF	Fluka, Seelze
Ponceau-S-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Precision Plus Protein Standards	Bio-Rad, München
Roti-Blue	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Sodiumdodecylsulfat	Fluka, Steinheim
Sodium orthovanadate	Fluka, Steinheim
Streptomycin	PAA, Pasching, Österreich
TEMED	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Thiourea	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trichloressigsäure(TCA)	Merck, Darmstadt
Trifluoressigsäure(TFA)	Merck, Darmstadt
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween-20	Merck, Darmstadt
Urea	Sigma-Aldrich, Steinheim

### **Enzyme**

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

### **Antikörper und Antiseren**

Anti- $\alpha$ smooth muscle actin (Maus)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Anti- $\beta$ -Aktin (Maus)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Anti-Cofilin (Maus)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Anti-ERP57 (Kaninchen)	Stressgen Bioreagents, Victoria, Kanada
Anti-ERP72 (Kaninchen)	Stressgen Bioreagents, Victoria, Kanada
Anti-Fibronectin (Maus)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Anti-GRP78 (Kaninchen)	Sigma-Aldrich, Steinheim

## Material und Methoden

---

Anti-GRP94 (Kaninchen)	Stressgen Bioreagents, Victoria, Kanada
Anti-Kaninchen-IgG	Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA
Anti-Maus-IgG	Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA
Anti-PRDX2 (Maus)	Abcam, Hamburg
Anti-STMN-1 (Maus)	Abcam, Hamburg
Anti-TPI1 (Maus)	Abnova, Taipei City, Taiwan
Anti-Vimentin (Maus)	Dako, Hamburg

### 2.1.2 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Elektrophoresekammer	PROTEAN II XL Cell	Bio-Rad, München
Entwicklungsmaschine	Konica SRX-101 A	Konica, Taipei City, Taiwan
Fokussierkammer	Protean IEF Cell	Bio-Rad, München
Fluoreszenz-Laserscanner	Fuji FLA 5100	Fujifilm, Düsseldorf
Inkubator	3548	Forma Scientific Inc, Marietta, Ohio, USA
Kocher	Dri-Block DB-20	Techne, Dublin, Irland
MALDI-TOF-MS	Voyager DE-STR	Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA
Mikroskop	Axiovert S100 TV	Zeiss, Göttingen
Mikroskop	ID 03	Zeiss, Göttingen
Mikroskop	Axiophot	Zeiss, Göttingen
pH-Meter	761 Calimatic	Knick, Berlin
Photometer	Lambda	Perkin-Elmer & Co GmbH, Stuttgart
Q-TOF Ultima	Ultima Global	Micromass, Manchester, UK
Schüttler	Duomax 1030	Heidolph Instruments, Schwabach
Speed Vacuum-Zentrifuge	SVC 10 CH	Savant, Holbrook, NY, USA

## Material und Methoden

---

Stromversorgungsgerät	Electrophoresis Power Supply EPS 301	Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK
Ultraschallbad	Bandelin	Sonorex, Berlin
Vortexer	REAX Top	Heidolph Instruments, Schwabach
Waage	Universal	Sartorius, Göttingen
Western-Blot-Apparatur	XCell II™ Blot Module	Bio-Rad, München
Zentrifuge	Biofuge 15 R	Heraeus Sepatech, Berlin
Zentrifuge	Sigma 3-18K	Sigma, Osterode
Zentrifuge	Optima™ TL Ultrazentrifuge 100.000 Umdrehungen pro Minute, Modell TL-100	Beckmann, Palo Alto, CA, USA

### 2.1.3 Verbrauchsmaterial

16 well Glas Side Platten	Nunc, Rochester, NY, USA
6 well Glas Side Platten	Nunc, Rochester, NY, USA
Bis-Tris-Gel (Criterion®)	Bio-Rad, München
Blotmembran Nitrocellulosemembran	Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK
Einmal-Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Eluierungssäulen	LC Packings, Dionex, CA, USA
Entwickler RP X-OMAT EX	Kodak, Rochester, NY, USA
Färbeschalen	Sarstedt, Nümbrecht
Filterpapier	Bio-Rad, München
Fixierer RP X-OMAT LO	Kodak, Rochester, NY, USA
Glasplatten	Bio-Rad, München
Handschuhe Peha Soft	Hartmann, Heidenheim
Haushaltsfolien	Haushaltswarengeschäft
IPG-Spacer	Bio-Rad, München
IPG-Streifen	Bio-Rad, München
Kulturflaschen 75 cm <sup>2</sup>	BD Biosciences, Bedford, MA, USA
Kunststoffkamm	Bio-Rad, München

## Material und Methoden

---

Parafilm	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen (10, 20, 100, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (500, 1500, 2000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsröhrchen 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Röntgenfilm	Kodak, Hohenbrunn
Sterile Filter	Sarstedt, Nümbrecht
Vlies	Bio-Rad, München
Zip-Tip Säulen	Millipore, Billerica, MA, USA

### 2.1.4 Wissenschaftliche Software

Programm	Verwendungszweck	Hersteller
AnalySiS Software	Bildbearbeitung	Soft Imaging Systems, Leinfelden
Data Explorer Voyager V5.0	MALDI-TOF Datenanalyse	Applied Biosystems, Laguna Beach, CA, USA
Entrez Pubmed	Proteinsequenzabfrage	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/</a>
Fluor-S-Multimanager Harvester	Western-Blot-Software Proteindatenbank	Bio-Rad, München <a href="http://harvester.fzk.de/harvester/">http://harvester.fzk.de/harvester/</a>
Mascot	Proteindatenbank- Suchmaschine	<a href="http://www.matrixscience.com">http://www.matrixscience.com</a>
MassLynx, Version 4.0	Software für Massenspektrometer	Waters, Milford, MA, USA
Microsoft Excel 2003	Statistische Analyse	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
MSDB	Proteindatenbank	<a href="http://www.matrixscience.com">http://www.matrixscience.com</a>
Multi Analyst Version 1.1	Densitometrie-Analyse	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
PD Quest V6.2.1	2D Gel-Elektrophorese Analyse	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Swissprot	Proteindatenbank	<a href="http://www.expasy.org/uniprot/">http://www.expasy.org/uniprot/</a>

### **2.1.5 Biologisches Material**

Die in dieser Arbeit verwendeten nichtfibrotischen interstitiellen Nierenfibroblasten (TK173) und fibrotischen interstitiellen Nierenfibroblasten (TK188) sind Zelllinien, die aus Nierenbiopsien etabliert wurden. Die Biopsien wurden sowohl aus menschlichen Nieren mit histologisch nachgewiesener Glomerulonephritis und interstitieller Fibrose als auch aus gesunden menschlichen Spendernieren entnommen. Die Zellen wurden durch Transfektion mit dem Plasmid pSV3gpt immortalisiert und haben typische morphologische und biochemische Eigenschaften von renalen interstitiellen Fibroblasten behalten (Müller et al. 1995).

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellkultur**

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit einer Grundfläche von 75 cm<sup>2</sup> kultiviert und im Inkubator (3548, Forma Scientific Inc, Marietta, Ohio, USA) bei 37°C in Gegenwart von 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> in modifiziertem D-DMEM-Medium (D-DMEM-Medium 300 mosmol/kg, Streptomycin/Penicillin 1% (w/v), L-Glutamin 1% (w/v), FCS 10% (v/v)) angezogen. Es wurden jeweils 10 ml modifiziertes D-DMEM-Medium zugefügt.

Der Zustand der Zellen wurde zweimal wöchentlich mikroskopisch (ID 03, Zeiss, Göttingen) kontrolliert, um Informationen über Zelldichte, abgestorbene Zellen und mögliche Infektionen zu erhalten.

Ein Mediumwechsel wurde dreimal in der Woche durchgeführt. Die Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen (Arbeitsplatz in laminar-flow Technologie) durchgeführt.

Für die Versuche mit Zellen unter osmotischem Stress wurden die Zellen folgenderweise vorbereitet: Nachdem die Zellen unter normalen Kulturbedingungen (300-mosmol/kg-Medium) eine 70%-Konfluenz erreicht haben, wurden sie mit einem 600-mosmol/kg-Medium gestresst. Die Osmolalität wurde mit einer dreimolaren NaCl-Lösung eingestellt, so wurde die Zelllinie (TK173-NaCl) mit großer Osmolalitätsresistenz etabliert.

### **2.2.2 Trypsinisierung der Zellen**

Nach Erreichen des gewünschten Zellbewuchses in den Zellkulturflaschen, wurden die Zellen vom Flaschenboden abgetrennt. So wurde ungewollte Apoptose vermieden. Das verbrauchte Kulturmedium wurde abgesaugt. Zur Entfernung von Mediumresten wurden die haftenden Zellen mit vorgewärmtem PBS-Puffer gewaschen. Nach Absaugen des PBS-Puffers wurde die Trypsinlösung (Trypsin 20 ml, EDTA 0,33 g, mit PBS auf 200 ml auffüllen) auf den Zellen verteilt und für 3 min bei 37°C inkubiert. Zur Ablösung der Zellen wurden die Kulturflaschen kurz geschüttelt, danach wurde die Trypsinlösung abgesaugt. Die Zellen wurden in Suspension aufgenommen und auf weitere Kulturflaschen verteilt. Anschließend wurden sie im Inkubator bei 37°C aufbewahrt.

Die Trypsin-Lösung wurde vor Gebrauch steril gefiltert.

### **2.2.3 Gewinnung des Gesamtzelllysates**

Die Kulturflaschen, welche die gewünschte Zelldichte zeigten, wurden zur Gewinnung des Zelllysates genommen. Dazu wurden die Zellen wie in 2.2.2 trypsinisiert, nicht erneut in Suspension aufgenommen, sondern vom Flaschenboden abgetrennt, zweimal mit PBS-Puffer gewaschen, abgesaugt und in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei 4°C auf 1200 Umdrehungen pro Minute in einer Zentrifuge (Sigma 3-18K, Sigma, Osterode) abzentrifugiert. Danach wurden je nach Zellmenge 500-1000 µl Lysepuffer (9,5 M Urea, CHAPS 2% (w/v), Ampholyte 2% (w/v), DTT (frisch dazu geben) 1% (w/v), 10 nM PMSF (frisch dazu geben)) auf das Pellet gegeben. Nach Zugabe des Lysepuffers, wurden die Zellen für 30 min bei 4°C inkubiert und wiederholt gemischt. Um unlösliches Material zu entfernen, wurden die Zellen bei 4°C für 45 min mit einer Geschwindigkeit von 15000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert (Biofuge 15R, Heraeus Sepatech, Berlin). Der Überstand wurde abgenommen und erneut für 45 min bei 4°C mit 15000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der gewonnene Überstand stellte die Probe dar, die dann weiterverarbeitet wurde. Bis zur Benutzung wurden die Proben bei -20°C aufbewahrt.

### 2.2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration der Proben wurde photometrisch nach dem Protokoll von Bradford (1976) bestimmt. Eine BSA-Stammlösung (1 mg/ml) wurde als Standard verwendet.

Zur Herstellung der Kalibrierkurve wurden eine Standardreihe und eine Kontrollreihe mit jeweils fünf Küvetten (Sarstedt, Nümbrecht) mit folgenden Konzentrationen benutzt (Tab.1):

**Tabelle 1:** Bradford-Pipettierschema

BSA-Stammlösung (1 mg/ml)	Bradford- Reagens	Wasser
0 µl	200 µl	1000 µl
2 µl	200 µl	998 µl
5 µl	200 µl	995 µl
10 µl	200 µl	990 µl
15 µl	200 µl	985 µl
20 µl	200 µl	980 µl

Die hergestellten Lösungen wurden gut vermischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die optischen Dichten mit dem Photometer Lambda (Perkin-Elmer & Co GmbH, Stuttgart) gemessen.

Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurden 2 µl von der Probe in 1 ml (Wasser und Bradford-Reagens) vermischt. Anschließend wurde die Probenkonzentration photometrisch bestimmt. Durch die Eichkurve wurde die Proteinkonzentration der Probe ermittelt. Die Proben wurden weiterverarbeitet oder bei -20°C aufbewahrt.

### 2.3 Die zweidimensionale Gel-Elektrophorese

Bei der zweidimensionalen Gel-Elektrophorese (2D-Gel-Elektrophorese) werden die Proteine in zwei aufeinander folgenden Schritten getrennt. Die Trennung beruht auf zwei voneinander unabhängigen Parametern: Im ersten Schritt (erste Dimension), werden die Proteine aufgrund eines chemischen Parameters, des isoelektrischen Punktes (pI), voneinander getrennt. Im zweiten Schritt (zweite Dimension: SDS-

PAGE), werden die Proteine dann nach einem physikalischen Parameter, der Molekülmasse, separiert. Die 2D-Gel-Elektrophorese stellt zurzeit eine der proteomischen Methoden mit großem Auflösungsvermögen dar und wird daher zur Analyse komplexer Proteingemische eingesetzt.

Die Methode wurde in modifizierter Weise nach Anleitung von O'Farrell (1975) durchgeführt.

### **2.3.1 Die erste Dimension**

In der ersten Dimension, der isoelektrischen Fokussierung, wandert das Protein oder Peptid im erzeugten elektrischen Feld durch einen pH-Gradienten, bis es an einen pH-Wert gelangt, an dem seine Nettoladung (Summe aller negativen und positiven Ladungen) und damit auch seine Wanderungsgeschwindigkeit null ist. Dies ist sein isoelektrischer Punkt (pI). An diesem Ort fokussiert das Protein.

#### ***2.3.1.1 Die Probenvorbereitung für die erste Dimension***

Die Proben des Zelllysates wurden, wie unter 2.2.3 beschrieben, gewonnen. Der Proteingehalt jeder Probe betrug 150 µg und wurde im Rehydratationspuffer (8 M Urea, CHAPS 1% (w/v), 15 mM DTT (frisch dazu geben), Ampholyte (frisch dazu geben) 0,2% (v/v)) gelöst und auf ein Endvolumen von 185 µl gebracht. Um die Proteinwanderung auf dem Gelstreifen verfolgen zu können, wurden 5 µl Bromphenolblau hinzugefügt.

Die Proteine wurden zuerst durch Zugabe von Aceton (3:1) ausgefällt. Die Fällung erfolgte über Nacht bei -20°C. Danach erfolgte die Zentrifugation der Proben für 20 min bei 4°C mit 14000 Umdrehungen pro Minute (Biofuge 15R, Heraeus Sepatech, Berlin). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal für 15 min mit eiskaltem Aceton gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet. Nach Lösung des trockenen Pellets im Rehydratationspuffer wurde die Proteinbestimmung, wie oben beschrieben nach Bradford (1976), durchgeführt.

#### ***2.3.1.2 Die isoelektrische Fokussierung der Proteine***

Die bearbeiteten Proben wurden für die Rehydratation in eine Fokussierkammer (Protean IEF Cell, Bio-Rad, München) gegeben. Die Proben wurden unter einem 11-cm-langen immobilisierten pH-Gradient-Streifen (pH 3-10) (Bio-Rad, München) positioniert. Die Gelseite des Streifens zeigte nach unten. Es wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen entstehen. Nach einer Stunde der Rehydratation bei

Raumtemperatur wurden 3 ml Mineralöl auf den Streifen gegeben, um Verdampfungen zu verhindern. Für eine passive Rehydratation in das Gel wurde der Streifen über Nacht für mindestens 12 h bei Raumtemperatur in der Fokussierkammer inkubiert.

Die isoelektrische Fokussierung mit Protean IEF Cell (Bio-Rad, München) wurde am nächsten Tag bei 20°C nach dem folgenden Protokoll durchgeführt:

**Tabelle 2:** Protokoll der isoelektrischen Fokussierung

Dauer	Spannung
1 h	500 V
1 h	1000 V
5 h	8000 V

Der fertig fokussierte Streifen wurde entweder weiterverarbeitet oder eingeschweißt und bei -20°C aufbewahrt.

### **2.3.2 Die zweite Dimension**

In der zweiten Dimension (SDS-PAGE) erfolgte die Trennung der Proteine nach der Molekülmasse. Um die Proteine erfolgreich aus dem IPG-Streifen auf die SDS-PAGE zu transferieren, ist eine Umpufferung, Äquilibration genannt, notwendig. Dafür wurden SDS, Iodacetamid und DTT verwendet. SDS denaturiert die Proteine und gibt ihnen eine negative Ladung. DTT bricht bestehende Disulfidbrücken auf. SDS und DTT sorgen gemeinsam dafür, dass das Protein seine primäre Struktur behält. Iodacetamid sorgt für eine Alkylierung der Thiogruppen.

#### ***2.3.2.1 Herstellung der SDS-PAGE***

Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurde in modifizierter Weise nach Laemmli (1970) durchgeführt.

Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurde in einer vertikalen Elektrophoresekammer (PROTEAN II XL Cell, Bio-Rad, München) durchgeführt. Die für die vertikale SDS-PAGE benötigten Gele wurden mit Hilfe eines Gelgießstandes, bestehend aus zwei Glasplatten (Bio-Rad, München), zwei 1-mm-IPG-Spacern (Bio-Rad, München) und einer Haltevorrichtung, hergestellt.

12%-Gele mit einem pH von 8,8 wurden gegossen:

**Tabelle 3:** Zusammensetzung des 12%-Trenngels pH 8,8

Komponenten der 12%-Trenngellösung pH 8,8	Volumen
Acrylamid-Bisacrylamid	12,5 ml
1,5 M Tris-HCl	7,5 ml
H <sub>2</sub> O	9,6 ml
Entgasen für 5 Min	
SDS 10%	0,3 ml
APS 10%	150 µl
TEMED	10 µl

Die Trenngellösung wurde in die Gießvorrichtung gegossen und mit 2 ml Butanol überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu bekommen. Die Polymerisation erfolgte über Nacht bei 4°C. Die weitere Bearbeitung folgte am nächsten Tag.

### ***2.3.2.2 Äquilibrierung der Gelstreifen für die SDS-PAGE***

#### **Äquilibrierungslösungen:**

**Stammlösung:** (6 M Urea, Glycerol 30% (w/v), SDS 2% (w/v), 0,05 M Tris-HCl pH 6,8)

**Lösung I:** 10 ml Stammlösung mit 50 µl Bromphenolblaulösung (Bromphenolblau 0,25% (w/v), 1,5 M Tris-HCl pH 8,8) und 100 mg DTT.

**Lösung II:** 10 ml Stammlösung mit 50 µl Bromphenolblaulösung und 400 mg Iodacetamid.

Die Äquilibrierung verlief in zwei Schritten: Im ersten Schritt wurde jeder Gelstreifen einzeln für 20 min in der Lösung I inkubiert. Danach wurde der gleiche Streifen ein weiteres Mal für 20 min in der Lösung II inkubiert.

### ***2.3.2.3 Aufsetzen des IPG-Streifens auf das Polyacrylamidgel***

Die fertig äquilibrierten Streifen und 10 µl eines Molekulargewichtsmarkers (Precision Plus Protein Standards, Bio-Rad, München) auf Filterpapier, wurden vorsichtig zwischen den Glasplatten geschoben und auf das polymerisierte SDS-Polyacrylamidgel aufgesetzt. Die Gelkassetten wurden in die Elektrophoresekammer

(Protean II XL Cell, Bio-Rad, München) mit zentralem Kühlblock eingesetzt und mit einfach konzentriertem Elektrophoresepuffer (fünffach konzentrierter Elektrophoresepuffer: Tris 15 g, Glycerin 72 g, SDS 5 g, auffüllen auf 1 l H<sub>2</sub>O) aufgefüllt.

Die zweite Dimension lief bei einer Spannung von 100-240 V bei 4°C. Nach der Elektrophorese wurden die Gele aus den Glasplatten herausgelöst und gefärbt.

### **2.3.3 Flamingo-Färbung**

Bei der Färbung von Gelen mittels Flamingo<sup>®</sup>-Färbelösung, handelt es sich um eine Fluoreszenz-basierte Proteinfärbungsmethode der Firma Bio-Rad. Das Protokoll dieser Färbung ist dem der Coomassie-Färbung ähnlich. Nach mindestens drei Stunden Fixierung (40%-Ethanol, 10%-Essigsäure), wurde das Gel über Nacht in der Färbelösung inkubiert, um es anschließend zu scannen. Weitere Waschschrte sind nicht erforderlich. Bei ausreichender Proteinmenge ist es möglich, das Gel anschließend mit anderen Färbemethoden zu visualisieren. Die Flamingo-gefärbten Gele wurden bei einer Laserlinie von 473 nm und bei mittlerer Sensitivität (PMT 1 400-600 V) mit dem Fuji FLA-5100 Fluoreszenz-Laserscanner (Fujifilm, Düsseldorf) digitalisiert.

### **2.3.4 Digitalisierung der Gele**

Die Digitalisierung der Gele erfolgte mittels Fuji FLA-5100 Fluoreszenz-Laser-Scanners. Dieses modular aufgebaute System ist mit vier Laserlinien (473 nm, 532 nm, 635 nm und 650 nm) und zwei Detektoren versehen. Um ein gutes Signal- zu Rauschverhältnis (S/N-Ratio) zu erhalten, ist es wichtig, die Spannung so gering wie möglich zu wählen. Eine Spannung von 400-500 V für beide Kanäle reichte aus, um eine gute Intensität zu erzielen. Es wurde mit einer Auflösung von 50 µm/Pixel in 16-Bit-Farbtiefe gescannt und für qualitative Analysen das TIFF-Format gewählt.

### **2.3.5 Übereinstimmung und Aufbereitung der Spots**

In diesem Schritt wurden drei verschiedene Läufe einer Zelllinie in einer Vergleichsreihe, dem Übereinstimmungsset, zusammengefasst. Dabei wird ein virtuelles Standardgel erstellt, das die Informationen aller drei Gele in sich vereinigt. Die erstellten Matchsets wurden miteinander verglichen. Vorher wurden die Gele aufeinander abgestimmt. Dazu wählt man besonders charakteristische Spots aus, die sowohl auf dem Standard TK173 als auch in der fibrotischen Zelllinie TK188 und der

NaCl-gestressten Zelllinie TK173-NaCl detektiert wurden, und markiert sie mit Hilfe eines Symbols. Diese Orientierungspunkte dienen dazu, weitere unmarkierte Spots in der Nähe zur Deckung zu bringen. Ca. drei Orientierungspunkte sollten in allen vier Quadranten des Gels gesetzt werden. Falls man auf einem Gel noch auffällige Spots entdeckt (erkennbar an einer Farbkodierung: Grün = automatisch erkannt, rot = nicht erkannt), die trotz Vorhandensein in allen Gelen nicht erkannt worden sind, kann man sie manuell anpassen. Spots, die nur in einem oder mehreren Gelen, jedoch nicht im Standardgel vorhanden sind, werden manuell in dieses projiziert.

### **2.4 Datenanalyse**

Die Spotanalyse erfolgte durch die PD Quest V6.2.1-Software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Hierfür waren nur Gele zulässig, die nicht digital nachbearbeitet wurden. Nur die Funktionen wie Spiegeln, Beschneiden und das Drehen um 90°, 180° und 270° sind zulässig. Die Analyse der Gele beginnt mit dem Scannen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Proteinspots aus 2D-Gelen ausgewertet, deren Visualisierung durch Flamingo®-Färbung erfolgte. Diese Färbung hat im Vergleich zur kolloidalen Coomassie-Färbung eine deutlich bessere Signaldynamik. Um die Regulationsunterschiede und ihre statistische Signifikanz darzustellen, werden für jeden Spot das relative Verhältnis der normierten Intensität, die Standardabweichung und ein T-Test berechnet. Die verschiedenen Intensitäten der Spots wurden in arbiträren Einheiten angezeigt. Die ermittelten und normierten Spotintensitäten wurden dann jeweils miteinander verglichen, sodass Aussagen über Hoch- und Herunterregulation der einzelnen Spots getroffen werden konnten. Die Expression eines Proteins gilt als signifikant reguliert, wenn der errechnete Quotient aus dem Vergleich Probe zu Kontrolle einen Wert von 2, was für eine Hochregulierung dieses Proteins spricht, oder einen Wert von 0,5 für eine Herunterregulierung bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit (p-Wert) von  $p < 0,05$  ergibt.

## 2.5 Sequenzierung der exprimierten Proteine

Die aus den präparativen Läufen der zweidimensionalen Elektrophorese gewonnenen Spots wurden enzymatisch gespaltet und anschließend mit massenspektrometrischen Methoden identifiziert.

### 2.5.1 Enzymatische Proteinspaltung im frischen Gel

Bei den folgenden Arbeitsschritten wurde darauf geachtet, dass jede Kontamination mit Hautkeratinen verhindert wird. Dazu wurden Handschuhe getragen.

Es wurde, wie von Dihazi et al. (2005) beschrieben, vorgegangen. Die gefärbten Spots wurden manuell aus dem Gel mit einem Skalpell aufgeschnitten und zerkleinert, dann in Eppendorf-Gefäße gegeben. Zuerst wurden die Proteinproben zweimal für 15 min im Wasser gewaschen, dann wurden wieder für 15 min 100 µl Wasser dazugegeben. Das Wasser wurde abgesaugt. Dann wurden 40 µl 50%iges ACN für 15 min gegeben. Diese Lösung wurde abgesaugt. Dann wurden 40 µl 100%iges ACN auf die Proben hinzugefügt. Nach der Entfärbung der Proben wurde die ACN-Lösung abgesaugt. Danach wurden die Proben für 5 min in 40 µl 100 mM Ammoniumbikarbonat inkubiert. Um eine 1:1-Lösung zu erhalten, wurde 40 µl ACN-Lösung auf die Probe gegeben und für 15 min inkubiert. Anschließend wurde die Lösung verworfen. Die Proben wurden in der *Speed Vacuum*-Zentrifuge (SVC 10 CH, Savant, Holbrook, NY, USA) für 15 min getrocknet. In den nächsten Schritten erfolgte die Spaltung der Proteinproben. Dazu wurden die Proben zuerst für 45 min in Trypsinpuffer (Verdaupuffer (1 M Calciumchlorid 5 µl, 1 M Ammoniumbikarbonat 25 µl, H<sub>2</sub>O 970 µl) 100 µl, 0,1 µg/µl-konzentrierte Trypsinstammlösung 12,5 µl) auf Eis inkubiert. Danach wurde der Trypsinpuffer abgesaugt und die Proben wurden für 12 h in 40-60 µl Verdaupuffer bei 37°C inkubiert.

Als Nächstes wurde zum Stoppen der Spaltung eine Behandlung mit 2%igem TFA für 1-2 min durchgeführt. Der Überstand wurde in einem zweiten Eppendorf-Gefäß gesammelt. Die Proben wurden mit 0,1%igem TFA versetzt und für 30 min ins Ultraschallbad (Bandelin, Sonorex, Berlin) gestellt. Der Überstand wurde abgesaugt und dem Gefäß mit dem vorher gesammelten Überstand hinzugefügt. Dieser Schritt wurde wiederholt mit einer Lösung aus 30% ACN in 0,1%igem TFA und anschließend mit 60% ACN in 0,1%igem TFA. Anschließend wurden die Proben in

der *Speed Vacuum*-Zentrifuge (SVC 10 CH, Savant, Holbrook, NY, USA) getrocknet, in 10 µl Ameisensäure gelöst und bis zur Analyse bei -20°C aufbewahrt.

### **2.5.2 Entsalzung der Proteinproben**

Die weitere Vorbereitung der Proben für die Massenspektrometrie beinhaltet die Entsalzung der Proben. Dies ist notwendig, da die Massenspektrometrie-Methoden sehr empfindlich gegenüber Verunreinigungen durch Salze sind. Zur Entsalzung wurden Zip-Tip-Säulen (Millipore, Billerica, MA, USA) benutzt und es wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen. Die Proben wurden mit 10 µl 50% ACN in 0,1%igem TFA eluiert, anschließend mit der *Speed Vacuum*-Zentrifuge (SVC 10 CH, Savant, Holbrook, NY, USA) getrocknet und für die Analyse mit MALDI-TOF-Massenspektrometer (Voyager DE-STR, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) in 0,1%igem TFA gelöst. Für die Analysen mit Q-TOF Ultima-Massenspektrometer (Ultima Global, Micromass, Manchester, UK) wurden die Proben in 0,1%iger Ameisensäure gelöst.

### **2.5.3 Kristallisation der Messproben mit der Matrix**

Der folgende Bearbeitungsvorgang ist für die MALDI-TOF-MS-Analyse erforderlich und erzielt die Überführung der gespaltenen Peptide aus dem soliden Aggregatzustand in die Gasphase. Dazu wurde eine Matrix aus 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) verwendet. Diese wurde vor jedem Messvorgang frisch angesetzt. Eine Lösung aus 20 µg/µl Matrix, 0,1%igem TFA und 30% ACN wurde erstellt, vor Gebrauch bei 25°C für 30 min inkubiert und weiter für 1 min bei 15000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert (Biofuge, Heraeus Sepatech, Berlin). Der Überstand wurde abgenommen und bildete die benötigte Matrix. Auf jede Probenplatte wurde jeweils 1 µl der gewonnenen Matrix aufgetragen, dazu 1 µl der Probe, die vorher je nach Probe mit 2 bis 10 µl 0,3%igem TFA rehydriert wurde, pipettiert. Nachdem das Lösungsmittel sich verflüchtigt hat, kristallisiert sich die Matrix mit den zu analysierenden Molekülen aus. Die Messung wurde mittels MALDI-TOF-MS (Voyager DE-STR, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) durchgeführt.

## 2.6 Die Massenspektrometrie

### 2.6.1 Übersicht über die verwendeten Techniken

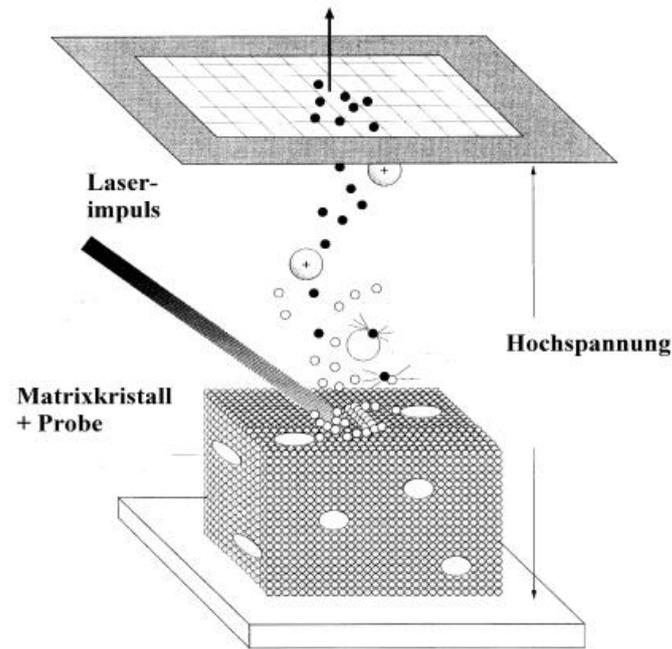
Die Massenspektrometrie ist eine Analysetechnik, mit der die Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum bestimmt werden kann. Das Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle zur Ionenerzeugung, einem Massenanalysator, in dem die Ionen beschleunigt und anschließend nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) aufgetrennt werden, und einer Detektionseinheit, welche die Ionen mit ihren relativen Intensitäten nachweist (Lottspeich und Zorbias 1998).

In dieser Arbeit wurden zwei der wichtigsten massenspektrometrischen Ionisierungsmethoden verwendet, die MALDI-MS und die ESI-MS. Die Massentrennung erfolgte mit den TOF- und Quadrupol-Instrumenten.

### 2.6.2 Ionisierungsprinzip

#### 2.6.2.1 Ionisierung mittels der MALDI-Technik

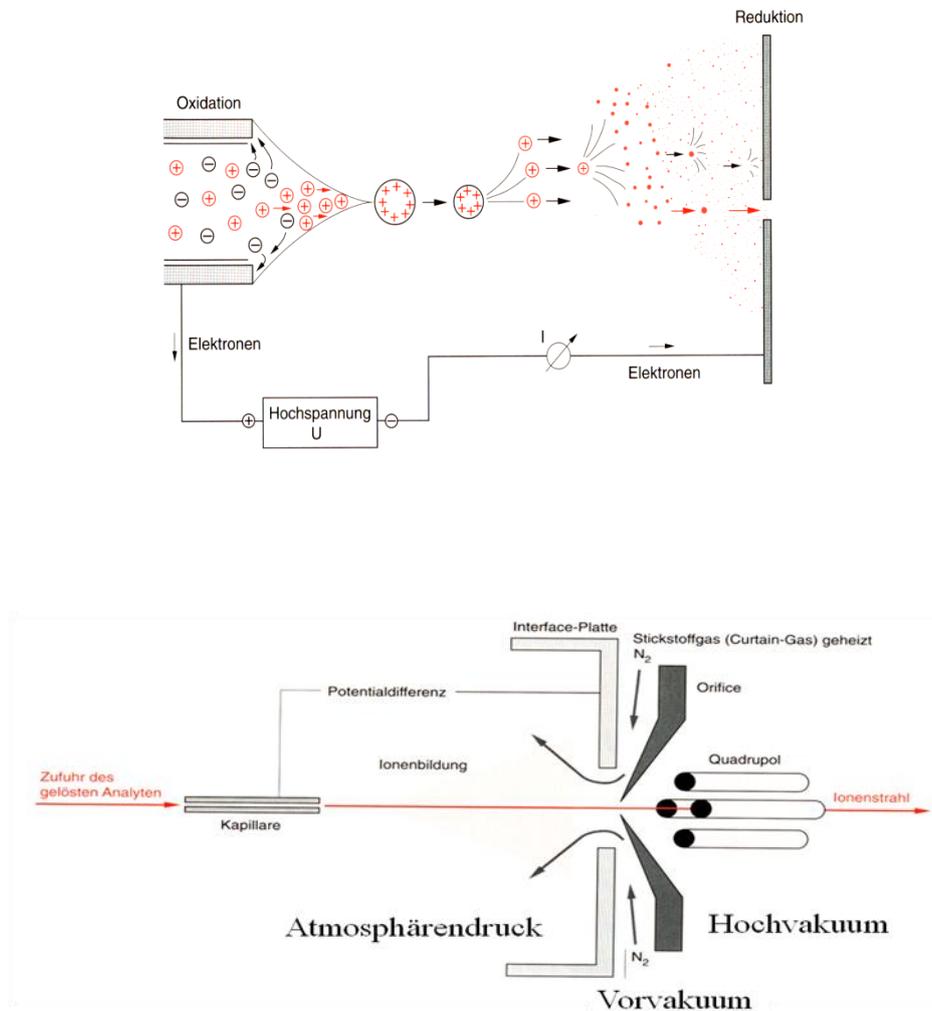
Die MALDI-Methode wurde 1988 entwickelt (Karas und Hillenkamp 1988). Bei der MALDI-TOF-MS (*Matrix-assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry*) wird das zu untersuchende Protein in eine organische Matrix eingebettet und mit einem Laserstrahl (häufig ein Stickstofflaser mit einer Wellenlänge von 337 nm im ultravioletten Strahlungsbereich) beschossen. Dabei werden Ladungen aus der Matrix losgelöst und auf das Proteinmolekül übertragen. Aufgrund dieses Energietransfers kommt es zur Desorption und gleichzeitig zur Ionisation der Proben (Abb. 3). Es entstehen geladene Proteine, die in einem luftleeren Flugrohr mittels Ringelektrode beschleunigt werden und nach etwa 60 bis 100 cm Flugweg auf einen Detektor treffen. Aus der Flugzeit wird die Molekülmasse berechnet: Je schwerer das Protein ist, desto länger ist die Flugzeit. Diese Methode ist äußerst empfindlich und genau.



**Abbildung 3:** Prinzip des MALDI-Prozesses: Durch die Laser-Impulse werden neben Matrixmolekülen auch Probenmoleküle in die Gasphase freigesetzt, die im Vakuum zu dem Massenanalysator fliegen. (Bioanalytik; Lottspeich und Zorbas 1998, S.326)

### 2.6.2.2 Ionisierung mittels der ESI-Technik

Die ESI-Methode wurde im Jahre 1989 entwickelt (Fenn et al. 1989). Bei der ESI-Ionisation (ESI-MS) (*Electrospray-Ionisation Mass Spectrometry*), wird die Proteinprobe angesäuert und zusammen mit organischen Lösungsmitteln unter Anlegen eines hohen elektrostatischen Potentials im Vakuum fein zerstäubt. Durch das Abdampfen des Lösungsmittels werden die Proteintröpfchen immer kleiner und die elektrostatische Abstoßung der gleich geladenen Protein-Ionen immer stärker, bis zur Bildung von Mikrotröpfchen (Abb. 4). Daraus treten mehrfach geladene Protein-Ionen aus, die im elektrischen Feld zu einem Quadrupol-Analysator fliegen (Abb. 4). Die Peaks im Spektrum repräsentieren die verschiedenen Ladungszustände und erlauben die Berechnung der Gesamtmasse des Proteins.



**Abbildung 4:** Prinzip der ESI-Massenspektrometrie (Bioanalytik; Lottspeich und Zorbas 1998, S.349, S.352)

### 2.6.3 Prinzip der Massentrennung

#### 2.6.3.1 Massentrennung mit dem TOF-Instrument

Ein TOF-Analysator arbeitet im Hochvakuum und trennt die Ionen in einem Flugrohr. Die durch den Laserimpuls gebildeten Ionen werden im Vakuum beschleunigt, um anschließend in einer Strecke nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis aufgetrennt zu werden. Dabei durchlaufen schwerere Ionen die Strecke langsamer als leichtere. Am Detektor kommen zuerst die kleinen Ionen und später die großen Ionen an.

#### 2.6.3.2 Massentrennung mit dem Quadrupol-Instrument

Das Quadrupol-Instrument besteht aus vier Metallstäben. Seine Wirkung als Massenfilter entsteht, wenn ein oszillierendes elektrisches Feld an den Quadrupol angeschlossen wird. Das Quadrupol-Filter ist zu einem bestimmten Zeitpunkt nur für

Ionen mit einem bestimmten  $m/z$ -Verhältnis durchlässig. Ionen anderer  $m/z$ -Verhältnisse fallen aus der Flugbahn und erreichen somit den Detektor nicht.

Viele Geräte besitzen drei Quadrupole, die hintereinander geschaltet werden (*triple quadrupole*). Die Hintereinanderschaltung ermöglicht eine differenziertere Identifizierung. Der erste Quadrupol trennt die Ionen nach ihrer Masse. Der zweite Quadrupol kann ein bestimmtes Peptid von Interesse weiter fragmentieren. Im dritten Quadrupol werden die im zweiten entstandenen Fragmente nach ihrer Masse getrennt (Fenn et al. 1989). Dieses Verfahren ermöglicht das Sequenzieren von Peptiden.

### 2.6.4 Sequenzierung der Proteine

Eine Sequenzierung der Peptide wird ermöglicht durch Hintereinanderschalten von zwei Massenanalysatoren. Die häufigsten Kombinationen sind MALDI mit einem TOF-Analysator und ESI mit einem Quadrupol-Analysator. In einem Q-TOF-Massenspektrometer wurden ein Quadrupol- mit einem TOF-Massenanalysator kombiniert (Wilm und Mann 1994).

Die Proteinidentifizierung in dieser Arbeit erfolgte mit MALDI-TOF und Q-TOF, wobei die Analyse der stark und mittel angefärbten Spots mit MALDI-TOF erfolgte, während bei den schwach und sehr schwach angefärbten Spots die Q-TOF-Analyse durchgeführt wurde. Um die Proteinidentifizierung als eindeutig anzusehen, wurden folgende Einstellungen festgelegt.

**Tabelle 4:** MALDI-TOF- und Q-TOF-Einstellungen

MALDI-TOF	Q-TOF
<ul style="list-style-type: none"><li>• Mindestens 30% Sequenzabdeckung</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Mindestens zwei übereinstimmende Peptidsequenzen</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• +/- 50 Teilchen ppm als erlaubte Massentoleranz eines einfach protonierten monoisotopischen Peptides (<math>[M+H]^+</math>)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• +/- 100 Teilchen ppm als erlaubte Massentoleranz eines mehrfach protonierten Peptides (<math>[M+H]^{n+}</math>)</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Mögliche Modifikation an Cysteinresten und Oxidation zu Methioninresten</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Mögliche Modifikation an Cysteinresten und Oxidation zu Methioninresten</li></ul>

### **2.6.5 Die Messung mit dem MALDI-TOF**

Die Messungen wurden mit einem Massenspektrometer (Voyager DE-STR, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) durchgeführt. Das Gerät arbeitete im Reflektronmodus „*delayed reflector*“, bei einer Beschleunigungsspannung von 20 KV. Das Spektrum eines Proteins wurde mit durchschnittlich 50 individuellen Stickstoff-Laserbeschüssen ermittelt.

Zur Messung wurden die Proteinproben auf eine Platte aufgetragen und die DHB-Matrix im Verhältnis 1:1 hinzugefügt. Die Matrix ermöglicht es den Peptidfragmenten, unter Laserbeschuss in die Gasphase zu gelangen. Danach wurden sie nach m/z-Verhältnis im Vakuum durch das Flugrohr beschleunigt. Vor jeder Messung erfolgte eine Kalibrierung mit einer Proteinmischung (Des-Arg-Bradykinin ( $[M+H]^+$  904,46), Angiotensin I ( $[M+H]^+$  1296,68), Glu 1-Fibrinopeptid B ( $[M+H]^+$  1570,67), ACTH (1-17) ( $[M+H]^+$  2093,08), ACTH (18-39) ( $[M+H]^+$  2465)). Eine weitere Kalibrierung erfolgte intern über zwei autoprotolytisch entstehende Peptide des Trypsins (m/z 842,51 und m/z 2211,11).

Die erhaltenen Massenspektren wurden mit den Kalibrierungsspektren der bekannten Mischungsproteine verglichen, um eine korrekte Identifikation des Proteins zu gewährleisten. Da der Massenspektrometer das m/z-Verhältnis misst, wurde der Wert mit der Ladung (z) multipliziert, um die Masse zu erhalten.

### **2.6.6 Proteinidentifizierung durch Peptidmassenmuster-Zuordnung**

Der Verdau des zu analysierenden Proteins ergibt durch die Sequenzspezifität der verwendeten Endoprotease ein Massenspektrum, das gleich einem Fingerabdruck (PMF, *Peptide Mass Fingerprint*) spezifisch für das zu analysierende Protein ist. Es wurde das Enzym Trypsin verwendet, welches an der C-terminalen Seite von den Aminosäuren Arginin und Lysin spaltet. Die fragmentierten Peptide wurden in eine für die Massenspektrometrie kompatible Lösung gebracht und vermessen. Das daraus resultierende Massenspektrum lieferte einen charakteristischen Peptidmassen-Fingerabdruck für dieses Protein. Die Spektren wurden kalibriert und die Peaks markiert. Die ermittelte Peptidmassentabelle wurde in ein Suchprogramm (Mascot, <http://www.matrixscience.com/>) eingegeben und über Proteindatenbanken identifiziert.

### **2.6.7 Proteinidentifizierung mit Hilfe der Datenbanken**

Die erhaltenen Peptidmassen wurden in Datenbanken gespeichert. Diese enthalten Massen, die durch eine theoretische Spaltung mit Trypsin errechnet wurden. Anhand des Vergleichs zwischen den erhaltenen Massen und den Datenbankmassen wurden die Proteine identifiziert.

In unserer Arbeit erfolgte die Durchsuchung der Datenbanksuchmaschine MASCOT, der Proteindatenbanken *Mass Spectrometry Protein Sequence Data Base* (MSDB) und *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) mit den folgenden Einstellungen: Spezies: Human; gesamter Massenbereich; gesamter pI-Bereich; Massengenauigkeit: Ca. 50 ppm; minimale Peptidmassenabweichung im mDa-Bereich; maximale Übereinstimmung der Sequenzen; höchst möglicher Trefferscore; maximale Intensität der Ionensignale; Spaltenzym: Trypsin; erlaubte mögliche Modifikation: Oxidation von Methionin und Veränderungen an Cysteinresten.

### **2.6.8 Elektrospray-Ionisation-Instrumente**

Neben der Peptidmassenmuster-Zuordnung existiert die Methode der Peptidsequenzierung mittels der Elektrospray-Ionisation. Diese erlaubt eine hochempfindliche Analyse und wurde in unserer Arbeit mittels eines Q-TOF-Analysators durchgeführt.

Die Vorbereitung der Proteinproben beinhaltete wie unter 2.5.1 und 2.5.2 die Verdauung im frischen Gel, die Entsalzung der Proben und für die Analyse die Lösung in 0,1%iger Ameisensäure. Ein Mikroliter der Probe wurde in ein Analysegläschen pipettiert und weiter auf eine analytische Säule (LC Packings, Dionex, CA, USA) geladen. Das Analysegerät arbeitete mit den folgenden Einstellungen: Positiver Ionenmodus; Peptidmassentoleranz von 50 ppm; Fragmenttoleranz von 100 multi mass unit.

Aus den bearbeiteten Proteinen resultierte ein Peptidgemisch. Dies wurde in gelöster Form in eine elektrische Nadel injiziert, die an einem Massenspektrometer angeschlossen war. Das Peptidgemisch wurde chromatographisch mit Hilfe eines Elutionsgradienten der analytischen Säule aufgetrennt. Als Eluenten dienten zwei Lösungen: Lösung A (5% ACN in 0,1%iger Ameisensäure) und Lösung B (95% ACN in 0,1%iger Ameisensäure). Um eine Elution in Reihenfolge ansteigender Hydrophobie der Peptide von der Säule zu erreichen, wurde der einstündige Elutionsvorgang zuerst mit 10% der Lösung B begonnen und anschließend mit 95%

der selben Lösung beendet. Am Ende der Trennsäule des Chromatographen wurden die Peptide von der Nanospraynadel mit 2 KV in ein bestehendes elektrisches Feld gesprüht. Die dabei entstandenen mehrfach geladenen Ionen wurden automatisch markiert und in den Quadrupolen eingelesen. In der Hexapolkollisionszelle wurden die Peptide fragmentiert und nach ihrer Flugzeit auf dem Detektor analysiert.

Die Datenakquirierung erfolgte mit MassLynx, Version 4.0 (Waters, Milford, MA, USA). Die erhaltenen Daten wurden mit der Proteindatenbanksuchmaschine MASCOT analysiert, durch die Durchsuchung der Proteindatenbanken MSDB und Swissprot.

## **2.7 Western-Blot-Analyse**

Zur Bestätigung der Ergebnisse der 2D-Gel-Elektrophorese wurden Western-Blot-Analysen nach einem modifizierten Protokoll von Towbin et al. (1979) durchgeführt.

Die Proteine, die davor in einer Trägermatrix (die SDS-PAGE) aufgetrennt wurden, wurden zuerst mit einem Polyacrylamid-Gel in Proteinbanden aufgetrennt. Beim Blotting wurde ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt. Somit wandern die Proteine aus dem Gel auf eine Membran aus Nitrozellulose. An der Membranoberfläche bleiben sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften. Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten, die Proteine sind aber für weitere Methoden zugänglich geworden (z.B. Antikörper-Bindung). Die Proteine können auf der Membran mit Hilfe spezifischer Antikörper identifiziert werden.

### **2.7.1 Vorbereitung der Proben für die SDS-Elektrophorese**

Die Proteinproben wurden, wie in Abschnitt 2.2.2 und 2.2.3 beschrieben, gewonnen. Für die Analyse wurden 30-60 µg Proteinlösung verwendet, welche mit Probenpuffer (125 mM Tris-HCl pH 6,8, SDS 4% (w/v), Glycerol 20% (v/v), Bromphenolblau 0,006 (v/v), Beta-Mercaptoethanol 2% (v/v)) auf 20 µl verdünnt wurde.

Zur Proteindenaturierung wurden die Proben für 10 min bei 97°C auf einem Kochblock (Dri-Block DB-20, Techne, Dublin, Irland) gekocht.

### 2.7.2 Vorbereitung der Minigele

Die SDS-Page für die Minigele wurde nach dem Protokoll von Laemmli (1970) durchgeführt.

Die Gele wurden in zwei Polymerisationsschritten in Gießkammern hergestellt. Zuerst wurde ein 10%iges Trenngel (Tab. 5) gegossen. Um eine gerade Geloberfläche zu bekommen, wurde das Gel mit Butanol übergossen.

**Tabelle 5:** Zusammensetzung des 10%-Trenngels pH 8,8

Komponenten der 10%-Trenngellösung pH 8,8	Menge
Wasser	20 ml
1,5 M Tris-HCl	12,5 ml
Acrylamid	16,5 ml
Entgasen für ca. 10 min	
SDS 10%	500 µl
APS 10%	250 µl
TEMED	24 µl

Nach Erreichen der erwünschten Polymerisation wurde das Butanol verworfen und auf dieses Gel ein 4%iges Sammelgel (Tab. 6) übergossen. Mit Hilfe eines Kunststoffkammes (Bio-Rad, München) wurden 8 Ladetaschen gebildet.

**Tabelle 6:** Zusammensetzung des 4%-Sammelgels pH 6,8

Komponenten der 4%-Sammelgellösung pH 6,8	Volumen
Wasser	12,2 ml
1,5 M Tris-HCl pH 6,8	6,25 ml
Acrylamid	3,3 ml
Entgasen für 5min	
SDS 10%	250 µl
APS 10%	125 µl
TEMED	25 µl

Nach ca. 30 min ist das Sammelgel vollständig polymerisiert. Der Kamm wurde entfernt und die Gele wurden danach in eine Elektrophoresekammer (Bio-Rad, München) montiert. Die Kammer wurde mit einfach konzentriertem Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Dies wurde aus verdünntem fünffach konzentriertem Elektrophoresepuffer (Tris 15 g, Glycerin 72 g, SDS 5 g, auf 1 l H<sub>2</sub>O auffüllen) hergestellt.

### 2.7.3 SDS-PAGE-Elektrophorese

5 µl eines Markers (Precision Plus Protein Standards, Bio-Rad, München) wurden verwendet, um den Elektrophorese-Lauf zu verfolgen und den Blotvorgang zu beurteilen. 20 µl von jeder Probe wurden in die Ladetaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde nach dem folgenden Protokoll (Tab. 7) durchgeführt:

**Tabelle 7:** Protokoll der SDS-PAGE-Elektrophorese

Zeit (min)	Spannung (V)
10	100
40	200

### 2.7.4 Tankblotting

Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Gele aus der Kammer entfernt und in die Blotzelle wie folgt eingebaut. Die dabei benötigten Nitrozellulosemembran (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) und Filterpapiere wurden davor für mindestens 15 min in einfach konzentriertem Transferpuffer (fünffach konzentrierter Transferpuffer: 950 mM Glycerin, 125 mM Tris, SDS 0,05% (w/v), Methanol 2% (v/v) auf 1L H<sub>2</sub>O auffüllen) inkubiert.

Die Blotzelle war während des Aufbaus der Lagen, mit der schwarzen Seite unten gelegen, in einfach konzentriertem Transferpuffer getaucht. Dann wurden, der Reihe nach, ein Vlies (Bio-Rad, München), zwei Filterpapiere (Bio-Rad, München), das Gel, die Nitrozellulosemembran, noch zwei Filterpapiere und ein Vlies aufgelegt. Anschließend wurde die Blotzelle verschlossen.

Während der Zusammenstellung der Blotzelle wurde darauf geachtet, dass zwischen den unterschiedlichen Schichten keine Luftblasen entstehen, und dass die Teile des Blots gut mit Transferpuffer getränkt sind, um den Stromfluss zu sichern.

Die Blotzelle wurde in die Blottingapparatur (XCell II™ Blot Module, Bio-Rad, München) montiert und mit einfach konzentriertem Transferpuffer vollständig aufgefüllt. Das Blotting wurde über Nacht bei 4°C und 30 Volt durchgeführt.

### **2.7.5 Färbung der Membran mit der Ponceau-S-Lösung**

Am nächsten Tag des Blottings wurde die Übertragung der Proteinbanden auf die Membran überprüft. Dafür wurde diese für 5 min in einer Ponceau-S-Lösung (0.2% Ponceau-S in 3%igem TCA) geschüttelt. Die Proteinbanden wurden durch eine Rosa-Färbung sichtbar. Danach wurde die Membran mit 5%iger Essigsäure wieder entfärbt und dann getrocknet.

### **2.7.6 Färbung der Gele mit der Coomassie-Blau-Lösung**

Die Coomassie-Brilliant-Blau-Färbelösung (Roti-Blue 20 ml, Methanol 40 ml, H<sub>2</sub>O 40 ml) wurde zur Überprüfung der Übertragung der Proteine vom Gel auf die Membran benutzt. Dafür wurden die Gele über Nacht in der Lösung angefärbt. Die Blaugefärbten Gele wurden für 5 min mit der Coomassie-Entfärbelösung entfärbt, um die nicht geblotteten Proteine zur Darstellung zu bringen.

### **2.7.7 Inkubation mit dem Antikörper**

Die Membranen wurden zunächst für 2 h bei 25°C mit Blockpuffer (Magermilchpulver 5% (w/v) in Waschpuffer pH 7,4) behandelt zur Vermeidung unspezifischer Antikörper-Bindungen. Das dabei benutzte Magermilchpulver dient der Absättigung der freien Bindungsstellen und wird vom Antikörper nicht erkannt. Anschließend wurde der spezifische Primärantikörper in einer bestimmten Konzentration in den Blockpuffer gegeben.

Folgende Primärantikörper wurden eingesetzt (Tab. 8):

**Tabelle 8:** Verdünnung der Primärantikörper

Antikörper	Konzentration
Anti-GRP94	1:1000
Anti-Cofilin	1:1000
Anti-ERP72	1:1000
Anti-GRP78	1:2000
Anti-ERP57	1:1500
Anti-Vimentin (Maus)	1:5000

## Material und Methoden

---

Anti-FIN	1:2500
Anti-PRDX2	1:1500
Anti-STMN1	1:1000
Anti-ACTA2	1:2000
Anti-TPI1	1:1500
Anti- $\beta$ -Aktin	1:5000

Die im Blockpuffer und Primärantikörper inkubierten Membranen wurden für eine Stunde bei 37°C geschwenkt.

Es folgten danach 3 Waschgänge für jeweils 10 min mit Waschpuffer pH 7,5 (Tween-20 0,1% (v/v), 10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl) bei 37°C. Anschließend wurde der Sekundärantikörper, mit einer bestimmten spezifischen Konzentration, in den Blockpuffer gegeben und für eine Stunde bei 37°C auf einem Schwenker inkubiert. Dabei bindet der Sekundärantikörper an den Primärantikörper und bilden zusammen einen Komplex, der später mit Chemilumineszenzfarbstoff (Perkin Elmer Inc, Boston, MA, USA) detektiert wird.

Die folgenden Sekundärantikörper wurden eingesetzt (Tab. 9):

**Tabelle 9:** Verdünnung der Sekundärantikörper

Antikörper	Verdünnung
Anti-Maus	1:1500
Anti-Kaninchen	1:10000

Nach der Inkubationszeit mit dem entsprechenden Sekundärantikörper folgten wieder 3 Waschgänge für jeweils 10 min mit Waschpuffer pH 7,5 bei 37°C. Zur Detektion des Antikörper-Antigen-Komplexes wurden die Blotmembranen für 1-2 min in 2 ml Chemilumineszenzfarbstoff inkubiert. Anschließend wurden die Membranen, um Luftblasen zu vermeiden, in eine Klarsichtfolie gelegt und in eine Filmkassette überführt. In der Dunkelkammer wurde ein Röntgenfilm (Kodak, Hohenbrunn) auf die Membranen gelegt und mit wechselnden Standardexpositionszeiten (1 min, 3 min, 5 min, 10 min und 20 min, bei Bedarf entsprechend länger oder kürzer) in der Entwicklungsmaschine (Konica SRX-101 A, Taipei City, Taiwan) entwickelt.

### **2.7.8 Auswertung der Western-Blot-Analysen**

Die Analyse der verschiedenen Banden des Western-Blots erfolgte mit dem Programm Multi-Analyst Version 1.1 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) nach dem Protokoll des Herstellers. Dabei entspricht die Bandenschwärzung auf dem Film der aufgenommenen Lichtintensität und ist abhängig von der gebundenen Antikörpermenge. Zur Zuordnung des Molekulargewichtes der Detektionsbande wurde der Film auf die Membran gelegt. Dabei wurden die den Farben entsprechenden Gewichte auf den Film manuell übertragen.

Die Western-Blots wurden im *scan white light*-Modus mit der Filtereinstellung *clear* und einer Einleseweite von 300 mm mit der Software Fluor-S-Multimanager (Bio-Rad, München) eingelesen.

Nach Subtraktion des Hintergrundes, ermittelte die Software automatisch die unterschiedlichen Intensitäten der verschiedenen Banden.

### **2.7.9 Behandlung der Blotmembranen für eine weitere Verwendung**

Für den Fall, dass die Membranen nochmal verwendet werden sollten, mussten die Antikörper daraus entfernt werden. Dafür wurden die Membranen zweimal für 15 min bei 37°C in Waschpuffer pH 7,5 (Tween-20 0,1% (v/v), 10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl) gewaschen und dann für 30 min bei 50°C in einer Elutionslösung pH 6,7 (Tris-HCl 100 ml, SDS 2 g, Mercaptoethanol 680 µl) auf einem Schwenker inkubiert. Danach wurden die Membranen erneut zweimal für 15 min bei 37°C in Waschpuffer pH 7,5 gewaschen. Nach diesem Schritt wurden die Membranen bis zum Einsatz neuer Antikörper in Blockpuffer (Magermilchpulver 5% (w/v) in Waschpuffer) aufbewahrt. Die wiederholte Verwendung der gleichen Membranen ist nur einmal möglich, danach müssen sie verworfen werden.

## **2.8 Die indirekte Immunfluoreszenzfärbung**

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung wurde die Expression und die Lokalisation der Proteine innerhalb der Zellen analysiert.

Für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung wurden die nichtfibrotischen Nierenfibroblasten (TK173), die fibrotischen Nierenfibroblasten (TK188) und die Nierenfibroblasten, welche dem osmotischen Stress mit NaCl ausgesetzt waren (TK173-NaCl), jeweils in 16 Kammern über Nacht angezchtet. Am nächsten Tag

## Material und Methoden

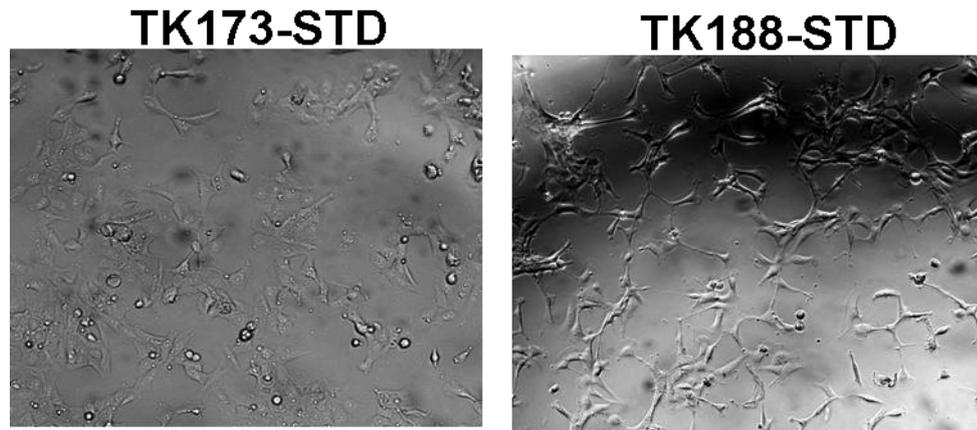
---

wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Die Fixation der Zellen wurde für 15 min bei Raumtemperatur mit 4% Paraformaldehyd in PBS-Puffer ausgeführt. Nach Permeabilisierung der Zellen für 1 min mit 0,1% Triton X-100 in PBS-Puffer wurden die fixierten Zellen für 30 min in 1%-BSA-Lösung und PBS-Puffer inkubiert, um eine unspezifische Antikörperbindung zu verhindern. Die Zellen wurden danach mit dem entsprechenden Primärantikörper über Nacht inkubiert. Es erfolgten drei Waschgänge mit PBS-Puffer für jeweils 10 min. Anschließend wurden die Zellen für 60 min mit dem Sekundärantikörper in 1%-BSA-Lösung und PBS-Puffer bei Raumtemperatur in einem dunklen Raum inkubiert. Danach wurde wieder dreimal mit PBS-Puffer für jeweils 10 min gewaschen. Um eine Zellkernkontrastierung zu erreichen, wurden die Proben für 5 min mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (Diamidinophenylindol) in PBS-Puffer gefärbt. Anschließend wurden die Proben an einem Immunfluoreszenz-Mikroskop (Axiophot, Zeiss, Göttingen) mit der AnalySIS Software (Soft Imaging Systems, Leinfelden) ausgewertet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 TK173- und TK188-Zelllinien als in-vitro-Modelle für die interstitielle Fibrose

Das genaue Erforschen des Mechanismus, welcher der Nierenfibrose unterliegt, erfordert geeignete in-vitro-Zellmodelle. Das Fehlen solcher in-vitro-Modelle ist zum größten Teil für das langsame Fortschreiten der Forschung in diesem Gebiet und die zähe Entwicklung effektiver anti-fibrotischer Medikamente verantwortlich. Unserer Arbeitsgruppe ist es gelungen, zwei humane Zelllinien als Modell für die interstitielle Nierenfibrose zu etablieren. Die beiden Zelllinien wurden durch Immortalisierung von Fibroblasten aus einer normalen Spenderniere (TK173) und aus einer Niere mit interstitieller Fibrose (TK188) durch Transfektion mit einem codierenden Plasmid für SV 40 large Ti Antigen etabliert. Die immortalisierten Zelllinien besitzen die selben morphologischen und Differenzierungseigenschaften wie die primären unverwandten Nierenfibroblasten (Abb. 5) (Müller et al. 1995). Die TK188 exprimieren, im Vergleich zu TK173, Myofibroblastenmarker wie Vimentin, *alpha smooth muscle actin* und Desmin. Außerdem zeigen die TK188 signifikante Unterschiede in der Proliferationsrate. Daraus resultiert ein hyperproliferatives Wachstum. Diese Zellen können Proteine ins Medium sezernieren oder vorhandene Serumfaktoren, welche eine Hyperproliferation in normalen dermalen Fibroblasten induzieren, modifizieren. Zusätzlich produzieren die TK188 vier bis fünf Mal mehr Kollagen pro Zelle als die TK173. Die relativen Mengen der produzierten Kollagentypen (Typ I, III und IV) unterscheiden sich wesentlich von denen einer TK173 (Rodemann und Müller 1991). Somit diene dieses in-vitro-Zellsystem als hilfreiches Modell in vielen Laboren zum Erläutern der Grundmechanismen, welche die Induktion und Progression der Nierenfibrose in vivo auslösen (Strutz et al. 2002, Heeg et al. 2005).



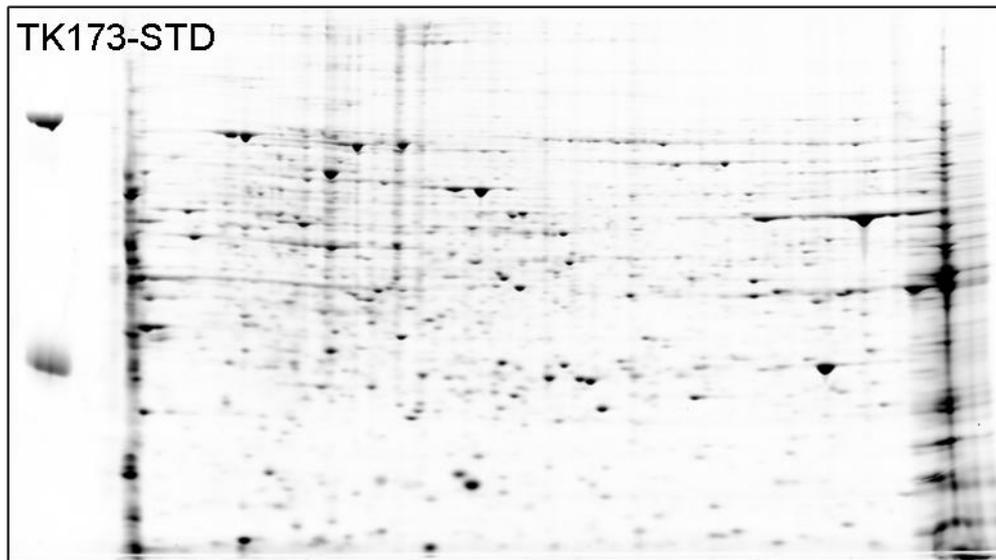
**Abbildung 5:** TK173- und TK188-Zellen unter Standardbedingungen: Lichtmikroskopische Aufnahmen (400 x vergrößert) von TK173- und TK188-Zellen in Kultur unter Standardbedingungen in modifiziertem D-MEM-Nährmedium.

## **3.2 Die proteomische Charakterisierung der TK173- und TK188-Zelllinien mit anschließender Identifizierung von Proteinmarkern für die Zelltransformation**

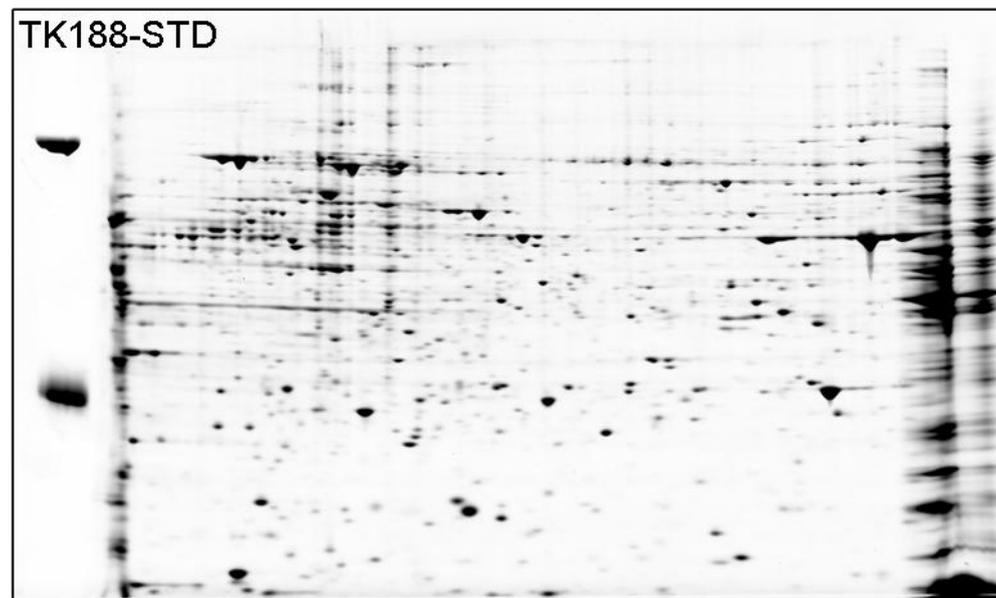
### **3.2.1 Etablierung zweier dimensionaler Proteinprofile von TK173 und TK188 mittels zweidimensionaler Gel-Elektrophorese**

Die Zelllinien TK173 und TK188 bilden ein hervorragendes in-vitro-Modell für den Phänotyp der renalen interstitiellen Fibrose (RIF) und dienen damit zur Identifizierung von neuen molekularen Faktoren und Mechanismen, die mit der RIF assoziiert sind. Eine vergleichende Analyse der Proteome beider Zelllinien konnte wertvolle Informationen über die Mechanismen der RIF liefern. Dazu wurden Zellextrakte aus TK173 und TK188 präpariert und mittels 2D-Gel-Elektrophorese, entsprechend Standardprotokollen wie unter 2.3 beschrieben, aufgetrennt. Die Proteinexpressionsmuster der beiden Zelllinien wurden mittels PD Quest V6.2.1-Software miteinander verglichen. Zweidimensionale Proteinkarten entstanden aus der Analyse der Proteinextrakte in den pH-Bereichen 3-10, 5-8, 3-6. Mehr als 2500 Proteinspots wurden in jeder Zelllinie, unter Verwendung von 20000 Pixels als Filtergrenze, identifiziert. Das Pixelvolumen von jedem Spot diente als Basis für den Vergleich zwischen den beiden Zelllinien. Die in Abbildung 6 dargestellten Gele pH 5-8 geben ein repräsentatives Bild der zweidimensionalen Gelelektrophoresen der Gesamtzelllysate von TK173 (Abb. 6 A) und TK188 (Abb. 6 B) wieder.

A



B



**Abbildung 6:** 2D-SDS-PAGE-Analyse der Proteinextrakte aus TK173 (A) und TK188 (B): TK173 und TK188 kultiviert unter Standardbedingungen wurden aus den Kulturflaschen geerntet und in Lysepuffer lysiert. 150 µg Protein wurden auf einem IPG-Streifen pH 5-8 (Bio-Rad) fokussiert und auf einem 12%-Bis-Tris-Gel (Criterion®, Bio-Rad) aufgetrennt. Zur Visualisierung wurde das Gel fixiert und mit Flamingo®-Färbelösung (Bio-Rad) gefärbt. Die Gele aus den jeweiligen Zellen sind dargestellt: (A) TK173; (B) TK188.

### 3.2.2 Massenspektrometrische Analyse der tryptischen Spaltprodukte

#### 3.2.2.1 Identifizierung der Proteine aus TK173- und TK188-Zellproteom

Mit dem Ziel, einen Einblick in die Proteine der beiden analysierten Fibroblasten zu bekommen, wurden die Zellen (TK173 und TK188) abtrypsinisiert, mehrmals in PBS-Puffer gewaschen und anschließend in Lysepuffer lysiert. Die verschiedenen

## Ergebnisse

---

Zelllysate wurden mittels 2D-SDS-PAGE analysiert. Die getrennten Proteinspots wurden manuell aus dem frischen Gel ausgeschnitten, enzymatisch mit Trypsin gespalten und für die massenspektrometrische Analyse, wie unter 2.5 beschrieben, vorbereitet. Anschließend wurde, wie unter 2.6 beschrieben, mittels MALDI-TOF-MS (Voyager DE-STR, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) der Massenfingerprint ermittelt oder mittels Q-TOF Ultima (Ultima Global, Micromass, Manchester, UK) die Peptidsequenz entschlüsselt. Die anschließende Datenbanksuche ermöglichte die Identifizierung von insgesamt 132 Proteinen (Tab. 10). Zusätzlich zu den Proteinamen gibt Tabelle 10 Informationen über die Molekülmasse, den isoelektrischen Punkt und den Wert der Übereinstimmung zwischen gemessenen und theoretisch errechneten Peptidmassen „*Match*“ und die Trefferquote „*Score*“ an.

## Ergebnisse

**Tabelle 10:** Liste aller identifizierten Proteine aus TK173- und TK188-Proteom gemessen mit MALDI-TOF-MS und ESI-MS/MS. Die Proteinidentifizierung erfolgte über Datenbankvergleich.

	Proteinname	Gencode	Zugangsnummer Swiss Prot	Molekülmasse	PMF-Score	PMF-Sequenz-Abdeckung	MS/MS-Score	MS/MS-Sequenz-Abdeckung	ESI-MS/MS-Score	Anzahl sequenzierter Peptide
1	14-3-3 protein epsilon	<b>YWHAE</b>	P62258	29155	160				310	8
2	14-3-3 protein zeta/delta	<b>YWHAZ</b>	P63104	29929	156				344	9
3	14-3-3 protein eta	<b>YWHAH</b>	Q04917	28070					239	6
4	Alanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	<b>AARS</b>	P49588	106734	105					
5	Alpha-actinin-4	<b>ACTN4</b>		104788	120					
6	Actin, cytoplasmic 2	<b>ACTG1</b>	P63261	41635	124	62	271	15	338	12
7	Actin, cytoplasmic 2	<b>ACTG1</b>	P63261	41635	124	62	271	15	585	28
8	Actin, cytoplasmic 1	<b>ACTB</b>	P60709	41737	160	68			650	30
9	Alcohol dehydrogenase [NADP+]	<b>AKR1A1</b>	P14550	36573	108	54				
10	Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase	<b>ALDH7A1</b>	P49419	55200					180	3
11	Annexin A1	<b>ANXA1</b>	P04083	38690					939	33
12	Annexin A2	<b>ANXA2</b>	P07355	38449					828	23
13	Annexin A5	<b>ANXA5</b>	P08758	35914					432	13
14	Annexin A6	<b>ANXA6</b>	P08133	75695					781	22
15	ANP32A protein	<b>ANP32A</b>	Q6PKH8	24053					571	16
16	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member	<b>ANP32B</b>	Q92688	28770					442	11
17	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	<b>ATP5A1</b>	P25705	59714					273	8
18	V-type proton ATPase catalytic subunit	<b>ATP6V1A</b>	P38606	68260					162	4

## Ergebnisse

<b>19</b>	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	<b>ATIC</b>	P31939	64575					162	8
<b>20</b>	Calponin-2	<b>CNN2</b>	Q99439	33697	129	65				
<b>21</b>	Calreticulin	<b>CALR</b>	P27797	48112					824	21
<b>22</b>	Calumenin	<b>CALU</b>	O43852	37054					89	3
<b>23</b>	F-actin-capping protein subunit alpha-1	<b>CAPZA1</b>	P52907	32923	85	55			80	7
<b>24</b>	T-complex protein 1 subunit theta	<b>CCT8</b>	P50990	59621	145	49	188	10		
<b>25</b>	T-complex protein 1 subunit epsilon	<b>CCT5</b>	P48643	43004	168	39			130	6
<b>26</b>	Cofilin-1	<b>CFL1</b>	P23528	18491	83			36	304	
<b>27</b>	Collagen alpha-1(I) chain	<b>COL1A1</b>	P02452	138911					250	13
<b>28</b>	Collagen alpha-1(IV) chain	<b>COL4A1</b>	P02462	160615					356	16
<b>29</b>	Class IVb beta tubulin		Q8IWP6	49721					814	38
<b>30</b>	Desmin	<b>DES</b>	P17661	53536					245	7
<b>31</b>	Elongation factor 1-alpha 1	<b>EEF1A1</b>	P68104	50141					1554	25
<b>32</b>	Elongation factor 2	<b>EEF2</b>	P13639	95146					1413	34
<b>33</b>	EF-hand domain-containing protein D2	<b>EFHD2</b>	Q96C19	26680					242	4
<b>34</b>	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	<b>EIF5a</b>	P63241	16821	108	80			209	19
<b>35</b>	Alpha-enolase	<b>ENO1</b>	P06733	47008	192	51			1229	30
<b>36</b>	Beta-enolase	<b>ENO3</b>	P13929	46826			85	10	157	3
<b>37</b>	Endoplasmic reticulum protein ERp29	<b>HSP90B1</b>		92411	160				1122	24
<b>38</b>	Endoplasmic reticulum protein ERp29	<b>ERP29</b>	P30040	28993	98	45				
<b>39</b>	S-formylglutathione hydrolase	<b>ESD</b>	P10768	31500					438	19
<b>40</b>	Fumarate hydratase, mitochondrial	<b>FH</b>	P07954	54637					562	15
<b>41</b>	Far upstream element-binding protein 1	<b>FUBP1</b>	Q96AE4	67431					363	9

## Ergebnisse

<b>42</b>	Far upstream element-binding protein 2	<b>KHSRP</b>	Q92945	73146	156	56				
<b>43</b>	Fibronectin	<b>FN1</b>	P02751	262607					425	14
<b>44</b>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<b>GAPDH</b>	P04406	35899	113			19		
<b>45</b>	Glutathione synthetase	<b>GSS</b>	P48637	52385	163					
<b>46</b>	Glutathione S-transferase P	<b>GSTP1</b>	P09211	23210					598	15
<b>47</b>	Heme-binding protein 1	<b>HEBP1</b>	Q9NRV9	21097					38	2
<b>48</b>	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	<b>HNRNPC</b>	P07910	33667	136	16			386	13
<b>49</b>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	<b>HNRNPH1</b>	P31943	49099					191	5
<b>50</b>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2/H1	<b>HNRNPH2</b>	P55795	49264	117	45	111	11		
<b>51</b>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3	<b>HNRNPH3</b>	P31942	36926	156	55				
<b>52</b>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	<b>HNRPAB</b>	Q99729	36225	130	54			156	6
<b>53</b>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	<b>HNRNPL</b>	P14866	64133	161	60				
<b>54</b>	Heat shock 70 kDa protein 4	<b>HSPA4</b>	P349326	94240	167		33	4		
<b>55</b>	78 kDa glucose-regulated protein	<b>GRP78/ HSPA5</b>	P11021	70888	248		293	10	155	10
<b>56</b>	Heat shock cognate 71 kDa protein (Heat shock 70 kDa protein 8)	<b>HSPA8</b>	P11142	64673	129				484	10
<b>57</b>	Heat shock 70 kDa protein 1	<b>HSPA1A</b>	P08107	70052	104					
<b>58</b>	Heat shock protein beta-1	<b>HSPB1</b>	P04792	22783	152	75				
<b>59</b>	Heat shock protein 90 kDa beta member 1	<b>GRP94/ HSP90B1</b>		92469	126				555	13
<b>60</b>	Stress-70 protein, mitochondrial	<b>HSPA9</b>	P38646	73635	161	42	311	11	375	12
<b>61</b>	Heat shock 70kD protein 9B	<b>HSPA9</b>	Q8N1C8	73808					571	8
<b>62</b>	Heat shock 70 kDa protein 6	<b>HSPA6</b>	P17066	71028					203	6

## Ergebnisse

<b>63</b>	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	<b>HSPD1</b>	P10809	61016	291	70			796	21
<b>64</b>	Hypoxia up-regulated protein 1	<b>HYOU1</b>	Q9Y4L1	111268					1127	33
<b>65</b>	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	<b>IMPDH2</b>	P12268	55770	126	35			817	24
<b>66</b>	Far upstream element-binding protein 2	<b>KHSRP</b>	Q92945	73146	232	70	108	5		
<b>67</b>	Keratin, type II cytoskeletal 8	<b>KRT8</b>	P05787	53704	145	40				
<b>68</b>	Keratin, type II cytoskeletal 7	<b>KRT7</b>	Q3KNV1	51387					978	16
<b>69</b>	Keratin, type I cytoskeletal 10	<b>KRT10</b>	P13645	58853					325	11
<b>70</b>	Keratin, type I cytoskeletal 18	<b>KRT18</b>	P05783	48058					1014	18
<b>71</b>	Cytosol aminopeptidase	<b>LAP3</b>	P28838	52607					360	10
<b>72</b>	LIM and SH3 domain protein 1	<b>LASP1</b>	Q14847	29,717	96	60	82	14	235	9
<b>73</b>	L-lactate dehydrogenase B chain	<b>LDHB</b>	P07195	36615					322	10
<b>74</b>	Galectin-1	<b>LGALS1</b>	P09382	14716	91	70			230	9
<b>75</b>	Lamin-A/C	<b>LMNA</b>	P02545	65096					376	11
<b>76</b>	Lamin-B1	<b>LMNB1</b>	P20700	66,408	139	54	69	6		
<b>77</b>	Mannose-6-phosphate receptor-binding protein 1	<b>M6PRBP1</b>	O60664	47047	163					
<b>78</b>	Myosin-7	<b>MYH7</b>	P12883	73355					359	8
<b>79</b>	Myosin-9	<b>MYH9</b>	P35579	226392					2375	63
<b>80</b>	Myosin-3	<b>MYH3</b>	P11055	223898					156	2
<b>81</b>	Nucleoside diphosphate kinase A	<b>NME1</b>	Q50KA9	17180	102	58	123	27		
<b>82</b>	Nucleophosmin	<b>NPM1</b>	P06748	32575	113	50	265	22		
<b>83</b>	Protein disulfide-isomerase	<b>P4HB</b>	P07237	57081	212	53			550	16
<b>84</b>	Protein DJ-1	<b>PARK7</b>	Q994970	19878	153	61	137	30	37	5

## Ergebnisse

<b>85</b>	Plastin-3	<b>PLS3</b>	P13797	70391						553	13
<b>86</b>	Poly(rC)-binding protein1	<b>PCBP1</b>	Q15365	37498	212	77	265	19			
<b>87</b>	Protein disulfide-isomerase A3	<b>ERP57/PDIA3</b>	P30101	56761						454	13
<b>88</b>	Protein disulfide-isomerase A4	<b>ERP72/PDIA4</b>	P13667	70854						1576	22
<b>89</b>	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	<b>PEBP1</b>	P30086	20913	130	80	224	32		220	9
<b>90</b>	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	<b>PHGDH</b>	O43175	56614						608	19
<b>91</b>	Phosphoglycerate mutase 1	<b>PGAM1</b>	P18669	28786	153					65	2
<b>92</b>	PHB protein	<b>PHB</b>	Q6FHP5	29814						368	13
<b>93</b>	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	<b>G6PD</b>	P11413	59097						127	6
<b>94</b>	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	<b>PHGDH</b>	O43175	56614						608	21
<b>95</b>	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	<b>PKM2</b>	P14618	57769				9		738	18
<b>96</b>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	<b>PPIA</b>	P62937	18001						496	23
<b>97</b>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A	<b>FKBP1A</b>	P62942	18001						512	
<b>98</b>	Peroxiredoxin-1	<b>PRDX1</b>	Q06830	22096	138	68	184	19			
<b>99</b>	Peroxiredoxin-2	<b>PRDX2</b>	P32119	18315	140	53		22		319	11
<b>100</b>	Peroxiredoxin-6	<b>PRDX6</b>	P30041	24888	163						
<b>101</b>	Proteasome subunit alpha type-6	<b>PSMA6</b>	P60900	27382	79					21	
<b>102</b>	Proteasome subunit beta type-2	<b>PSMB2</b>	P49721	22836	66	29	64	13			
<b>103</b>	Proteasome subunit alpha type-3	<b>PSMA3</b>	P25788	28433	101	53	216	30			
<b>104</b>	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 3	<b>PTPN3</b>	A0AUW9	103990						127	13
<b>105</b>	Protein SET	<b>SET</b>	Q01105	32115	112						
<b>106</b>	GTP-binding nuclear protein Ran	<b>RAN</b>	P62826	24423	109	50	233	27			

## Ergebnisse

<b>107</b>	60S acidic ribosomal protein P0	<b>RPLP0</b>	P05388	34252					176	4
<b>108</b>	RuvB-like 2	<b>RUVBL2</b>	Q9Y230	51125					1064	21
<b>109</b>	RuvB-like 1	<b>RUVBL1</b>	Q9Y265	50228	205	75				
<b>110</b>	Protein S100-A11	<b>S100A11</b>	P31949	11740	125	70				
<b>111</b>	Reticulocalbin-1	<b>RCN1</b>		38866	173					
<b>112</b>	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	<b>SOD1</b>	P00441	15936	85	39	171	24		
<b>113</b>	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	<b>SOD2</b>	P04179	24707	115	69			289	17
<b>114</b>	Splicing factor, arginine/serine-rich 2	<b>SFRS2</b>	Q01130	25429					139	2
<b>115</b>	Hsc70-interacting protein	<b>ST13</b>	P50502	41332					115	4
<b>116</b>	Stress-induced-phosphoprotein 1	<b>STIP1</b>	P31948	62599	70	30			227	10
<b>117</b>	Stathmin	<b>STMN1</b>	P16949	17161	40	30			497	31
<b>118</b>	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	<b>STRAP</b>	Q9Y3F4	38414					93	3
<b>119</b>	Transketolase	<b>TKT</b>	P29401	58174					453	11
<b>120</b>	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	<b>VCP</b>		89135	179					
<b>121</b>	Triosephosphate isomerase	<b>TPI1</b>	P60174	26522	104				504	15
<b>122</b>	Tropomyosin alpha-1 chain	<b>TPM1</b>	P09493	26573	171	19	57	10	93	8
<b>123</b>	Tropomyosin alpha-3 chain	<b>TPM3</b>	P06753	28792	100		135	14		
<b>124</b>	Tropomyosin alpha-4 chain	<b>TPM4</b>	P67936	28504	172		123	18	237	15
<b>125</b>	Tubulin alpha-1B chain	<b>TUBA1B</b>	Q8WU19	37194	101	28	240	13		
<b>126</b>	Tubulin beta-2B chain	<b>TUBB2B</b>	Q9BVA1	49554	146	56	114	8		
<b>127</b>	Tubulin beta-7 chain	<b>TUBB7</b>	B4DMU8	49639					923	42
<b>128</b>	Netrin receptor UNC5B	<b>UNC5B</b>	Q8IZJ1	103576					105	4

## Ergebnisse

---

<b>129</b>	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L	<b>UCHL1</b>	P09936	23012	319	12
<b>130</b>	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolo	<b>VAT1</b>	Q99536	41431	253	4
<b>131</b>	Vimentin	<b>VIM</b>	P08670	53522	736	18
<b>132</b>	Vinculin	<b>VCL</b>	P18206	123591	1131	23

PMF: Peptide Mass Fingerprint, MS/MS Score: Trefferquote

### 3.2.2.2 Identifizierung der unterschiedlich exprimierten Proteine zwischen TK173- und TK188-Zellen

Um die Veränderungen in der Proteinexpression, welche die Aktivierung von Fibroblasten und ihre Transformation begleiten, hervorzuheben, wurde die 2D-Gel-Elektrophorese bei den beiden Zelllinien durchgeführt. Mit dem Ziel, Proteine zu identifizieren, die zum Verständnis des Pathomechanismus der Fibrose beitragen können, wurden die Proteinmuster aus den TK173 und TK188 mittels PD Quest V6.2.1-Software miteinander verglichen. Die 2D-Gele wiesen Gemeinsamkeiten auf, aber auch große Unterschiede (Abb. 7). Der Vergleich des Expressionsmusters aller identifizierten Proteine aus beiden Zelllinien ergab eine differentielle Expression von 43 Proteinen ( $P < 0,05$ ), zusammengefasst in Tabelle 11. Abbildung 7A zeigt die Position einiger differentiell exprimierten Proteine auf einem 2D-Gel aus TK188. Eine genaue Betrachtung mit quantitativem Vergleich der einzelnen Proteine ist in Abbildung 7B dargestellt. Hier wurden Proteine ausgewählt, die als bekannte Fibrosemarker der Fibrose dienen, wie Fibronectin, Vimentin und Keratin 10, sowie andere Proteine, die als ER-Stress-Proteine bekannt sind. Alle dargestellten Proteine sind in TK188 in größeren Mengen als in TK173 synthetisiert.

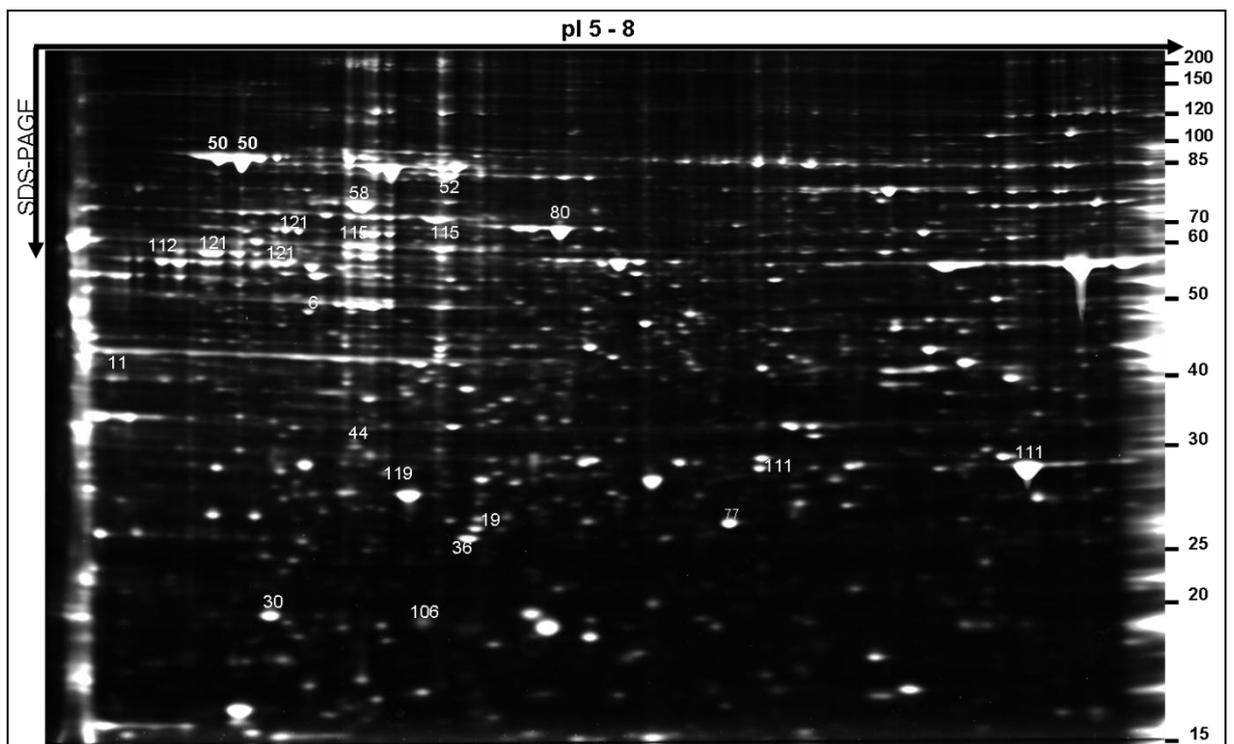
**Tabelle 11:** Die unterschiedlich exprimierten Proteine zwischen TK188 und TK173. Die Proteine sind mit Namen, isoelektrischem Punkt, Molekülmasse und Massenspektrometrie-Score aufgelistet.

Spot	Proteinname	Genname	Molekülmasse	Expressionslevel	pI	MS/MS-Score
1	Aldehyde dehydrogenase	ALDH2	55200	2,1	6,63	180
2	Alpha smooth muscle actin	ACTA2	41635	5,0	5,24	814
3	Annexin A1	ANXA1	38690	2,1	6,57	939
4	Annexin A2	ANXA2	38449	2,5	7,57	1492
5	Annexin A5	ANXA5	35914	2,6	4,94	537
6	Calreticulin	CALR	48142	2,2	4,29	230
7	78 kDa glucose-regulated protein	GRP78	70888	2,6	5,07	946
8	Cofilin-1	CFL1	18491	2,0	8,22	304
9	Collagen alpha-1(I) chain	COL1A1	138911	2,5	5,60	250
10	Collagen alpha-1(IV) chain	COL4A1	160615	3,1	8,55	356
11	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	HSPD1	61055	2,8	5,70	1617
12	Desmin	DES	53536	2,8	5,21	245
13	Fibronectin	FIN	262607	2,0	5,46	425
14	Elongation factor 1-alpha 1	EEF1A1	50141	2,4	9,10	1554
15	Fumarate hydratase mitochondrial	FH	54602	4,0	8,85	562
16	Glutathione S-transferase P	GSTP1	23210	3,0	5,43	598
17	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	HNRNPH1	49099	3,4	5,89	504

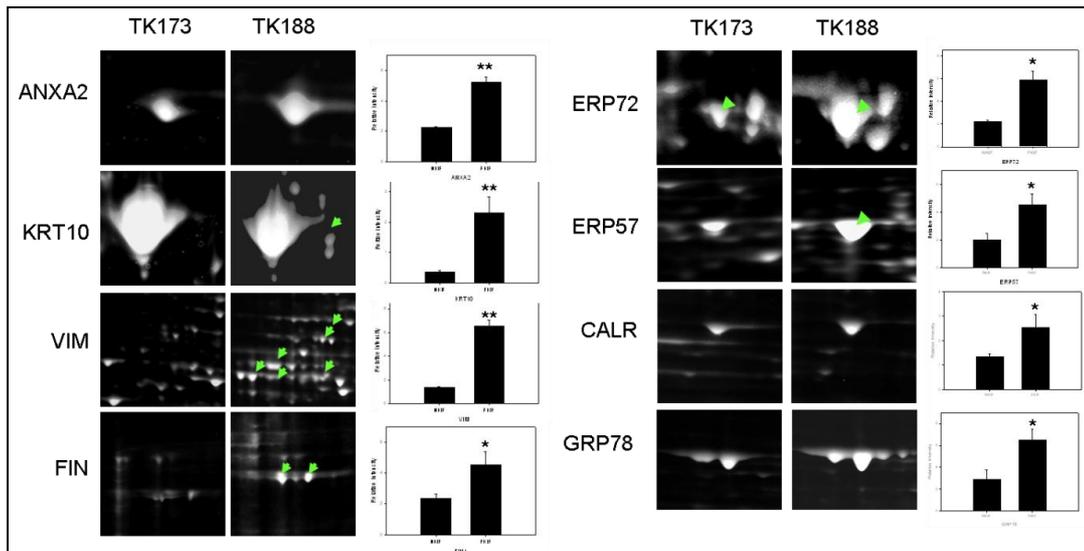
## Ergebnisse

18	Heat shock protein 90 kDa beta member 1	GRP94	92469	2,4	4,76	550
19	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	IMPDH2	55770	2,0	6,44	817
20	Plastin-3	PLS3	70391	2,5	5,41	553
21	Keratin, type II cytoskeletal 7	KRT7	51387	3,2	5,42	978
22	Keratin, type I cytoskeletal 18	KRT18	47897	2,6	5,34	1014
23	Keratin, type I cytoskeletal 10	KRT10	59511	4,0	5,13	325
24	Non-muscle myosin heavy polypeptide 9	MYH9	226392	2,6	5,50	2375
25	Hypoxia up-regulated 1	HYOU1	111266	3,2	5,16	1127
26	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A	FKBP1A	18001	3,0	7,89	512
27	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	PHGDH	56614	2,5	6,29	608
28	Protein disulfide-isomerase A3	ERP57	56761	2,5	5,98	1328
29	Protein DJ-1	PARK7	19878	2,8	6,33	137
30	Peroxiredoxin 1	PRDX1	22096	2,7	8,27	184
31	Peroxiredoxin 2	PRDX2	22049	2,3	5,66	152
32	Peroxiredoxin 6	PRDX6	24888	2,7	6,00	163
33	Protein disulfide isomerase A4	ERP72	70854	3,0	4,96	1576
34	RuvB-like 1 protein	RUVBL1	51125	2,3	6,02	281
35	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	SOD1	15936	2,1	5,70	171
36	Stathmin	STMN1	17161	2,0	5,76	491
37	Stress-induced-phosphoprotein 1	STIP1	62599	2,9	6,40	1160
38	Translation initiation factor eIF-5A	EIF5A	16821	2,0	5,07	209
39	Triosephosphate isomerase	TPI1	26522	3,1	6,45	863
40	Tubulin alpha-1A chain	TUBA1A	50104	2,8	4,94	480
41	Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase isozym L1	UCHL1	23012	2,6	5,33	319
42	Vimentin	VIM	53652	4,0	5,06	736
43	Vinculin (Metacinculin)	VCL	123591	2,1	5,50	1131

**A**



B



**Abbildung 7:** Differenziell exprimierte Proteine zwischen TK173 und TK188. A: 2D-Gel-Elektrophorese von Proteinextrakten aus TK188-Zellen: Proteine, die in beiden Zelllinien unterschiedlich exprimiert sind, sind mit Zahlen markiert, wie in Tabelle 10 aufgelistet. B: Vergrößerte Gelausschnitte, die einige differenziell exprimierte Proteine zwischen TK173- und TK188-Zellen zeigen. Die Quantifizierung der Proteinexpression ist als Balkendiagramm wiedergegeben. Die y-Achse zeigt die relative Intensität des Spots, die x-Achse den entsprechenden Gennamen. Jeder Balken gibt den Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen an. (\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ )

Eine funktionelle Analyse der Proteine zeigte, dass die identifizierten Proteine mit unterschiedlichen biologischen Funktionen assoziiert sind (Tab. 12). Interessanterweise konnte ein großer Teil dieser Proteine, welche zwischen TK173 und TK188 unterschiedlich exprimiert wurden, in zwei Kategorien klassifiziert werden. Die erste Kategorie umfasst Proteine, die in Zusammenhang mit der Fibrogenese beschrieben wurden (z.B. FIN, ACTA2, VIN, DES, VIM und KRT). Die zweite und interessantere Kategorie umfasst Proteinmarker des ER-Stress- und „*Unfolded protein response*“ (UPR)-Pathway (GRP78, GRP94, ERP57, ERP72, PDI und CALR) sowie Proteine des oxidativen Stress-Pathway (PRDX1, PRDX2, PRDX6, SOD, PARK7 und *hypoxia up-regulated 1*). Diese waren in TK188 hochreguliert.

**Tabelle 12:** Die unterschiedlich exprimierten Proteine nach Funktion aufgelistet und in Kategorien klassifiziert.

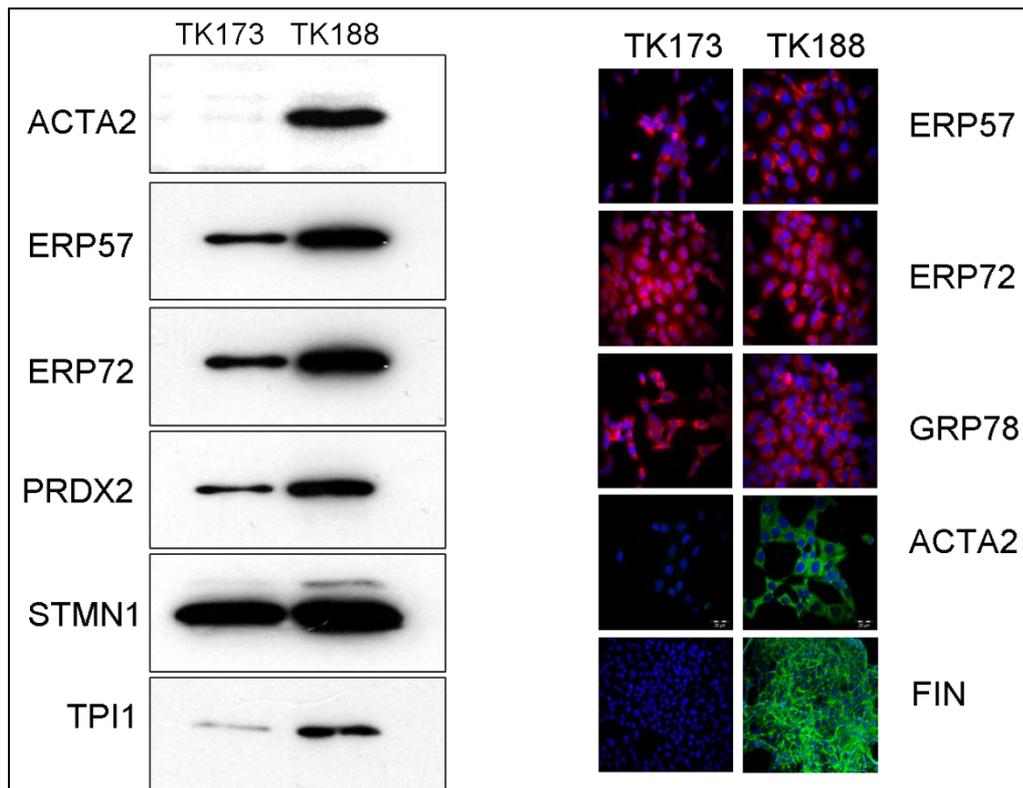
Kategorie	Proteinname	Funktion
Strukturproteine Fibrosemarker	Alpha smooth muscle actin	Zellstruktur und Motilität
	Kollagen I, IV	Extrazelluläre Matrix
	Desmin	Intermediäre Filamente
	Fibronectin	Extrazelluläre Matrix
	Vimentin	Intermediäre Filamente

## Ergebnisse

Proteine des oxidativen Stresses	Peroxiredoxin 1,	Involviert in Redox-Regulation der Zelle und oxidativen Stress.
	Peroxiredoxin 2	Involviert in Redox-Regulation der Zelle und oxidativen Stress.
	Peroxiredoxin 6,	Involviert in Redox-Regulation der Zelle und oxidativen Stress.
	Protein DJ-1	Agiert als positiver Regulator der Androgen-Rezeptor-abhängigen Transkription. Funktion als Redox-sensitive Chaperone und als Sensor für den oxidativen Stress.
	Superoxid-Dismutase	Involviert in Redox-Regulation der Zelle und oxidativen Stress.
	hypoxia up-regulated 1	Involviert in Redox-Regulation der Zelle und oxidativen Stress.
ER-Stress-Proteine	Calreticulin	ER-Stress- und UPR-Pathway. Kalzium-bindende Chaperone, welche die Faltung der Proteine fördert und die Qualitätskontrolle im ER durch den Calreticulin/Calnexin-Zyklus gewährleistet.
	Protein-Disulfid-Isomerase A3	Katalysiert das Neuordnen der -S-S- Verbindungen in Proteinen. ER-Stress- und UPR-Pathway
	Protein-Disulfid-Isomerase A4	Katalysiert das Neuordnen der -S-S- Verbindungen in Proteinen. ER-Stress- und UPR-Pathway
	Bip-Protein	ER-Stress- und UPR-Pathway. Erleichtert den Zusammenbau von Proteinkomplexen innerhalb des ERs.
	Endoplasmin	ER-Stress- und UPR-Pathway. Molekulare Chaperone, welche an der Entwicklung und Transport von sezernierten Proteinen beteiligt ist.
	Protein-Disulfid-Isomerase A1	Katalysiert das Neuordnen der -S-S- Verbindung in Proteinen. ER-Stress- und UPR-Pathway

### 3.2.3 Western-Blot-Analyse und Immunfluoreszenzfärbung: Bestätigung der Ergebnisse aus der 2D-Gel-Elektrophorese

Zur Bestätigung der bisher durch 2D-Gel-Elektrophorese erhaltenen Ergebnisse wurden Western-Blot-Analyse und Immunfluoreszenzfärbung bei selektierten Proteinen aus den TK173- und TK188-Zelllinien durchgeführt. Die Western-Blot-Daten korrelieren mit den Ergebnissen der 2D-Gel-Elektrophorese für alle untersuchten Proteine (Abb. 8). Interessanterweise wurden ER-Proteine wie CALR, ERP57, ERP72 und GRP78 in TK188-Zellen hochreguliert (Abb. 8). Zusätzlich zeigten die Western-Blot- und Immunfluoreszenz-Analysen eine Überexpression der Proteinmarker für Fibroblastenaktivierung wie FIN und ACTA2 in TK188- im Vergleich zu TK173-Zellen (Abb. 8).



**Abbildung 8:** Western-Blot-Analyse und Immunfluoreszenzfärbung für selektierte Proteine, bei denen eine Überexpression beobachtet wurde. Links: Western-Blots getestet mit Antikörper gegen das entsprechende Protein in beiden Zelllinien TK173 und TK188. Rechts: Immunfluoreszenzfärbung von unterschiedlichen Proteinen einschließlich Fibrosemarker z.B Fibronectin und alpha smooth muscle actin.

### 3.3 Einfluss des osmotischen Stresses auf die Morphologie und das Proteom der TK173-Zellen

Der osmotische Stress löst generell in den Zellen unterschiedliche Reaktionen aus, die mit Morphologie- und Proteomveränderungen einhergehen, unter anderem Denaturierung mancher zellulären Komponenten, Hemmung des Zellzyklus (DNA-Replikation, -Translation, -Transkription...), Umordnung der Proteine des Zytoskeletts, Zellvolumenverlust oder gar Apoptose. Die Niere ist aufgrund des Urinkonzentrationsmechanismus ständig unterschiedlichen osmotischen Gradienten ausgesetzt. Dieser osmotische Stress löst Veränderungen in der Expression der ER-Stress-Proteine aus (Beck et al. 1998, Dihazi et al. 2005). Um diese Proteinexpressionsveränderungen und ihre Korrelation mit einer möglichen Progression der Fibrose zu untersuchen, wurden die TK173-Zellen unterschiedlichen osmotischen Stressfaktoren ausgesetzt. Dabei wurden die morphologischen und

proteomischen Veränderungen mittels Mikroskopie, 2D-Gel-Elektrophorese, Western-Blot und Immunfluoreszenzfärbung analysiert.

### 3.3.1 Analyse der morphologischen Veränderungen

Um den Einfluss des osmotischen Stresses auf die Morphologie der TK173-Zellen zu untersuchen, wurden diese Zellen einer physiologischen Osmolalität von 300 mosmol/kg oder einer zunehmenden extrazellulären Osmolalität mit NaCl (600 mosmol/kg) ausgesetzt. Die erhöhte Osmolalität der Umgebung wurde von morphologischen Veränderungen begleitet. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen (Axiovert S100 TV, Zeiss, Göttingen) der TK173-Zellen unter Standardbedingungen und unter osmotischem Stress zeigen, dass die TK173-Zellen auf NaCl-Stress mit Volumenverlust und daraus resultierendem Schrumpfen reagieren (Abb. 9). Die morphologischen Veränderungen wurden bereits in den ersten Stunden nach Osmolalitätsänderung beobachtet. Signifikante ausgeprägte Veränderungen wurden nach 35 Stunden festgestellt. Der Vergleich der TK173 unter osmotischem Stress mit den TK188 unter Standardbedingungen zeigte eine große morphologische Ähnlichkeit. Dies könnte bereits auf einen möglichen Zusammenhang zwischen osmotischem Stress und Entwicklung fibrotischer Eigenschaften hinweisen.



**Abbildung 9:** Lichtmikroskopische Aufnahmen von TK173-Zellen unter Standardbedingungen in modifiziertem D-MEM-Nährmedium in Zellkultur und unter NaCl-Stress, sowie TK188-Zellen unter Standardbedingungen. Die Aufnahmen zeigen eine 100-fache Vergrößerung der Zellen.

### 3.3.2 Analyse der Proteomveränderungen der TK173 unter osmotischem Stress

Nach Beobachtung der morphologischen Veränderungen der nichtfibrotischen Zelllinie TK173 unter osmotischem Stress, untersuchten wir einerseits, ob diese Phänotypveränderungen mit Proteomveränderungen einhergehen, andererseits, ob die durch osmotischen Stress ausgelöste Transformation in TK173, dem

## Ergebnisse

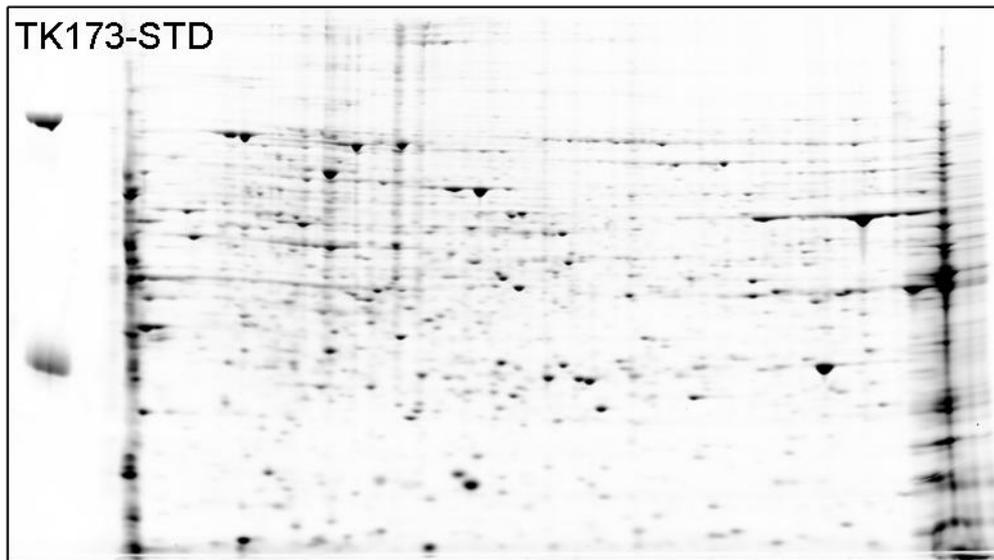
---

Fibrosepheänotyp entspricht. Um dies zu analysieren wurden die TK173-Zellen jeweils unter Standardbedingungen und unter osmotischem Stress mit NaCl (600 mosmol/kg) kultiviert. Zum Vergleich wurden die TK188-Zellen unter Standardbedingungen kultiviert. Aus den verschiedenen Zellsätzen wurden die Proteine extrahiert und die Proteinkonzentrationen der Proben nach Bradford (1976), wie unter 2.2.4 beschrieben, bestimmt. Für die Untersuchungen wurden Gesamtzelllysate verwendet.

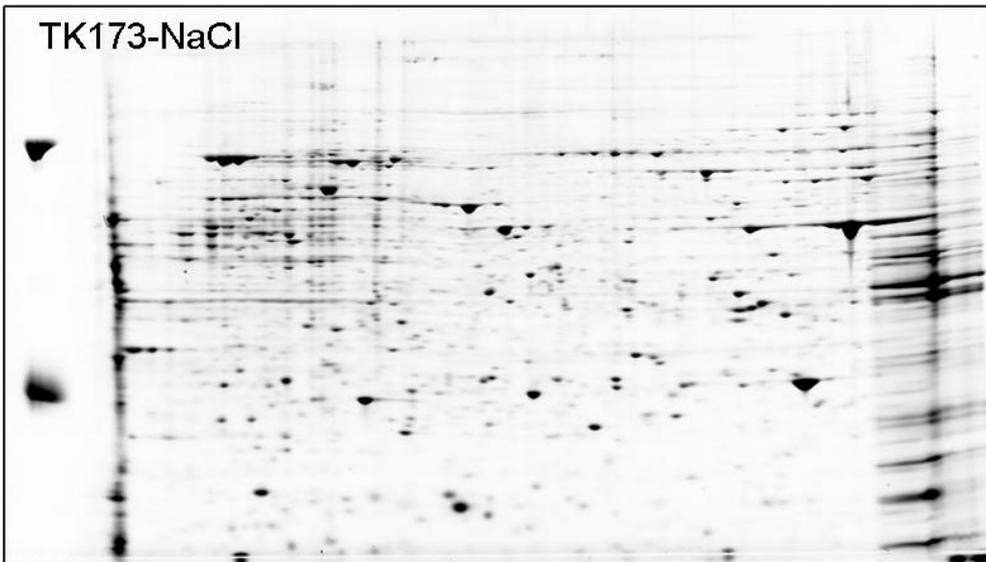
Nach Ermittlung der Proteinkonzentrationen der Zelllysate wurden 150 µg Zellextrakt auf einen 11-cm-langen IPG-Streifen (pH 5-8) fokussiert. Die rehydrierten und fokussierten Streifen wurden auf die SDS-PAGE geladen. Dann erfolgte eine Elektrophorese. Anschließend wurden die Gele mit Flamingo-Fluoreszenz-Färbelösung angefärbt, um die Proteinspots sichtbar zu machen. In einer Elektrophorese-Apparatur wurden die Elektrophoresen mit einer Standardprobe und einer Probe mit Zellen unter osmotischem Stress immer parallel durchgeführt. Dies gewährleistet gleiche Laufbedingungen für beide Proben. Die Gele wurden mit dem Fluoreszenz-Laserscanner (Fuji FLA 5100, Fujifilm, Düsseldorf) gescannt. Jede Gel-Elektrophorese wurde in mindestens drei unabhängigen Versuchen wiederholt.

Die in Abbildung 10 dargestellten Gele zeigen jeweils ein repräsentatives Bild der 2D-Gel-Elektrophorese der Gesamtzelllysate der TK173-Zellen unter Standardbedingungen (Abb. 10A) und unter osmotischem Stress mit NaCl (Abb. 10B). Die Gele zeigen in Bezug auf das Proteinspotmuster Ähnlichkeiten wie auch große Unterschiede.

A



B



**Abbildung 10:** Effekt des osmotischen Stresses auf das TK173-Proteom: 2D-Gel-Elektrophorese mit Gesamtzelllysaten aus TK173-Zellen unter Standardbedingungen (A) und unter osmotischem Stress mit NaCl (600 mosmol/Kg) (B). Die Proteinmuster zeigen Ähnlichkeiten sowie große Unterschiede.

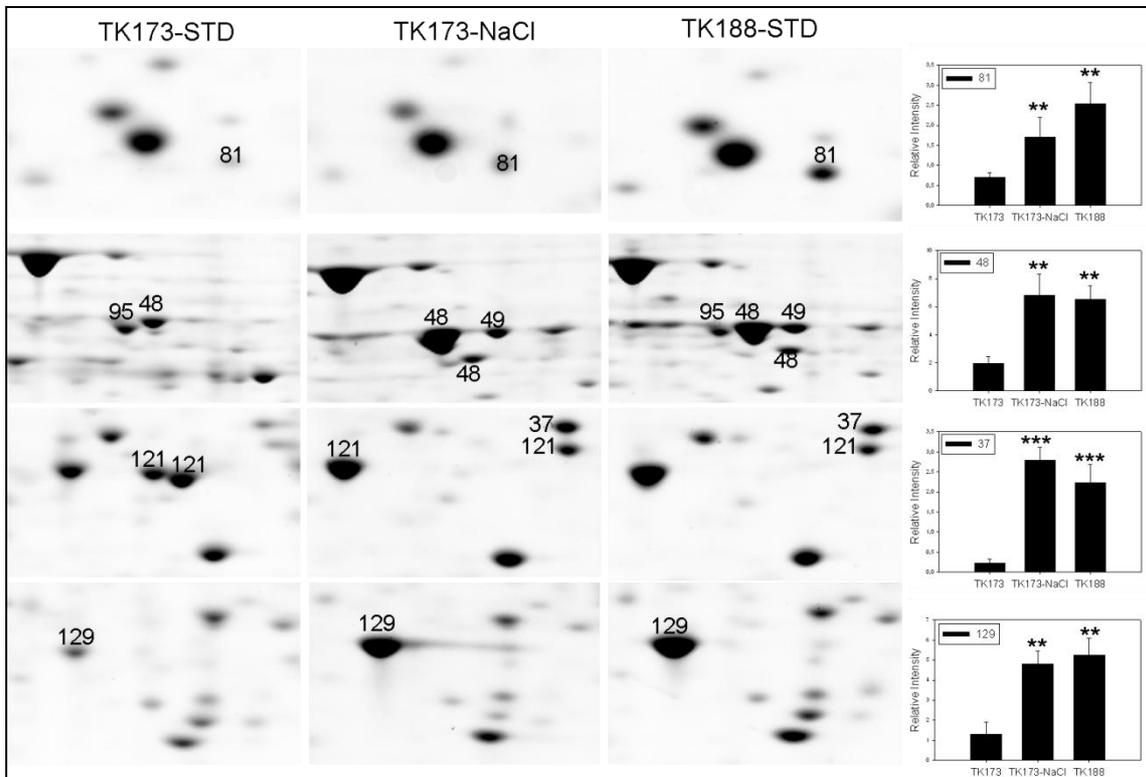
### 3.3.3 Differenziell exprimierte Proteine unter osmotischem Stress

Die Behandlung mit NaCl versetzte die Zellen unter osmotischem Stress und ergab eine differentielle Expression von 27 Proteinen ( $P < 0,05$ ), zusammengefasst in Tabelle 13. Eine genaue Betrachtung mit quantitativem Vergleich des Effektes des hyperosmotischen Stresses auf die Proteinexpression ist in Abbildung 11 dargestellt. Hier wurden Proteine ausgewählt, die eine ausgeprägte Regulierung unter NaCl-Stress zeigen und ähnlich in TK188 reguliert sind (Abb. 11). Neben den phänotypischen Veränderungen weisen die TK173 unter NaCl-Stress ein TK188-

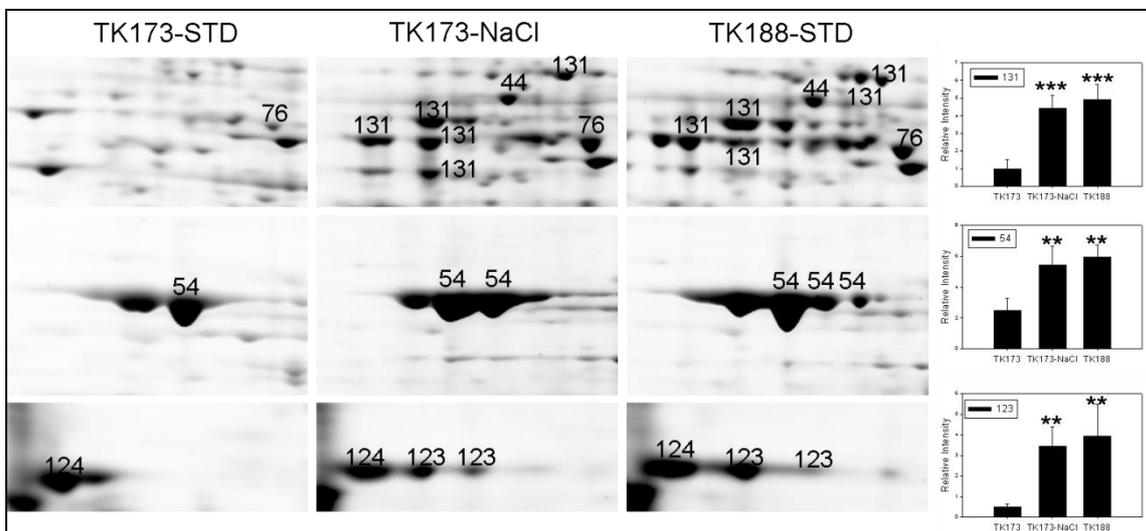
## Ergebnisse

ähnliches Proteom auf, was den transformierenden Effekt des osmotischen Stresses bestätigt.

A



B



**Abbildung 11:** Quantitative Analyse der Proteomänderung unter osmotischem Stress: Vergrößerte Gelausschnitte, die einige differentiell exprimierte Proteine aus TK173-, TK173-NaCl- und TK188-Zellen zeigen. Die Quantifizierung der Proteinexpression ist als Balkendiagramm wiedergegeben. Die y-Achse zeigt die relative Intensität des Spots, die x-Achse den entsprechenden Gennamen. Jeder Balken gibt den Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen an. (\*:  $P < 0,05$ , \*\*:  $P < 0,01$ , \*\*\*:  $P < 0,001$ ). Die Nummerierung der Proteine entspricht ihrer Auflistung in Tabelle 10.

## Ergebnisse

Der Vergleich der TK173-Zellen unter NaCl-Stress mit den TK173-Standardzellen zeigte eine Veränderung der Expression von insgesamt 27 Proteinen, darunter eine Hochregulierung von insgesamt 22 Proteinen (Tab. 13). In Tabelle 13 sind die überexprimierten Proteine der TK173-Zellen nach NaCl-Stress entsprechend ihres Regulierungsgrades mit Namen und Verhalten in entsprechenden Zellen aufgelistet. Neben den hochexprimierten Proteinen wurden auch 5 Proteine identifiziert, deren Expression unter Stressbedingungen herunterreguliert wurde (Tab. 13).

**Tabelle 13:** Differentiell exprimierte Proteine unter NaCl-Stress: TK173-Zellen wurden unter osmotischem Stress mit NaCl kultiviert. Der Effekt des osmotischen Stresses auf die Proteinexpression wurde mittels 2D-Gel-Elektrophorese analysiert. Angegeben sind die Proteine, deren Expression unter Stress sich verändert hat. Die Expressionsregulierung des betroffenen Proteins wie auch sein Regulierungsgrad sind in Zahlen und Pfeilen angegeben.

Protein	TK173-STD	TK173-NaCl	TK188-STD
1 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein h	1x↑	3x↑	
2 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein h		2x↑	1x↑
3 Pyruvate kinase	1x↑		1x↑
4 Triosephosphate isomerase	1x↑		
5 Triosephosphate isomerase	1x↑	2x↑	2x↑
6 Endoplasmic-reticulum-luminal protein 28		2x↑	1x↑
7 Triosephosphate isomerase		2x↑	1x↑
8 UCHL1	1x↑	3x↑	3x↑
9 GRP78	2x↑	4x↑	4x↑
10 Heat shock 70 kDa protein 5		2x↑	1x↑
11 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like	1x↑	2x↑	2x↑
12 LIM and SH3 domain protein 1: cytoskeleton reorganisation		2x↑	1x↑
13 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 2H9	1x↑	2x↑	2x↑
14 Calponin-2	1x↑	2x↑	2x↑
15 GAPDH	1x↑		
16 Nucleoside diphosphate kinase A	1x↑	2x↑	3x↑
17 Tropomyosin 4	2x↑	1x↑	2x↑
18 Tropomyosin 3		1x↑	1x↑
19 Vimentin		1x↑	1x↑
20 Glutathione synthetase		1x↑	1x↑
21 Mannose-6-phosphate	1x↑	2x↑	2x↑

## Ergebnisse

---

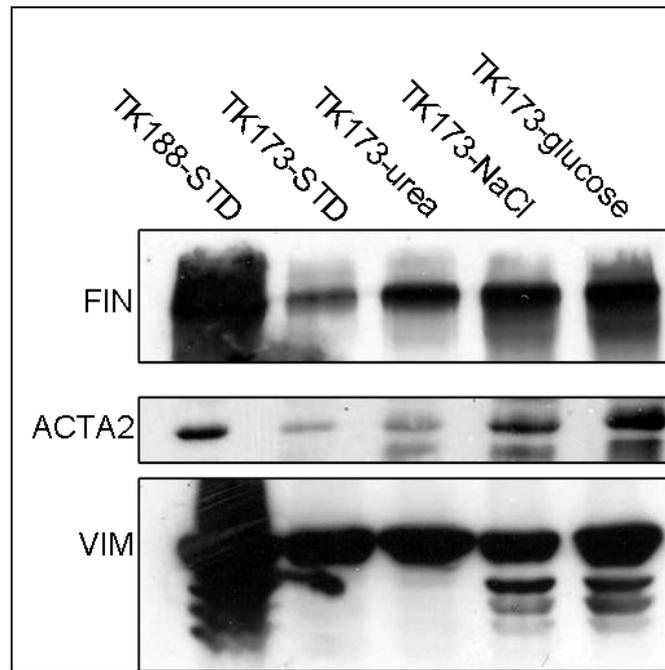
receptor-binding protein-1			
<b>22</b> HSPA1A		2x↑	2x↑
<b>23</b> Heat shock cognate 71 kDa protein (Heat shock 70 kDa protein 8)	2x↑		1x↑
<b>24</b> Dank-type molecular chaperone		2x↑	3x↑
<b>25</b> Heat shock 70 kDa protein 8		2x↑	3x↑
<b>26</b> Heat shock 70 kDa protein 5 (GRP78)		2x↑	3x↑
<b>27</b> GRP75: 75 kDa glucose-regulated protein	1x↑	2x↑	2x↑

### 3.4 Bestätigung der Ergebnisse aus der proteomischen Analyse mittels Western-Blot-Analysen und Immunfluoreszenzfärbung

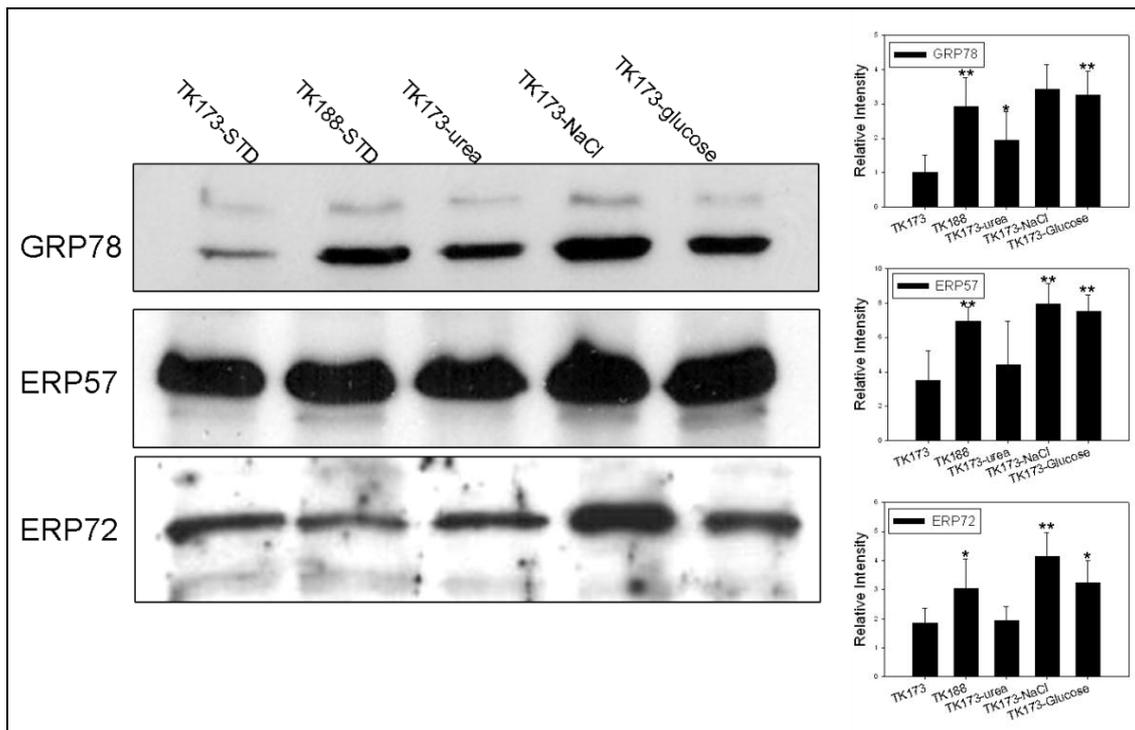
#### 3.4.1 Einfluss des osmotischen Stresses auf die Zelltransformation und Expression der Fibrosemarker

Nach der Untersuchung der differentiellen Expression einiger Proteine der TK173-Zellen unter osmotischem Stress mit Hilfe der 2D-Gel-Elektrophorese wurden zur Bestätigung der Ergebnisse Western-Blot-Analysen durchgeführt. Die Analysen erfolgten für einige metabolisch interessante differentiell exprimierte Proteine, darunter ERP57, ERP72, GRP78, FIN, ACTA2 und VIM. Die Western-Blots wurden modifiziert nach Towbin et al. (1979) als Tankblotting durchgeführt. Dabei wurden für jedes Protein mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt. Das Expressionsverhalten der Proteine in der 2D-Gel-Elektrophorese konnte in der Western-Blot-Analyse für alle untersuchten Proteine bestätigt werden (Abb. 12). Der osmotische Stress in der Niere kann durch unterschiedliche Komponenten verursacht werden; neben NaCl können sowohl Harnstoff als auch Glucose den osmotischen Stresswert steigern. Um den Effekt der anderen osmotischen Stressfaktoren auf die TK173 zu studieren und die Expression der unter NaCl-Stress beeinflussten Proteine zu analysieren, wurden TK173 unter osmotischem Stress mit Harnstoff oder Glucose inkubiert und die Proteinexpression mittels Western-Blot analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass die Proteine ein Stressfaktor-spezifisches Regulierungsverhalten aufweisen. So wurde allgemein eine erhöhte Expression der analysierten Proteine unter NaCl- und Glucose- im Vergleich zu Harnstoff-Stress festgestellt (Abb. 12). Ähnliches Verhalten wurde auch bei Marker der Zelltransformation und Fibrose beobachtet (Abb. 12 A).

A



B

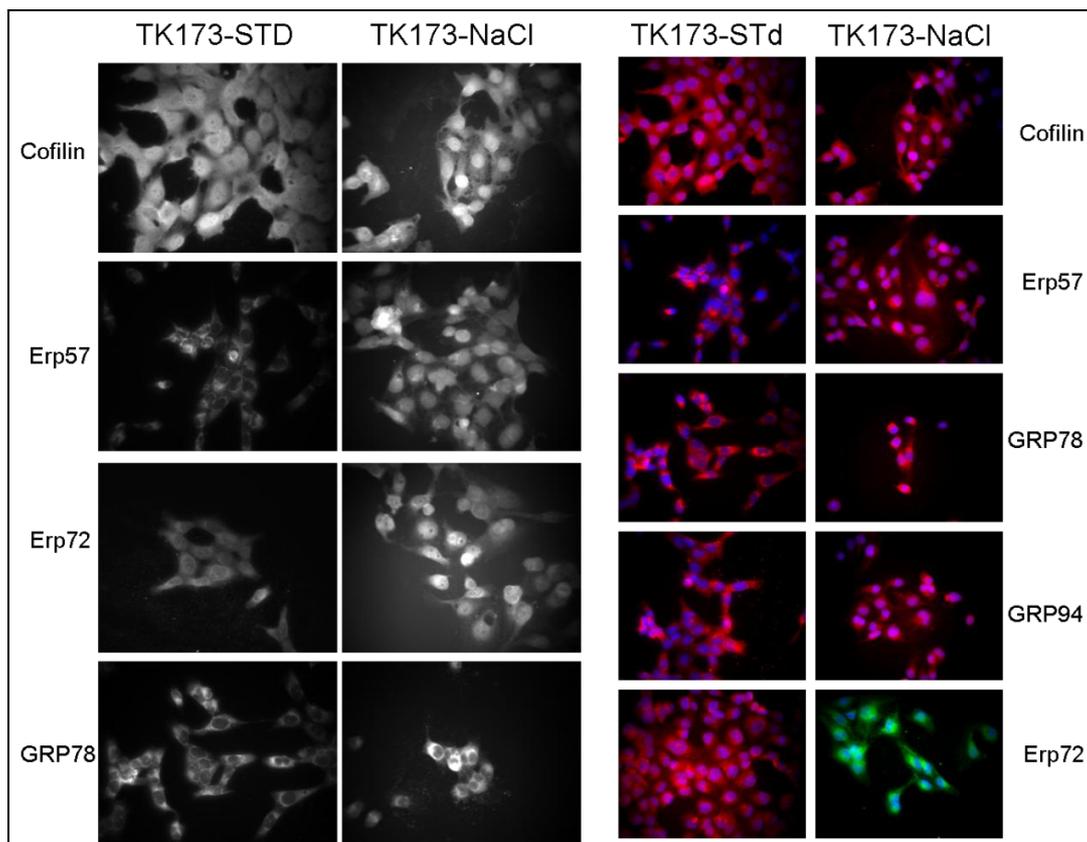


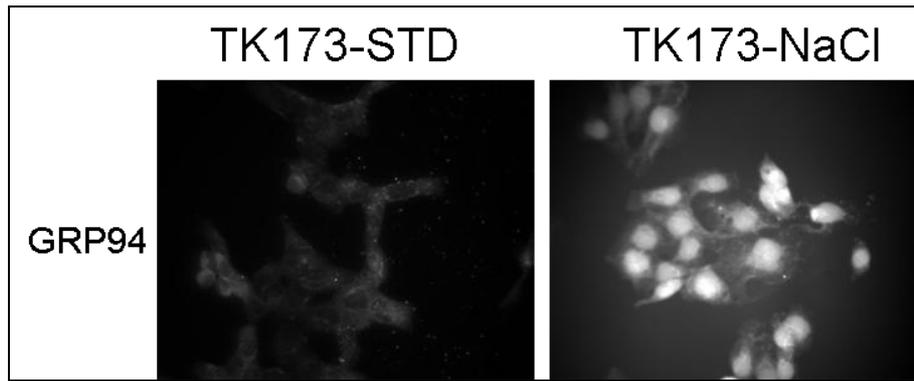
**Abbildung 12:** Western-Blot-Analyse für selektierte Proteine, bei denen eine Hochexpression unter hyperosmotischem Stress beobachtet wurde. Die Expressionsregulierung der Proteine wurde in TK188-Standard und TK173 unter verschiedenen Stressfaktoren untersucht. Die Quantifizierung der Proteinexpression ist als Balkendiagramm wiedergegeben. Die y-Achse zeigt die relative Intensität der Banden, die x-Achse den entsprechenden Zell- und Stresstyp. Jeder Balken gibt den Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen an. (\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ ). Die Namen sind als Gennamen des untersuchten Proteins angegeben. A: Proteine, die als Fibrosemarker bekannt sind. B: Proteine des ER-Stresses.

### 3.4.2 Bestätigung der Ergebnisse mittels der Immunfluoreszenzfärbung

Nach der Untersuchung der Proteine mittels der 2D-Gel-Elektrophorese und die Bestätigung der Ergebnisse mittels des Western-Blots wurde eine weitere Bestätigung durch die Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Dafür wurden die TK173-Std und die TK-NaCl, wie unter 2.3.3 beschrieben, angefärbt und an einem Mikroskop (Axiophot, Zeiss, Göttingen) mit der AnalySIS Software (Soft Imaging Systems, Leinfelden) ausgewertet. Parallel zu den Änderungen in der Proteinexpression wurde ein Wechsel der Proteinlokalisierung bei einigen Proteinen beobachtet (Abb. 13). Alle ER-Proteine (ERP57, ERP72, GRP78 und GRP94) zeigen eine zellkernnahe Lokalisation unter Stressbedingungen. Ein ähnlicher Effekt wurde auch bei Cofilin beobachtet. Zusätzlich zu der Lokalisationsänderung konnte eine Steigerung der Expression des Fibrosemarkers Fibronectin beobachtet werden. Abbildung 13 zeigt repräsentative Immunfluoreszenzbilder der ausgewählten Proteine.

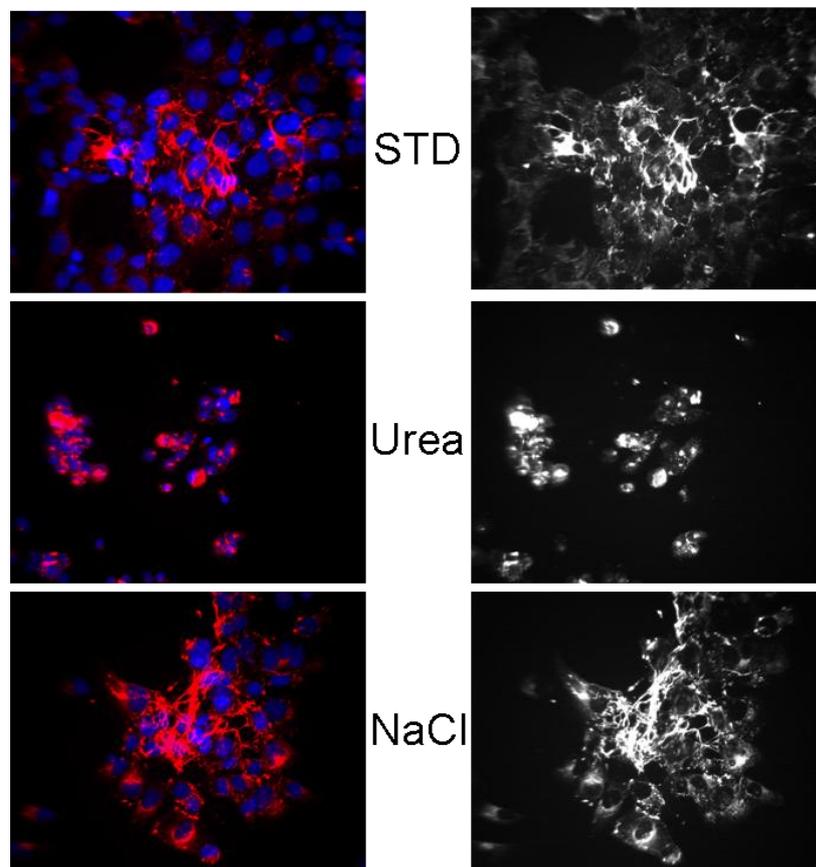
**A**





B

### TK173 Fibronectin



**Abbildung 13:** Immunfluoreszenzfärbung von ER-Stress-Proteinen und Fibronectin: Immunfluoreszenz-Analyse für ausgesuchte Proteine, bei denen eine Expressionsänderung als Folge des Stresseinflusses beobachtet wurde. A: ER-Stress-Proteine zeigen eine zellkernnahe Lokalisation unter Stressbedingungen. B: Immunfluoreszenz von Fibronectin unter unterschiedlichen Stressbedingungen; unter NaCl ist eine vermehrte Ausscheidung von Fibronectin zu beobachten im Vergleich zu Harnstoff (Urea) und STD.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Die Proteomik als Analyseverfahren**

#### **4.1.1 Rolle in der medizinischen Forschung**

Die Proteomik befasst sich mit der quantitativen Analyse aller Proteine, die in einem Organismus, einem Gewebe oder einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt und unter definierten Bedingungen vorhanden sind. Als Proteom wird die Gesamtheit dieser Proteine bezeichnet, deren Zusammensetzung je nach Bedingung (z.B. Umweltfaktoren, Temperatur, Genexpression, Wirkstoffgabe etc.) sich ändert (Wilkins et al. 1996). In den letzten Jahren wurden die Methoden der Proteomanalyse immer weiter entwickelt und der biomedizinischen Forschung immer zugänglicher gemacht. Als Folge gewann die Proteomanalyse eine breite Anwendung in der klinischen Forschung (Westermeier et al. 2008).

Die Proteomik ist ein Analyseverfahren, das streng kontrollierte Schritte erfordert: Die Probenvorbereitung, 2D-Gel-Elektrophorese, Bilddetektion und Analyse, Spotidentifikation und Datenbanksuche (Westermeier 2001). Das Kernstück der klassischen Proteomik stellt die 2D-Gel-Elektrophorese dar. In unserer Arbeit profitierten wir von den Möglichkeiten der proteomischen Analyse, welche diese Methode der Proteomik bietet. Einige Einschränkungen der Methode bleiben jedoch zu kritisieren.

#### **4.1.2 Möglichkeiten und Grenzen der 2D-Gel-Elektrophorese**

- **Möglichkeiten**

Die 2D-Gel-Elektrophorese bietet neben der hohen Proteinbeladungskapazität die einmalige Fähigkeit zur simultanen Trennung tausender Proteine in einer einzigen Prozedur. Dabei können Isoformen charakterisiert werden (Berkelman und Stenstedt 2002). Des Weiteren bietet die Methode die Möglichkeit zur Detektion von post- und cotranslationalen Modifikationen, welche von der Genomsequenz nicht vorausgesagt werden können (Berkelman und Stenstedt 2002). Die Methode bietet eine große Flexibilität, was die Durchführungszeit angeht. So können die Schritte der 2D-Gel-Elektrophorese in Zeit und Raum getrennt sein. Dazu kommt, dass isolierte Proteine in der Gelmatrix gespeichert bleiben. So kann eine weitere Analyse auch später erfolgen, nach Monaten oder gar Jahren. Durch diese Konservierung der Proteine

wird eine Art Archivierung der Proteine von Interesse ermöglicht, z.B. seltene Proben wie von wertvollen Tumorgewebe können für lange Zeit aufbewahrt werden (Beranova-Giorgianni 2003).

- **Grenzen**

Neben den Möglichkeiten der 2D-Gel-Elektrophorese, hat die Methode auch ihre Grenzen: Aufgrund der Sensitivität der Färbemethoden ist es unmöglich, das gesamte Proteom als hoch dynamische und komplexe Entität zu analysieren (Beranova-Giorgianni 2003). Die Proteinmenge ist auch ein begrenzender Faktor. So werden Proteine in geringen Mengen oder auch mit hydrophoben Eigenschaften nur begrenzt detektiert (Wilkins et al. 1999, Baltimore 2001, Godovac-Zimmermann und Brown 2001, Alaoui-Jamali und Xu 2006). Zu dieser Kategorie gehören Schlüsselproteine in zellulären Prozessen, regulierende Proteine oder Rezeptoren, die für die Analyse unzugänglich bleiben. Weitere Einschränkungen hat die Methode bei kleinen (Molekülmasse < 10 kDa) und großen (> 150 kDa) Proteinen sowie bei Proteinen aus dem sauren und basischen Bereich, hier ist nur eine geringfügige Trennung möglich (Wilkins et al. 1999, Baltimore 2001, Godovac-Zimmermann und Brown 2001, Alaoui-Jamali und Xu 2006). Die schlechte Trennung von basischen Proteinen ist bedingt durch Streaking der Spots und Auflösung der Membranproteine (Bae et al. 2003). Die schlechte Löslichkeit der Transmembranproteine und ihre geringe Menge limitieren ihre quantitative Analyse (Santoni et al. 2000).

Die Präzision der Detektion ist beeinflusst durch den begrenzten dynamischen Bereich der Färbemethoden. Diese unterscheiden sich ebenfalls bezüglich Reproduzierbarkeit und Sensitivität (z.B. Coomassie oder Silber) (Beranova-Giorgianni 2003).

Trotz der oben genannten Einschränkungen der 2D-Gel-Elektrophorese hat sich die Methode als sehr nützlich für die Darstellung des Zellproteoms und die Identifizierung von Proteinen erwiesen, die als Schlüsselmoleküle für verschiedene zelluläre Mechanismen dienen. Im Rahmen unserer Arbeit konnten wir einen großen Teil der Schwächen dieser Methode durch die Wiederholung der Experimente in mindestens drei unabhängigen Abläufen aufheben.

## **4.2 Das biologische Material**

### **4.2.1 Bedeutung der in-vitro-Modelle für das Erforschen des Pathomechanismus der renalen Fibrose**

Renale Fibroblasten scheinen eine bedeutende Rolle in der Entwicklung der renalen interstitiellen Fibrose (RIF) zu spielen. Die Mechanismen, die zur RIF führen, blieben jedoch wenig verstanden. Interaktionen zwischen immunkompetenten, epithelialen, endothelialen und mesangialen Zellen mit lokalen renalen Fibroblasten scheinen in diesen Prozess involviert zu sein. Interaktionen zwischen diesen Zellen sind möglich, entweder durch direkten Zellkontakt oder durch sezernierte Zytokine aus den unterschiedlichen Zelltypen. Primäre Zellkulturen aus Biopsien können nutzbare Hilfsmittel für solche Untersuchungen darstellen. Das Erforschen der zellulären Mechanismen dieses Prozesses war hauptsächlich erschwert durch das Fehlen von suffizienten Zellen aus renalen Biopsien. Die Immortalisation von Zellen und das Generieren von Zelllinien aus primären Kulturen stellten eine Möglichkeit dar, die Grenzen der vorigen Untersuchungen an Nierenbiopsien, bisher limitiert durch die Differenzierung und die geringe Wachstumsrate der frisch isolierten primären Zellen, zu überwinden (Müller et al. 1995). Die Arbeit von Müller et al. (1995) hatte als Ziel die Etablierung von immortalisierten Fibroblasten-Zelllinien aus Nieren mit RIF und aus normalen Nieren, welche den Originalzellen sowohl phänotypisch als auch funktionell gleichen. Diese stabilen Zelllinien dienten als Modell für die Identifizierung von Schlüsselproteinen der renalen Fibrose und zur Untersuchung der Fibrose-Entwicklung unter osmotischem Stress in unserer Arbeit.

### **4.2.2 TK173/TK188 als in-vitro-Modell für die renale Fibrose**

Die beiden Zelllinien wurden durch Immortalisierung von Fibroblasten, isoliert aus normaler Niere (TK173) und aus einer Niere mit interstitieller Fibrose (TK188) durch Transfektion mit einem Plasmid, das für SV 40 large T Antigen codiert, etabliert. Die etablierten Zellen konnten kontinuierlich wachsen und über Monate in Kultur gehalten werden. Die Zellen hatten zudem morphologische wie auch funktionelle Eigenschaften der untransformierten Zellen erhalten. Zusätzlich produzierten sie die selben ECM-Proteine und Oberflächenmoleküle wie ihre untransformierten Pendanten. Die Expression von ICAM-1 ermöglicht diesen Zellen das Interagieren mit Lymphozyten und Monozyten. Arbeiten von Lonnemann et al. (1995a) zeigten eine Expression von mRNA für Interleukin 1 $\alpha$  und 1 $\beta$  in TK173 und TK188, ferner auch

eine Inhibition des Wachstums der TK188 durch IL-1-Rezeptorantagonisten (Lonnemann et al. 1995b). Angesichts der bisher festgestellten Eigenschaften eignen sich die Zelllinien bereits für in-vitro-Versuche vor allem zum besseren Verständnis des Pathomechanismus der Fibrose. So wurde dieses Zelllinienmodell von verschiedenen Gruppen zur Untersuchung des RIF-Pathomechanismus benutzt (Bechtel et al. 2010, Dihazi et al. 2011)

### **4.3 Vergleichende Proteomanalyse der TK173/TK188, ein Weg zur Identifizierung der RIF-Schlüsselproteine**

Die Proteomveränderungen reflektieren den metabolischen Zustand der Fibroblasten. Diese Veränderungen resultieren aus Expressionsunterschieden auf molekularer Ebene und deuten auf eine phänotypische Änderung der Fibroblasten auf zellulärer Ebene hin. Die vergleichende Proteomanalyse ergab für unsere beiden untersuchten Zelllinien eine große Zahl von Proteinen, deren Expression in den beiden Zelltypen unterschiedlich reguliert wurde. Tabelle 12 listet die Proteine anhand ihrer funktionellen Eigenschaften auf. Die Proteine konnten zwei verschiedenen Hauptkategorien zugeordnet werden: Strukturproteine und Proteine des ER- und oxidativen Stresses. Es wurde allgemein eine signifikante Hochregulierung dieser Proteine in der fibrotischen Zelllinie TK188 festgestellt. Dies deutet auf eine wichtige Rolle dieser Mechanismen in der renalen Fibrose hin. In den folgenden Absätzen werden die einzelnen Mechanismen wie auch die Proteine in Zusammenhang mit der renalen Fibrose diskutiert.

#### **4.3.1 Die Strukturproteine und ihre Rolle bei der renalen Fibrose**

Die erste Kategorie umfasst Proteine der ECM (Kollagen I, IV und Fibronectin), Zellstrukturproteine (*alpha smooth muscle actin*) und intermediäre Filamente (Vimentin und Desmin), die bereits als Marker der Fibrose und der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) in der Literatur beschrieben wurden. Diese Proteine sind auch nachweislich in die Pathogenese der Fibrose in verschiedenen Organen, wie Niere, Leber, Lunge und Auge involviert. Die Detektion dieser Marker mit fibrogenem Potential in Biopsien bietet diagnostische Möglichkeiten zum Erfassen der Progression fibrotischer Erkrankungen (Guarino et al. 2009). Unsere Daten zeigten eine Überexpression dieser Fibrosemarker in der fibrotischen Zelllinie

TK188 verglichen zu TK173. In den folgenden Abschnitten werden diese einzelnen Fibrosemarker diskutiert.

### ***4.3.1.1 Die Rolle der ECM-Proteine Kollagen und Fibronectin in der renalen Fibrose***

Kollagen ist ein Protein, das in den Zellen der Säugetiere reichlich vorhanden ist. Es repräsentiert 25% des ganzen Proteininhaltes. Aktuell sind 28 Kollagenmoleküle definiert, welche in struktur- und funktionsabhängigen Subfamilien gruppiert sind (Myllyharju und Kivirikko 2001). In Zusammenhang mit der Niere stehen die Typen I und III quantitativ im Vordergrund. Diese gehören der fibrillären Kollagenfamilie an, während Typ IV ein netzwerkbildendes Kollagen und eine Hauptkomponente der Basalmembran ist (Miner 1999). Wachstumsfaktoren und Zytokine sind wichtige Regulatoren der Kollagenproduktion, vor allem *transforming growth factor beta* (TGF- $\beta$ ) und *connective tissue growth factor* (CTGF) (Rossert et al. 2000, Abdel Wahab und Mason 2004). Bei der Pathogenese von renalen Erkrankungen wird z.B. die Akkumulation des Kollagens I im Niereninterstitium als ein charakteristisches Merkmal bei Endstadien der Niereninsuffizienz betrachtet. Dabei wird ebenfalls eine vermehrte Lagerung an der glomerulären Basalmembran beobachtet (Glick et al. 1992). Die renale Fibrose, als komplexes Phänomen, ist durch eine massive Deposition der Matrix charakterisiert und involviert eine breite Zahl an Zellen. Die Fibroblasten stellen dabei die Effektorzellen der Matrixproduktion dar und zeigen in diesem Rahmen ausgeprägte Phänotypmerkmale der Myofibroblasten. Diese Zellen exprimieren u.a. Strukturproteine wie *alpha smooth muscle actin*, Vimentin und ECM-Proteine wie Fibronectin und Kollagen I und III (Alexakis et al. 2006). Unsere Daten zeigen eine gesteigerte Expression von Kollagen in TK188 verglichen zu TK173. Dies deutet auf den fibrotischen Phänotyp der Zelllinie hin und bestätigt ihre Nutzung als Modell für die renale Fibrose.

Fibronectin ist ein großes ECM-Glycoprotein, das als Dimer existiert. Das lösliche Fibronectin ist im Plasma und in verschiedenen Körperflüssigkeiten vorhanden, während das zelluläre Fibronectin im Gewebe eingebunden ist. In der normalen Niere wird Fibronectin im Mesangium und in der Lamina Rara der glomerulären Basalmembran (GBM) exprimiert (Hynes 1990). Bei kranken Nieren ist die Produktion des zellulären Fibronectins im Glomerulus und im Tubulointerstitium der

Niere erhöht. Fibronectin stellt dabei eine signifikante Komponente der renalen Fibrose dar (Reilly und Nash 1988, Hynes 1990, Zuk et al. 1998, Zuk et al. 2001). Die Degradation von Fibronectin erzielte in vivo und in vitro eine renoprotektive antifibrotische Wirkung (McDonald et al. 2003).

Bei der Fibrose spielt die Fibroblastenrekrutierung eine entscheidende Rolle (Crystal et al. 1978, Crapo 1986). Als Chemoattraktant vermittelt Fibronectin diese Rekrutierung (Postlethwaite et al. 1981, Gharaee-Kermani et al. 1996). Fibronectin akkumuliert als einer der ersten ECM-Proteine und vermittelt die Deposition weiterer ECM-Proteine (Gharaee-Kermani et al. 1996). Arbeiten über die Fibrose an der Lunge ergaben ausgeprägte Veränderungen in der Menge sowie der Distribution des Fibronectins in fibrotischen Lungen. Dies suggeriert seine Involvierung in zelluläre Ereignisse, welche die Fibrose begleiten (Torikata et al. 1985). Bei der Leberfibrose korrelierte der Spiegel vom zirkulierenden Fibronectin mit dem histologischen Ausmaß der Fibrose (Hackl et al. 2010). Arbeiten an fibrotischen Schweinfibroblasten zeigten, dass diese bis 2,5-mal mehr Fibronectin synthetisierten als die normalen Fibroblasten (Wegrowski et al. 1989). Ähnlich konnte bei unserer Arbeit eine Überexpression des Fibronectins in der fibrotischen Zelllinie (TK188) festgestellt werden, sowie eine Steigerung der Synthese in der normalen Zelllinie bei der Entwicklung des Fibrose-Phänotyps unter Stressbedingungen (TK173-NaCl). Dies unterstützt die Hypothese, dass der Stress ein pro-fibrotischer Faktor ist.

### **4.3.1.2 Zytoskelett-Proteine in der renalen Fibrose**

- **Vimentin**

Vimentin ist ein intermediäres Filament, das hauptsächlich von Zellen mesenchymaler Herkunft exprimiert wird. In normalen Nieren wird Vimentin in Epithel- und Mesangialzellen der Glomeruli, Gefäße und Interstitialzellen detektiert (Holthöfer et al. 1984). Seine abnorme Expression durch Epithelzellen wird als relevanter Marker der EMT betrachtet, welche zur Fibrose-Entwicklung beiträgt (Grünert et al. 2003). Interessanterweise wurde unter pathologischen Konditionen eine Überexpression mesenchymaler Marker wie Vimentin in Epithelzellen beobachtet, während die Epithelialmarkerproduktion abgenommen hat (Aresu et al. 2007). Dieser Epithelialphänotyp-Wechsel hat die Entstehung von Matrixproduzierenden Fibroblasten zufolge. Daraus suggeriert die erhöhte Expression

dieses Markers in unserer fibrotischen Zelllinie TK188 und gestressten Zelllinie TK173-NaCl einen Phänotypwechsel, als Teil der Fibrose-Entwicklung.

- **Desmin**

Dieses Protein gehört zu den Intermediär-Filamenten Klasse III und ist der am breitesten exprimierte myogene Marker (Thomas und Moll 2003). Es gehört neben Vimentin, ACTA2 und Kollagen zu den Hauptmarkern zur Identifizierung von Myofibroblastenpopulationen (Skalli et al. 1989). Seine Überexpression begleitet die Transition von inaktiven Fibroblasten zu aktiven ECM-produzierenden Fibroblasten (Muchaneta-Kubara und El Nahas 1997) und wurde bei der Progression der Lungenfibrose in vitro nach chronischer TGF- $\beta$ -Exposition zunehmend beobachtet (Willis et al. 2005). Andere Arbeiten über die Glomerulosklerose und die damit verbundenen fibrotischen Veränderungen detektierten ebenfalls eine Überexpression dieses Markers in Zusammenhang mit dem Phänotypwechsel zu aktiven Fibroblasten (Van den Branden et al. 2000). Die Hochregulierung von Desmin in TK188 verglichen zu TK173 bestätigt sowohl die Transformation in einen aktiven Zustand mit Akquisition von Eigenschaften der glatten Muskulatur als auch die Nutzung dieses Proteins als Marker für die renale Fibrose.

- **Alpha smooth muscle actin**

Unsere proteomische Analyse und die immunologische Validierung haben eine erhöhte Expression des *alpha smooth muscle actin* sowohl in der fibrotischen Zelllinie TK188 als auch in der gestressten Zelllinie TK173-NaCl gezeigt. Actin stellt ein reichlich vorhandenes Protein in vielen eukaryotischen Zelltypen dar. Es reguliert Kontraktilität, Adhäsion, Zellmorphologie und Strukturhalt. Actin existiert in sechs Typen, die den drei folgenden Kategorien zugeordnet sind, alpha (*alpha skeletal, alpha cardiac, alpha smooth muscle*), beta (*beta non muscle*) und gamma (*gamma smooth muscle, gamma non muscle*) (Firtel 1981, Rubenstein 1990). Für unsere Arbeit war die *Alpha-smooth-muscle-Actin*-Isoform (ACTA2) von Interesse. ACTA2 gilt als spezifischer Marker für die Zelldifferenzierung der glatten Muskulatur (Yamaoka et al. 1993). An der Niere wird ACTA2 normalerweise durch die Zellen der Gefäßmuskulatur exprimiert, aber auch durch Bindegewebsfibroblasten unter pathologischen Konditionen führend zur Fibrose (Boukhalfa et al. 1991). Das Erscheinen von ACTA2-positiven Zellen wurde in Verbindung mit dem Prozess der Fibrose an einigen Organen, wie an der Leber, gebracht (Nouchi et al. 1991, Yamaoka et al. 1993). So zeigten zirrhotische Lebern eine starke ACTA2-Positivität

in allen Fibrose-Stadien (Yu et al. 1993). Ebenfalls wurde eine höhere ACTA2-Expression an fibrotischen Lungenfibroblasten als bei den Kontrolllungenfibroblasten beobachtet (Zhang et al. 1996). An der Niere konnten mehrere Studien an experimentellen Fibrose-Modellen (Pichler et al. 1996) wie auch in humanen fibrotischen Nierenbiopsien (Boukhalfa et al. 1996), ACTA2-positive Zellen im Interstitium identifizieren. Die Hochregulierung von ACTA2 korrelierte mit der Myofibroblastenakkumulation, der Deposition von Kollagentypen I und III, der tubulären TGF- $\beta$ -Expression, der renalen Fibrose und letztendlich mit der Nierendysfunktion (Boukhalfa et al. 1996, Jinde et al. 2001).

### **4.3.2 Die Rolle der ER-Proteine und der Proteine des oxidativen Stresses in der renalen Fibrose**

Neben der Hochregulierung der Zytoskelettproteine und der Fibrosemarker zeigte die proteomische Analyse beider untersuchten Zelllinien zusätzlich eine Hochregulierung der ER-Proteine und Proteine des oxidativen Stresses in der fibrotischen Zelllinie TK188. Dies deutet auf eine mögliche Beteiligung der beiden ER- und oxidativen Stress-Pathways im Fibrose-Prozess hin.

#### ***4.3.2.1 Die Aktivierung des ER-Stresses und die Hochregulierung der ER-Stressproteine sind wichtige Aspekte der renalen Zellaktivierung***

Das endoplasmatische Retikulum (ER) ist ein wichtiges Zellorganell für die Proteinfaltung in jeder Zelle, die auf Proteinexport spezialisiert ist. Die Faltung von sekretorischen Proteinen oder Extrazellulärraumproteinen findet in dem geschützten zellulären Raum des ER statt. Eine Reihe an ER-residenten Chaperonen sorgen für den korrekten Aufbau und die Faltung der Proteine. Dabei verhindern diese molekularen Chaperone die Aggregation der Proteine während der Faltung und Entfaltung, verhindern unproduktive Interaktionen mit anderen Zellkomponenten, regulieren die Signaltransduktion in der Zelle, beeinflussen Ausbeute und Kinetik während der Proteinfaltung, stabilisieren das Mikrofilamentsystem in der Zelle und sind am Proteinabbau beteiligt (Löffler 1998). Viele entscheidende posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierung und Bildung von Disulfid-Verbindungen werden zusätzlich im ER koordiniert. Das ER ist ebenfalls ein Zellort der Kalziumlagerung und eine Hauptstation der Signalintegration. Neben der Rolle als einzigartiges Proteinfaltungsmilieu besitzt das ER eine entscheidende Funktion bei der Qualitätskontrolle (Ellgaard und Helenius 2001). Diese gewährleistet, dass lediglich

korrekt aufgebauten und gefalteten Proteinen das Voranschreiten in die weitere Station des sekretorischen Apparates erlaubt wird. Falsch gefaltete Proteine werden durch Involvierung der Chaperone erkannt, selektiert und angehalten. Anschließend werden sie entweder erneut gefaltet oder abgebaut (Mori et al. 1996, Cox et al. 1997). Ferner ist das ER hochsensitiv gegenüber Alterationen, die seine Homöostase betreffen. Störungen dieser Homöostase führen zu einer Akkumulation von ungefalteten Proteinen. Das Ungleichgewicht zwischen den ungefalteten Proteinen und der Kapazität des ERs, diese Belastung zu beherrschen, wird als ER-Stress bezeichnet (Schröder und Kaufman 2005, Xu C et al. 2005). Um diesen Stress zu bewältigen, aktiviert das ER eine Signalkaskade, genannt "*Unfolded Protein Response* (UPR)". Das Ziel der UPR ist die Adaptierung an das veränderte Milieu und das Wiederherstellen der normalen ER-Funktion. Dies involviert eine Reduktion der Proteinsynthese und Translokation in das ER, gefolgt von transkriptioneller Aktivierung von UPR-Genen. ER-Stress-Proteine werden dabei überexprimiert. Falls diese adaptativen Antworten einen ernsten ER-Stress nicht kompensieren können, resultiert die Zellapoptose (Lindenmeyer et al. 2008). Der ER-Stress wurde bei der Pathogenese vieler Erkrankungen wie Diabetes, Atherosklerose, oder neurodegenerativer Erkrankungen als eine der Hauptursachen des apoptotischen Zelltodes beschrieben (Harding und Ron 2002, Ryu et al. 2002, Ni und Lee 2007). Unter ER-Stress kommt es in der Zelle zur Überexpression der Stressproteine. Dabei unterscheidet man die Hauptklasse der Hitzeschockproteine (HSP), die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Klasse oder Glucose-regulierte Proteine (GRP78/BIP, GRP94/HSP90, Calreticulin) sowie Mitglieder der Thioredoxin-Superfamilie (PDI, ERP72, ERP57, p50), deren Expression ebenfalls durch  $\text{Ca}^{2+}$  stimuliert werden kann und somit als  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Chaperone bezeichnet werden (Nigam et al. 1994). Die Fibrose ist durch eine massive Synthese und Sekretion der ECM-Proteine charakterisiert. Diese Steigerung der ECM-Proteinsynthese übersteigt die normalen Faltungskapazitäten des ERs. Dies resultiert in ER-Stress und führt zur Steigerung der Expression von ER-Stress-Proteinen wie in unserer fibrotischen Zelllinie TK188 und im gestressten Modell TK173-NaCl.

### ***4.3.2.2 Die HSP spielen eine wichtige Rolle bei der Zelltransformation während der renalen Fibrose***

Die Hitzeschockproteine zählen, wie bereits erwähnt, zu den molekularen Chaperonen, deren Hauptfunktion das Verhindern von Wechselwirkungen und Aggregation zwischen den Proteinen ist sowie das Erreichen des nativen korrekt gefalteten Zustandes der Proteine. Die Synthese bzw. Steigerung der Expression von Hitzeschockproteinen wird sowohl bei prokaryotischen als auch eukaryotischen Zellen durch verschiedene Stress-induzierende Faktoren wie sublethalen Hitzeschock, chemische Substanzen, physikalische Reize und bei Zuständen, bei denen die Zahl nicht oder fehlerhaft gefalteter Proteine in der Zelle zunimmt, hervorgerufen (Löffler 1998). Die HSP werden in Klassen eingeteilt, wobei die erste Klasse die großen Proteine HSP60, 70, 90 und 110 umfasst, welche ohne Hitzeschockbedingungen exprimiert werden, die zweite Klasse aus den Glucose-regulierten Proteinen GRP34, 47, 56, 76, 78, 94 und 174 besteht, deren Expression unter Glucose-Deprivation induziert wird, und die dritte Klasse, welche die kleinen Hitzeschockproteine HSP27, Ubiquitin und  $\alpha$ -Crystallin beinhaltet (Sarto et al. 2000). Die HSP haben wichtige Funktionen bei der zellulären Antwort auf Stress und bei der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase. Einige HSP werden in der Zelle unter Normalbedingungen synthetisiert, andere hauptsächlich durch Stressereignisse hochreguliert. In Fibrose-Modellen konnte eine Überexpression einiger HSP wie die Kollagen-spezifischen HSP (z.B. HSP47) beobachtet werden. HSP47 wurde während der Progression der Fibrose parallel zur Kollagenexpression in der Lunge hochreguliert (Ishii et al. 2003). Eine Überexpression durch Myofibroblasten oder Fibroblasten konnte in humanen Biopsien aus fibrotischen Lungen (Razzaque et al. 1998a) und in Bleomycin-induzierter Lungenfibrose bei Ratten (Razzaque et al. 1998b) beobachtet werden. Andere Arbeiten zeigten, dass die Expressionslevels von HSP47 mit denen des Kollagens I und III und mit der Progression der Leberfibrose korrelierten (Masuda et al. 1994). HSP47 spielt eine wichtige Rolle bei der Kollagendeposition im Allograft-Nierengewebe (Abe et al. 2000) und im Peritoneum von Peritoneal-Dialyse-Patienten (Shiohita et al. 2000). Anderen HSP wie das HSP70 wurde bei der Fibrose ein eher cytoprotektiver Effekt zugeteilt. Dabei wurde in Zusammenhang mit der Lungenfibrose eine Involvierung gegen Gewebeschädigung, Inflammation, Fibrose und Dysfunktion durch eine Inhibierung von TGF- $\beta$ -Produktion, TGF- $\beta$ -abhängiger EMT und Expression von pro-

inflammatorischen Zytokinen festgestellt (Tanaka et al. 2010). Die vergleichende proteomische Analyse der beiden Zelllinien TK173 und TK188 zeigte eine Hochregulierung der Chaperone. Vor allem Calreticulin, HSPA1B, HSPD1, GRP78 und GRP94 waren signifikant hochreguliert in TK188. Dies weist auf eine bedeutende Rolle der Proteinfaltung bei der renalen Fibroseprogression hin. In folgenden Abschnitten widmen wir uns drei der HSP, die in unserer Arbeit speziell hochreguliert waren.

### ***4.3.2.3 Die Glucose-regulierten Proteine***

Die ER-Stress-Induktion von GRP78/BiP stellt einen Hauptregulator der UPR dar (Luo et al. 2006). Dabei kontrolliert das GRP78 die UPR-Signale und hemmt die Stress-induzierte Apoptose (Pyrko et al. 2007). GRP78 kann sich vorübergehend mit neu synthetisierten sekretorischen oder Membranproteinen verbinden oder dauerhaft mit mutanten Proteinen sowie falsch gefalteten Proteinen interagieren und sie für den Abbau markieren. Es wurde gezeigt, dass die Reduktion der GRP78-Expression, eine persistierende UPR aktivieren kann. Die daraus resultierende ER-Dysfunktion kann zur Apoptose führen (Pyrko et al. 2007, Virrey et al. 2008). Eine Überexpression dagegen kann vor der ER-Stress-induzierten Apoptose schützen (Fu et al. 2007, Shu et al. 2008). In Zusammenhang mit der Fibrose zeigten einige Arbeiten (Xu et al. 2009), dass der ER-Stress initial die Induktion der GRP78-Expression aktiviert, zwecks der Zellprotektion, jedoch führt ein prolongierter Stress letztendlich zur Dissoziation des GRP78 von den ER-Stress-Sensorproteinen, zur persistierenden UPR-Aktivierung, zur Kalziumfreisetzung aus dem ER und zur Stress-induzierten Apoptose (Korfei et al. 2008, Lawson et al. 2008). Eine Überexpression konnte auch im Rahmen von Erkrankungen, bei deren Pathogenese der ER-Stress und die Zellapoptose involviert sind, und jenen, die mit fibrotischen Gewebsveränderungen einhergehen, wie die diabetische Kardiomyopathie, beobachtet werden (Li et al. 2008). Ähnlich wie das GRP78, gehört GRP94 zu den ER-molekularen Chaperonen. Eine anti-apoptotische Funktion von GRP94 in der Zelle wird auch vermutet. Es ist festgestellt worden, dass die Expression von GRP94 umgekehrt mit dem apoptotischen Zelltod korreliert (Little und Lee 1995, McCormick et al. 1997). Dabei scheint das GRP94 die apoptotischen Kaskaden zu regulieren, welche aus der Akkumulation der ungefalteten Proteine im ER-Lumen entstehen. In experimentellen Modellen wurde gezeigt, dass Mäuse, welche heterozygote

Mutationen der ER-Chaperone, u.a. GRP94, aufweisen, Glomerulosklerose und tubulointerstitielle Erkrankungen entwickeln (Cybulsky 2010). Die zellprotektive anti-apoptotische Rolle dieser Chaperone scheint im Vordergrund zu stehen. Es ist anzunehmen, dass diese Eigenschaft eine Involvierung bei den fibrotischen Erkrankungen erklärt, da der ER-Stress mit fibrotischen Gewebsveränderungen einhergeht und beim Versagen der Adaptierungsmechanismen auch zur Zellapoptose führen kann. Ein anderer Grund für die Involvierung bei der Fibrose könnte auch die Funktion dieser Chaperone in der Proteinfaltung sein. Fibrotische Zellen, vor allem aktivierte Fibroblasten, produzieren eine große Menge ECM-Proteine. Die korrekte Faltung dieser Proteine und die Vermeidung des ER-Stresses wäre für die Hochregulierung der molekularen Chaperone in den fibrotischen Zellen verantwortlich.

#### ***4.3.2.4 Calreticulin ist ein bedeutendes Protein für die Fibrose***

Calreticulin ist ein Lectin-ähnliches molekulares Chaperon, das in unterschiedlichen Lokalisationen in eukaryotischen Zellen zu finden ist. Dabei stellt das ER-Lumen der Zellkompartiment dar, in dem das Calreticulin mit den größten Mengen zu treffen ist. Es ist ein Kalzium-bindendes/speicherndes Hauptchaperon im ER (Michalak et al. 2002), das, wie andere ER-Chaperone, die Faltung neuer Proteine erleichtert und ihre Aggregation verhindert. Durch seine hohe Kalziumbindungskapazität ist das Calreticulin an der Faltung neu synthetisierter Proteine und Glykoproteine beteiligt. Es ist eine wichtige Komponente des Calreticulin/Calnexin-Zyklus und der Qualitätskontrollpathways im ER (Kopito 1997). Calreticulin ist ebenfalls als interzellulärer Mediator für die Integrin-vermittelte Zelladhäsion und Inhibitor der Steroidhormon-regulierten Genexpression charakterisiert (Coppolino und Dedhar 1998). Calreticulin zählt zusätzlich zu den Chaperonen wie GRP78 und GRP94, welche im Rahmen des ER-Stresses überreguliert werden (Kaufman 1999, Ferri und Kroemer 2001, Patterson und Cyr 2002). Calreticulin ist in die inflammatorischen Antwort involviert. Es stimuliert die Proliferation und Migration von Fibroblasten und fungiert offensichtlich als Chemoattraktant für Makrophagen und Monozyten (Nanney et al. 2008). Calreticulin fördert die Wundheilung. Seine Expression korreliert mit der Fibrose-Entwicklung in Tiermodellen. Dies lässt eine Rolle von Calreticulin in der Regulierung der ECM-Produktion vermuten. Fibroblasten, die Calreticulin überexprimieren, produzieren mehr Kollagen I. Die Kollagenexpression scheint durch

die Kalzium-Levels des ERs und des intrazellulären Calreticulins reguliert zu werden. Calreticulin bildet einen Komplex mit Kollagen in den Zellen und spielt dabei eine wichtige Rolle in sämtlichen Stadien der Kollagenexpression und Verarbeitung. Somit ist Calreticulin als Regulator der Kollagenproduktion identifiziert, mit einer wichtigen Rolle bei der Gewebsumgestaltung und bei der Fibrose (Van Duyn Graham et al. 2010). In Zusammenhang mit der Fibrose zeigten Arbeiten von Kypreou et al (2008), eine Korrelation zwischen der Überexpression von Calreticulin und dem Progress der Fibrose. Im Rahmen der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose konnte eine Überexpression von Calreticulin in frühen Stadien beobachtet werden. Zusätzlich wurde festgestellt, dass TGF- $\beta$ , ein Hauptfaktor in sämtlichen fibrotischen Prozessen, die Expression von Calreticulin in humanen Epithelzellkulturen des Nierenhaupttubulus überreguliert. Diese Beobachtungen weisen auf die Involvierung von Calreticulin in die Fibrose hin, obwohl die genauen Mechanismen noch nicht erläutert sind (Kypreou et al. 2008). Die Überexpression von Calreticulin in TK188 kann auf ihren fibrotischen Phänotyp zurückgeführt werden.

#### ***4.3.2.5 Protein-Disulfid-Isomerase-Hochregulierung als Teil der Zellantwort auf die Zelltransformation während der renalen Fibrose***

Die Thiol-Disulfid-Oxidoreduktasen ERP57 und ERP72 sind lösliche Proteine, die sich hauptsächlich im ER befinden. Sie sind ein Teil der 17 Disulfid-Isomerasen des ERs und sind bekannte Homologe der Protein-Disulfid-Isomerase(PDI)-Familie. ERP57 interagiert bekannterweise mit den beiden Lectin-ähnlichen Chaperonen Calreticulin und Calnexin und fördert dabei die oxidative Faltung neu synthetisierter Glykoproteine, ein Prozess, der die Formation von inter- und intramolekularen Disulfid-Verbindungen erfordert. ERP57 wie auch ERP72 katalysieren effizient die Disulfid-Reduktion, Isomeration und Dithioloxidation in Substratproteinen (Frickel et al. 2004). Eine korrekte Disulfid-Verbindung ist ein Schlüsselschritt der ER-Qualitätskontrolle. Proteine mit inkorrekten Disulfid-Verbindungen werden erkannt und von der Kontrollmaschinerie in den Zytosol zurückgeschickt, in dem sie von Proteasomen abgebaut werden. Durch die Disulfid-Verbindung akquirieren die Proteine im ER ihre stabile Form (Maattanen et al. 2006). Ferner spielen die Disulfidbrücken eine wichtige Rolle bei der korrekten Faltung der Hauptbestandteile der ECM, vor allem Kollagen, Fibronectin und Laminin. Die Hochregulierung der

ERP57 und ERP72 in Zellen mit fibrotischem Phänotyp deutet auf einen erhöhten Bedarf an der Bildung von Disulfid-Verbindungen bei der gesteigerten Synthese und Sekretion von ECM-Proteinen hin und weist auf eine Involvierung in die Entwicklung der renalen Fibrose hin.

### ***4.3.2.6 Proteine des oxidativen Stresses und ihre Rolle bei der Entwicklung der renalen Fibrose***

Der oxidative Stress trägt zur Pathogenese vieler humaner Erkrankungen bei. Dazu zählen Diabetes-induzierte Gefäßschädigungen (Heistad 2006, Masoudi und Inzucchi 2007), neurodegenerative Funktionsstörungen wie bei Morbus Alzheimer (Widmann et al. 1999) und Morbus Parkinson (Edmondson et al. 2002) und Fibrose-verursachte Gewebeschädigungen an vitalen Organen wie Niere, Lunge und Leber. Der oxidative Stress aktiviert verschiedene Signalübertragungskaskaden in der Zelle. Dabei sind die reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) als Hauptmediatoren impliziert. Ihre exzessive Generation leitet den Organismus zur Entwicklung von sämtlichen Abwehrmechanismen (Valko et al. 2007). Einer dieser wichtigen Abwehrmechanismen gegen den oxidativen Stress ist die Abwehr durch die antioxidanten Enzyme, welche unterschiedliche Typen von Glutathion-Peroxidasen beinhalten, u.a. die Peroxiredoxin-Familie (PRDX) und die Superperoxid-Dismutasen (SOD). PRDX ist eine kürzlich entdeckte und charakterisierte Familie von Thiol-spezifischen antioxidanten Enzymen (Chae et al. 1994a, Chae et al. 1994b, Rhee et al. 2005). Sie haben eine Peroxidase-Aktivität ( $\text{ROOH} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{ROH} + \text{H}_2\text{O}$ ) und reduzieren dadurch Hydrogenperoxide, Peroxynitrate und verschiedene organische Hydroperoxide (Hofmann et al 2002, Wood et al. 2003, Immenschuh und Baumgart-Vogt 2005). Sechs Isoformen (PRDX 1 bis 6) sind identifiziert (Rhee et al. 2005). Diese werden in relativ großen Mengen in Zellen produziert (Butterfield et al. 1999, Wood et al. 2003, Immenschuh und Baumgart-Vogt 2005), wobei die PRDX1 die häufigste und ubiquitär verbreitete Isoform der Säugetiere-PRDX ist (Immenschuh und Baumgart-Vogt 2005). Bei einigen Mitgliedern der PRDX-Familie, darunter die PRDX6, wurde im Rahmen von Studien gezeigt, dass die Überexpression dieses Enzyms eine Zytoprotektion gegen ROS-induzierte Zytotoxizität in unterschiedlichen Zelltypen bewirkt (Manevich et al. 2002, Dierick et al. 2003, Wang Y et al. 2004). Die SOD, ebenfalls als antioxidantes Enzym, bewirkt eine Reduktion der Entstehung von freien Radikalen im Rahmen des oxidativen Stresses, indem sie die Dismutation von

O<sub>2</sub><sup>-</sup> zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> katalysiert. Arbeiten zeigten die zytoprotektive Rolle der SOD z.B. bei der Asbest- sowie Bleomycin-induzierten Lungenfibrose (Moriyama et al. 2001). Sowohl die SOD als auch die PRDX-Proteine (PRDX1, 2 und 6) und andere Proteine des oxidativen Stresses waren in der fibrotischen Zelllinie TK188 hochreguliert, mit einer Korrelation zur Hochregulierung von Myofibroblastenmarkern. Dies stellt den oxidativen Stress als wichtigen fibrogenen Faktor in renalen Zellen dar. Interessanterweise konnte im Rahmen einiger Arbeiten ein Zusammenhang zwischen dem oxidativen Stress und der interstitiellen Fibrose festgestellt werden; so führte die Behandlung mit Antioxidanten in vitro zur Suppression des Erscheinens von ACTA2-positiven Myofibroblasten als zelluläre Fibrosemarker (Moriyama et al. 2001). Zudem zeigten andere Arbeiten, dass der zunehmende oxidative Stress und die Formation von oxidativen Produkten eine signifikante Rolle in der Entwicklung der tubulointerstitiellen Fibrose spielen (Kawada et al. 1999). Dies bestätigt eine Beteiligung des oxidativen Stresses im Fibrose-Prozess, führend zu progressiven renalen Erkrankungen. In diesem Zusammenhang würden Antioxidanten eine therapeutische Option bei der Verzögerung oder Prophylaxe der RIF darstellen.

### **4.3.3 Der osmotische Stress und seine Rolle bei der Entwicklung der renalen Fibrose**

Die Niere als metabolisch aktives Organ ist diversen Stressfaktoren wie Sauerstoffdeprivation, Ischämie und Nephrotoxine ausgesetzt. Vor allem aber der ausgeprägt erhöhte osmotische Stress, bedingt durch eine ständig wechselnde Menge an osmotisch wirkenden Substanzen, wie NaCl und Urea im Urin, verlangt von der Niere ein ständiges Anpassen. Der osmotische Stress verursacht Veränderungen der Zytoskelettorganisation (Beck et al 1998) und der Membrantransporteraktivitäten (Burg et al 2007). Darüber hinaus führt der osmotische Stress zu DNA-Läsionen, Protein-Denaturierung, erhöhter Bildung von ROS und stimuliert die Zellapoptose (Neuhofer et al. 1998). Um das Überleben und den Funktionserhalt zu gewährleisten, besitzen die Nierenzellen Anpassungsmechanismen, um diesem Stress entgegen zu wirken. Zu den Anpassungsmechanismen zählen u.a. Akkumulation von intrazellulären organischen Osmolyten (Sorbitol, Betaine, Taurine..) (Burg et al. 2007) und Überexpression von molekularen Chaperonen (z.B. HSP) mit effizientem zytoprotektivem Effekt (Santos et al. 1998). Studien zeigten eine Überexpression und schnelle Induktion von

spezifischen HSP (HSP70, HSP110) in den Nierenzellen nach NaCl-Exposition als adaptative Antwort auf die Perturbationen der Proteinkonformation unter Stress (Santos et al. 1998). Ein anderer Trigger dieser Überexpression könnte der hohe Bedarf an Proteinneufaltung nach der Proteindenaturierung unter Stress sein. Ferner zeigten Arbeiten von Sugiura et al (1998), dass der osmotische Stress die Kollagensynthese in Nierenzellen durch Aktivierung von TGF- $\beta$  stimuliert. Dies hebt die Rolle des osmotischen Stresses als Fibrose-triggernder Faktor hervor. In diesem Zusammenhang zeigte unsere Arbeit bei den Zellen unter NaCl-Stress eine Transformation vom TK173-Phänotyp in einen TK188-ähnlichen-Phänotyp. Zusätzlich detektierten wir unter osmotischem Stress eine erhöhte ROS-Freisetzung als Zeichen des oxidativen Stresses, welcher einen potentiellen Mediator für den profibrotischen Effekt des osmotischen Stresses darstellen könnte. Letztendlich korrelierte unter osmotischem Stress eine Überexpression der Marker vom ER- und oxidativen Stress mit einer Überexpression der Myofibroblasten-Marker. Der Zusammenhang zwischen diesen Pathways und der Fibrose-Entwicklung wurde festgestellt. Die Details zu den molekularen Mechanismen sind Bestandteil weiterer Untersuchungen in unserem Labor.

### 5 Zusammenfassung

Die Forschung an der renalen Fibrose, als grundlegender Pathomechanismus der Gewebeschädigung in der Niere, führend zum Verlust der Nierenfunktion und verantwortlich für die meiste Zahl der renalen Erkrankungen, war bisher unbefriedigend. Die Rolle der renalen Fibroblasten bei der Entwicklung der renalen Fibrose schien immer mehr im Vordergrund zu stehen, jedoch blieben die genauen zellulären Mechanismen unklar. Das Etablieren von zwei immortalisierten Zelllinien, TK173 (nichtfibrotische Nierenfibroblasten) und TK188 (fibrotische Nierenfibroblasten), ermöglichte uns durch eine differentielle proteomische Analyse der beiden Zelllinien die Identifizierung von Proteinen, die verschiedene molekulare Funktionen bei der Entwicklung der renalen Fibrose haben. Diese proteomische Analyse beinhaltete die Zellkultur, die zweidimensionale Gel-Elektrophorese und die massenspektrometrische Analyse. Anschließend wurden die Ergebnisse für ausgewählte Proteine mittels Western-Blot und Immunfluoreszenz bestätigt. Nach Gewinn der Proteinextrakte aus den jeweiligen Zelllinienkulturen, erfolgte die Auftrennung mittels 2D-Gel-Elektrophorese. Dabei entstanden zweidimensionale Proteinmuster mit mehr als 2500 Proteinspots für jede Zelllinie. Die massenspektrometrische Analyse und die Datenbanksuche ermöglichte die Identifizierung von insgesamt 132 Proteinen in den TK173 und TK188. Darunter wiesen 43 Proteine Expressionsunterschiede auf. Interessanterweise konnte der größte Teil dieser Proteine funktionell einzelnen Kategorien zugeordnet werden: Die erste Kategorie umfasst Proteine, die in der Fibrogenese beschrieben wurden (z.B.: FIN, ACTA2, VIN, VIM, DES und KRT). Die zweite Kategorie besteht aus Proteinmarkern des ER(endoplasmatisches Retikulum)-Stresses und des UPR(*unfolded protein response*)-Pathways (GRP78, GRP94, ERP57, ERP72, PDI und CALR) sowie aus Proteinen des oxidativen Stresses (PRDX1, PRDX2, PRDX6, SOD, PARK7 und hypoxia up-regulated 1). Diese waren hochreguliert in der fibrotischen Zelllinie TK188. Für einige ausgewählte genannte Proteine führten wir eine erfolgreiche Bestätigung der Ergebnisse mittels Western-Blot und Immunfluoreszenz-Färbung durch. Die Tatsache, dass die identifizierten differentiell exprimierten Proteine zwischen den beiden Zelllinien u.a. Proteine der Stresspathways wie ER-Stress und oxidativen Stress sind, führte uns in dem weiteren Teil unserer Arbeit zur Prüfung der Hypothese, welchen Einfluss

Stressfaktoren, die diese Proteine regulieren, auf die renalen Fibroblasten haben könnten. Die Aktivierung dieser Stresspathways erfolgte durch Exposition der nichtfibrotischen Zelllinie TK173 gegenüber einem hohen osmotischen Stress mittels hoher NaCl-, Glucose- oder Urea-Konzentration. Eine Exposition der TK173 gegenüber einer höheren Osmolalität resultierte überraschenderweise in einer Aktivierung der beiden oben genannten Stresspathways und in einem TK188-ähnlichen Phänotyp. Zusätzlich wurde eine Steigerung der ROS-Produktion festgestellt und es zeigten sich signifikante Expressionsänderungen der Fibrosemarker und Proteine des ER- und oxidativen Stresses bei der gestressten Zelllinie. Insgesamt wurden 27 Proteine unterschiedlich exprimiert, darunter 22 hochreguliert und 5 herunterreguliert. Parallel zu dem Proteinexpressionsunterschied unter Stress wurde ein Lokalisationswechsel einiger Proteine bei der Immunfluoreszenzfärbung beobachtet; so zeigten beispielsweise ER-Proteine eine zellkernnahe Lokalisation unter Stressbedingungen.

In unserer Arbeit gelang es uns durch die proteomische Analyse von zwei stabilen immortalisierten Zelllinien, einiges über die Mechanismen der renalen Fibrose zu erfahren; typische Fibrosemarker konnten identifiziert werden. Wir stellten eine enge Korrelation zwischen einigen Stresspathways, vor allem zwischen ER-, osmotischem und oxidativem Stress, und ihre Rolle bei der Entwicklung der renalen Fibrose fest (Dihazi et al. 2011). Da einige genaue Zusammenhänge uns noch unklar blieben oder sich lediglich vermuten ließen, sind weitere Untersuchungen notwendig, um Näheres über die Fibrose zu erfahren sowohl in der Niere als auch in anderen Vitalorganen. Das Ziel ist die Entwicklung neuer Therapie-Optionen, welche auf zellulärer Ebene eingreifen würden und zum klinischen Einsatz bei Patienten kommen können.

## 6 Literaturverzeichnis

Abbate M, Zoja C, Remuzzi G (2006): How does proteinuria cause progressive renal damage?. *J Am Soc Nephrol* 17, 2974-2984

Abdel Wahab N, Mason RM (2004): Connective tissue growth factor and renal diseases: some answers, more questions. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 13, 53-58

Abe K, Ozono Y, Miyazaki M, Koji T, Shiohita K, Furusu A, Tsukasaki S, Matsuya F, Hosokawa N, Harada T et al (2000): Interstitial expression of heat shock protein 47 and alpha-smooth muscle actin in renal allograft failure. *Nephrol Dial Transplant* 15, 529-535

Alaoui-Jamali MA, Xu YJ (2006): Proteomic technology for biomarker profiling in cancer: an update. *J Zhejiang Univ Sci B* 7, 411-420

Alexakis C, Maxwell P, Bou-Gharios G (2006): Organ-specific collagen expression: implications for renal disease. *Nephron Exp Nephrol* 102, 71-75

Alpers CE, Hudkins KL, Floege J, Johnson RJ (1994): Human renal cortical interstitial cells with some features of smooth muscle cells participate in tubulointerstitial and crescentic glomerular injury. *J Am Soc Nephrol* 5, 201-209

Aresu L, Rastaldi MP, Scanziani E, Baily J, Radaelli E, Pregel P, Valenza F (2007): Epithelial-mesenchymal transition (EMT) of renal tubular cells in canine glomerulonephritis. *Virchows Arch* 451, 937-942

Bae SH, Harris AG, Hains PG, Chen H, Garfin DE, Hazell SL, Paik YK, Walsh BJ, Cordwell SJ (2003): Strategies for the enrichment and identification of basic proteins in proteome projects. *Proteomics* 3, 569-579

Bai Y, Galetskiy D, Damoc E, Paschen C, Liu Z, Griese M, Liu S, Przybylski M (2004): High resolution mass spectrometric alveolar proteomics: identification of surfactant protein SP-A and SP-D modifications in proteinosis and cystic fibrosis patients. *Proteomics* 4, 2300-2309

Baltimore D (2001): Our genome unveiled. *Nature* 409, 814-816

Bechtel W, McGoohan S, Zeisberg EM, Müller GA, Kalbacher H, Salant DJ, Müller CA, Kalluri R, Zeisberg M (2010): Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney. *Nat Med* 16, 544-550

Beck FX, Burger-Kentischer A, Müller E (1998): Cellular response to osmotic stress in the renal medulla. *Pflugers Arch* 436, 814-827

Beck-Schimmer B, Oertli B, Pasch T, Wüthrich RP (1998): Hyaluronan induces monocyte chemoattractant protein-1 expression in renal tubular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 9, 2283-2290

Beranova-Giorgianni S (2003): Proteome analysis by two dimensional electrophoresis and mass spectrometry: Strengths and Limitations. *Trends Anal Chem* 22, 273-281

Berkelman T, Stenstedt T: 2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients. Principles and Methods. Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden 2002

Boor P, Sebeková K, Ostendorf T, Floege J (2007a): Treatment targets in renal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant* 22, 3391-3407

Boor P, Konieczny A, Villa L, Schult AL, Bücher E, Rong S, Kunter U, van Roeyen CR, Polakowski T, Hawlisch H et al. (2007b). Complement C5 mediates experimental tubulointerstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 18, 1508-1515

Boukhalfa G, Desmoulière A, Rondeau E, Gabbiani G, Sraer JD (1996): Relationship between alpha-smooth muscle actin expression and fibrotic changes in human kidney. *Exp Nephrol* 4, 241-247

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

Bruzzi I, Corna D, Zoja C, Orisio S, Schiffrin EL, Cavallotti D, Remuzzi G, Benigni A (1997): Time course and localization of endothelin-1 gene expression in a model of renal disease progression. *Am J Pathol* 151, 1241-1247

Burg MB, Ferraris JD, Dmitrieva NI (2007): Cellular response to hyperosmotic stresses. *Physiol Rev* 87, 1441-1474

Butterfield LH, Merino A, Golub SH, Shau H (1999): From cytoprotection to tumor suppression: the multifactorial role of peroxiredoxins. *Antioxid Redox Signal* 1, 385-402

Campistol JM, Iñigo P, Jimenez W, Lario S, Clesca PH, Oppenheimer F, Rivera F (1999): Losartan decreases plasma levels of TGF-beta1 in transplant patients with chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 56, 714-719

Chae HZ, Chung SJ, Rhee SG (1994 a): Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J Biol Chem* 269, 27670-27678

Chae HZ, Robison K, Poole LB, Church G, Storz G, Rhee SG (1994 b): Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 7017-7021

Cheung KJ, Tilleman K, Deforce D, Colle I, Van Vlierberghe H (2008): Proteomics in liver fibrosis is more than meets the eye. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 20, 450-464

Chevalier RL, Goyal S, Kim A, Chang AY, Landau D, LeRoith D (2000): Renal tubulointerstitial injury from ureteral obstruction in the neonatal rat is attenuated by IGF-1. *Kidney Int* 57, 882-890

Clouthier DE, Comerford SA, Hammer RE (1997): Hepatic fibrosis, glomerulosclerosis, and a lipodystrophy-like syndrome in PEPCK-TGF-beta1 transgenic mice *J Clin Invest* 100, 2697-2713

Coppolino MG, Dedhar S (1998): Calreticulin. *Int J Biochem Cell Biol* 30, 553-558

Cox JS, Chapman RE, Walter P (1997): The unfolded protein response coordinates the production of endoplasmic reticulum protein and endoplasmic reticulum membrane. *Mol Biol Cell* 8, 1805-1814

Crapo JD (1986): Morphologic changes in pulmonary oxygen toxicity. *Annu Rev Physiol* 48, 721-731

Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribeiro SM, Lawler J, Hynes RO, Boivin GP, Bouck N (1998): Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell* 93, 1159-1170

Crystal RG, Fulmer JD, Baum BJ, Bernardo J, Bradley KH, Bruel SD, Elson NA, Fells GA, Ferrans VJ, Gadek JE et al (1978): Cell, collagen, and idiopathic pulmonary fibrosis. *Lung* 155, 199-224

Cybulsky AV (2010): Endoplasmic reticulum stress in proteinuric kidney disease. *Kidney Int* 77, 187-193

Darby IA, Hewitson TD (2007): Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. *Int Rev Cytol* 257, 143-179

De Jesus Soares T, Costa RS, de Mattos Coelho R, Alves da Silva CG, Coimbra TM (2005): Angiotensin II and endothelin in the renal cortex during the evolution of glycerol-induced acute tubular necrosis. *Ren Fail* 27, 757-762

De Nadal E, Alepuz PM, Posas F (2002): Dealing with osmotic stress through MAP kinase activation. *EMBO Rep* 3, 735-740

Derynck R, Zhang YE (2003): Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425, 577-584

Dierick JF, Wenders F, Chainiaux F, Remacle J, Fisher AB, Toussaint O (2003): Retrovirally mediated overexpression of peroxiredoxin VI increases the survival of WI-38 human diploid fibroblasts exposed to cytotoxic doses of tert-butylhydroperoxide and UVB. *Biogerontology* 4, 125-131

Dihazi H, Asif AR, Agarwal NK, Doncheva Y, Müller GA (2005): Proteomic analysis of cellular response to osmotic stress in thick ascending limb of Henle's loop (TALH) cells. *Mol Cell Proteomics* 4, 1445-1458

Dihazi H, Dihazi GH, Mueller C, Lahrichi L, Asif AR, Bibi A, Eltoweissy M, Vasko R, Mueller GA (2011): Proteomics characterization of cell model with renal fibrosis phenotype: osmotic stress as fibrosis triggering factor. *J Proteomics* 74, 304-318

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

Edmondson DG, Davie JK, Zhou J, Mirnikjoo B, Tatchell K, Dent SY (2002): Site-specific loss of acetylation upon phosphorylation of histone H3. *J Biol Chem* 277, 29496-29502

Ellgaard L, Helenius A (2001): ER quality control: towards an understanding at the molecular level. *Curr Opin Cell Biol* 13, 431-437

Fan JM, Ng YY, Hill PA, Nikolic-Paterson DJ, Mu W, Atkins RC, Lan HY (1999): Transforming growth factor-beta regulates tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in vitro. *Kidney Int* 56, 1455-1467

Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM (1989): Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246, 64-71

Fern RJ, Yesko CM, Thornhill BA, Kim HS, Smithies O, Chevalier RL(1999): Reduced angiotensinogen expression attenuates renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy in mice. *J Clin Invest* 103, 39-46

Ferri KF, Kroemer G (2001): Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* 3, 255-263

Fine LG, Norman JT (2008): Chronic hypoxia as a mechanism of progression of chronic kidney diseases: from hypothesis to novel therapeutics. *Kidney Int* 74, 867-872

Finkel T (1998): Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 10, 248-253

Firtel RA (1981): Multigene families encoding actin and tubulin. *Cell* 24, 6-7

Floege J, Eitner F, Alpers CE (2008): A new look at platelet-derived growth factor in renal disease. *J Am Soc Nephrol* 19, 12-23

Francki A, Bradshaw AD, Bassuk JA, Howe CC, Couser WG, Sage EH (1999): SPARC regulates the expression of collagen type I and transforming growth factor-beta1 in mesangial cells. *J Biol Chem* 274, 32145-32152

Franklin TJ (1997): Therapeutic approaches to organ fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 29, 79-89

Frickel EM, Frei P, Bouvier M, Stafford WF, Helenius A, Glockshuber R, Ellgaard L (2004): ERp57 is a multifunctional thiol-disulfide oxidoreductase. *J Biol Chem* 279, 18277-18287

Fu Y, Li J, Lee AS (2007): GRP78/BiP inhibits endoplasmic reticulum BIK and protects human breast cancer cells against estrogen starvation-induced apoptosis. *Cancer Res* 67, 3734-3740

Gesualdo L, Di Paolo S, Milani S, Pinzani M, Grappone C, Ranieri E, Pannarale G, Schena FP (1994): Expression of platelet-derived growth factor receptors in normal and diseased human kidney. An immunohistochemistry and in situ hybridization study. *J Clin Invest* 94, 50-58

Gharaee-Kermani M, Wiggins R, Wolber F, Goyal M, Phan SH (1996): Fibronectin is the major fibroblast chemoattractant in rabbit anti-glomerular basement membrane disease. *Am J Pathol* 148, 961-967

Glick AD, Jacobson HR, Haralson MA (1992): Mesangial deposition of type I collagen in human glomerulosclerosis. *Hum Pathol* 23, 1373-1379

Godovac-Zimmermann J, Brown LR (2001): Perspectives for mass spectrometry and functional proteomics. *Mass Spectrom Rev* 20, 1-57

Goumenos DS, Brown CB, Shortland J, el Nahas AM (1994): Myofibroblasts, predictors of progression of mesangial IgA nephropathy? *Nephrol Dial Transplant* 9, 1418-1425

Grünert S, Jechlinger M, Beug H (2003): Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 657-665

Guarino M, Tosoni A, Nebuloni M (2009): Direct contribution of epithelium to organ fibrosis: epithelial-mesenchymal transition. *Hum Pathol* 40, 1365-1376

Guo G, Morrissey J, McCracken R, Tolley T, Klahr S (1999): Role of TNFR1 and TNFR2 receptors in tubulointerstitial fibrosis of obstructive nephropathy. *Am J Physiol* 277, 766-772

Ha H, Lee HB (2005): Reactive oxygen species amplify glucose signalling in renal cells cultured under high glucose and in diabetic kidney. *Nephrology (Carlton)* 10, 7-10

Hackl NJ, Bersch C, Feick P, Antoni C, Franke A, Singer MV, Nakchbandi IA (2010): Circulating fibronectin isoforms predict the degree of fibrosis in chronic hepatitis C. *Scand J Gastroenterol* 45, 349-356

Harding HP, Ron D (2002): Endoplasmic reticulum stress and the development of diabetes: a review. *Diabetes* 51, 455-461

Heeg MH, Koziolk MJ, Vasko R, Schaefer L, Sharma K, Müller GA, Strutz F (2005): The antifibrotic effects of relaxin in human renal fibroblasts are mediated in part by inhibition of the Smad2 pathway. *Kidney Int* 68, 96-109

Heistad DD (2006): Oxidative stress and vascular disease: 2005 Duff lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 689-695

Hewitson TD (2009): Renal tubulointerstitial fibrosis: common but never simple. *Am J Physiol Renal Physiol* 296, 1239-1244

Hinz B (2010): The myofibroblast: paradigm for a mechanically active cell. *J Biomech* 43, 146-155

Hirschberg R (1996): Bioactivity of glomerular ultrafiltrate during heavy proteinuria may contribute to renal tubulo-interstitial lesions: evidence for a role for insulin-like growth factor I. *J Clin Invest* 98, 116-124

Hisada Y, Sugaya T, Yamanouchi M, Uchida H, Fujimura H, Sakurai H, Fukamizu A, Murakami K (1999): Angiotensin II plays a pathogenic role in immune-mediated renal injury in mice. *J Clin Invest* 103, 627-635

Hoher B, Thöne-Reineke C, Rohmeiss P, Schmager F, Slowinski T, Burst V, Siegmund F, Quertermous T, Bauer C, Neumayer HH et al (1997): Endothelin-1 transgenic mice develop glomerulosclerosis, interstitial fibrosis, and renal cysts but not hypertension. *J Clin Invest* 99, 1380-1389

Hofmann B, Hecht HJ, Flohé L (2002): Peroxiredoxins. *Biol Chem* 383, 347-364

Holthöfer H, Miettinen A, Lehto VP, Lehtonen E, Virtanen I.(1984): Expression of vimentin and cytokeratin types of intermediate filament proteins in developing and adult human kidneys. *Lab Invest* 50, 552-559

Hruska KA, Guo G, Wozniak M, Martin D, Miller S, Liapis H, Loveday K, Klahr S, Sampath TK, Morrissey J (2000): Osteogenic protein-1 prevents renal fibrogenesis associated with ureteral obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol* 279, 130-143

Hugo C, Shankland SJ, Pichler RH, Couser WG, Johnson RJ (1998): Thrombospondin 1 precedes and predicts the development of tubulointerstitial fibrosis in glomerular disease in the rat. *Kidney Int* 53, 302-311

Hynes RO: Fibronectins, Springer series in molecular biology. Springer Verlag, New York 1990

Immenschuh S, Baumgart-Vogt E (2005): Peroxiredoxins, oxidative stress, and cell proliferation. *Antioxid Redox Signal* 7, 768-777

Ishii H, Mukae H, Kakugawa T, Iwashita T, Kaida H, Fujii T, Hayashi T, Kadota J, Kohno S (2003): Increased Expression of collagen-binding heat shock protein 47 in murine bleomycin- induced pneumopathy. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285: 957-963

Jernigan SM, Eddy AA: Experimental insights into the mechanism of tubulo-interstitial scarring. In: Mechanisms and clinical management of chronic renal failure; Hrsg. El Nahas M, Harris K, Anderson S. 2.Auflage. Oxford University Press, Oxford 2000: 104-145

Jinde K, Nikolic-Paterson DJ, Huang XR, Sakai H, Kurokawa K, Atkins RC, Lan HY (2001). Tubular phenotypic change in progressive tubulointerstitial fibrosis in human glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis* 38: 761-769

Kamata H, Hirata H (1999). Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal* 11: 1-14

Karas M, Hillenkamp F (1988): Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 60, 2299-2301

Kaufman RJ (1999): Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev* 13, 1211-1233

Kawada N, Moriyama T, Ando A, Fukunaga M, Miyata T, Kurokawa K, Imai E, Hori M (1999): Increased oxidative stress in mouse kidneys with unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* 56, 1004-1013

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

Kliem V, Johnson RJ, Alpers CE, Yoshimura A, Couser WG, Koch KM, Floege J (1996): Mechanisms involved in the pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis in 5/6-nephrectomized rats. *Kidney Int* 49, 666-678

Kopito RR (1997): ER quality control: the cytoplasmic connection. *Cell* 88: 427-430

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

Korfei M, Ruppert C, Mahavadi P, Henneke I, Markart P, Koch M, Lang G, Fink L, Bohle RM, Seeger W et al. (2008): Epithelial endoplasmic reticulum stress and apoptosis in sporadic idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 178, 838-846

Kypreou KP, Kawadas P, karamessinis P, Peroulis M, Alberti A, Sideras P, Psarras S, Capetanaki Y, Politis PK, Charonis AS (2008): Altered expression of calreticulin during the development of fibrosis. *Proteomics* 8, 2407-2419

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

Lawson WE, Crossno PF, Polosukhin VV, Roldan J, Cheng DS, Lane KB, Blackwell TR, Xu C, Markin C, Ware LB et al. (2008): Endoplasmic reticulum stress in alveolar epithelial cells is prominent in IPF: association with altered surfactant protein processing and herpesvirus infection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294, 1119-1126

Lewis MP, Norman JT (1995): Pro-fibrogenic relevance of expression of smooth muscle actin (SMA) by renal fibroblasts- Correlation with tissue inhibitor of metalloproteinase-1(TIMP-1) expression. *J Am Soc Nephrol* 6, 899

Li X, Kimura H, Hirota K, Kasuno K, Torii K, Okada T, Kurooka H, Yokota Y, Yoshida H (2005): Synergistic effect of hypoxia and TNF-alpha on production of PAI-1 in human proximal renal tubular cells. *Kidney Int* 68, 569-583

Li Z, Zhang T, Dai H, Liu G, Wang H, Sun Y, Zhang Y, Ge Z (2008): Endoplasmic reticulum stress is involved in myocardial apoptosis of streptozocin-induced diabetic rats. *J Endocrinol* 196, 565-572

Lindenmeyer MT, Rastaldi MP, Ikehata M, Neusser MA, Kretzler M, Cohen CD, Schlöndorff D (2008): Proteinuria and hyperglycemia induce endoplasmic reticulum stress. *J Am Soc Nephrol* 19, 2225-2236

Little E, Lee AS (1995): Generation of a mammalian cell line deficient in glucose-regulated protein stress induction through targeted ribozyme driven by a stress-inducible promoter. *J Biol Chem* 270, 9526-9534

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

Liu Y (2004b): Hepatocyte growth factor in kidney fibrosis: therapeutic potential and mechanisms of action. *Am J Physiol Renal Physiol* 287, 7-16

Liu Y (2006): Renal fibrosis: New insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int* 69, 213-217

Löffler G: Proteinbiosynthese, Proteinmodifizierung und Proteinabbau; in: *Biochemie und Pathobiochemie*; hrsg. v. Löffler G, Petrides PE u.a.; Springer Verlag, Berlin 1998, 278-281

Lonnemann G, Shapiro L, Engler-Blum G, Müller GA, Koch KM, Dinarello CA(1995a): Cytokines in human renal interstitial fibrosis. I. IL-1 is a paracrine growth factor for cultured fibrosis-derived kidney fibroblasts. *Kidney Int* 47, 837-844

Lonnemann G, Engler-Blum G, Müller GA, Koch KM, Dinarello CA(1995b): Cytokines in human renal interstitial fibrosis.II. Intrinsic Interleukin (IL)-1 synthesis and IL-1-dependant production of IL-6 and IL-8 by cultured kidney fibroblasts. *Kidney Int* 47, 845-854

Lottspeich F, Zorbas H: *Bioanalytik*; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 1998

Luo S, Mao C, Lee B, Lee AS (2006): GRP78/BiP is required for cell proliferation and protecting the inner cell mass from apoptosis during early mouse embryonic development. *Mol Cell Biol* 26, 5688-5697

- Ma LJ, Fogo AB (2009): PAI-1 and kidney fibrosis. *Front Biosci* 14, 2028-2041
- Maattanen P, Kozlov G, Gehring K, Thomas DY (2006): ERp57 and PDI: multifunctional protein disulfide isomerases with similar domain architectures but differing substrate-partner associations. *Biochem Cell Biol* 84, 881-889
- Manevich Y, Sweitzer T, Pak JH, Feinstein SI, Muzykantov V, Fisher AB (2002): 1-Cys peroxiredoxin overexpression protects cells against phospholipid peroxidation-mediated membrane damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 11599-11604
- Marcussen N (1992): Atubular glomeruli and the structural basis for chronic renal failure. *Lab Invest* 66, 265-284
- Masoudi FA, Inzucchi SE (2007): Diabetes mellitus and heart failure: epidemiology, mechanisms, and pharmacotherapy. *Am J Cardiol* 99, 113-132
- Masuda H, Fukumoto M, Hirayoshi K, Nagata K (1994): Coexpression of the collagen-binding stress protein HSP47 gene and the alpha 1(I) and alpha1(III) collagen genes in carbon tetrachloride-induced rat liver fibrosis. *J Clin Invest* 94, 2481-2488
- McCarty MF (1998): A central role for protein kinase C overactivity in diabetic glomerulosclerosis: Implications for prevention with antioxidants, fish oil, and ACE inhibitors. *Med Hypotheses* 50, 155-165
- McCormick TS, McColl KS, Distelhorst CW (1997): Mouse lymphoma cells destined to undergo apoptosis in response to thapsigargin treatment fail to generate a calcium-mediated grp78/grp94 stress response. *J Biol Chem* 272, 6087-6092
- McDonald GA, Sarkar P, Rennke H, Unemori E, Kalluri R, Sukhatme VP (2003): Relaxin increases ubiquitin-dependent degradation of fibronectin in vitro and ameliorates renal fibrosis in vivo. *Am J Physiol Renal Physiol* 285, 59-67
- Michalak M, Lynch J, Groenendyk J, Guo L, Robert Parker JM, Opas M (2002): Calreticulin in cardiac development and pathology. *Biochim Biophys Acta* 1600, 32-37
- Miner JH (1999): Renal basement membrane components. *Kidney Int* 56, 2016-2024
- Miyazaki M, Nishino T, Abe K, Furusu A, Koji T, Kohno S: Regulation of Renal Extracellular Matrix metabolism. In: *Renal Fibrosis; Contrib Nephrol*, vol.139. Razaque MS, Taguchi T, Karger Verlag, Basel, 2003: 141-155
- Mizuno S, Kurosawa T, Matsumoto K, Mizuno-Horikawa Y, Okamoto M, Nakamura T (1998): Hepatocyte growth factor prevents renal fibrosis and dysfunction in a mouse model of chronic renal disease. *J Clin Invest* 101, 1827-1834
- Mori K, Kawahara T, Yoshida H, Yanagi H, Yura T (1996): Signalling from endoplasmic reticulum to nucleus: transcription factor with a basic-leucine zipper motif is required for the unfolded protein-response pathway. *Genes Cells* 1, 803-817

Moriyama T, Kawada N, Nagatoya K, Takeji M, Horio M, Ando A, Imai E, Hori M (2001): Fluvastatin suppresses oxidative stress and fibrosis in the interstitium of mouse kidneys with unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* 59, 2095-2103

Morrissey J, Hruska K, Guo G, Wang S, Chen Q, Klahr S (2002): Bone morphogenetic protein-7 improves renal fibrosis and accelerates the return of renal function. *J Am Soc Nephrol* 13, 14-21

Muchaneta-Kubara EC, el Nahas AM (1997): Myofibroblast phenotypes expression in experimental renal scarring. *Nephrol Dial Transplant* 12, 904-915

Müller GA, Frank J, Rodemann HP, Engler-Blum G (1995): Human renal fibroblast cell lines (tFKIF and tNKF) are new tools to investigate pathophysiologic mechanisms of renal interstitial fibrosis. *Exp Nephrol* 3, 127-133

Myllyharju J, Kivirikko KI (2001): Collagens and collagen-related diseases. *Ann Med* 33, 7-21

Nanney LB, Woodrell CD, Greives MR, Cardwell NL, Pollins AC, Bancroft TA, Chesser A, Michalak M, Rahman M, Siebert JW et al. (2008): Calreticulin enhances porcine wound repair by diverse biological effects. *Am J Pathol* 173, 610–630

Nathan CF (1987): Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 79, 319-326

Neuhofer W, Müller E, Burger-Kentischer A, Fraek ML, Thurau K, Beck F (1998): Pretreatment with hypertonic NaCl protects MDCK cells against high urea concentrations. *Pflügers Arch* 435, 407-414

Ni M, Lee AS (2007): ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS Lett* 581, 3641-3651

Nigam SK, Goldberg AL, Ho S, Rohde MF, Bush KT, Sherman MYu (1994): A set of endoplasmic reticulum proteins possessing properties of molecular chaperones includes Ca<sup>2+</sup>-binding proteins and members of the thioredoxin superfamily. *J Biol Chem* 269, 1744-1749

Nouchi T, Tanaka Y, Tsukada T, Sato C, Marumo F (1991): Appearance of alpha-smooth-muscle-actin-positive cells in hepatic fibrosis. *Liver* 11, 100-105

Oda T, Jung YO, Kim HS, Cai X, López-Guisa JM, Ikeda Y, Eddy AA (2001): PAI-1 deficiency attenuates the fibrogenic response to ureteral obstruction. *Kidney Int* 60, 587-596

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

Orphanides C, Fine LG, Norman JT (1997): Hypoxia stimulates proximal tubular cell matrix production via a TGF-beta1-independent mechanism. *Kidney Int* 52, 637-647

Ostendorf T, Eitner F, Floege J.(2011): The PDGF family in renal fibrosis. *Pediatr Nephrol.*(im Druck)

Patterson C, Cyr D (2002): Welcome to the machine: a cardiologist's introduction to protein folding and degradation. *Circulation* 106, 2741-2746

Pichler RH, Bassuk JA, Hugo C, Reed MJ, Eng E, Gordon KL, Pippin J, Alpers CE, Couser WG, Sage EH et al (1996): SPARC is expressed by mesangial cells in experimental mesangial proliferative nephritis and inhibits platelet-derived-growth-factor-mediated mesangial cell proliferation in vitro. *Am J Pathol* 148, 1153-1167

Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Balian J, Kang AH (1981): Induction of fibroblast chemotaxis by fibronectin. Localization of the chemotactic region to a 140,000-molecular weight non-gelatin-binding fragment. *J Exp Med* 153, 494-499

Powell DW (2000): Myofibroblasts: paracrine cells important in health and disease. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 111, 271-292; discussion 292-293

Pyrko P, Schönthal AH, Hofman FM, Chen TC, Lee AS (2007): The unfolded protein response regulator GRP 78/BiP as a novel target for increasing chemosensitivity in malignant gliomas. *Cancer Res* 67, 9809-9816

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

Razzaque MS, Nazneen A, Taguchi T (1998a): Immunolocalization of collagen and collagen-binding heat shock protein 47 in fibrotic lung diseases. *Mod Pathol* 11, 1183-1188

Razzaque MS, Hossain MA, Kohno S, Taguchi T (1998b): Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rat is associated with increased expression of collagen-binding heat shock protein (HSP) 47. *Virchows Arch* 432, 455-460

Reilly JT, Nash JR (1988): Vitronectin (serum spreading factor): its localisation in normal and fibrotic tissue. *J Clin Pathol* 41, 1269-1272

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

Rhee SG, Chae HZ, Kim K (2005): Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med* 38, 1543-1552

Richter CM (2006): Role of endothelin in chronic renal failure--developments in renal involvement. *Rheumatology (Oxford)* 45, 36-38.

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

Rodemann HP, Müller GA (1991): Characterization of human renal fibroblasts in health and disease: II. In vitro growth, differentiation, and collagen synthesis of fibroblasts from kidneys with interstitial fibrosis. *Am J Kidney Dis* 17, 684-686

Rossert J, Terraz-Durasnel C, Brideau G (2000): Growth factors, cytokines, and renal fibrosis during the course of diabetic nephropathy. *Diabetes Metab* 26, 16-24

Rubenstein PA. (1990): The functional importance of multiple actin isoforms. *Bioessays* 12, 309-315

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

Ryu EJ, Harding HP, Angelastro JM, Vitolo OV, Ron D, Greene LA (2002): Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in cellular models of Parkinson's disease. *J Neurosci* 22, 10690-10698

Sakai N, Wada T, Matsushima K, Bucala R, Iwai M, Horiuchi M, Kaneko S (2008): The renin-angiotensin system contributes to renal fibrosis through regulation of fibrocytes. *J Hypertens* 26, 780-790

Santoni V, Molloy M, Rabilloud T (2000): Membrane proteins and proteomics: un amour impossible?. *Electrophoresis* 21, 1054-1070

Santos BC, Chevaile A, Kojima R, Gullans SR (1998): Characterization of the Hsp110/SSE gene family response to hyperosmolality and other stresses. *Am. J. Physiol* 274, 1054-1061

Sarto C, Binz PA, Mocarelli P (2000): Heat shock proteins in human cancer. *Electrophoresis* 21, 1218-1226

Schröder M, Kaufman RJ (2005): The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 74, 739-789

Serón D, Alexopoulos E, Raftery MJ, Hartley B, Cameron JS (1990): Number of interstitial capillary cross-sections assessed by monoclonal antibodies: relation to interstitial damage. *Nephrol Dial Transplant* 5, 889-893

Sharma K, Eltayeb BO, McGowan TA, Dunn SR, Alzahabi B, Rohde R, Ziyadeh FN, Lewis EJ (1999): Captopril-induced reduction of serum levels of transforming growth factor- $\beta$ 1 correlates with long-term renoprotection in insulin-dependent diabetic patients. *Am J Kidney Dis* 34, 818-823

Shiohita K, Miyazaki M, Ozono Y, Abe K, Taura K, Harada T, Koji T, Taguchi T, Kohno S (2000): Expression of heat shock proteins 47 and 70 in the peritoneum of patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Kidney Int* 57, 619-631

Shu CW, Sun FC, Cho JH, Lin CC, Liu PF, Chen PY, Chang MD, Fu HW, Lai YK (2008): GRP78 and Raf-1 cooperatively confer resistance to endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Cell Physiol* 215, 627-635

Skalli O, Schürch W, Seemayer T, Lagacé R, Montandon D, Pittet B, Gabbiani G (1989): Myofibroblasts from diverse pathologic settings are heterogeneous in their content of actin isoforms and intermediate filament proteins. *Lab Invest* 60, 275-285

Sonnylal S, Shi-Wen X, Leoni P, Naff K, Van Pelt CS, Nakamura H, Leask A, Abraham D, Bou-Gharios G, de Crombrughe B (2010): Selective expression of connective tissue growth factor in fibroblasts in vivo promotes systemic tissue fibrosis. *Arthritis Rheum* 62, 1523-1532

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

Studer RK, Craven PA, DeRubertis FR (1997): Antioxidant inhibition of protein kinase C-signaled increases in transforming growth factor- beta in mesangial cells. *Metabolism* 46, 918-925

Sugiura T, Yamauchi A, Kitamura H, Matusoka Y, Horio M, Imai E, Hori M (1998): Effects of hypertonic stress on transforming growth factor-beta activity in normal rat kidney cells. *Kidney Int* 53, 1654-1660

Syrovets T, Simmet T (2004): Novel aspects and new roles for the serine protease plasmin. *Cell Mol Life Sci* 61, 873-885

Takeji M, Moriyama T, Oseto S, Kawada N, Hori M, Imai E, Miwa T (2006): Smooth muscle alpha-actin deficiency in myofibroblasts leads to enhanced renal tissue fibrosis. *J Biol Chem* 281, 40193-40200

Tanaka K, Tanaka Y, Namba T, Azuma A, Mizushima T (2010): Heat shock protein 70 protects against bleomycin -induced pulmonary fibrosis in mice. *Biochem Pharmacol* 80, 920-931

Taneda S, Pippin JW, Sage EH, Hudkins KL, Takeuchi Y, Couser WG, Alpers CE (2003): Amelioration of diabetic nephropathy in SPARC-null mice. *J Am Soc Nephrol* 14, 968-980

Tang WW, Ulich TR, Lacey DL, Hill DC, Qi M, Kaufman SA, Van GY, Tarpley JE, Yee JS (1996): Platelet-derived growth factor-BB induces renal tubulointerstitial myofibroblast formation and tubulointerstitial fibrosis. *Am J Pathol* 148, 1169-1180

Tang WW, Van GY, Qi M (1997): Myofibroblast and alpha 1 (III) collagen expression in experimental tubulointerstitial nephritis. *Kidney Int* 51, 926-931

Thomas C, Moll R: Systematik immunhistochemisch darstellbare Makromoleküle; in: *Allgemeine Pathologie*; hrsg v. Büttner R, Thomas C u.a.; Schattauer Verlag, Stuttgart 2003, 12-20

Torikata C, Villiger B, Kuhn C 3rd, McDonald JA (1985): Ultrastrukturelle Distribution von Fibronectin in normaler und fibrotischer menschlicher Lunge. *Lab Invest* 52, 399-408

Tostes RC, Touyz RM, He G, Ammarguella F, Schiffrin EL (2002): Endothelin A-Rezeptorblockade verringert die Expression von Wachstumsfaktoren und Kollagen und verbessert die Aktivität von Matrixmetalloproteinase-2 in den Nieren von spontan hypertensiven Ratten. *J Cardiovasc Pharmacol* 39, 892-900

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979): Elektrophoretischer Transfer von Proteinen von Polyacrylamidgelen auf Nitrocelluloseblätter: Verfahren und einige Anwendungen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007): Freie Radikale und Antioxidantien in normalen physiologischen Funktionen und menschlicher Krankheit. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 44-84

Van den Branden C, Ceysens B, De Craemer D, Pauwels M, Vanden Houte K, De Bleser P, Hellemans K, Geerts A, Verbeelen D (2000): Nierenantioxidantienenzyme und fibroseassoziierte Marker im Ratte-Adriamycin-Modell. *Nephron* 86, 167-175

Van Duyn Graham L, Sweetwyne MT, Pallero MA, Murphy-Ullrich JE (2010): Intrazelluläres Calreticulin reguliert mehrere Schritte in der Fibrillarkollagenexpression, -trafficking und -verarbeitung in die Extrazellulärmatrix. *J Biol Chem* 285, 7067-7078

Verrecchia F, Mauviel A (2007): Transformierendes Wachstumsfaktor-beta und Fibrose. *World J Gastroenterol* 13, 3056-3062

Vesey DA, Cheung C, Cuttle L, Endre Z, Gobe G, Johnson DW (2002): Interleukin-1beta stimuliert die menschliche Nierenfibroblastenproliferation und die Matrixproteinproduktion durch einen transformierenden Wachstumsfaktor-beta-abhängigen Mechanismus. *J Lab Clin Med* 140, 342-350

Virrey JJ, Dong D, Stiles C, Patterson JB, Pen L, Ni M, Schönthal AH, Chen TC, Hofman FM, Lee AS (2008): Stresschaperon GRP78/BiP verleiht Chemoresistenz Tumorenassoziierten Endothelzellen. *Mol Cancer Res* 6, 1268-1275

Wada T, Furuichi K, Sakai N, Iwata Y, Kitagawa K, Ishida Y, Kondo T, Hashimoto H, Ishiwata Y, Mukaida N et al. (2004): Gengentherapie durch Blockade von Monocytenchemoattraktantprotein-1 bei Nierenfibrose. *J Am Soc Nephrol* 15, 940-948

Wang SN, Lapage J, Hirschberg R (1999): Glomeruläre Ultrafiltration von IGF-I kann zu erhöhter Natriumretention bei diabetischer Nephropathie beitragen. *J Lab Clin Med* 134, 154-160

Wang Y, Manevich Y, Feinstein SI, Fisher AB (2004): Adenovirusvermittelte Übertragung des 1-cys Peroxiredoxin-Gens in die Mause Lunge schützt vor hyperoxischer Schädigung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286, 1188-1193

Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL, Humphery-Smith I (1995): Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 16, 1090-1094

Wegrowski J, Remy J, Martin M, Lafuma C (1989): Fibronectin and Glycosaminoglycan Synthesis by fibrotic Pig fibroblasts in primary culture. *Connect Tissue Res* 23, 237-249

Wells AF, Larsson E, Tengblad A, Fellström B, Tufveson G, Klareskog L, Laurent TC (1990): The localization of hyaluronan in normal and rejected human kidneys. *Transplantation* 50, 240-243

Westermeier R: *Electrophoresis in Practice*, 3.Auflage, Wiley-VCH, Weinheim 2001

Westermeier R, Naven T, Höpker HR: *Proteomics in practice: a guide to successful experimental design*, 2. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim 2008

Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL (1999): Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 79, 143-180

Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, Yan JX, Gooley AA, Hughes G, Humphery-Smith I et al. (1996): From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N Y)* 14, 61-65

Wilkins MR, Gasteiger E, Gooley AA, Herbert BR, Molloy MP, Binz PA, Ou K, Sanchez JC, Bairoch A, Williams KL et al (1999): High-throughput mass spectrometric discovery of protein post-translational modifications. *J Mol Biol* 289, 645-657

Willis BC, Liebler JM, Luby-Phelps K, Nicholson AG, Crandall ED, Du Bois RM, Borok Z (2005): Induction of Epithelial-Mesenchymal Transition in Alveolar Epithelial Cells by Transforming Growth Factor-beta1: Potential Role in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Pathol* 166, 1321-1332

Wilm MS, Mann M (1994): Electrospray and Taylor-Cone Theory, Dole's beam of macromolecules at last?. *Int J Mass Spectrom Ion Proc* 136, 167-180

Wolf G (2006): Renal injury due to renin-angiotensin-aldosterone system activation of the transforming growth factor-beta pathway. *Kidney Int* 70, 1914-1919

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, Stahl RA (1999): Angiotensin II induces alpha3(IV) collagen expression in cultured murine proximal tubular cells. *Proc Assoc Am Physicians* 111, 357-364

Wood ZA, Schröder E, Robin Harris J, Poole LB (2003): Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* 28, 32-40

Wulfkuhle JD, Paweletz CP, Steeg PS, Petricoin EF 3rd, Liotta L (2003): Proteomic approaches to the diagnosis, treatment, and monitoring of cancer. *Adv Exp Med Biol* 532, 59-68

Wynn TA (2008): Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 214, 199-210

Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC (2005): Endoplasmic reticulum stress: Cell life and death decisions. *J Clin Invest* 115, 2656-2664

Xu D, Perez RE, Rezaiekhaliq MH, Bourdi M, Truog WE (2009): Knockdown of ERp57 increases BiP/GRP78 induction and protects against hyperoxia and tunicamycin-induced apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297, 44-51

Yamaoka K, Nouchi T, Marumo F, Sato C (1993): Alpha-smooth-muscle actin expression in normal and fibrotic human livers. *Dig Dis Sci* 38, 1473-1479

Yamate J (2007): Heterogeneity of Macrophage Populations and Myofibroblasts Appearing in Rat Renal Interstitial Fibrosis. *J Toxicol Pathol* 20, 185-195

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

Yang J, Dai C, Liu Y (2005): A novel mechanism by which hepatocyte growth factor blocks tubular epithelial to mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol* 16, 68-78

You SA, Archacki SR, Angheloiu G, Moravec CS, Rao S, Kinter M, Topol EJ, Wang Q (2003): Proteomic approach to coronary atherosclerosis shows ferritin light chain as a significant marker: evidence consistent with iron hypothesis in atherosclerosis. *Physiol Genomics* 13, 25-30

Yu E, Choe G, Gong G, Lee I (1993): Expression of alpha-smooth muscle actin in liver diseases. *J Korean Med Sci* 8, 367-373

Zeisberg EM, Potenta SE, Sugimoto H, Zeisberg M, Kalluri R (2008): Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol* 19, 2282-2287

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

Zhang HY, Gharaee-Kermani M, Zhang K, Karmioli S, Phan SH (1996): Lung fibroblast alpha-smooth muscle actin expression and contractile phenotype in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 148, 527-537

Zhou Y, Poczatek MH, Berecek KH, Murphy-Ullrich JE (2006): Thrombospondin 1 mediates angiotensin II induction of TGF-beta activation by cardiac and renal cells under both high and low glucose conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 339, 633-641

Zimmerli LU, Schiffer E, Zurbig P, Good DM, Kellmann M, Mouis L, Pitt AR, Coon JJ, Schmieder RE, Peter KH et al. (2008): Urinary proteomic biomarkers in coronary artery disease. *Mol Cell Proteomics* 7, 290-298

Zoja C, Morigi M, Figliuzzi M, Bruzzi I, Oldroyd S, Benigni A, Ronco P, Remuzzi G (1995): Proximal tubular cell synthesis and secretion of endothelin-1 on challenge with albumin and other proteins. *Am J Kidney Dis* 26, 934-941

Zuk A, Bonventre JV, Brown D, Matlin KS (1998): Polarity, integrin, and extracellular matrix dynamics in the postischemic rat kidney. *Am J Physiol* 275, 711-731

Zuk A, Bonventre JV, Matlin KS (2001): Expression of fibronectin splice variants in the postischemic rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 280, 1037-1053

## Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben.  
Insbesondere bei:

Herrn Prof. Dr. H. Dihazi für die Überlassung dieses interessanten Themas sowie für die Betreuung und Hilfe bei der Durchführung der Experimente und Verfassung dieser Arbeit

Herrn Prof. Dr. GA. Müller als Leiter der Abteilung Nephrologie und Rheumatologie für die Bereitstellung der Räumlichkeiten für die Durchführung der Arbeit

Frau E. Brunst-Knoblich für die nette Zusammenarbeit und die freundliche Unterstützung sowie die Hinweise bei der technischen Durchführung der Arbeit

Allen anderen Doktoranden der Arbeitsgruppe für die freundliche Hilfe und die gute Arbeitsatmosphäre

Herrn Dr. rer. nat. A. R. Asif aus der klinischen Chemie für die Messungen am Q-TOF.

