

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

**Die Rolle der *Bone-Morphogenetic-Proteine*
(BMP) -2 und -5 in der adulten humanen Niere und bei der
hypertensiven Nephrosklerose**

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

vorgelegt von
Jelena Bevanda
aus
Göppingen

Göttingen 2014

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H.K. Kroemer
I. Berichterstatter/in: PD Dr. med. C. Bramlage
II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. M. Zeisberg
III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. M. Oppermann
Tag der mündlichen Prüfung: 28.04.2015

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Chronische Niereninsuffizienz.....	1
1.2. Hypertensive Nephrosklerose.....	3
1.3. Pathophysiologie der hypertensiven Nephrosklerose.....	3
1.4. Pathophysiologie der Nierenfibrose.....	4
1.5. Angiotensin-2 als profibrogenes Zytokin der hypertensiven Nephrosklerose.....	5
1.6. TGF-β-Superfamilie.....	6
1.7. Bone-Morphogenetic-Proteine	8
1.7.1. Bone-Morphogenetic-Protein-5 (BMP-5).....	9
1.7.2. Bone-Morphogenetic-Protein-2 (BMP-2).....	11
1.8. Therapeutische Möglichkeiten der hypertensiven Nephrosklerose.....	12
1.9. Zielsetzung.....	14
2. Material und Methoden.....	16
2.1. Material.....	16
2.1.1. Geräte.....	16
2.1.2. Gebrauchsmittel.....	17
2.1.3. Chemikalien.....	17
2.1.4. Kit-Systeme	19
2.1.5. Allgemeine Puffer und Lösungen.....	19
2.1.6. Materialien für die <i>real-time PCR</i>	20
2.1.7. Materialien für den Western Blot.....	20
2.1.8. Stimulanzen.....	21
2.1.9. Antikörper.....	21
2.1.10. Primer für die <i>real-time PCR</i>	22
2.1.11. Renale humane Fibroblastenzelllinien TK-173 und TK-188.....	22
2.1.12. Renale proximale Tubulusepithelzelllinie HK-2.....	22
2.1.13. Software.....	23
2.2. Methoden.....	23
2.2.1. Analyse der Daten aus dem Kooperationsprojekt <i>European Renal cDNA Bank</i>	23

2.2.2. Transkription von BMP-2 und BMP-5 <i>in vitro</i>	24
2.2.3. Stimulation von TK-173-, TK-188- und HK-2-Zellen <i>in vitro</i>	24
2.2.4. <i>real-time PCR</i>	25
2.2.5. Western Blot.....	29
2.2.6. Makrophagen-Migrationsassay.....	30
2.2.7. Proliferationsassay.....	32
2.2.8. Statistische Auswertung.....	33
3. Ergebnisse.....	34
3.1. BMP-5 in der adulten humanen Niere.....	34
3.1.1. BMP-5 in der adulten humanen Niere und bei der hypertensiven Nephrosklerose	34
3.1.2. Transkription von BMP-5 in humanen renalen Zelllinien	35
3.1.3. Transkription von BMP-5 <i>in vitro</i>	36
3.2. Regulation von BMP-5	36
3.2.1. Einfluss von Angiotensin-2 auf die BMP-5-Transkription <i>in vitro</i>	36
3.2.2. Einfluss von BMP-7 auf die Transkription von BMP-5 in renalen Zelllinien.....	38
3.3. Funktion von BMP-5	40
3.3.1. Einfluss von BMP-5 auf die Migration von Makrophagen <i>in vitro</i>	40
3.3.2. Einfluss auf die Proliferation durch BMP-5 und Angiotensin-2 <i>in vitro</i>	42
3.4. BMP-2 in der adulten humanen Niere	44
3.4.1. BMP-2 in der adulten humanen Niere und bei der hypertensiven Nephrosklerose	44
3.4.2. Transkription von BMP-2 in humanen renalen Zelllinien.....	45
3.4.3. Transkription von BMP-2 <i>in vitro</i>	46
3.5. Regulation von BMP-2.....	46
3.5.1. Einfluss von Angiotensin-2 auf die BMP-2-Transkription <i>in vitro</i>	46
3.5.2. Einfluss von BMP-5 und -7 auf die Transkription von BMP-2 <i>in vitro</i>	48
3.6. Funktion von BMP-2.....	50
3.6.1. Proliferativer Einfluss durch BMP-2 <i>in vitro</i>	50
4. Diskussion.....	51
4.1. Methodik.....	51
4.2. Die Bedeutung von BMP-5 in der hypertensiven Nephrosklerose.....	52
4.2.1. BMP-5 wird in der humanen adulten Niere transkribiert.....	53

4.2.2. BMP-5 wird in humanen renalen Zelllinien transkribiert.....	53
4.2.3. BMP-5 wird bei der hypertensiven Nephrosklerose vermindert transkribiert.....	54
4.3. Regulation von BMP-5.....	55
4.3.1. Angiotensin-2 induziert erhöhte Transkription von BMP-5 in TK-173-Fibroblasten.....	55
4.3.2. BMP-7 besitzt keinen Einfluss auf die Transkription von BMP-5 in renalen Zelllinien	56
4.4. Funktion von BMP-5	56
4.4.1. BMP-5 antagonisiert TGF- β 1- und TNF- α -induzierte Effekte.....	56
4.4.2. BMP-5 übt keinen Einfluss auf die Mitoserate von TK-173-Fibroblasten aus	58
4.4.3. Einfluss von BMP-5 auf die Migration und Proliferation.....	58
4.5. Expression von BMP-2	60
4.5.1. BMP-2 wird in der humanen adulten Niere transkribiert.....	60
4.5.2. BMP-2 wird in humanen renalen Zelllinien transkribiert.....	61
4.5.3. BMP-2 wird bei der hypertensiven Nephrosklerose vermindert transkribiert.....	61
4.6. Regulation von BMP-2	62
4.6.1. Einfluss des RAAS auf die Transkription von BMP-2 <i>in vitro</i>	62
4.6.2. BMP-5 und -7 üben keinen Einfluss auf die BMP-2-Transkription aus	63
4.7. Funktion von BMP-2	63
4.7.1. Proliferativer Einfluss von BMP-2 auf renale Fibroblasten TK-173.....	63
4.7.2. Einfluss von BMP-2 auf die Migration und Proliferation.....	64
5. Zusammenfassung.....	66
6. Anhang.....	68
6.1. Abkürzungsverzeichnis.....	68
6.2. Abbildungsverzeichnis.....	70
6.3. Tabellenverzeichnis.....	70
7. Literaturverzeichnis.....	71

1. Einleitung

1.1. Chronische Niereninsuffizienz

Die chronische Niereninsuffizienz ist durch einen irreversiblen Verlust der renalen Funktion gekennzeichnet. Unabhängig von der Grunderkrankung führen pathophysiologische Mechanismen zum Untergang funktionstüchtiger Nephrone und somit zu einer Abnahme der glomerulären Filtrationsrate (GFR). Die zunehmende Unfähigkeit der Niere, harnpflichtige Substanzen auszuscheiden und der Verlust der endokrinen Funktionen führen zu einer Fehlfunktion verschiedener Organsysteme. Unbehandelt führt die chronische Niereninsuffizienz über eine Urämie zum Tod.

Nach der diabetischen Nephropathie ist die hypertensive Nephrosklerose die zweithäufigste Erkrankung, die zu einer terminalen Niereninsuffizienz führt (Frei und Schober-Halstenberg 2008).

Der hypertensiven Nephrosklerose liegt ein langfristig bestehender arterieller Hypertonus zugrunde, und sie ist eine Manifestationsform dieser kardiovaskulären Systemerkrankung. Der Begriff der benignen Nephrosklerose wird als Synonym für die hypertensive Nephrosklerose verwendet und grenzt sich zur malignen Nephrosklerose durch ihren langjährigen klinischen Verlauf bis zum Funktionsverlust der Niere ab (Luke 1999).

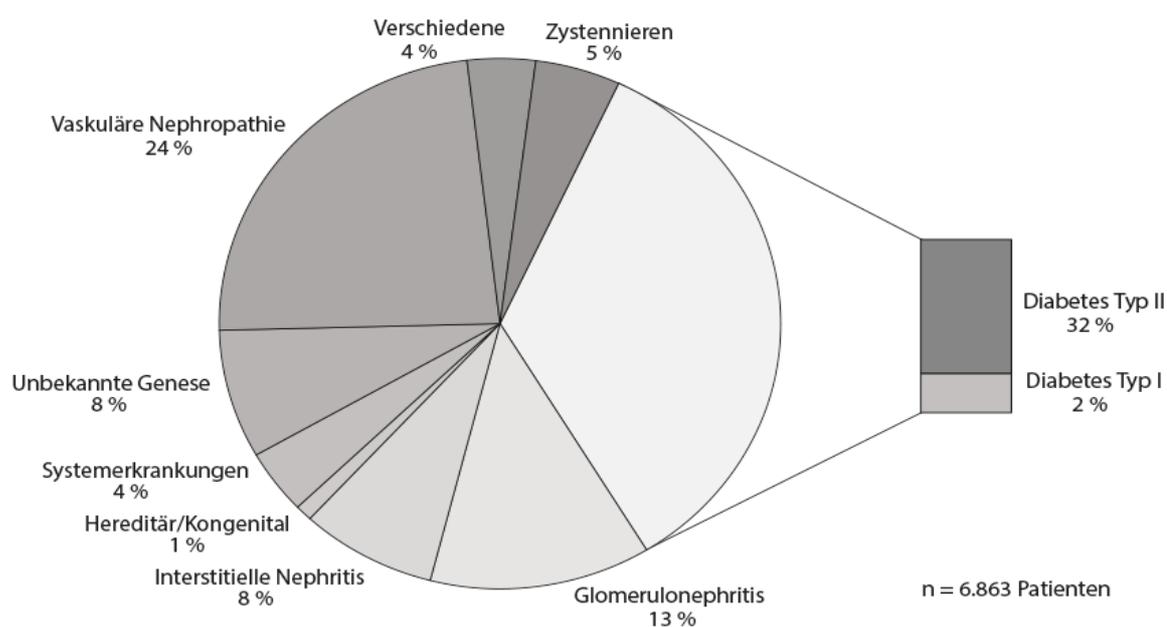
Therapeutische Möglichkeiten beschränken sich auf eine Verlangsamung der Krankheitsprogression und eine Behandlung der Begleit- und Folgeerkrankungen. Eine Remission kann bei der hypertensiven Nephrosklerose nicht erreicht werden (Ruggenti et al. 2001, Remuzzi et al. 2002).

Die frühzeitige und konsequente Therapie eines arteriellen Hypertonus und die Verringerung der Proteinurie als Zeichen einer bereits eingetretenen renalen Schädigung sind wichtige Bestandteile eines multimodalen Konzepts, das ebenfalls die Therapie von Begleiterkrankungen wie beispielsweise Diabetes mellitus oder Hyperlipidämie beinhaltet (Marcantoni et al. 2000, Segura et al. 2006, Ritz 2006).

Im fortgeschrittenen Stadium ist zur Vermeidung einer lebensbedrohlichen Urämie eine Nierenersatztherapie notwendig. Dabei bestehen zwei Therapieformen. Zum einen die Dialyse, die mit einer deutlichen Einschränkung der Lebensqualität und Lebenserwartung einhergeht (Baid-Agrawal und Frei 2007), zum anderen die Nierentransplantation, wobei der Bedarf an Transplantatnieren die Anzahl der zur Verfügung stehenden weiterhin stark überschreitet (Eurotransplant 2012, Deutsche Stiftung Organspende 2012). Die Zahl an Patienten, die einer Nierenersatztherapie bedürfen, steigt weltweit und geht mit sehr hohen Kosten für das Gesundheitssystem einher.

Im Durchschnitt ist im Zeitraum von 1997 bis 2006 in Deutschland ein jährlicher Zuwachs der Prävalenz von Patienten mit chronischer Nierenerersatztherapie von 4,4% und ein Anstieg der Inzidenz von 5,1% zu verzeichnen. Somit lebten 2006 in Deutschland circa 70.000 Dialysepatienten und 24.000 Menschen mit Nierentransplantat. Allein die Kosten für die Dialysebehandlung belaufen sich auf circa 3 Milliarden Euro pro Jahr (Frei und Schober-Halstenberg 2008).

Abb.1: Diagnoseverteilung der Patienten bei Therapiebeginn der Nierenerersatztherapie im Jahr 2006 (Frei und Schober-Halstenberg 2008, S.35)



Die Zunahme an Patienten mit hypertensiver Nephrosklerose als Ursache für eine chronische Niereninsuffizienz zeigt die wachsende Bedeutung dieses Krankheitsbildes, die Notwendigkeit präventiver Maßnahmen und das Erforschen der pathophysiologischen Prozesse zur Entwicklung neuer Therapieformen.

1.2. Hypertensive Nephrosklerose

Der arterielle Hypertonus ist eine wichtige Ursache für die terminale Niereninsuffizienz. Es besteht ein circa dreifach höheres Risiko für die Entwicklung einer terminalen Niereninsuffizienz bei Patienten mit arterieller Hypertonie als bei Gesunden (Hsu et al. 2009). Bei circa 10 Millionen betroffenen Patienten in Deutschland ist dies ein immenser Risikofaktor für die Entstehung und Progression der Nierenerkrankung.

Bereits das Vorhandensein einer leicht eingeschränkten Nierenfunktion stellt einen kardio-vaskulären Risikofaktor dar, der mit einer höheren Hospitalisierungsrate sowie einer erhöhten Morbidität und Mortalität einhergeht (Sarnak et al. 2003, Menon und Sarnak 2005, Segura et al. 2006, Go et al. 2004).

Die Diagnose der hypertensiven Nephrosklerose im klinischen Alltag beruht auf dem Ausschluss anderer primär renaler Erkrankungen und beinhaltet eine sorgfältig erhobene Familien- und Eigenanamnese. Zudem erfolgt die Suche nach Endorganschäden aufgrund des systemischen arteriellen Hypertonus. Dazu gehören unter anderem die linksventrikuläre Hypertrophie und die retinale hypertensive Schädigung. Desweiteren sollten ein Nachweis einer vorliegenden Proteinurie, mikroskopische Urinuntersuchung und Ultraschalluntersuchung der Niere erfolgen. Die hypertensive Nephrosklerose ist eine klinische Diagnose (National Kidney Foundation 2002). Die Spezifität wird kontrovers diskutiert und Nierenbiopsiestudien zeigen Variablen zwischen 50% und 90% (Fogo et al. 1997, Zucchelli und Zuccala 1993).

1.3. Pathophysiologie der hypertensiven Nephrosklerose

Physiologisch wird in der Niere bei erhöhtem Perfusionsdruck eine myogene Konstriktion der präglomerulären afferenten Arteriolen ausgelöst. Diese physiologische Antwort schützt das Glomerulum vor erhöhtem Druck und hält den kapillären Perfusionsdruck stabil. Damit stellt die myogene Konstriktion zusammen mit dem tubuloglomerulären Feedback einen essentiellen Mechanismus zur Autoregulation des renalen Blutflusses dar und stellt die Aufrechterhaltung einer konstanten glomerulären Filtrationsrate (GFR) sicher.

Chronische Druckerhöhung aufgrund eines arteriellen Hypertonus führt zu präglomerulären, vaskulären Veränderungen durch Ablagerungen von hyalinem, atherosklerotischen Material in die Gefäßwände. Dies führt zu einer Verdickung der Arteriolen und Arterien und somit zu einer Einengung des Gefäßlumens mit daraus resultierender Minderperfusion. Die Autoregulation des Gefäßtonus am juxtaglomerulären Apparat ist gestört und der renale vaskuläre Widerstand in den Arteriolen und Arterien steigt zur Aufrechterhaltung der GFR.

Die Minderperfusion führt zur Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und zur Ausschüttung vasokonstriktorischer Mediatoren wie Angiotensin-2 und Endothelin mit konsekutiver Steigerung des vaskulären Widerstandes (Juncos et al. 1995, Bonsib 2013).

1.4. Pathophysiologie der Nierenfibrose

Der zunehmende Verlust der renalen Funktion kennzeichnet die chronische Niereninsuffizienz. Unabhängig von der Grunderkrankung zeigen die unterschiedlichen Schädigungsmechanismen im finalen Stadium dasselbe pathologische Muster, das zum terminalen Nierenfunktionsverlust führt (Kuncio et al. 1991, Harris und Neilson 2006).

Histopathologisch finden sich bei Persistenz des Schädigungsmechanismus eine fokale Glomerulosklerose, Tubulusatrophie, eine Erhöhung der extrazellulären Matrix sowie eine interstitielle Fibrose (Churgh und Sobin 1982, Nadasdy et al. 1994).

Die Fibrose ist die pathologische Vernarbung der Niere, die letztendlich zur sogenannten Schrumpfniere führt und mit einem Funktionsverlust des Organs einhergeht. Sie lässt sich in drei Stadien einteilen.

Kennzeichnend für das erste Stadium, die Induktionsphase, ist die Migration von inflammatorischen Zellen, vor allem der Leukozyten (Kuncio et al. 1991, Kelly 1999), Makrophagen (Sean Eardley und Cockwell 2005), mononukleären Zellen (Ricardo et al. 2008) sowie Mastzellen (Holdsworth und Summers 2008) in das Interstitium. Diese inflammatorischen Zellen schütten zahlreiche Zytokine wie *transforming-growth-factor-β1* (TGF-β1), *tumor-necrosis-factor-α* (TNF-α) und Angiotensin-2 (AT-2) aus, die sowohl chemotaktische als auch pro-fibrotische Effekte verursachen (Kondo et al. 2001, Muller et al. 1992, Strutz und Neilson 1994, Vielhauer et al. 2004). Es besteht eine starke Korrelation zwischen der Makrophageninfiltration und dem Ausmaß der Fibrose, die die Bedeutung des ersten Stadiums, der Induktionsphase, in der Pathophysiologie der Nierenfibrose unterstreicht (Nishida und Hamaoka 2008).

Anschließend folgt die Inflammationsphase, bei der es zu einer Aktivierung der interstitiellen Fibroblasten kommt. Diese synthetisieren vermehrt extrazelluläre Matrix. Hierbei ist vor allem die übermäßige Produktion von Kollagenfasern der auffälligste Befund der tubulointerstitiellen Fibrose (Bohle et al. 1979). Neben den interstitiellen Fibroblasten nehmen auch die tubulären Epithelzellen eine zentrale Rolle als Mediatoren der interstitiellen Inflammation ein und sind wesentlich an der extrazellulären Matrixsynthese beteiligt (Strutz und Zeisberg 2006, Zeisberg et al. 2003).

Das letzte Stadium, die Postinflammationsphase ist charakterisiert durch eine Proliferation interstitieller Zellen, vor allem durch aktivierte Fibroblasten. Zudem wird eine Umwandlung von Tubulusepithelzellen in fibroblastenartige Zellen vermutet (Zeisberg und Duffield 2010,

Zeisberg et al. 2003). Diese Zellen sind an der andauernden extrazellulären Matrixdeposition beteiligt (Powell et al. 1999, Qi et al. 2006) und die Anzahl der funktionellen Tubulusepithelzellen nimmt weiter ab, zudem findet eine Rarefizierung der Kapillaren mit daraus resultierender Minderperfusion des Gewebes und Hypoxie statt. Dies führt letztendlich zum irreversiblen und progredienten Verlust der Organfunktion (Bohle et al. 1979, Ng et al. 1998, Kang et al. 2002).

Bohle und Mitarbeiter beschreiben bereits 1977, dass sowohl bei inflammatorischen wie auch nicht-inflammatorischen Nierenerkrankungen eine signifikante Korrelation zwischen Serumkreatinin und Vergrößerung des kortikalen Interstitiums durch die interstitielle Fibrose existiert. Unabhängig vom initialen Ereignis zeigt die chronische Niereninsuffizienz eine übliche Pathologie der Glomerulosklerose und tubulointerstitiellen Fibrose, wobei der Grad der tubulointerstitiellen Beteiligung die beste Korrelation mit der renalen Schädigung und dem Funktionsverlust bietet (Bohle et al. 1977 und 1979).

Man vermutet, dass für die Fibrosierung viele pathologische Prozesse und molekulare Mechanismen verantwortlich sind. Fibroblastenaktivierung nach Schädigung ist essentiell im Prozess der Wundheilung und gehört zu den physiologischen Reparationsmechanismen des Gewebes. In der Progression der Nierenfibrose kommt es zu einem Verlust der Homöostase von wundheilungsfördernden und regulierenden, bzw. inhibitorischen und regenerativen Faktoren in der adulten Niere.

1.5. Angiotensin-2 als profibrogenes Zytokin der hypertensiven Nephrosklerose

Das Octapeptid Angiotensin-2 (AT-2) ist Teil des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) zur Regulation des systemischen arteriellen Blutdrucks und des Wasserhaushaltes im Organismus.

Ein Hauptstimulus für die Reninsekretion aus den juxtaglomerulären Zellen der Niere ist die glomeruläre Minderperfusion. Bei der hypertensiven Nephrosklerose ist diese verursacht durch arteriosklerotische Veränderungen an den afferenten Arteriolen. Renin spaltet enzymatisch Angiotensinogen zu Angiotensin-1, das durch das *angiotensin converting enzyme* (ACE) zu AT-2 umgewandelt wird. AT-2 ist ein potenter Vasokonstriktor, der den systemischen Blutdruck und somit den Perfusionsdruck in der Niere zur Aufrechterhaltung der glomerulären Filtrationsrate steigert. Desweiteren stimuliert AT-2 die Ausschüttung des Hormons Aldosteron aus der Nebenniere, das über eine Natrium- und Wasserretention zusätzlich den Blutdruck erhöht.

Die meisten bekannten Effekte von Angiotensin-2 werden über den membranständigen Angiotensinrezeptor-1 vermittelt. Die Rolle des Angiotensinrezeptors-2 ist noch ungeklärt. Es werden modulierende und Angiotensin-2-hemmende Effekte diskutiert. Diesem klassischen Bild von Angiotensin-2 als vasoaktives Zytokin zur lokalen und systemischen hämodynamischen

Regulation wird ebenfalls die Eigenschaft eines morphogenen Zytokins mit einer aktiven Rolle bei pathologischen renalen Vorgängen zugesprochen (Klahr et al. 1995, Mezzano et al. 2001). Dabei scheinen viele der stimulierenden Effekte von AT-2 auf der direkten Interaktion mit TGF- β 1 oder dessen nachgeordneten Mediatoren zur Matrixakkumulation, Inflammation und Apoptose zu beruhen (Mezzano et al. 2001, Wolf 1998, Wolf und Neilson 1996). Diese Daten wurden vor allem in *in-vitro*-Untersuchungen erhoben. Hierbei wurde beobachtet, dass erhöhte AT-2 Konzentrationen zu einer erhöhten Transkription von pro-fibrotischen Zytokinen wie TGF- β 1, Fibronectin und Kollagen Typ-1 in glomerulären mesangialen Zellen von Ratten führen (Kagami et al. 1994).

Über die Bindung am Angiotensinrezeptor-1 werden weitere pro-fibrotische Zytokine, die an der Proliferation von Zellen, Inflammation und Fibrose beteiligt sind, aktiviert (Klahr und Morrissey 1998, Hu et al. 2009). Die Folgen der TGF- β 1-Aktivierung und weiteren pro-fibrotischen Faktoren führen zu den oben aufgeführten histopathologischen Veränderungen in der Niere mit progredienter Organdysfunktion (Kagami et al. 1994, Burns et al. 2010, Johnson et al. 1992).

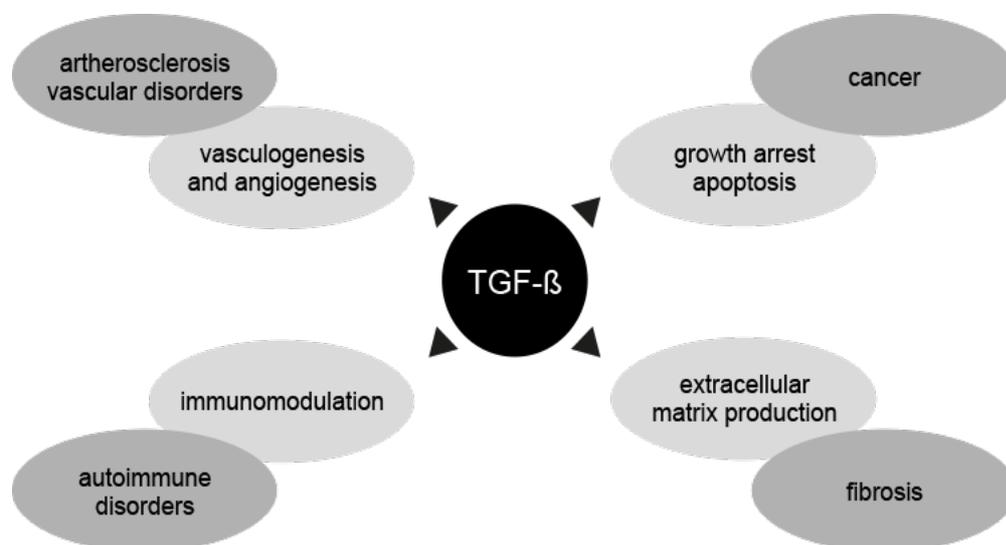
1.6. TGF- β -Superfamilie

Die *transforming-growth-factor- β* (TGF- β)-Superfamilie umfasst eine große Anzahl von strukturell verwandten Wachstumsfaktoren. Jedes Mitglied der Familie ist fähig, eine große Anzahl von zellulären Prozessen einschließlich Zellproliferation, Differenzierung, Migration, Adhäsion und Apoptose zu regulieren. Exprimiert in komplexen und gewebespezifischen Mustern spielen TGF- β und seine verwandten Faktoren eine herausragende Rolle in der Entwicklung, Homöostase und Reparatur von nahezu allen Gewebearten in vielen Organismen: von der Fruchtfliege bis hin zum Menschen (Massagué 1990).

Zu den interessanten Vertretern der Familie zählen - neben TGF- β selbst - Nodale, Activine und *Bone-Morphogenetic-Proteine*, die sowohl in der Embryogenese als auch im adulten Organismus zahlreiche lebenswichtige Prozesse steuern (Massagué 1990, Zhou et al. 1993, Zhao 2003).

Mutationen, Störungen oder eine chronische Aktivierung der TGF- β -Kaskade sind involviert in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen zum Beispiel von Karzinomen, Entwicklungsstörungen sowie autoimmunen, degenerativen und chronischen Erkrankungen.

Abb.2: TGF- β ist ein multifunktionales Zytokin in essentiellen Zellprozessen. Störungen in der TGF- β -Signalkaskade sind in die Pathogenese vieler Erkrankungen beim Menschen involviert. (Dennler et al. 2002, S.732)



Bei Säugetieren existieren 3 Isoformen: TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3 mit ähnlicher biologischer Aktivität und Potenz.

Das TGF- β 1 Gen wird bei Gewebsschädigung vermehrt exprimiert und ist die Isoform, die bei anhaltender Ausschüttung wesentlich an der Entwicklung der Gewebefibrose vieler Organe beteiligt ist (Border und Noble 1994, Massagué 1998). TGF- β 1 nimmt eine zentrale Rolle bei der Nierenfibrose ein und gilt als deren Hauptmediator. Durch die TGF- β 1-induzierten Effekte entstehen die typischen histopathologischen Veränderungen wie Glomerulosklerose, Tubulusatrophie, Dilatation, Nephronverlust und Rarefizierung der Kapillaren, die zur chronischen Niereninsuffizienz führen (Border und Noble 1994, Schnaper et al. 2009).

Die TGF- β 1/Smad-Signalkaskade ist verantwortlich für die Transkription von einer Vielzahl an Zielgenen, die an der Differenzierung und Proliferation der Zielzelle beteiligt sind. So wurden diese TGF- β 1-induzierten Effekte bei der Produktion von Bestandteilen der extrazellulären Matrix wie Kollagen Typ-1 *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen (Wynn 2008, Zeisberg et al. 2003, Strutz et al. 1995, Zeisberg und Duffield 2010).

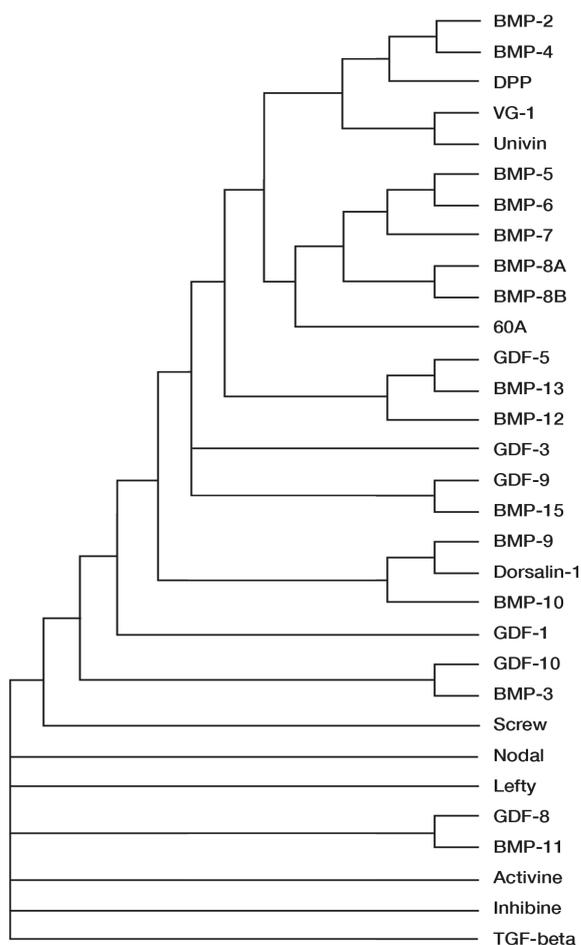
1.7. *Bone-Morphogenetic-Proteine*

Die *Bone-Morphogenetic-Proteine* (BMP) sind multifunktionale Wachstumsfaktoren und gehören zur Gruppe der TGF- β -Superfamilie (Ducy und Karsenty 2000).

Entdeckt wurden sie 1965 von Urist, als dieser bei subkutaner Verabreichung von demineralisierten Knochenextrakten in Ratten eine ektope Knochenbildung beobachtete (Urist 1965). Aufgrund ihrer knochenbildenden Fähigkeit wurden diese Proteine *Bone-Morphogenetic-Proteine* (BMP) genannt.

Bisher wurden über 30 BMPs identifiziert und eine vielfältige Beteiligung bei verschiedenen biologischen Prozessen nachgewiesen. Sie sind von essentieller Bedeutung in der Embryogenese, nicht nur in der Entwicklung des Skeletts, sondern ebenfalls in der Organogenese und besitzen wichtige Funktionen in der Zellproliferation und -differenzierung, Apoptose und Morphogenese (Ducy und Karsenty 2000).

Abb.3: Die TGF- β -Superfamilie und die phylogenetische Verwandtschaft zwischen den *Bone-Morphogenetic-Proteinen* (Ducy und Karsenty 2000, S. 2208).



BMPs binden an heterodimere Komplexe, bestehend aus zwei transmembranen Rezeptoren, genannt BMP-Rezeptor Typ-1 und -2 (BMPR-1 und BMPR-2), die eine Serin/Threonin-Kinase-Aktivität besitzen (Hogan 1996a, Kingsley 1994, Massagué und Weis-Garcia 1996). Nach Ligandenbindung phosphoryliert der Typ 2-Rezeptor den Typ 1-Rezeptor und aktiviert die Kinase des Typ-1-Rezeptors (Liu et al. 1995, Ruberte et al. 1995). Es folgt die Phosphorylierung der Smad-Proteine, einer Familie von Transkriptionsfaktoren, die anschließend in den Zellkern translozieren und direkt die Expression der Zielgene in Verbindung mit Transkriptionsfaktoren und DNA-bindenden Partnern aktivieren (Heldin et al. 1997, Massagué 1998).

Durch die unterschiedliche Affinität der BMP an ihre Rezeptoren und Aktivierung der intrazellulären Smad-Proteine lassen sich die synergistischen und zum Teil konträren Effekte der verschiedenen BMPs erklären (Ducy und Karsenty 2000, Massagué 1998, Kopp 2000).

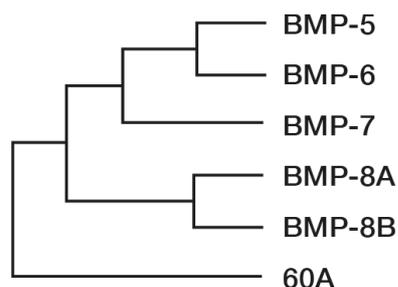
1.7.1. *Bone-Morphogenetic-Protein-5 (BMP-5)*

BMP-5 ist ein zur TGF- β -Superfamilie zählendes Protein, das nicht nur eine Rolle im Knochenstoffwechsel spielt, sondern auch in extraossären Geweben nachgewiesen werden konnte (Dudley et al. 1995, Luo et al. 1995).

BMP-5 wird aus einem Vorläuferprotein gebildet. Nach proteolytischer Spaltung besitzt das aktive BMP-5 138 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 16 kD (Celeste et al. 1990). Nach Bindung von BMP-5 an die membrangebundenen BMP-Rezeptoren BMPR-1A, -1B und -2 wird die intrazelluläre Smad-Kaskade aktiviert. Die Phosphorylierung des Smad 1/5/8-Komplexes transloziert in Verbindung mit Smad 4 in den Nukleus und transkribiert in Abhängigkeit von DNA-bindenden Partnern und weiteren Cofaktoren die Zielgene (Celeste et al. 1990, Kopp 2000).

BMP-5 und BMP-7 werden mit BMP-6 innerhalb der 60A-Familie zu einer Subgruppe zusammengefasst, da ein Vergleich der Aminosäuresequenzen eine signifikante Homologie von über 75% aufweist (Celeste et al. 1990). Dieser Arbeit liegt daher die Hypothese zugrunde, dass BMP-5 ähnlich anabole Funktionen wie BMP-7 aufweist.

Abb.4: 60A-Familie innerhalb der TGF- β -Superfamilie (Ducy und Karsenty 2000, S. 2208)



BMP-7 ist ein potentes Morphogen in der Nephrogenese (Ducy und Karsenty 2000, Hogan 1996b). BMP-7-defiziente Mäuse zeigen ausgeprägte Dysplasien beider Nieren und versterben innerhalb der ersten Tage postnatal an der Urämie (Godin et al. 1999). In der adulten Niere ist die Funktion und Expression von BMP-7 gut untersucht. In Tiermodellen des akuten sowie chronischen Nierenversagens konnte die große Bedeutung von BMP-7 als protektiver und regenerativer Faktor aufgezeigt werden. Vor allem zwei Haupteffekte von BMP-7 stehen im Vordergrund: es wirkt anti-inflammatorisch und anti-fibrotisch.

Der anti-inflammatorische Effekt entsteht über eine verminderte Migration und Akkumulation von Inflammationszellen und einer verminderten Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen (Gould et al. 2002, Vukicevic et al. 1998). TGF- β 1 führt in der geschädigten Niere zu einer progredienten Fibrosierung durch Fibroblastenproliferation und vermehrter Produktion von extrazellulärer Matrix.

Der anti-fibrotische Effekt von BMP-7 beruht auf der Antagonisierung der TGF- β 1-vermittelten Schädigungen und wirkt dadurch regenerativ auf Tubulusepithelzellen (Kitten et al. 1999, Sugimoto et al. 2007, Zeisberg et al. 2003).

Deutlich weniger Daten und Untersuchungen findet man zur Funktion von BMP-5 in der Niere. Anhand der vorhandenen Daten vermutet man eine wichtige Rolle von BMP-5 in der Nephrogenese. Zudem wird BMP-5 auch postnatal in der Niere exprimiert (Dudley und Robertson 1997, Ozkaynak et al. 1992, King et al. 1994). BMP-5 defiziente Mäuse zeigen neben anatomischen Abnormitäten ausgeprägte Veränderungen in der Niere und den ableitenden Harnwegen, sind aber trotz Hydronephrose im Gegensatz zu BMP-7-defizienten Mäusen lebensfähig (Kingsley et al. 1992, Zhao 2003).

Aufgrund der signifikanten Homologie zu BMP-7 wird angenommen, dass Kreuzhybridisierungen möglich sind (Ducy und Karsenty 2000, Hogan 1996b) und daraus synergistische Effekte von BMP-5 und -7 resultieren. BMP-5 konnte teilweise die Rolle von fehlendem BMP-7 in der Nephrogenese übernehmen (Oxburgh et al. 2005). Das Fehlen beider Proteine in Mausmodellen führt zu einem intrauterinen Versterben der Embryos (Solloway und Robertson 1999). Über die Expression, Funktion und Regulation von BMP-5 in der adulten Niere ist bisher noch sehr wenig bekannt. BMP-5 spielt neben BMP-7 eine wichtige Rolle in der Nephrogenese und könnte ähnliche protektive und regenerative sowie anti-inflammatorische und anti-fibrotische Effekte wie BMP-7 in der Nephropathogenese besitzen.

1.7.2. *Bone-Morphogenetic-Protein-2 (BMP-2)*

Das *Bone-Morphogenetic-Protein-2 (BMP-2)* besitzt ebenfalls Eigenschaften zur Regulation von Zellwachstum und -differenzierung und gehört zur Gruppe der TGF- β -Superfamilie. In zahlreichen Versuchen wurde die zentrale Rolle von BMP-2 in der Entwicklung des Skeletts *in vitro* und *in vivo* beschrieben (Urist 1965, Reddi 1992, Wozney et al. 1988, Wozney 1992).

Nach proteolytischer Trennung eines Vorläuferproteins entsteht das aktive BMP-2. Es ist ein Monomer aus 114 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 13 kD (Celeste et al. 1990). Nach Ligandenbindung von BMP-2 an membranständige Rezeptoren erfolgt die Phosphorylierung von Smad-1, -5 und -8, die zusammen mit Smad-4 einen Komplex bilden und in den Nukleus translozieren. Dort wird direkt in Abhängigkeit von Cofaktoren und DNA-bindenden Partnern die Transkription der Zielgene aktiviert (Kopp 2000).

Da BMP-2 eine enge Verwandtschaft zu BMP-4 zeigt und im Vergleich der Aminosäuresequenzen beider Proteine eine Homologie von bis zu 86% besteht, bilden diese beiden Proteine eine Subgruppe innerhalb der TGF- β -Superfamilie (Celeste et al. 1990).

BMP-2 wird eine essentielle Beteiligung in der Embryogenese zugeschrieben. In *knock-out*-Modellen versterben BMP-2-defiziente Mäuse zwischen dem siebten und zehnten Tag *post conceptionem* aufgrund einer abnormalen Herzentwicklung, sodass eine weitere Beteiligung von BMP-2 in der Embryogenese, vor allem in der Nephrogenese, aufgrund der frühen Letalität nicht beobachtet werden konnte (Ducy und Karsenty 2000, Zhang und Bradley 1996).

Eine zentrale Rolle spielt BMP-2 in der Osteogenese. BMP-2 ist das Protein, das in rekombinanter Form fähig ist, die Aktivierungskaskade in der Chondro- und Osteogenese zur Knochenbildung *in vivo* zu induzieren (Wang et al. 1990, Li et al. 2003).

Ebenfalls wird BMP-2 eine wichtige Rolle in der Angiogenese zugeschrieben. So wurden in endothelialen Vorläuferzellen, Endothelzellen und den *vascular smooth muscle cells (VSMC)* der Gefäßintima von Menschen und Ratten BMP-2-Expressionen nachgewiesen (Nakaoka et al. 1997, Emmanuele et al. 2003, Amini et al. 2012). Bei Schädigung von Gefäßen durch oxidativen Stress, Inflammation sowie Hyperglykämie zeigt sich eine Erhöhung der BMP-2-Expression und eine Zellproliferation der VSMC. VSMC spielen eine zentrale Rolle in der physiologischen Antwort zur Gefäßreparatur (Parhami et al. 1997, Fukui et al. 2003, Rifas et al. 2003).

Im weiteren Krankheitsverlauf der Atherosklerose scheint bei Schädigungspersistenz und Änderungen des umgebenden Milieus durch Hypoxie sowie Zytokine der chronischen Inflammation die regenerative Funktion von BMP-2 verloren zu gehen. Über alternative Aktivierungswege könnte BMP-2 als Induktor der Kalzifizierung in Gefäßen wirken. Zumindest wurde in atherosklerotischen Plaques eine erhöhte Expression von BMP-2 festgestellt (Dhore et al. 2001, Corriere et al. 2008).

In zahlreichen adulten Geweben wie Herz, Lunge, Muskel und Leber konnte ebenfalls eine Expression von BMP-2 nachgewiesen werden. Dies unterstreicht die essentielle Rolle von BMP-2 auch jenseits der Embryogenese (Iwasaki et al. 1995, Schultheiss et al. 1997).

Immunhistochemisch gelang der Nachweis einer BMP-2-Expression in der adulten humanen Niere (Simone et al. 2012). Protektive Effekte von BMP-2 bei der Nierenfibrose werden angenommen und diskutiert. So konnten Yang und Mitarbeiter in Tiermodellen zeigen, dass BMP-2 fähig ist, die TGF- β 1-induzierten Effekte der zellulären Fibrose abzumildern (Yang S et al. 2009). Im tierexperimentellen Modell der induzierten Fibrose bei Ratten wurde bei täglicher Gabe von BMP-2 eine signifikante Reduktion der interstitiellen Nephritis und Fibrose sowie eine verminderte Kollagenproduktion beobachtet. Ebenfalls war die Zahl der TGF- β 1-Rezeptoren reduziert (Yang YL et al. 2009, Wang et al. 2001).

BMP-2 scheint somit protektive Effekte bei der Nierenfibrose zu haben. Die molekularen Wirkungsweisen sind jedoch noch unverstanden. Bisher liegen im adulten humanen Nierengewebe wenig Ergebnisse vor, sodass das therapeutische Potential von BMP-2 bei chronischen Nierenerkrankungen noch weitgehend unbekannt ist.

1.8. Therapeutische Möglichkeiten der hypertensiven Nephrosklerose

Die therapeutischen Möglichkeiten bei der hypertensiven Nephrosklerose sind sehr begrenzt und beruhen im Wesentlichen auf einer Verzögerung des Krankheitsverlaufs.

Die Albuminurie kann als Frühmarker angesehen werden, die potentiell reversibel ist. Häufig erfolgt die Diagnosestellung aber in einem späten Stadium, da erhöhte Retentionsparameter und eine Proteinurie erst bei eingetretener Nierenschädigung mit progredientem renalem Funktionsverlust auftreten.

Die optimale arterielle Blutdruckeinstellung sowie die konsequente Behandlung weiterer Progressionsfaktoren wie beispielsweise Diabetes mellitus oder Hyperlipidämie sind wesentliche Bestandteile eines multimodalen Konzepts zur Verlangsamung des Krankheitsverlaufes. Eine Remission der hypertensiven Nephrosklerose kann nicht erreicht werden. Das therapeutische Ziel ist die Verlangsamung der Krankheitsprogression (Marcantoni et al. 2000, Segura et al. 2006, Ritz 2006).

Die medikamentöse Therapie des arteriellen Hypertonus richtet sich vor allem auf das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS). Die Hemmung des *angiotensin converting enzyme* (ACE), das Angiotensin-1 in Angiotensin-2 spaltet sowie die Blockade des Angiotensinrezeptors-1 sind zwei Möglichkeiten der pharmakologischen Interaktion zur Blutdrucksenkung und Reduktion der tubulotoxischen Proteinurie.

Durch diese Maßnahmen lässt sich das Fortschreiten der Nierenfibrose deutlich verlangsamen und führt neben der verbesserten Hämodynamik zu einer Absenkung der Proteinurie.

Da Angiotensin-2 als pro-fibrotisches Zytokin gilt und bei der Inflammation, Zellproliferation und Produktion der extrazellulären Matrix (ECM) beteiligt ist (Fogo 2000, Brewster und Perazella 2004, Ruester und Wolf 2006, Wolf 2006), wird durch die Hemmung des ACE das Vorhandensein dieses pro-fibrotischen Zytokins im Gewebe vermindert.

Das zunehmende molekulare Verständnis über Faktoren, die einer Nierenfibrose zugrunde liegen, bietet weitere Möglichkeiten für Therapieansätze. Jedoch befinden sich diese im experimentellen Stadium.

TGF- β 1 als Hauptmediator des nierenfibrotischen Prozesses stellt ein mögliches therapeutisches Ziel dar. Ansatzpunkte sind eine Hemmung der TGF- β 1-vermittelten Schädigungen und Reduktion der pro-fibrotischen und pro-inflammatorischen Zytokine die zu einer Nierenfibrose führen. In Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die Inhibition von TGF- β 1 *in vivo* tubuläre Schäden vermindern kann und die renale Funktion verbessert wird (Strutz und Zeisberg 2006, Bataller und Brenner 2005). BMP-7 scheint dabei ein möglicher Gegenspieler von TGF- β 1 zu sein und kehrt teilweise dessen Effekte um (Zeisberg et al. 2003).

Auch die zentrale Rolle der Fibroblasten und deren übermäßige Produktion an ECM werden intensiv erforscht. Die Frage, weshalb Fibroblasten in der Postinflammationsphase aktiviert bleiben, ist weiterhin ungeklärt.

Ein weiterer ausschlaggebender Faktor im Versagen der renalen Regeneration nach initialer Schädigung ist die relative Abwesenheit renoprotektiver Faktoren bei Nieren, die fibrotisch werden. Diese Imbalance ist Gegenstand intensiver Untersuchungen wie auch die Rolle der *Bone-Morphogenetic-Proteine* als renoprotektive Faktoren.

1.9. Zielsetzung

Bone-Morphogenetic-Proteine sind in der Embryogenese und der Gewebsregeneration unabdingbare Morphogene.

BMP-5 gehört zur gleichen Subgruppe der *Bone-Morphogenetic-Familie* wie das eng verwandte BMP-7 und ist an der Nephrogenese beteiligt. Studien zeigen, dass BMP-7 *in vivo* und *in vitro* bei akuten und chronischen Nierenerkrankungen vermindert exprimiert wird.

Da regenerative Effekte vor allem auf das Tubulusepithel durch BMP-7 *in vivo* und *in vitro* festgestellt wurden, könnte die Minderung der Expression von BMP-7 bei progredienten renalen Erkrankungen den Verlust von protektiven Faktoren bedeuten.

Daten über die Expression und das mögliche regenerative Potential von BMP-5 in der adulten Niere und bei Nierenerkrankungen liegen bisher nicht vor.

Daher sind die Fragestellungen dieser Arbeit:

1. Wird BMP-5 in der adulten humanen Niere exprimiert?
2. Wird BMP-5 ähnlich zur Expression von BMP-7 bei der hypertensiven Nephrosklerose ebenfalls vermindert exprimiert?

Angiotensin-2 als Mitglied des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) stimuliert als pro-inflammatorischer Marker die Sekretion von progressionsfördernden Faktoren und ist bei der Entwicklung der hypertensiven Nephrosklerose relevant. Die Hemmung des RAAS konnte in unzähligen Studien die Progression der tubulointerstitiellen Fibrose verlangsamen, wobei der genaue Pathomechanismus hierbei unbekannt ist. Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit ist:

3. Welchen Einfluss übt Angiotensin-2 auf die renale Expression von BMP-5 aus?

Aus der Chondro- und Osteogenese ist bekannt, dass *Bone-Morphogenetic-Proteine* sich gegenseitig beeinflussen können und in der Embryogenese deren Zusammenspiel essentiell ist. Die Applikation von BMP-7 in vielen *in vitro*- sowie *in vivo*-Modellen zeigte dessen regeneratives Potential, möglicherweise auch durch die Stimulation von BMP-5.

In dieser Arbeit soll folgende Fragestellung untersucht werden:

4. Besitzt BMP-7 einen regenerativen Einfluss in Zusammenspiel mit dem eng verwandten BMP-5 in der Niere?

Chemotaxis als grundlegendster Mechanismus der physiologischen Zellreaktion ist nicht nur in der Embryonalphase essentiell zur regelrechten Ausbildung des Organismus, sondern auch im adulten Organismus bei der Gewebsreparatur und der Chronifizierung von Erkrankungen von großer Bedeutung.

Pro-inflammatorische Zytokine wie TGF- β 1 und TNF- α spielen eine wichtige Rolle in der Migration von Entzündungszellen ins Tubulointerstitium der Niere. Aktivierte Fibroblasten stellen einen zentralen Mechanismus in der Inflammationsphase dar.

Aufgrund dessen sind weitere Fragestellungen dieser Arbeit:

5. Besitzt BMP-5 einen Einfluss auf die, durch die pro-inflammatorischen Zytokine TGF- β 1- und TNF- α -induzierte Migration von Entzündungszellen?
6. Übt BMP-5 einen Effekt auf die Zellproliferation von renalen Fibroblasten aus?

BMP-2 ist ein weiteres Protein aus der TGF- β -Superfamilie. Es ist ein potentes Morphogen in der Induktion der Osteogenese und besitzt die Fähigkeit zahlreiche Zellen zur Differenzierung, Proliferation und Migration zu aktivieren. Über die Expression von BMP-2 in der adulten humanen Niere und bei renalen Erkrankungen liegen bisher kaum Daten vor. In Analogie zu den Überlegungen bezüglich BMP-5 sollen folgende Fragen über die Bedeutung von BMP-2 in der Niere untersucht werden:

7. Wird BMP-2 in der adulten humanen Niere exprimiert?
8. Zeigt BMP-2 ein verändertes Expressionsmuster bei der hypertensiven Nephrosklerose?
9. Übt Angiotensin-2 als Mitglied des RAAS und pro-inflammatorisches Zytokin einen Einfluss auf die Expression von BMP-2 in der Niere aus?
10. Werden regenerative Fähigkeiten von BMP-7 in der Niere und des eng verwandten BMP-5 über eine Interaktion mit BMP-2 reguliert?
11. Besitzt BMP-2 einen Effekt auf die Proliferationsrate von Fibroblasten?

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Analysewaage 1213 MP	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Autoklav	Biomedis, Gießen, Deutschland
Belichtungsmaschine Kodak-X-Omat	Kodak, Rochester, USA
CO ₂ -Inkubator Nuaire Autoflow	Nuaire, Plymouth, USA
Elektrophoresekammer Mini-Protean	BioRad, München, Deutschland
Heizblock TR-L288	Liebisch, Bielefeld, Deutschland
Kühlzentrifuge GS-6R	Beckmann, München, Deutschland
Kühlzentrifuge, Mikroliterzentrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Lichtmikroskop	Leica, Solms, Deutschland
Magnetrührer IKAMAG RCT	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Mikroskop Axiophot S100TV mit Digitalkamera C-3040	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mikrotom 2040	Reichert-Jung, Nussloch, Deutschland
Mx3000P Thermocycler	Stratagene, La Jolla, USA
Nanopore Wasser-Anlage Ultrafree 20	Millipore, Eschborn, Deutschland
ph-Meter MP 220	Mettler Toledo, Columbus, USA
Pipettierhilfe pipetus-akku	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Photometer Gene Quant II	Pharmacia Biotech, Cambridge, UK
Photometer Dynatech MR 400	Dynatech, Denkendorf, Deutschland
Röntgenfilm	Kodak, Rochester, USA
Scanner CanonScan 4400 F	Canon, Tokyo, Japan
Spannungsgerät Power Pac 1000	BioRad, München, Deutschland
Spektralphotometer Genesys 5	Spectronic, München, Deutschland
Sterilbank Hera Save	Heraeus, Hanau, Deutschland
Stickstofftank Chronos Biosave	Messer, Griesheim, Deutschland
Thermocycler Mastercycler personal	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermocycler RT-PCR MX3000P	Stratagene, La Jolla, USA
Vortex VF2	Jancke, Stauffen, Deutschland
Waage Sartorius excellence	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wärmebad GFL 1004	Schütt Labortechnik, Göttingen, Deutschland
Wippe Duomax 1030	Heidolph, Schwabach, Deutschland

2.1.2. Gebrauchsmittel

Chamber slides 8 Well/0,8 cm ² pro Well	Nalge Nunc, Rochester, USA
Chemotaxis 48 Well	Neuro Probe, Gaithersburg, USA
Combitips plus 2,5 ml, 10 ml, steril	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Falcon 15 ml-Röhrchen, steril	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Falcon 50 ml-Röhrchen, steril	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Falcon Zellkulturflasche mit Luftfilter T75	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Eindeckgläser	Thermo, Braunschweig, Deutschland
Filterpapier 2MM	Whatman, Wiesloch, Deutschland
Filterpapier Microscience	Schleicher & Schell, Dassel, Deutschland
Glaswaren	Schott, Mainz, Deutschland
Mehrkanalpipette Dispenser Multipipette 4780	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Migrationskammer 48 Well/8 mm ² Filterfläche	Neuro Probe, Gaithersburg, USA
Mikroliter Pipetten 2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikrotiterplatten Falcon Microtest 96	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Neubauer Zählkammer	Saaringia, Saarlouis, Deutschland
Objektträger Lab Tec Chamber slide System	Nalge Nunc, Naperville, USA
Parafilm „M“	Pechiney, Chicago, USA
Pasteurkapillarpipetten	WU, Mainz, Deutschland
Pasteurpipetten	Brand, Gießen, Deutschland
Petrischalen Cellstar	Greiner, Solingen, Deutschland
Pipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25ml	Greiner, Solingen, Deutschland
Pipettenspitzen 2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Polycarbonat-Membran, PVP-frei	Neuro Probe, Gaithersburg, USA
Reagenzgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Skalpelle	pfm, Köln, Deutschland
Spritzen 2 ml, 5 ml, 10 ml	Braun, Melsungen, Deutschland
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

2.1.3. Chemikalien

Alle Chemikalien besaßen, sofern nicht anders angegeben, den Reinheitsgrad „pro analysi“.

4',6-Diamin-2'-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI)	Boehringer, Mannheim, Deutschland
Accutase	PAA, Pasching, Österreich
Aceton	Merck, Darmstadt, Deutschland

Acrylamid / Bis	BioRad, München, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Fluka, Buchs, Schweiz
Bovines Serum Albumin (BSA)	Paesel & Lorei, Hanau, Deutschland
Bradford-Reagenz	BioRad, München, Deutschland
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Coomassie-Brilliantblau	BioRad, München, Deutschland
Dimethylsulphoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	Invitrogen, Carlsbad, USA
<i>Dulbecco's</i> PBS	PAA, Pasching, Österreich
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eindeckmedium Immu-Mount	Thermo, Braunschweig, Deutschland
Essigsäure 1%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS), US-Standard	Invitrogen, Carlsbad, USA
Glycin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Isopropanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i> (IMDM)	Gibco BRL, Paisley, UK
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
L-Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
L-Glutamin 200nm	PAA, Pasching, Österreich
Laemmli Sample Buffer	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
LSM 1077 = Lymphozytenseparationsmedium	PAA, Pasching, Österreich
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Mastermix iQ SYBR Green Supermix	BioRad, Heidelberg, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Natronlauge (NaOH) 1M	Merck, Darmstadt, Deutschland
Nitrozellulosemembran Hybond-ECL	Amersham, Freiburg, Deutschland
Nonidet-P 40	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Nukleasefreies Wasser	Ambion, Cambridgeshire, UK
Panserin 401	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Plasmocin 25 ng/ml	Invivogen, Toulouse, Frankreich
Phenylmethansulfonsäurefluorid = PMSF	Boehringer, Mannheim, Deutschland
Quantum 286	PAA, Pasching, Österreich

Rainbow Marker RPN 800V	Amersham, Freiburg, Deutschland
RNase H	Invitrogen, Carlsbad, USA
RNase out	Invitrogen, Carlsbad, USA
ROX Passive Reference Dye	BioRad, Heidelberg, Deutschland
RPMI-1640-Medium	Invitrogen, Carlsbad, USA
Salzsäure (HCl) 1 M	Merck, Darmstadt
Superscript	Invitrogen, Carlsbad, USA
Tetramethylethyldiamin = Temed	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tetramethylbenzidin = TMB	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tris-Base	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Trypsin-EDTA 1x	PAA, Pasching, Österreich
Trypan-Blau	Biochrom Seromed, Berlin, Deutschland
Tween 20%	Boehringer, Mannheim, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

2.1.4. Kit-Systeme

Cell Proliferation ELISA System, version 2	Amersham, Freiburg, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Western Lightning plus ECL	Perkin Elmer, Waltham, USA

2.1.5. Allgemeine Puffer und Lösungen

10 x PBS (Phosphat-gepufferte Lösung)

KH ₂ PO ₄	1,44 g
Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	7,59 g
NaCl	90,0 g
ddH ₂ O	ad 1000 ml

10 x TBS 10 (Tris-gepufferte Lösung)

Tris-Base	60,5 g
NaCl	87,5 g
ddH ₂ O	ad 1000 ml

2.1.6. Materialien für die *real-time PCR*

Lysispuffer für die mRNA-Isolation

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

DNA-Verdau

RNAse-freie DNase I	10 µl
RDD Puffer	70 µl

Oligonukleotide für die Umschreibung der mRNA in cDNA

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

Ansatz für *real-time PCR*

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

2.1.7. Materialien für den Western Blot

Laufpuffer

Tris-Base	3,03g
Glycin	14,4g
1% SDS	100µl
ddH ₂ O	1000 ml

Lysispuffer

Natriumdeoxycholat	0,4g
Nonidet P-40	1ml
EGTA	1,9g
Tris 1M, pH 7,4	1ml
ddH ₂ O pH 7,4	100ml
PMSF (3% in Isopropanol)	1:500

Transferpuffer

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

15%-Trenngel

dd H ₂ O	2,5ml
1,5M TrisPuffer	2,5ml
10% SDS	100µl
Acrylamid / Bis	5ml
10% APS	50µl
Temed	5µl

2.1.8. Stimulanzen

Rekombinantes humanes BMP-2	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Rekombinantes humanes BMP-5	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Rekombinantes humanes BMP-7	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
humanes Angiotensin-2	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Rekombinantes humanes TGF-β1	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Rekombinantes humanes TNF-α	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland

2.1.9. Antikörper

Biotinyliertes Kaninchen-anti-Ziege monoklonal IgG	Dako, Glostrup, Dänemark
Kaninchen-anti-Mensch-beta-Aktin polyklonal IgG	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Kaninchen-anti-Ziege-polyklonal IgG	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Ziege-anti-Mensch-BMP-2 monoklonal IgG	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Ziege-anti-Mensch-BMP-5 monoklonal IgG	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Ziege-anti-Mensch-BMP-2 monoklonal IgG	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Ziege-anti-Mensch-BMP-5 monoklonal IgG	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

2.1.10. Primer für die *real-time PCR*

BMP-2	Primerdesign, Southampton, UK
BMP-5	Primerdesign, Southampton, UK
Peptidylprolyl-Isomerase A (PPIA)	Primerdesign, Southampton, UK

2.1.11. Renale humane Fibroblastenzelllinien TK-173 und TK-188

TK-173 sind Fibroblasten, die ursprünglich aus einer zur Nierentransplantation vorgesehenen humanen Normalniere isoliert wurden. TK-188-Zellen entsprechen Fibroblasten, die aus biopischem Material von Patienten mit interstitieller Fibrose gewonnen wurden. Durch Transfektion mit dem SV40-Plasmid pSVgpt wurden die Fibroblasten immortalisiert (Mulligan und Berg 1981, Muller et al. 1995).

TK-173 und TK-188-Zellen entsprechen phänotypisch renalen interstitiellen Fibroblasten und besitzen zytochemisch die unveränderte Expression an Enzymen wie beispielsweise Kollagen Typ-1, -3 und -5, Fibronectin und Vimentin (Muller et al. 1995).

Zur Kultivierung wurde das *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) versetzt mit 10%FCS verwendet. Bei Stimulationsversuchen wurde das *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM), ein serumfreies Hungermedium verwendet.

Die Anfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) zum Ausschluss einer Mykoplasmeninfektion wurde regelmäßig durchgeführt.

2.1.12. Renale proximale Tubulusepithelzelllinie HK-2

R.J. Ryan und Mitarbeiter etablierten die renale, proximale Tubulusepithelzelllinie HK-2 (*Human Kidney-2-Zellen*). Dabei handelt es sich um renale proximale Tubulusepithelzellen, die aus einer humanen Normalniere gewonnen und durch Transfektion mit dem humanen Papillomavirus (E6/E7) immortalisiert wurden (Ryan et al.1994). Dieses Verfahren bewirkt keine signifikanten Änderungen im Phänotyp oder Funktion der Zellen. Die Zellen weisen funktionell, immunhisto- und zytochemisch Charakteristika von differenzierten renalen proximalen Tubulusepithelzellen auf, beispielsweise phänotypisch Mikrovilli und zytochemisch Enzyme wie die alkalische und saure Phosphatase oder die Leucin-Aminopeptidase (Ryan et al. 1994). Zur Kultivierung wurde Quantum 286-Medium verwendet, in Stimulationsversuchen DMEM. Auch bei dieser Zelllinie wurden regelmäßig DAPI-Färbungen zum Ausschluss einer Mykoplasmeninfektion durchgeführt.

2.1.13. Software

MS Office	Microsoft, Redmond, USA
MxPro 3000	Stratagene, La Jolla, USA
Statistikprogramm S plus	Tibco, Palo Alto, USA

2.2. Methoden

2.2.1. Analyse der Daten aus dem Kooperationsprojekt *European Renal cDNA Bank*

Die Universitätsmedizin Göttingen beteiligt sich an der *European Renal cDNA Bank*. Dies ist ein Zusammenschluss multipler nationaler Zentren. Jedes Zentrum schickt ein Teil seiner Nierenbiopsien zusammen mit klinischen Parametern des Patienten an die *European Renal cDNA Bank*. Im Gegenzug ist jedes Zentrum berechtigt, die *European Renal cDNA Bank* zu beauftragen, eine PCR-Analyse explizit auf das eigene Forschungsobjekt bezogene interessierende Gen durchführen zu lassen. Die Untersuchungen erfolgten in München und wurden von im Projekt beschäftigten medizinisch-technischen Assistenten durchgeführt. Die Daten sind folglich keine Entnahme aus einer ohnehin bestehenden Datenbank, sondern eine individuelle promotionsbezogene Untersuchung. Hierbei erfolgt die komplette praktische Durchführung in München. Die Interpretation und statistische Auswertung wurden im Rahmen meiner Promotion mithilfe der Abteilung für medizinische Statistik in Göttingen durchgeführt.

Ziel dieses Projektes ist die Ausdehnung der Probandenanzahl, da der Pool aus bundesweit eingesendeten Nierenbiopsien besteht. Die größere Zahl der untersuchten Biopsien erzielt damit eine höhere Relevanz und Signifikanz als ein Zentrum alleine.

Das Team der *European Renal cDNA Bank* stellte manuell Mikrodissektate aus Glomeruli und Tubulointersitium her und führte nach Lyse eine *real-time PCR* auf die Transkription von BMP-2 und BMP-5 durch (Cohen et al. 2002). Die Transkriptionsanalyse von BMP-2 und BMP-5 wurden auf Wunsch und Überlegungen unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. Außer der Projektplanung und der wissenschaftlichen Fragestellung sind in diesem Teil der Promotion keine selbständigen Arbeiten von mir durchgeführt worden. Die Ethikkommission der Universität Göttingen stimmte dieser Studie zu (#11/10/04).

Im Rahmen des Verbundprojektes wurden Nierenbiopsien von 32 Patienten mit Nephrosklerose und 10 gesunden Patienten hinsichtlich der BMP-Transkription mittels quantitativer *real-time PCR* im Glomerulum sowie Tubulointersitium verglichen. Die statistische Auswertung erfolgte anhand des Mann-Whitney-U-Tests.

2.2.2. Transkription von BMP-2 und BMP-5 *in vitro*

Zur Detektion der BMP-2 und -5 Transkription wurde mit unstimulierten Zellen eine qualitative *real-time PCR*-Analyse durchgeführt.

Es wurden Fibroblasten der TK-173 und TK-188-Zelllinie verwendet, die für 24 Stunden in serumfreien Hungermedium (IMDM) inkubiert wurden. Desweiteren wurden proximale Tubulusepithelzellen der HK-2-Zelllinie sowie distale Tubulusepithelzellen, die Primärzellen sind, nach 24 Stunden Inkubation in DMEM verwendet. Eine humane Zelllinie mit distalen Tubulusepithelzellen ist nicht etabliert.

Die mRNA-Isolierung und die Umschreibung in cDNA erfolgte wie in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben.

Es wurde nur eine qualitative *real-time PCR*-Analyse durchgeführt. Auf eine quantitative Analyse des absoluten cDNA-Gehalts wurde bei einer zum Teil sehr niedrigen Transkription und entsprechend großer Standardabweichung verzichtet.

2.2.3. Stimulation von TK-173-, TK-188- und HK-2-Zellen *in vitro*

Zur Untersuchung der möglichen Auswirkungen von Angiotensin-2 auf die Transkription von BMP-2 und BMP-5 wurden die Zelllinien mit Angiotensin-2 stimuliert. Desweiteren wurde die Transkription von BMP-2 und -5 auch nach Stimulation der Zellen mit BMP-5 und -7 bestimmt, um Interaktionen zwischen den Proteinen zu beleuchten.

Die Aussaat von TK-173 und TK-188 Zellen erfolgte jeweils in T75 großen Zellkulturflaschen mit 10^5 Zellen in 10 ml DMEM mit 10% FCS. Nach 24 Stunden erfolgte die Inkubation der Zellen für weitere 24 Stunden in *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM), einem serumfreien Hungermedium. Dieses serumfreie Hungermedium gemischt mit den Stimulanzien wurde auch für die Stimationsversuche verwendet (Dauer und Konzentrationen siehe Tab.1 und 2). Als Kontrollgruppe diente bei allen Experimenten die parallele Inkubation von TK-173 und TK-188-Zellen in IMDM ohne Zusätze.

Analog zu den Stimationsversuchen mit Fibroblasten wurden proximale Tubulusepithelzellen HK-2 ebenfalls in T75 großen Zellkulturflaschen mit 10^5 Zellen in 10 ml Quantum 286-Medium ausgesät. Als Hungermedium diente DMEM, und die Stimulation erfolgte mit in DMEM gelösten Stimulanzien (Dauer und Konzentrationen siehe Tab. 1 und 2). Die Kontrollgruppe bestand bei allen Experimenten aus HK-2-Zellen, die parallel ohne Stimulanzien in DMEM inkubiert wurden. Nach Beendigung der Stimulation wurden die Zellen mit PBS jeweils dreimal für 5 min gewaschen, mittels Zelllysispuffer lysiert und das Zelllysat zur anschließenden mRNA-Isolierung verwendet.

Tab.1: rtPCR auf BMP-2 mit jeweiliger Zelllinie und Stimulanz sowie Stimulationsdauer

Primer	Zelllinie	Stimulanz	Stimulationsdauer
BMP-2	TK-173	10^{-7} , 10^{-5} , 10^{-3} M AT-2	12 h
BMP-2	HK-2	10^{-7} , 10^{-5} , 10^{-3} M AT-2	12 h
BMP-2	TK-173	1, 10 100 ng/ml rhBMP-5	12 h
BMP-2	HK-2	1, 10 100 ng/ml rhBMP-5	12 h
BMP-2	TK-173	1, 10 100 ng/ml rhBMP-7	12 h

Tab.2: rtPCR auf BMP-5 mit jeweiliger Zelllinie und Stimulanz sowie Stimulationsdauer

Primer	Zelllinie	Stimulanz	Stimulationsdauer
BMP-5	TK-173	10^{-7} , 10^{-5} , 10^{-3} M AT-2	12 h
BMP-5	TK-188	10^{-7} , 10^{-5} , 10^{-3} M AT-2	12 h
BMP-5	HK-2	10^{-7} , 10^{-5} , 10^{-3} M AT-2	12 h
BMP-5	TK-173	1, 10 ng/ml rhBMP-7	12 h
BMP-5	TK-188	1, 10 ng/ml rhBMP-7	12 h
BMP-5	HK-2	1, 10 ng/ml rhBMP-7	12 h

2.2.4. *real-time PCR*

mRNA-Isolation

Die Isolierung der mRNA aus den verwendeten Zellen erfolgte mithilfe des RNeasy Mini Kits nach Herstellerangaben der Firma Qiagen.

Die, je nach Stimulationsversuch behandelten Zellen, wurden zur Vorbereitung der mRNA-Isolation mit PBS mehrmals gewaschen und mit Trypsin bzw. HK-2-Zellen mit Accutase gelöst. Nach Überführung der Zellen in ein RNase-freies Röhrchen, wurden diese bei 300 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Dem Zellpellet wurde 700 µl RLT-Lysispuffer mit 7 µl β-Mercaptoethanol zugefügt und miteinander vermenget. Als Modifikation zur Entfernung unerwünschter Zellbestandteile wurde das Zelllysate über eine QIA-Schredder-Säule gegeben und zentrifugiert.

Das Verfahren der mRNA-Isolation beruht auf dem Prinzip von Säulen, die mit einer Silikat-Gelmembran ausgestattet sind und so die mRNA binden. Die mRNA wurde durch die verschiedenen Waschschrte mit Ethanol und anschließender Zentrifugation aufgereinigt.

Um mögliche Verunreinigung durch cDNA und deren Amplifikation in der anschließend durchgeführten *real-time PCR* zu vermeiden, wurde zusätzlich ein DNase-Verdau mit dem RNase-free DNase-Set von Qiagen als weitere Modifikation in das Protokoll eingefügt. Dabei wurde 10µl RNase freie DNase I in 70µl RDD-Puffer gelöst, direkt auf die Säule gegeben und für

15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgten weitere Waschschriffe, bis letztlich die isolierte und aufgereinigte mRNA mit nukleasefreiem Wasser durch Zentrifugation bei 10 000 g aus der Membran gelöst wurde.

Die Konzentrationsbestimmung der mRNA erfolgte photometrisch bei 260 nm mittels des Photometers GeneQuant.

Umschreibung der mRNA in cDNA

Die mRNA wurde nun mittels der RNA-abhängigen DNA-Polymerase (syn. Reverse Transkriptase) zur cDNA synthetisiert. Dafür wurde ein Thermozykler der Firma Stratagene verwendet. Es folgte die Inkubation der mRNA in einer Oligonukleotidmischung für 10 min bei 70 °C.

Zum Verdau endogener mRNAsen wurde der Enzyminhibitor Rnase Out bei 37°C für 5 min hinzugefügt. Die Synthese der cDNA erfolgte bei 42°C für 50 min nach Zugabe der Reversen Transkriptase. Als letzter Schritt erfolgte die Inaktivierung der Reversen Transkriptase über 15 min bei 70°C. Zum Ausschluss einer Kontamination mit genomischer DNA dienten als Negativkontrollen parallele Umschreibungen mit Ausnahme des Inkubationsschrittes der Reversen Transkriptase. Alle verwendeten Reagenzien stammten von der Firma Invitrogen.

***real-time PCR* (rtPCR)**

Die *real-time PCR* ist eine Modifizierung der klassischen PCR-Methode. Dabei wird ein Fluoreszenzfarbstoff verwendet, der ausschließlich an die synthetisierte Doppelstrang-DNA bindet und proportional zur vorhandenen DNA-Menge fluoresziert. Bei der *real-time PCR* wird die Fluoreszenz bei jedem Zyklus während des Amplifikationsprozesses gemessen. Dies erlaubt eine Quantifizierung der Probe, die auf der exponentiellen Phase der Amplifikation beruht (Higuchi et al. 1992, Wittwer et al. 1997).

Vorteile bei der Verwendung von SYBR Green als Fluoreszenz-Farbstoff ist die geringe Fluoreszenz in ungebundener Form. Bei Bindung an die Doppelstrang-DNA steigt die Fluoreszenz um das 1000-fache. Bei allen Versuchen wurde der SYBR Green PCR Master Mix und der Thermocycler Mx3000P der Firma Stratagene verwendet.

Die Primer für die *real-time PCR* wurden mit der Sequenz der Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) abgeglichen und von der Firma Primerdesign generiert (siehe Tab. 3).

Es wurde das Programm *Comparative Quantitation* der MxPro™ QPCR-Software von Stratagene verwendet, bei dem die relative Quantität der in den Proben enthaltenen DNA-Amplifikation in Bezug zu einem Calibrator (Kontrollgruppe) gemessen wird. Als Calibrator dienten Zellen, die nicht mit Stimulanzen behandelt wurden.

Tab.3: verwendete Primer für die rtPCR

Zielgen	Sequenz (Vorwärts / Rückwärts)	Anlagerungs- temperatur	Zyklenzahl
PPIA	TGG GCA ACA TAG TGA GAC G TGT ACA GTG GCA TGA TAA TAG C	60 °C	40
BMP-2	GGG CAT CCT CTC CAC AAA AG CCA CGT CAC TGA AGT CCA C	60 °C	40
BMP-5	ATC CTC GTC GCA TAC CAG TTA TC TGT CAG CAT CAT TCA AGAAAG TTG	60 °C	40

Zur Denaturierung der DNA-Stränge wurde im initialen Zyklus die Temperatur bei 95°C für 10 min gehalten. Die Annealingphase, die die spezifische Anlagerung der Primer an die Einzelstränge der DNA erlaubt, wurde bei beiden Primern in allen Versuchen bei 60°C für 1 min durchgeführt (identische Anlagerungstemperatur). Die Amplifikationsphase bei 72°C dauerte 30 s und es folgte ein neuer Zyklus, beginnend wieder mit der Denaturierung bei 95°C für 30 s. Die *real-time PCR* bestand aus 40 Zyklen. In jeder *real-time PCR*-Untersuchung wurde jeder Stimulationsansatz dreimal durchgeführt (Triplets).

Externe Kontamination, Verunreinigungen, unspezifische PCR-Produkte, Primer-Dimere sowie fremde genomische DNA können zu einer unspezifischen Zunahme des Fluoreszenz-Signals führen und die Ergebnisse verfälschen. Deshalb erfolgte die Auswertung nur, wenn interne Kontrollen zum Ausschluss dieser Verfälschungen, negativ waren.

Die Ergebnisse wurden zu einem sogenannten *housekeeping gene* (HKG) normalisiert. Dies ist typischerweise ein Gen, das konstant in allen Proben unter allen experimentellen Bedingungen transkribiert wird. Somit wird ein interner Standard bestimmt, der Konzentrationsunterschiede zwischen den Proben ausgleichen soll (Radonic et al. 2004, Bustin 2000).

Der Schwellenwert, auch Ct-Wert genannt, ist die Zykluszahl bei der sich das Fluoreszenzsignal vom Hintergrund abhebt. Dieser Wert geht in die Berechnung der Ergebnisse ein.

Das *housekeeping gene* GAPDH besitzt einen Schwellenwert zwischen 14 und 15 Zyklen und wird typischerweise bei der *real-time PCR* verwendet. Da die untersuchten Proteine in sehr geringen Konzentrationen in der Niere transkribiert werden, besitzen diese hohe Schwellenwerte (> 30 Zyklen). Diese hohe Differenz zwischen den Schwellenwerten von GAPDH und den *Bone-Morphogenetic-Proteinen* führt bei geringen Schwankungen zu hohen Standardabweichungen.

Zur Verbesserung des *real-time PCR*-Verfahrens wurde nach einem *housekeeping gene* mit höherem Schwellenwert gesucht, das unter allen experimentellen Versuchsbedingungen stabil exprimiert wird. Die in Tab. 4 angegebenen Gene wurden in Verdünnungsreihen als HKG getestet.

Tab.4: verwendete *housekeeping genes* für die rtPCR

<i>Housekeeping gene</i>		Ct-Wert
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphatdehydrogenase	14-15
PPIA	Peptidylprolyl-Isomerase A	21-22
YWHAZ	Tyrosine 3/tryptophan 5-Monooxygenase-activation-protein	20-28
RRN18S	18S rRNA	11-12
B2M	Beta-2-microglobulin	14-16
TBP	TATAA-box Binding Protein	20-21

Letztendlich wurde als *housekeeping gene* die Peptidylprolyl-Isomerase A (PPIA) bestimmt, da es sich unter allen experimentellen Bedingungen als stabil erwies und einen Schwellenwert von 21 bis 22 Zyklen besitzt. Alle Primer der untersuchten *housekeeping genes* stammten von der Firma TATAA Biocenter, Göteborg, Schweden.

Auswertung der *real-time PCR*

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem MXPro 3000-Programm der Firma Stratagene. Die absolute Transkription der Zielgene wurde als Ct-Wert angegeben. Dies entsprach der Zykluszahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal signifikant vom Hintergrund abhob. Zum Ausgleich von Schwankungen innerhalb der Proben wurde zur Berechnung des Δ Ct-Werts das *housekeeping gene* PPIA vom Ct-Wert des gesuchten Gens subtrahiert (Radonic et al. 2004). Nach Subtraktion der Δ Ct-Werte der einzelnen Probengruppen (stimuliert - unstimuliert) ergab sich der $\Delta\Delta$ Ct-Wert. Dieser Wert ging zur Berechnung der relativen quantitativen Transkription in die Formel

$$\frac{-\Delta\Delta Ct}{2} \text{ ein.}$$

2.2.5. Western Blot

Proteinisolation

Die TK-173-Fibroblasten und proximalen Tubulusepithelzellen HK-2 wurden in Zellkulturflaschen der Größe T75 ausgesät und für 24 Stunden in DMEM mit 10% FCS bzw. Quantum 286-Medium kultiviert. Anschließend erfolgte die 24-stündige Kultivierung der TK-173-Zellen in IMDM sowie der HK-2-Zellen in DMEM, den entsprechenden Hungermedien der jeweiligen Zelllinie. Vor der Isolierung wurden die Zellen dreimalig mit PBS gewaschen. Die Lyse erfolgte mit einem Lysispuffer, der Phenylmethansulfonsäurefluorid (PMSF) zur Hemmung endogener Proteasen enthielt. Es wurden 3 ml Lysispuffer zugefügt und die Zellen vorsichtig mechanisch abgeschabt. Anschliessend wurde das erhaltene Lysat für 5 min bei 1000g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand enthielt die denaturierten Proteine. Die Proteinkonzentration wurde nach der Bradford-Methode bestimmt. Dabei wurden 50 µl des Überstandes mit 2,45 ml Bradford-Reagenz vermengt und für 10 min inkubiert. Die Messung bei einer Wellenlänge von 595 nm erfolgte mit dem Photometer Genesys 5 der Firma Spectronic.

Auftrennung der Proteine mittels Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die Auftrennung der Proteine erfolgt mithilfe eines Polyacrylamidgels (SDS-Page) elektrophoretisch nach Molekulargewicht. Zur Optimierung des Western Blots wurden in Testreihen verschiedene Konzentrationen, Zeiten und Temperaturen angewendet.

Die lysierten Proteine wurden zunächst mit Aceton ausgefällt und SDS in verschiedenen Konzentrationen zugegeben (10, 50, 100, 200 µg). Die Proben wurden nach Zugabe von β-Mercaptoethanol für unterschiedliche Dauern (3,5,10,15 min) auf 95°C erhitzt.

Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proteine im SDS-Trenngel. Zur Bestimmung der optimalen Proteinkonzentration wurden Verdünnungsreihen mit Proteinkonzentrationen von 10, 25, 50, 100, 200 µg verwendet. Dazu wurde das Gel in eine mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingelegt und mit einer Gleichstromspannung zunächst von 80 V für 15 min und anschließend mit 120 V für 4 Stunden versehen.

Der ebenfalls im Trenngel aufgetragene Marker diente als farbliche Orientierung aufgrund der bekannten Molekulargewichte.

Proteintransfer

Ziel des Western Blots ist die Transferierung der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran, die immunochemisch weiter untersucht wird.

Dazu wurden das Gel und die Membran in Filterpapier und Vlies eingebettet und in eine Kassette mit Transferpuffer eingelegt. Der Transfer fand anschließend bei einer konstanten Spannung von 30 V für 16 Stunden bei 4°C statt.

Durchführung des Western Blots

Nach dem Transfer wurde die Nitrozellulosemembran in Blocklösung zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen eingelegt. Die Blocklösung bestand aus 5% Magermilch in TBS mit 0,05% Tween 20. Desweiteren wurden ebenfalls im Rahmen der Optimierungen des Versuchsaufbaus Blocklösungen mit 3% Magermilch in TBS mit 0,05% bzw. 0,1% Tween 20 und unterschiedlichen Zeiten (2h, 6h, 12h, 24h) sowie Temperaturen (Raumtemperatur, 4°C) verwendet.

Anschliessend wurde die Membran dreimal für 5 min mit TBS gewaschen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte in TBS-Tween mit 2,5%iger Magermilch. Es wurde eine Verdünnungsreihe des Primärantikörpers (1:1000, 1:500, 1:250, 1:100) verwendet und jeweils für 6h, 12h bzw. 24h bei RT inkubiert.

Nach gründlicher Waschung mit TBS-Tween folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Dieser wurde ebenfalls in TBS-Tween mit 2,5%iger Magermilch gelöst und in einer Verdünnungsreihe (1:5000, 1:1000, 1:200) für eine Stunde bei RT inkubiert. Längere Inkubationszeiten mit dem Sekundärantikörper führten zu unspezifischen Banden im Western Blot.

Die Membran wurde mehrmals mit TBS gewaschen und für die Detektion mittels Chemilumineszenz für 1 min in Entwicklerlösung inkubiert. Es wurde das Western Lightning ECL-Kit von Perkin Elmer verwendet. Die Entwicklung der Bilder erfolgte mithilfe des Belichtungsautomats Kodak-X-Omat auf einen Röntgenfilm der Firma Kodak.

Die zahlreichen Modifikationen des Western Blot-Protokolls dienen zum Ausschluss methodischer Mängel bei ausbleibendem Nachweis der BMP-2 und -5-Proteine. Es wurden Antikörper von zwei unterschiedlichen Herstellern verwendet. Bei allen Experimenten wurde eine Positivkontrolle mit β -Aktin angefertigt.

2.2.6. Makrophagen-Migrationsassay

Isolation von mononukleären Zellen aus Leukozytenkonzentrat (Buffy Coat)

Mononukleäre Zellen wurden aus Buffy Coats gewonnen. Das Buffy Coat wurde zum Lymphozytenseparationsmedium in ein 50 ml-Röhrchen gegeben und anschliessend bei 2000 rpm für 20 min zentrifugiert. Dadurch wurde eine Trennung der verschiedenen Bestandteile des Buffy Coats aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte erreicht. Im Röhrchen befanden sich nun Erythrozyten und Granulozyten am Boden als Pellet, darüber das Separationsmedium, gefolgt von der Interphase, die Lymphozyten und Monozyten enthielt und zuletzt das Serum als Überstand.

Die Interphase wurde mit einer 10 ml-Pipette vorsichtig abgesaugt und in ein neues 50 ml-Röhrchen gegeben. Erneut wurde bei 2000 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Anschliessend folgte die Waschung mit 50 ml PBS und die Zentrifugation bei

1500 rpm für 5 min. Dies wurde zweimal wiederholt. Zum Pellet wurde 12 ml Panserin mit 2% FCS gegeben und gut vermischt. Jeweils 2 ml der Suspension wurden auf Petrischalen in 6 ml Panserin mit 2% FCS verteilt. Es erfolgte eine zweistündige Inkubation bei 37°C bei der die Monozyten an der Polystyroloberfläche der Petrischale adhärten, Lymphozyten jedoch nicht. Nach der Inkubationszeit wurden die Lymphozyten mit dem Überstand abgenommen. Zu den adhärten Monozyten in der Petrischale wurden nochmals 6 ml Panserin mit 2% FCS zugegeben und für 6 Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Das Inkubationsmedium wurde jeweils nach 3 Tage erneuert.

Am siebten Tag erfolgte der Wechsel des Mediums von Panserin mit 2% FCS auf RPMI-Medium mit 1% FCS, nachdem die Monozyten mit PBS gewaschen wurden. Am 14. Tag waren die Monozyten zu Makrophagen herangereift und wurden für das Makrophagen-Migrationsassay verwendet.

Durchführung des Makrophagen-Migrationsassay

Es wurde eine 48-Well-Platte verwendet, die aus einer unteren und oberen Kammer besteht (sog. *Boyden chamber*). Die Kammern sind durch eine Polyvinylpyrrolidone-freien Polykarbonat-Membran getrennt. Die Membran verfügt über Poren, durch die die Passage von der oberen in die untere Kammer möglich ist.

Die Makrophagen wurden mit Trypan-Blau angefärbt und in der Neubauer- Zählkammer gezählt. Abgestorbene Zellen verfärbten sich blau und wurden nicht mitgezählt, vitale Zellen blieben ungefärbt.

In die obere Kammer wurden 25.000 Zellen pro Well in 40 µl DMEM ohne Stimulanzien eingefüllt, die untere Kammer mit jeweils 32 µl DMEM und dem entsprechenden Stimulanz (siehe Tab. 5) befüllt. Danach wurde die Well-Platte für 4 Stunden bei 37°C inkubiert.

Nach Inkubation wurde das obere Kompartiment zuerst mit einem trockenem und anschließend mit einem in PBS-getränktem Wattestäbchen zur Entfernung aller nicht migrierten Zellen von der Membranoberfläche gereinigt. Die Membran wurde auf einen mit PBS beschichteten Objektträger gebracht und im Dunkeln mit 1:1000 verdünnter DAPI-Lösung für 4 min inkubiert. Anschließend wurde vorsichtig mit PBS gespült und der Objektträger mit der Membran in Mounting Medium eingedeckt.

Schlussendlich wurden die Objektträger mit dem Mikroskop Axiophot S100TV mit Digitalkamera C-3040 fotografiert und die Zellen gezählt.

Tab.5: Versuchsaufbau des Makrophagen-Migrationsassay mit entsprechenden Stimulanzen

Kontrolle	unstimuliert
Stimulanzen	10 ng/ml rhTGF- β 1
	10 ng/ml rhTGF- β 1 + 10 ng/ml rhBMP-5
	10 ng/ml rhTGF- β 1 + 10 ng/ml rhBMP-7
	100 ng/ml rhTNF- α
	100 ng/ml rhBMP-5 + 100 ng/ml rhTNF- α

2.2.7. Proliferationsassay

Die Auswirkungen von BMP-2 und BMP-5 auf die Proliferation von renalen Fibroblasten der TK-173-Zelllinie wurden mittels eines nicht-radioaktiven Proliferationsassays untersucht. Dabei handelt es sich um einen indirekten ELISA, der auf einem Nachweis des Thymidinanalogons Bromdesoxyuridin (BrdU) beruht.

Verwendet wurde das Biotrak Cell Proliferation ELISA system, Version 2 von Amersham Biosciences. Die Durchführung erfolgte dem Herstellerprotokoll entsprechend.

Der Test beruht auf drei wesentlichen Schritten: BrdU-Inkorporation, Inkubation mit Anti-BrdU-Primärantikörper und Detektion mittels eines Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers.

Für das Proliferationsassay mit renalen Fibroblasten der TK-173-Zelllinie wurden diese in einer Zellsuspension mit 4000 Zellen in 100 μ l/Well mit DMEM und 10%igem FCS für 24h kultiviert. Im Anschluss erfolgte die 24-stündige Ruhigstellung in serumfreien Hungermedium (IMDM).

Die Stimulationsansätze wurden für Fibroblasten der TK-173-Zelllinie in IMDM mit den entsprechenden Konzentrationen an rhBMP-2, rhBMP-5 und AT-2 (siehe Tab. 6) angesetzt, in Sextetts pipettiert und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

Tab.6: verwendete Stimulanzen im Proliferationsassay bei TK-173-Fibroblasten

Stimulanz	Konzentration	Stimulationsdauer
rhBMP-2	1, 10 100 ng/ml	24 h
rhBMP-5	1, 10 100 ng/ml	24 h
AT-2	10^{-7} , 10^{-5} , 10^{-3} M AT-2	24 h

Nach der Stimulation erfolgte die Inkubation für 4h bei 37°C in IMDM, das mit einer BrdU-Konzentration von 10 μ M versetzt war. Anschließend wurden die Zellen dreimal für 5 min bei Raumtemperatur auf der Wippe in einer Waschlösung (PBS) gewaschen.

Es folgte die Zellfixation und DNA-Denaturierung mit Ethanol als Fixationslösung für 30 min bei Raumtemperatur, danach die Blockierung in Blocklösung für 30 min bei Raumtemperatur.

Anschließend wurden die Zellen mit Peroxidase-gebundenem anti-BrdU-Antikörper für 2h inkubiert. Nach Waschen in PBS erfolgte die Zugabe von 100 µl Substratlösung (TMB in 15% DMSO) und die Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur. Die Messung der optischen Dichte (OD) wurde im Reader (Photometer Dynatech MR 400) bei 450 nm durchgeführt.

Zum Ausschluss unspezifischer Bindungen und Signale dienten Assay-blank-Kontrollen (Ansätze ohne Zellkultivierung) als Negativkontrollen.

2.2.8. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der Abteilung für medizinische Statistik der Universitätsmedizin Göttingen. Die statistische Auswertung und Graphenerstellung wurde mit dem Softwareprogramm S plus (Tibco, Palo Alto, USA) erstellt. Die Ergebnisse der Zellkultur-experimente wurden nach dreimaliger Durchführung als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. Nach Anwendung des Student'schen t-Tests wurden P-Werte kleiner 0,05 als statistisch signifikant angesehen und in den Graphen mit * gekennzeichnet. P-Werte kleiner 0,01 sowie kleiner 0,001 wurden mit ** bzw. *** markiert.

Zur Prüfung der Signifikanz wurden die Ergebnisse der *real-time PCR* der *European Renal Data Bank* mittels der nicht-parametrischen Variante des Student'schen t-Tests für unverbundene Stichproben, dem Mann-Whitney-U-Test analysiert. Ein P-Wert kleiner 0,05 gilt als statistisch signifikant.

3. Ergebnisse

3.1. BMP-5 in der adulten humanen Niere

3.1.1. BMP-5 in der adulten humanen Niere und bei der hypertensiven Nephrosklerose

Als Grundlage für die Promotion wurde im Rahmen des Kooperationsprojektes *European Renal cDNA Bank* die Transkription von BMP-5 in 42 adulten humanen Nieren mittels *real-time PCR* untersucht. Dabei wurden Nierenbiopsien von 32 Patienten mit hypertensiver Nephrosklerose und 10 gesunden Patienten verwendet. Aufgrund der Anwendung des Mikrodissektionsverfahrens war es möglich die Transkription von BMP-5 getrennt nach Glomeruli und Tubulointerstitium zu untersuchen. Als Ergebnis zeigte sich:

- der erstmalige Nachweis einer BMP-5 Transkription in der adulten humanen Niere. Insgesamt bestand eine niedrige Transkriptionsrate von BMP-5,
- eine sehr geringe BMP-5-Transkription in den Glomeruli. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der gesunden und nephrosklerotisch veränderten Gruppe bei insgesamt sehr geringer glomerulärer Transkription von BMP-5,
- eine höhere Transkription von BMP-5 im Tubulointerstitium,
- eine signifikant verminderte Transkription von BMP-5 im Tubulointerstitium der nephrosklerotischen Nieren im Vergleich zum Tubulointerstitium von gesunden Patienten (0,251, +- 0,309, $p=0,0060$).

Abb.5: Transkription von BMP-5 im Tubulointerstitium bei humanen adulten gesunden und nephrosklerotischen Nieren in der rtPCR nach Mikrodissektion (Mittelwert, Standardabweichung, $*=p<0,05$)

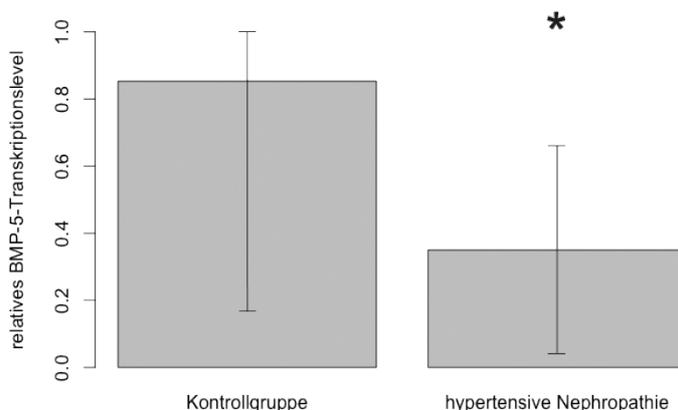
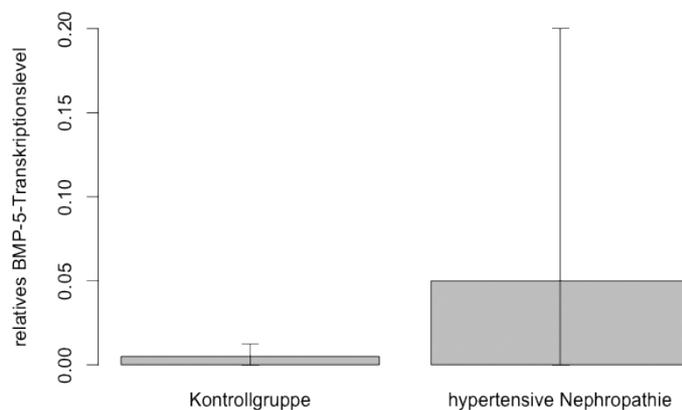


Abb.6: Transkription von BMP-5 in den Glomeruli bei humanen adulten gesunden und nephrosklerotischen Nieren in der rtPCR nach Mikrodissektion (Mittelwert, Standardabweichung)



3.1.2. Transkription von BMP-5 in humanen renalen Zelllinien

Nachdem BMP-5 erstmalig in der adulten humanen Niere nachgewiesen werden konnte, wurde untersucht, in welchen Zellen eine Transkription von BMP-5 stattfindet. Dazu wurde eine *real-time PCR* auf BMP-5 mit verschiedenen unbehandelten Zellen durchgeführt.

Es wurden folgende Zellen verwendet:

- proximale Tubulusepithelzellen HK-2 (Zelllinie),
- distale Tubulusepithelzellen (primär isolierte Zellen aus humanen Nieren, freundlicherweise von PD Dr. med Patrick C. Bär, Zentrum der Inneren Medizin, Funktionsbereich Nephrologie der Goethe-Universität Frankfurt am Main, zur Verfügung gestellt (Baer et al. 1997)),
- Fibroblasten der TK-173-Reihe (Zelllinie), die aus gesunden adulten humanen Nieren isoliert wurden und
- Fibroblasten der TK-188-Reihe (Zelllinie), die aus fibrotisch veränderten adulten humanen Nieren stammen.

Die hohe notwendige Zyklusanzahl von > 30 Zyklen zum Nachweis der BMP-5 Transkripte ließ auf eine sehr geringe Transkription in den Zellen schließen. Aufgrund der großen Streuung in den späten Zyklen war eine valide statistische Auswertung hinsichtlich der Quantität der Transkripte nicht möglich. Unter Beachtung des oben Genannten fand man in distalen Tubulusepithelzellen und TK-188-Fibroblasten höhere Konzentrationen an BMP-5 Transkripten als in proximalen Tubulusepithelzellen HK-2- und TK-173-Fibroblasten.

Trotz der höheren Transkription von BMP-5 in distalen Tubulusepithelzellen mussten für weitere Versuche die proximalen Tubuluszelllinie HK-2 verwendet werden, da es sich bei den distalen Tubulusepithelzellen um primär isolierte und nicht weiter kultivierbare Zellen handelte.

3.1.3. Transkription von BMP-5 *in vitro*

Aus den Zelllinien TK-173 und HK-2 wurden gelelektrophoretisch die Proteine aufgetrennt und ein Western Blot durchgeführt.

Trotz der, in Kapitel 2.2.5 beschriebenen Modifizierungen und Optimierungen des Western Blot-Protokolls, gelang ein Nachweis von BMP-5 auf Proteinebene nicht. Als Positivkontrolle diente β -Aktin, das jeweils nachweisbar war. Vermutlich ist die Konzentration des BMP-5-Proteins in den untersuchten Zellen sehr niedrig und einem Nachweis mittels Western Blot daher nicht zugänglich.

3.2. Regulation von BMP-5

3.2.1. Einfluss von Angiotensin-2 auf die BMP-5-Transkription *in vitro*

Basierend auf der Beobachtung einer verminderten Transkription von BMP-5 im Tubulointerstitium nephrosklerotisch veränderter Nieren wurde die Transkription von BMP-5 nach Stimulation verschiedener Zellreihen mit Angiotensin-2 (AT-2) als Hauptmediator in der Pathogenese der Nephrosklerose untersucht.

Für diesen Stimulationsversuch wurden proximale Tubulusepithelzellen HK-2, Fibroblasten der TK-173-Zelllinie, die aus ursprünglich gesunden adulten Nieren isoliert wurden sowie Fibroblasten der TK-188-Reihe, die aus fibrotischen Nieren stammen, verwendet und mit Angiotensin-2 für 12 Stunden inkubiert. Es wurde die relative Expression gegenüber unstimulierten Zellen als Kontrollgruppe bestimmt.

Interessanterweise zeigte sich in proximalen HK-2-Zellen keine signifikante Veränderung in der Transkription von BMP-5. In Fibroblasten der beiden Gruppen waren jedoch unterschiedliche Effekte zu sehen.

Während in Fibroblasten der TK-173-Reihe, die aus gesundem Nierengewebe stammten, eine Erhöhung der Transkription von BMP-5 beobachtet werden konnte (185%, +82%, $p=0,0333$ bzw. 220%, +158%, $p=0,0367$), zeigte sich in Fibroblasten der TK-188-Reihe, die aus fibrotischen Nieren stammten und krankhaft verändert waren, eine signifikante Reduktion an BMP-5-Transkripten (44%, -12%, $p=0,0029$).

Abb.7: rtPCR auf BMP-5 nach 12-stündiger Stimulation von HK-2-Zellen mit Angiotensin-2 (Mittelwert, Standardabweichung)

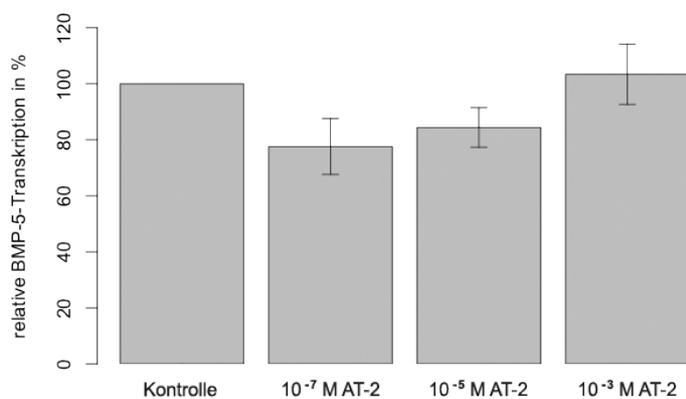


Abb.8: rtPCR auf BMP-5 nach 12-stündiger Stimulation von TK-173-Zellen mit Angiotensin-2 (Mittelwert, Standardabweichung, *=p<0,05)

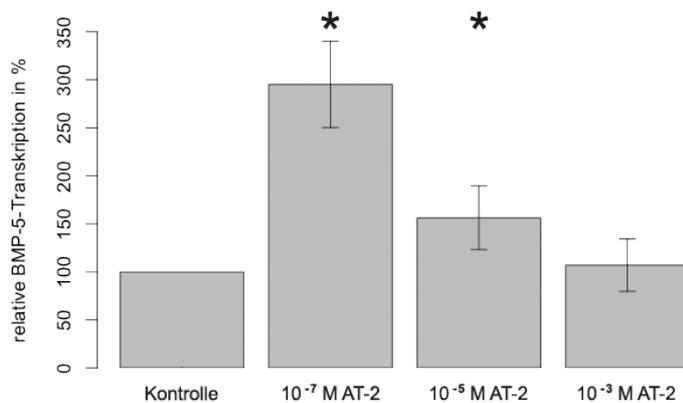
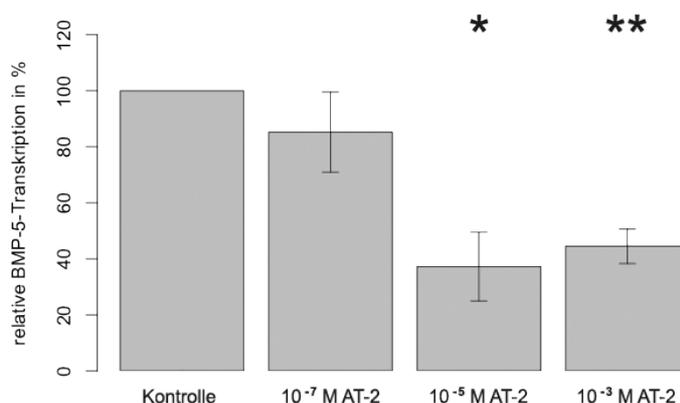


Abb.9: rtPCR auf BMP-5 nach 12-stündiger Stimulation von TK-188-Zellen mit Angiotensin-2 (Mittelwert, Standardabweichung, *=p<0,05, **=p<0,01)



3.2.2. Einfluss von BMP-7 auf die Transkription von BMP-5 in renalen Zelllinien

In Untersuchungen an Chondrozyten konnte gezeigt werden, dass *Bone-Morphogenetic-Proteine* sich intensiv gegenseitig beeinflussen. Yeh und Lee berichten von zahlreichen Interaktionen der BMPs miteinander sowie in Kombination mit weiteren Mediatoren, die zu einer Regeneration von Knorpel führten (Yeh und Lee 2002).

Aufgrund der zentralen Bedeutung von BMP-7 in der Nephrogenese wie auch in der Pathogenese der Nephrosklerose wurde der Einfluss von rekombinantem humanen BMP-7 (rhBMP-7) auf die Transkription von BMP-5 in distalen Tubulusepithelzellen HK-2 und den Fibroblasten der TK-173- sowie TK-188-Zelllinie untersucht. Es wurde eine relative Transkriptionsanalyse im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe mittels *real-time PCR* durchgeführt.

Anders als in den Ergebnissen in Chondrozyten konnten keine signifikanten Effekte von rhBMP-7 auf die Transkription von BMP-5 in oben genannten adulten humanen Zelllinien der Niere nachgewiesen werden.

Bei den HK-2-Zellen sowie den Fibroblasten der TK-173-Zelllinie ließen sich lediglich Tendenzen einer Erhöhung der BMP-5-Transkripte beobachten. Bei der TK-188-Zelllinie zeigt sich eine tendenzielle Minderung, wobei allen Daten eine statistische Signifikanz fehlt.

Abb.10: rtPCR auf BMP-5 nach 12-stündiger Stimulation von HK-2-Zellen mit rhBMP-7
(Mittelwert, Standardabweichung)

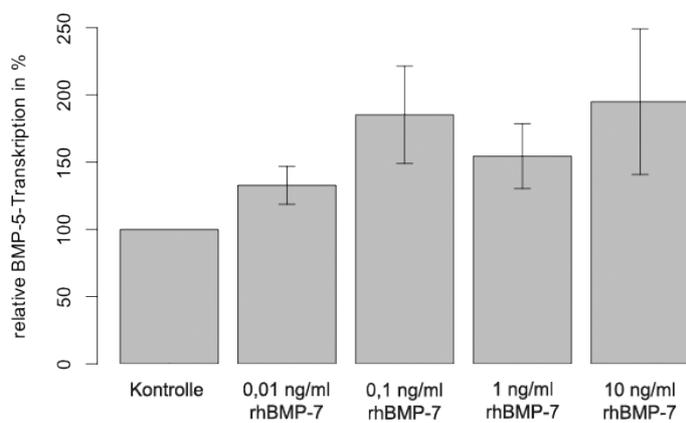


Abb.11: rtPCR auf BMP-5 nach 12-stündiger Stimulation von TK-173-Zellen mit rhBMP-7
(Mittelwert, Standardabweichung)

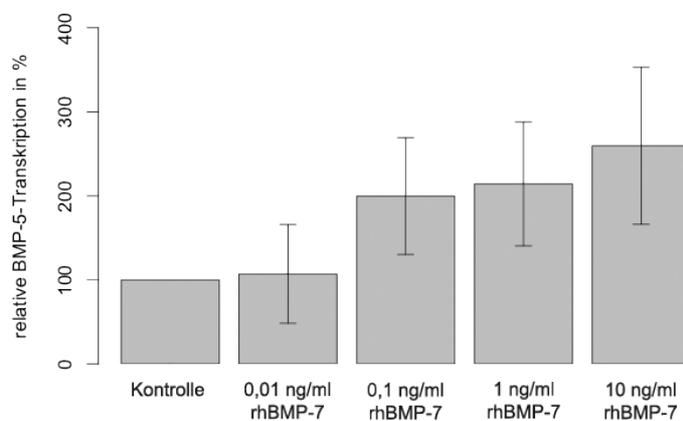
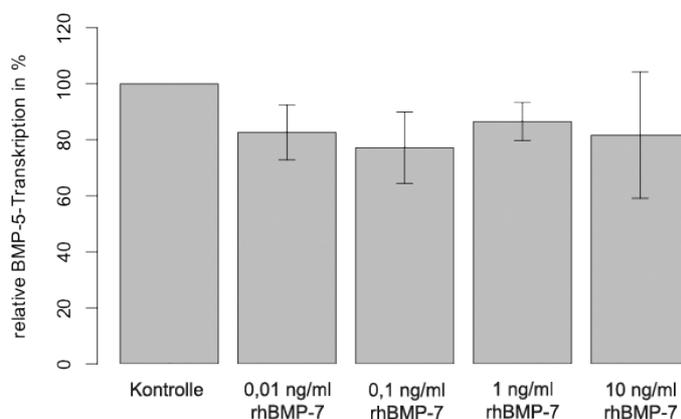


Abb.12: rtPCR auf BMP-5 nach 12-stündiger Stimulation von TK-188-Zellen mit rhBMP-7
(Mittelwert, Standardabweichung)



3.3. Funktion von BMP-5

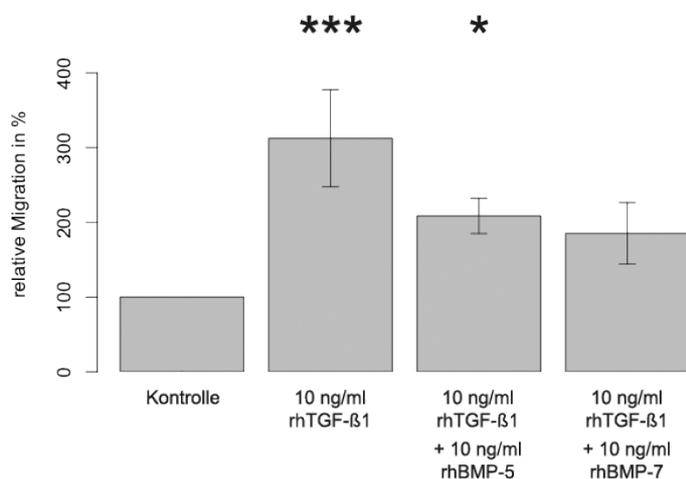
3.3.1. Einfluss von BMP-5 auf die Migration von Makrophagen *in vitro*

Die chronische Niereninsuffizienz ist gekennzeichnet durch eine progressive Fibrosierung und Umbau der Niere. Der initiale Schritt zur Fibrose ist die Inflammation. Dabei wird das Tubulointerstitium von zahlreichen Entzündungszellen, darunter auch Makrophagen, infiltriert.

Zur Untersuchung einer möglichen Migrationsinduktion durch BMP-5 wurde ein Makrophagen-Migrationsassay verwendet. Dabei wurden Makrophagen mit rhTGF- β 1 alleine sowie mit rhTGF- β 1 in Ko-Stimulation mit rhBMP-5 bzw. rhBMP-7 stimuliert. Von rhTGF- β 1 ist bekannt, dass es als wichtiger Mediator am Prozess der Nephrosklerose beteiligt ist und die Migration von Entzündungszellen induziert. Deshalb wurde die Stimulation von Makrophagen mit rhTGF- β 1 als Positivkontrolle benutzt.

Als Kontrollgruppe wurde die Zellmigration bei Inkubation von Makrophagen in reinem BasalmEDIUM verwendet. Die Ergebnisse sind als relative Migrationsrate in % zur Kontrollgruppe angegeben.

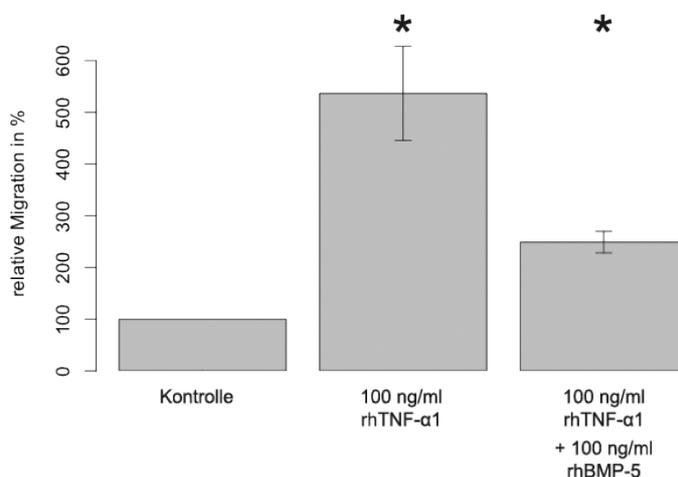
Abb.13: Makrophagen-Migrationassays nach Stimulation mit rhTGF- β 1 sowie rhTGF- β 1 in Ko-Stimulation mit rhBMP-5 bzw. rhBMP-7 (Mittelwert, Standardabweichung, *= $p < 0,05$, ***= $p < 0,001$)



Es zeigte sich bei der Stimulation von rhTGF- β 1 als Positivkontrolle die zu erwartende Migration der Makrophagen (325%, $\pm 165,06\%$, $p=0,0006$). Interessanterweise zeigt sich bei der Ko-Stimulation von rhTGF- β 1 und rhBMP-5 eine Migration in deutlich verminderten Ausmaße (199,71%, $\pm 128,52\%$, $p=0,0281$) als die alleinige Stimulation mit rhTGF- β 1. BMP-5 scheint eine Abmilderung der TGF- β 1-induzierten Migration von Entzündungszellen zu bewirken. Für BMP-7 sind bereits Effekte, die die TGF- β 1 induzierten Vorgänge teilweise aufheben oder rückgängig machen, beschrieben. In diesem Versuch zeigte sich ebenfalls eine nicht signifikante Migration von Makrophagen in Ko-Stimulation von rhTGF- β 1 mit rhBMP-7 (178,29%, $\pm 68,67\%$, $p=0,0603$) und somit eine Abmilderung des TGF- β 1-induzierten Migrationseffekts durch BMP-7. BMP-5, das eng verwandt BMP-7 ist, übt einen ähnlichen abmildernden Effekt auf die TGF- β 1-induzierte Makrophagen-Migration aus wie BMP-7.

Der *tumor-necrosis-factor- α* (TNF- α) ist wohl der potenteste Mediator von Entzündungsreaktionen. Er induziert und reguliert zahlreiche inflammatorische Prozesse unter anderem die Produktion von inflammatorischen Zytokinen wie beispielsweise das *monocyte-chemo-attractant-protein-1* (MCP-1), das die Migration, insbesondere von mononukleären Zellen, verstärkt. Deshalb wurden Makrophagen sowohl mit rhTNF- α alleine als auch mit einer Kombination von rhTNF- α mit rhBMP-5 stimuliert. Untersucht werden sollte, ob ein ähnlicher anti-migratorischer Effekt von BMP-5 beim Vorhandensein des potenten pro-migratorischen Zytokins TNF- α eintritt. Im vorausgegangenem Versuch mit TGF- β 1 konnte ein anti-migratorischer Effekt für BMP-5 beobachtet werden.

Abb.14: Makrophagen-Migrationassays nach Stimulation mit rhTNF- α und rhTNF- α in Ko-Stimulation mit rhBMP-5 (Mittelwert, Standardabweichung, $*=p<0,05$)



Wie zu erwarten, zeigte sich eine signifikante Migration von Makrophagen bei Stimulation mit rhTNF- α (536,49%, $\pm 157,21\%$, $p=0,0406$). Bei der Ko-Stimulation von rhTNF- α und rhBMP-5 zeigt sich ein anti-migratorischer Effekt von BMP-5 auf die Induktion der Makrophagenmigration durch rhTNF- α (249%, $\pm 36,08\%$, $p=0,0190$). Somit besteht neben einem anti-migratorischem Effekt von BMP-5 auf die TGF- β 1-induzierte-Migration ebenfalls ein anti-migratorischer Effekt bei TNF- α -induzierten migratorischen Prozessen.

3.3.2. Einfluss auf die Proliferation durch BMP-5 und Angiotensin-2 *in vitro*

Im Rahmen der nephrosklerotischen Veränderungen kommt es zu einer zunehmenden Fibrosierung der Niere. Dieser Prozess stellt sich unabhängig von der Grunderkrankung dar. Hierbei geht man von einer Proliferation der Fibroblasten als zentralem Mechanismus aus. Interessanterweise werden TGF- β proliferative Effekte zugeschrieben, wohingegen BMP-7, zur TGF- β -Gruppe gehörig, anti-proliferative Effekte aufweist (Bramlage et al. 2011).

Unklar bleibt die Bedeutung von BMP-5 auf die Proliferation von Fibroblasten. Hierbei sind zwei Hypothesen denkbar:

1. BMP-5 bewirkt eine Proliferation von Fibroblasten und wird daher möglicherweise reaktiv zum Schutz bei der Nephrosklerose vermindert exprimiert.
2. BMP-5 besitzt ähnlich wie BMP-7 anti-proliferative Effekte.

Zum Nachweis eines möglichen Einflusses von BMP-5 auf die Proliferation von Fibroblasten der TK-173-Zelllinie wurde dieser mittels Proliferationsassay untersucht.

Das Ergebnis zeigte bei allen Stimulationen mit rekombinantem humanen BMP-5 keine Änderung in der Mitoserate und somit keinen Einfluss von BMP-5 auf die Proliferationsrate von Fibroblasten der TK-173-Reihe.

Darüberhinaus wurde ein Proliferationsassay nach Stimulation von TK-173-Fibroblasten mit Angiotensin-2, Mitglied des RAAS und potenter Mediator der nephrosklerotischen Veränderungen, durchgeführt. Auch Angiotensin-2 scheint keinen proliferativen Effekt auf die TK-173-Fibroblasten auszuüben. Der Prozess der Proliferation scheint unabhängig von BMP-5 und AT-2 über andere Mechanismen induziert zu werden.

Abb.15: Proliferationsassay nach 12-stündiger Stimulation von TK-173-Zellen mit rhBMP-5 (Mittelwert, Standardabweichung)

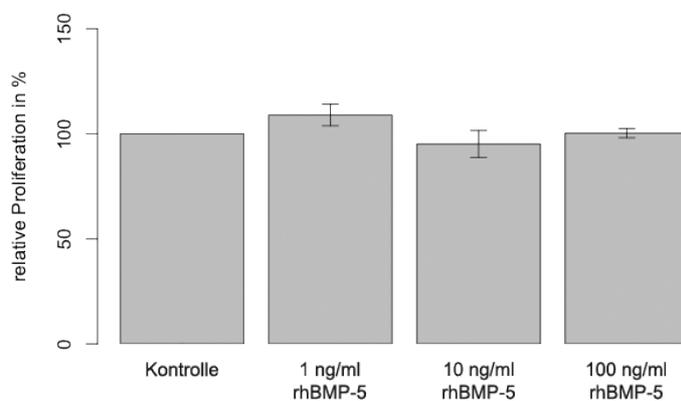
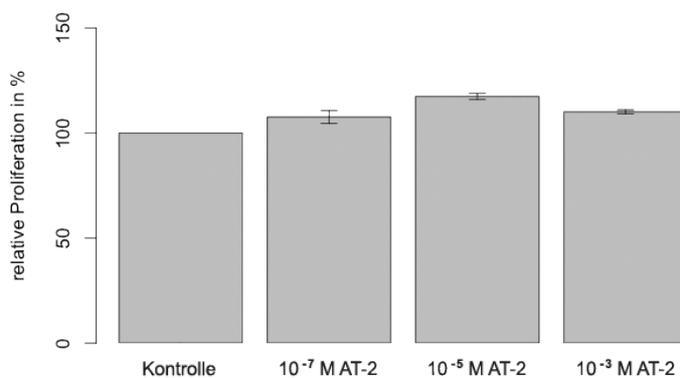


Abb.16: Proliferationsassay nach 12-stündiger Stimulation von TK-173-Zellen mit Angiotensin-2 (Mittelwert, Standardabweichung)



3.4. BMP-2 in der adulten humanen Niere

3.4.1. BMP-2 in der adulten humanen Niere und bei der hypertensiven Nephrosklerose

Im Rahmen des Kooperationsprojektes *European Renal cDNA Bank* wurde in dieser Promotion ebenfalls die Transkription von BMP-2 in 42 adulten humanen Nieren untersucht.

Die Transkription von BMP-2 wurde nach Mikrodissektionsverfahren mittels *real-time PCR* in Nierenbiopsien von 32 Patienten mit hypertensiver Nephrosklerose und 10 gesunde Patienten untersucht. Als Ergebnis zeigte sich:

- der erstmalige Nachweis einer BMP-2-Transkription in der adulten humanen Niere,
- eine sehr geringe BMP-2-Transkription in den Glomeruli ohne signifikanten Unterschied zwischen gesundem und nephrosklerotischen Nierengewebe,
- eine höhere Transkription im Tubulointerstitium bei insgesamt niedrigem Transkriptionslevel,
- im Tubulointerstitium eine signifikant verminderte Transkription von BMP-2 der nephrosklerotischen Nieren im Vergleich zu gesunden Patienten (0,419, \pm 0,284, $p=0,0029$).

Abb.17: Transkription von BMP-2 im Tubulointerstitium bei humanen adulten gesunden und nephrosklerotischen Nieren in der rtPCR nach Mikrodissektion (Mittelwert, Standardabweichung, $*=p<0,05$)

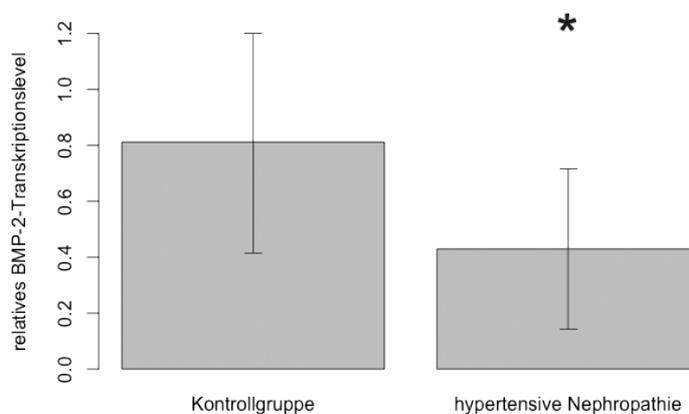
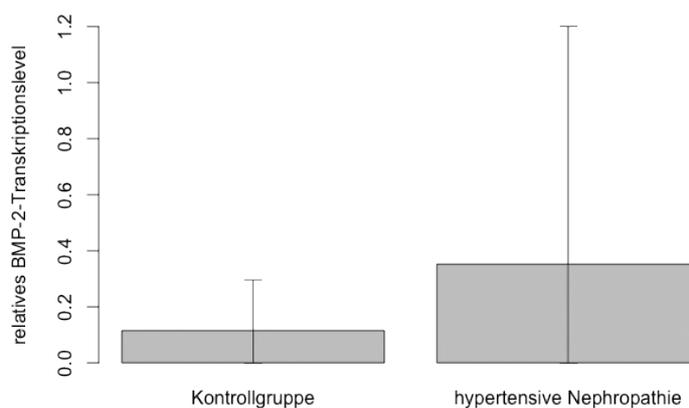


Abb.18: Transkription von BMP-2 in den Glomeruli bei humanen adulten gesunden und nephrosklerotischen Nieren in der rtPCR nach Mikrodissektion (Mittelwert, Standardabweichung)



3.4.2. Transkription von BMP-2 in humanen renalen Zelllinien

Aufgrund des gelungenen erstmaligen Nachweis von BMP-2 in der adulten humanen Niere wurde die Transkription von BMP-2 in renalen Zellen untersucht. Für die *real-time PCR* auf BMP-2 wurden folgende unbehandelte Zellen verwendet:

- proximale Tubulusepithelzellen HK-2 (Zelllinie),
- distale Tubulusepithelzellen (primär isoliert Zellen aus humanen Nieren),
- Fibroblasten der TK-173-Reihe (Zelllinie), die aus gesunden adulten humanen Nieren isoliert wurden und
- Fibroblasten der TK-188-Reihe (Zelllinie), die aus fibrotisch veränderten adulten humanen Nieren stammen.

Der Schwellenwert in der *real-time PCR* beschreibt die Zykluszahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal vom Hintergrund abhebt. Der sehr hohe Schwellenwert für BMP-2 (>32 Zyklen) lässt auf eine geringe Transkription in den Zellen schließen. Aufgrund der Streuung bei hoher Zykluszahl ist eine quantitative statistische Auswertung nicht möglich. Unter Beachtung der statistischen Begebenheit finden sich in distalen Tubulusepithelzellen höhere Konzentrationen an BMP-2 Transkripten als in proximalen Tubulusepithelzellen HK-2 und TK-173-Fibroblasten. In Fibroblasten der TK-188-Zelllinie, die ursprünglich aus fibrotischen Nieren isoliert wurden, konnten BMP-2 Transkripte nicht nachgewiesen werden. Dies deutet möglicherweise auf einen bereits eingetretenen Verlust des protektiven Faktors BMP-2 bei fibrotischen Nieren hin.

Obwohl höhere Transkripte von BMP-2 in distalen Tubulusepithelzellen nachgewiesen werden konnten, mussten für weitere Versuche die proximalen Tubuluszelllinie HK-2 verwendet werden. Distale Tubuluszellen sind primär isolierte Zellen und können nicht weiter kultiviert werden.

3.4.3. Transkription von BMP-2 *in vitro*

Für BMP-2 wurde ebenfalls ein Western Blot nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine aus den Fibroblasten TK-173 und proximalen Tubulusepithelzellen HK-2 durchgeführt. Trotz der in Kapitel 2.2.5 des Material und Methodenteils beschriebenen Modifizierungen und Optimierungen gelang ein Nachweis des BMP-2-Proteins nicht. Aufgrund der zahlreich durchgeführten Versuchsansätze mit diversen Variationen im Versuchsaufbau gehen wir von einer zu niedrigen Konzentration von BMP-2 Protein in den Zellen aus.

3.5. Regulation von BMP-2

3.5.1. Einfluss von Angiotensin-2 auf die BMP-2-Transkription *in vitro*

Da erstmalig nachgewiesen werden konnte, dass BMP-2 im Tubulointerstitium nephrosklerotischer Nieren vermindert transkribiert wird, wurde nach Stimulation mit Angiotensin-2, einem potenten Mediator in der Pathogenese der Nephrosklerose, die Transkription von BMP-2 untersucht. Es wurden die proximalen Tubulusepithelzellen HK-2 und Fibroblasten der TK-173-Zelllinie für 12 Stunden mit Angiotensin-2 inkubiert und eine *real-time PCR* durchgeführt. Die relative Transkription wurde im Vergleich zu unstimulierten Zellen als Kontrollgruppe bestimmt. Da in Fibroblasten der TK-188-Zelllinie, die ursprünglich aus fibrotisch veränderten humanen Nieren stammten, eine Transkription von BMP-2 nicht nachgewiesen werden konnte und vermutlich bereits ein Verlust des protektiven BMP-2 im späten Krankheitsstadium eingetreten ist, wurde auf Stimulationsversuche der TK-188-Fibroblasten mit Angiotensin-2 verzichtet. Interessanterweise zeigte sich wie schon bei BMP-5 in proximalen HK-2-Zellen ein unverändertes Transkriptionslevel von BMP-2.

Bei den Fibroblasten TK-173 konnte bei einer sehr hohen Konzentration von 10^{-3} M AT-2 eine signifikant erhöhte Transkription von BMP-2 festgestellt werden (1248%, \pm 451%, $p=0,0478$).

Abb.19: rtPCR auf BMP-2 nach 12-stündiger Stimulation von HK-2-Zellen mit Angiotensin-2 (Mittelwert, Standardabweichung)

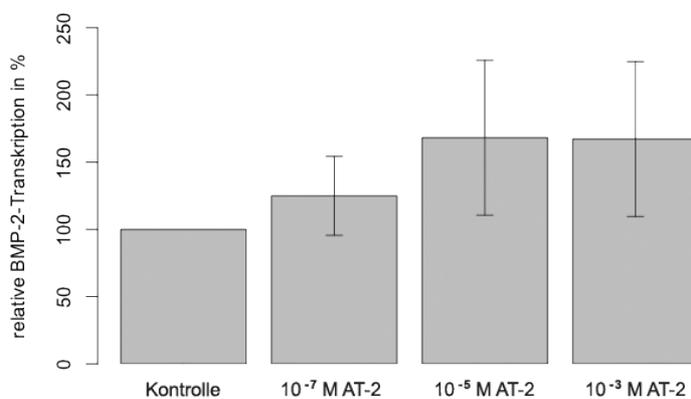
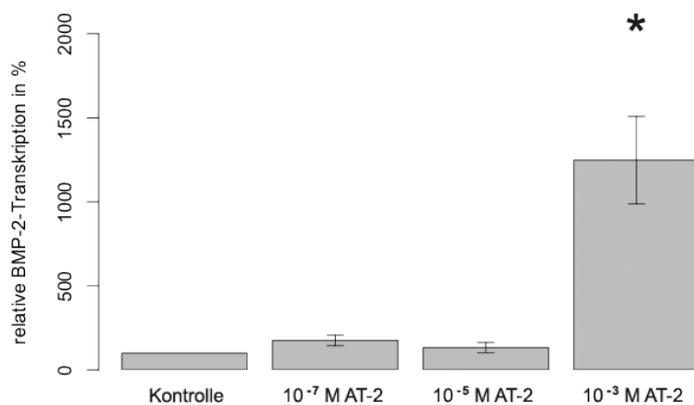


Abb.20: rtPCR auf BMP-2 nach 12-stündiger Stimulation von TK-173-Zellen mit Angiotensin-2 (Mittelwert, Standardabweichung, *=p<0,05)



3.5.2. Einfluss von BMP-5 und -7 auf die Transkription von BMP-2 *in vitro*

Neben BMP-7 als zentralem Protein in der Nephrogenese sowie in der Pathogenese der Nephrosklerose spielt BMP-5 ebenfalls in der Nephrogenese eine wichtige Rolle. Es weist starke Homologien zu BMP-7 auf und kann teilweise die Funktion von BMP-7 übernehmen (Oxburgh et al. 2005). Aufgrund dieser beschriebenen Eigenschaften der *Bone-Morphogenetic-Proteine* wurde der Einfluss von rekombinanten humanen BMP-5 und BMP-7 auf die Transkription von BMP-2 in distalen Tubulusepithelzellen HK-2 und den Fibroblasten der TK-173-Zelllinie untersucht. Es wurde eine relative Transkriptionsanalyse im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe mittels *real-time PCR* durchgeführt.

Entgegen aller bisherigen Beobachtungen konnte ein signifikanter Einfluss von rhBMP-5 und -7 auf die Transkription von BMP-2 in HK-2- und TK-173-Zellen nicht nachgewiesen werden.

Lediglich in der Stimulation von TK-173-Fibroblasten mit rhBMP-7 konnte eine leichte Steigerung von BMP-2 beobachtet werden. Aufgrund der hohen Standardabweichungen blieb eine Signifikanz dieses Ergebnisses aus.

Abb.21: rtPCR auf BMP-2 nach 12-stündiger Stimulation von HK-2-Zellen mit rhBMP-5 (Mittelwert, Standardabweichung)

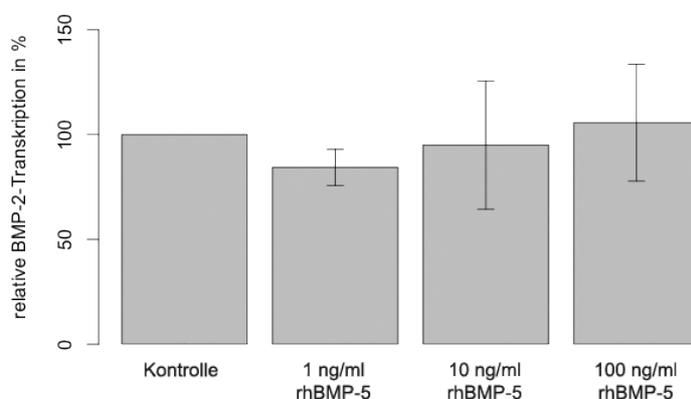


Abb.22: rtPCR auf BMP-2 nach 12-stündiger Stimulation von TK-173-Zellen mit rhBMP-5 (Mittelwert, Standardabweichung)

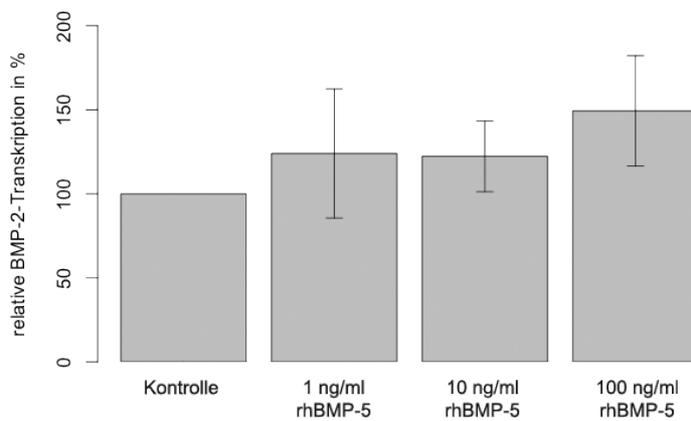
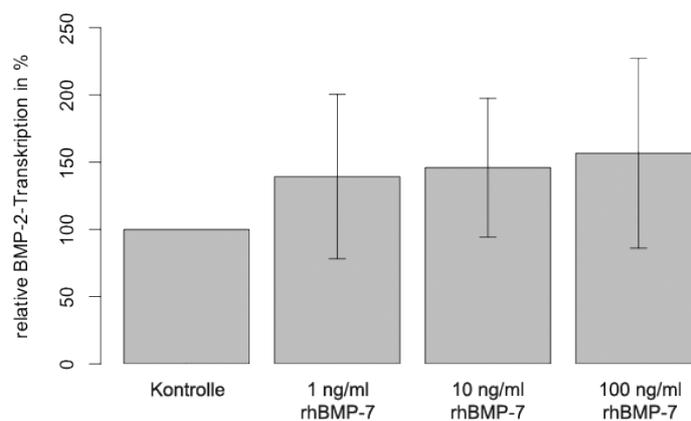


Abb.23: rtPCR auf BMP-2 nach 12-stündiger Stimulation von TK-173-Zellen mit rhBMP-7 (Mittelwert, Standardabweichung)



3.6. Funktion von BMP-2

3.6.1. Proliferativer Einfluss durch BMP-2 in vitro

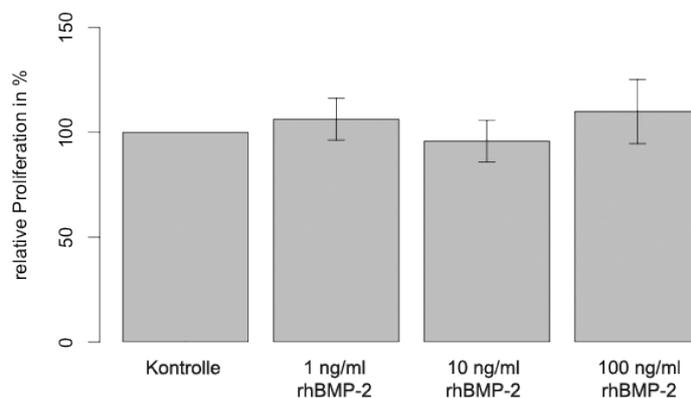
Unabhängig von der Grunderkrankung, kommt es im Rahmen der Nephrosklerose zu einer zunehmenden Fibrosierung der Niere. Als zentraler Mechanismus gilt die Proliferation der Fibroblasten. TGF- β als proliferativer Mediator spielt dabei eine wichtige Rolle. Der anti-proliferative Effekt von BMP-7, das zur TGF- β -Gruppe gehört, ist bereits beschrieben worden.

Über die Rolle von BMP-2 an regulatorischen Prozessen in der Niere ist bisher sehr wenig bekannt. Yang und Mitarbeiter konnten eine Interaktion von BMP-2 mit der Signalkaskade von TGF- β 1 zeigen und daraus resultierende abmildernden Effekte auf die TGF- β 1-induzierte zelluläre Fibrose nachweisen (Yang YL et al. 2009).

Der Einfluss von BMP-2 auf die Proliferation von Fibroblasten der TK-173-Zelllinie wurde mittels Proliferationsassay untersucht. Es erfolgte die Stimulation der Zellen für 12 Stunden mit rekombinatem humanen BMP-2.

Jedoch zeigten sich trotz vorausgegangener Überlegungen keine signifikante Änderung in der Proliferationsrate der TK-173 Fibroblasten nach Stimulation mit rhBMP-2.

Abb.24: Proliferationsassay nach 12-stündiger Stimulation von TK-173-Zellen mit rhBMP-2 (Mittelwert, Standardabweichung)



4. Diskussion

Bone-Morphogenetic-Proteine sind morphogene Wachstumsfaktoren, die zur TGF- β -Superfamilie gehören und wesentlich an einer Vielzahl von biologischen Prozessen während der Embryogenese sowie im adulten Organismus beteiligt sind. BMP-7 ist ein Vertreter dieser Gruppe, das eine zentrale Rolle in der Nephrogenese einnimmt und im adulten Organismus nephroprotektive Eigenschaften besitzt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei weitere Mitglieder der BMP-Familie untersucht: das mit BMP-7 eng verwandte BMP-5 sowie BMP-2. Es wurde die *in-vivo* Transkription von BMP-5 und BMP-2 in der adulten humanen gesunden Niere sowie bei der hypertensiven Nephrosklerose bestimmt. Die Funktion und Regulation beider Proteine wurde *in vitro* in humanen proximalen Tubulusepithelzellen und in humanen Fibroblasten aus gesunden (TK-173)- und fibrotischen Nieren (TK-188) untersucht. Die Rolle dieser potenten Wachstumsfaktoren aus der TGF- β -Familie in der Niere ist noch unbekannt.

4.1. Methodik

Für die Untersuchung der Fragestellungen wurden unter anderem die *real-time PCR* und der Western Blot gewählt. Jedoch gestaltete sich die Etablierung dieser Verfahren für die jeweiligen Versuche schwierig, da BMP-2 und BMP-5 in der adulten humanen Nieren sowie in Zellkulturen nur in geringen Mengen transkribiert bzw. exprimiert werden.

Bei der *real-time PCR* wurden zur Bestimmung der optimalsten Bedingungen, Verdünnungsreihen von Konzentrationen an cDNA und Primern durchgeführt. Ebenfalls wurden verschiedene Temperaturprotokolle und die Anzahl der Replikationszyklen getestet. Beispielsweise führte eine Erhöhung der Replikationszyklen zu einer Akkumulation von unspezifischen Produkten, die einen negativen Effekt auf die Effizienz der Amplifikation ausübten.

Aufgrund der niedrigen Transkriptionsrate der *Bone-Morphogenetic-Proteine* zeigte sich ein sehr hoher Schwellenwert für BMP-2 und BMP-5 (> 32 bzw. 30 Zyklen). Der Schwellenwert (auch Ct-Wert genannt) beschreibt die Zykluszahl bei der sich die Fluoreszenz vom Hintergrundsignal abhebt. Ein weiteres Problem in diesem Zusammenhang stellt der interne Standard (*housekeeping gene*) dar. Dieses soll Konzentrationsunterschiede zwischen den Proben ausgleichen. Das sonst üblicherweise verwendete *housekeeping gene* GAPDH besitzt einen niedrigen Schwellenwert (zwischen 14 und 15 Zyklen). Dadurch ist die Differenz zu den Schwellenwerten der *Bone-Morphogenetic-Proteine-2* und *-5* sehr hoch. Diese hohe Differenz führt zu Ungenauigkeiten in der Quantifizierung mit schwankenden Werten. Letztendlich resultieren daraus für die Zellkulturuntersuchungen ungewöhnlich hohe Standardabweichungen mit Schwierigkeiten in der statistischen Auswertung.

Dieser Effekt wurde durch die Bestimmung eines geeigneteren *housekeeping gene* vermindert (Radonic et al. 2004, Bustin 2000). Von den getesteten *housekeeping genes* war die Peptidylprolyl-Isomerase A (PPIA) das Gen, das unter allen Versuchsbedingungen am stabilsten exprimiert wurde und dem Schwellenwert von BMP-2 und BMP-5 am nächsten kam (zwischen 21 und 22 Zyklen), wenn auch noch geringere Differenzen zwischen den Schwellenwerten wünschenswert gewesen wären. Aufgrund der sehr niedrigen Transkriptionsraten von BMP-2 und -5 blieb die Standardabweichung für die Versuche mit Zellkulturen trotz dieser methodischen Optimierung zum Teil weiterhin erhöht. Bei geringeren Standardabweichung hätten Ergebnisse, die sich lediglich als Tendenzen darstellten, zu einer statistischen Signifikanz geführt.

Die sehr niedrigen Konzentrationen von BMP-2 und BMP-5 in der Niere zeigten sich auch auf der Proteinebene wieder. Der Nachweis der Expression von BMP-2 und BMP-5 im Western Blot blieb trotz zahlreicher Modifizierungen des Protokolls aus. Hierbei wurden Verdünnungsreihen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Proteinen, Primärantikörpern, Sekundärantikörpern, Puffern und Lösungen sowie Inkubationszeiten und Temperaturen getestet. Ebenfalls wurden Antikörper verschiedener Hersteller benutzt. Die Kontrolle mit β -Aktin fiel jeweils positiv aus, sodass von einer korrekten Anwendung des Western Blots ausgegangen werden kann.

4.2. Die Bedeutung von BMP-5 in der hypertensiven Nephrosklerose

Das mit BMP-7 eng verwandte BMP-5 zählt zur gleichen Subgruppe der *Bone-Morphogenetic-Proteine* innerhalb der TGF- β -Superfamilie. BMP-7 ist als Morphogen zentral an der Nephrogenese beteiligt (Ducy und Karsenty 2000, Hogan 1996b, Kazama et al. 2008). In zahlreichen Studien wurden nephroprotektive Eigenschaften von BMP-7 und das Entgegenwirken der TGF- β 1-induzierten Prozesse beschrieben (Zeisberg et al. 2003, Vukicevic et al. 1998, Bechtel und Zeisberg 2009).

Neben der nachgewiesenen Beteiligung von BMP-5 an der Nephrogenese konnte ebenfalls dessen wichtige Rolle in der Entwicklung des Skeletts nachgewiesen werden. *BMP-5-knock-out-Mäuse* zeigten neben Hydronephrosen phänotypisch ein *short-ear-Syndrom* sowie zahlreiche skelettale Deformierungen (Ducy und Karsenty 2000).

BMP-5 kann bei Fehlen von BMP-7 dessen Funktion teilweise übernehmen (King et al. 1994, Oxburgh 2005). Beispielsweise induziert BMP-7 in der Entwicklung von bestimmten Arealen des zentralen Nervensystems die Differenzierung neuronaler Zellen. Bei *BMP-7-knock-out-Mäusen* wurde die Differenzierung der neuronalen Zellen von BMP-5 übernommen und diese ZNS-Areale wiesen keine Unterschiede im Vergleich zu gesunden Mäusen auf (Tillemann et al. 2010). Da BMP-7 nephroprotektive Eigenschaften besitzt, können diese für BMP-5 in der Niere ebenfalls vermutet werden.

4.2.1. BMP-5 wird in der humanen adulten Niere transkribiert

In dieser Arbeit konnte erstmalig die Transkription von BMP-5 in der humanen adulten Niere nachgewiesen werden. Insgesamt wurde eine niedrige Rate an BMP-5-Transkripten in der Niere detektiert. Dabei fand die Transkription von BMP-5 vornehmlich im Tubulointerstitium statt, während sich nur eine sehr geringe Transkriptionsrate in den Glomeruli fand.

Von dieser Arbeit unabhängig konnte die Arbeitsgruppe von Bramlage in weiteren Untersuchungen die Expression von BMP-5 auf Proteinebene immunhistochemisch bestätigen (Bramlage et al. 2011). Es zeigte sich eine Expression im Tubulointerstitium, jedoch wurde in den Glomeruli keine BMP-5-Expression nachgewiesen (Tampe 2011). Ursächlich könnte eine sehr niedrige Expression von BMP-5 als Protein im Glomerulum sein. Die in dieser Arbeit nachgewiesene sehr niedrige Rate von BMP-5-mRNA glomerulär lässt dies zumindest vermuten.

Die Zusammenschau dieser Ergebnisse lässt ein vergleichbares Expressionsmuster von BMP-5 und BMP-7 in der adulten Niere erkennen (Bramlage et al. 2010). Es finden sich ebenfalls BMP-7-Transkripte vornehmlich im Tubulointerstitium, insbesondere in Tubulusepithelzellen. Da BMP-7 seine nephroprotektiven Effekte vor allem auf das Tubulusepithel ausübt (Motazed et al. 2008) und das eng verwandte BMP-5 ein ähnliches Expressionsmuster aufweist, wurde in verschiedenen Zellkulturen untersucht, ob diese BMP-5 transkribieren.

4.2.2. BMP-5 wird in humanen renalen Zelllinien transkribiert

BMP-5 Transkripte konnten in Fibroblasten aus gesunden (TK-173-Zelllinie) und fibrotisch veränderten Nieren (TK-188-Zelllinie) nachgewiesen werden.

Zudem liess sich ein Nachweis von BMP-5-mRNA in distalen und proximalen Tubulusepithelzellen erbringen. Auch wenn aufgrund der hohen Standardabweichungen eine statistische Auswertung nicht sinnvoll erschien, zeigte sich tendenziell eine erhöhte Transkription von BMP-5 in den distalen verglichen mit proximalen Zellen. Das Vorhandensein von BMP-5 in Fibroblasten und Tubulusepithelzellen wurde bisher noch nicht beschrieben.

Kitten und Mitarbeitern gelang der Nachweis von BMP-Rezeptoren in proximalen Tubulusepithelzellen HK-2 und somit die Beeinflussbarkeit dieser Zellen durch BMP. Die Arbeitsgruppe von Simone konnte dieses Ergebnis bestätigen. (Kitten et al. 1999, Simone et al. 2012).

Neben dem Nachweis von BMP-5-mRNA in humanen Fibroblasten und Tubuluszellen, beschreibt die Arbeitsgruppe von Patschan und Mitarbeitern eine Transkription auch in *early endothelial outgrowth cells* (eEOC) der Maus. Diese stellen eine Subpopulation von endothelialen Vorläuferzellen dar, die in Mäusen bei der frühen Phase des akuten Nierenversagens eine gewisse protektive Rolle spielen (Patschan et al. 2013, Patschan et al. 2006). Weitere Nachweise von BMP-5-Expression in Zellkulturen der Niere liegen nicht vor.

Neben dem Nachweis einer BMP-5-Expression in der Niere und in renalen Zellen sind in weiteren Geweben und Zellen BMP-5-Expressionen beschrieben worden. Am Modell der *BMP-5-knock-out-Mäuse* konnten dargestellt werden, dass BMP-5 in vielen Organen an der Embryogenese beteiligt ist.

So zeigten diese Mäuse neben skelettalen Deformierungen Abnormalitäten des Weichteilgewebes in unterschiedlicher Ausprägung. Betroffen waren neben der Niere und den Ohren, die phänotypisch zu *short-ear-Mäusen* führen, auch das Parenchym von Herz, Lunge und Leber sowie Uterus und Blase (King et al. 1994).

Im adulten Organismus konnten mRNA-Transkripte von BMP-5 in Geweben und Zellen detektiert werden, die im Expressionsmuster die Beteiligung von BMP-5 in der Embryogenese widerspiegeln.

Beispielsweise konnte in Gewebe des adulten Ohrs und Innenohrs BMP-5 nachgewiesen werden (Csomor et al. 2012). Auch in Knorpelgewebe ließ sich eine Expression von BMP-5 nachweisen (Bramlage et al. 2006, Teng et al. 2011). In Fibroblasten der menschlichen Haut, Sklera und Mamma wurden ebenfalls BMP-5-Expressionen beschrieben (Kangsamaksin und Morris 2011, Wang et al. 2011, Romagnoli et al. 2012).

4.2.3. BMP-5 wird bei der hypertensiven Nephrosklerose vermindert transkribiert

Diese Arbeit konnte eine signifikante Reduktion von BMP-5 im Tubulointerstitium des nephrosklerotischen Nierengewebes im Vergleich zur gesunden Niere nachweisen. Auch in diesem Punkt zeigt sich eine Vergleichbarkeit zu BMP-7, das ebenfalls im Tubulointerstitium der humanen nephrosklerotischen Niere vermindert exprimiert wird (Bramlage et al. 2010). Aufgrund der anti-inflammatorischen und anti-fibrotischen Wirkung von BMP-7 kann die verminderte Expression in der geschädigten Niere einen Verlust dieses protektiven Faktors darstellen und möglicherweise zu einer weiteren Progredienz der Erkrankung beitragen (Sugimoto et al. 2007, Vukicevic et al. 1998, Zeisberg et al. 2003, Zeisberg und Kalluri 2004, Bramlage et al. 2010).

Entsprechend zur verminderten Transkription von BMP-5 im Tubulointerstitium der nephrosklerotischen Niere liess sich bei zahlreichen Erkrankungen ebenfalls eine verminderte Transkription von BMP-5 feststellen. So wurden in Synovialgewebe von Patienten mit Osteoarthritis und rheumatoider Arthritis erniedrigte BMP-5-Transkripte im Vergleich zu Gesunden festgestellt (Bramlage et al. 2006).

Bei einer Form der Myopie wurde in der humanen Sklera ebenfalls eine verminderte Zahl an BMP-5-mRNA detektiert (Wang et al. 2011). In Hautgewebe führt die verminderte BMP-5-Transkription zu einer verminderten Anzahl von Keratinozyten und es bestand ein zweifach erhöhtes Risiko für Hauttumore (Kangsamaksin und Morris 2011).

Die Arbeitsgruppe von Romagnoli berichtet über eine Assoziation von niedriger BMP-5-Expressionsrate und niedrigen erkrankungsfreien Intervallen bei Brustkrebs-Patientinnen, die mit einer verminderten Überlebensrate einhergingen (Romagnoli et al. 2012). In der Karzinogenese wird jedoch über unterschiedliche Expressionsmuster von BMP-5 berichtet. Größtenteils wurden verminderte BMP-Expressionen in Tumorgewebe beschrieben (Johnsen et al. 2009, Virtanen et al. 2011, Romagnoli et al. 2012). Es wurde aber vereinzelt auch über höhere Transkriptionsraten von BMP-5 in Tumoren berichtet, beispielsweise in Präkanzerosen und malignen Läsionen des oralen Epithels sowie in großzelligen Knochenkarzinomen (Jin et al. 2001, Kudo et al. 2009). Wahrscheinlich wird BMP-5 in Abhängigkeit von Gewebetyp und Differenzierungsstadium unterschiedlich exprimiert.

Die meisten Daten zeigen eine verminderte Expression von BMP-5 in erkranktem Gewebe und lassen vermuten, dass dies durch den Verlust von BMP-5 als protektiven Faktor bedingt ist.

4.3. Regulation von BMP-5

4.3.1. Angiotensin-2 induziert erhöhte Transkription von BMP-5 in TK-173-Fibroblasten

Unabhängig von der initialen Schädigungsursache sind tubulointerstitielle Veränderungen wesentlich an der Progression der renalen Dysfunktion beteiligt. Diese Veränderungen münden in das pathologische Bild der Schrumpfnieren bei Nierenfibrose (Bohle et al. 1996, Eddy 2000). Wesentlich an der Schädigung beteiligt sind Tubulusepithelzellen sowie Fibroblasten. Induziert wird dieser inflammatorische und pro-fibrotische Effekt durch die Ausschüttung einer Vielzahl von Chemo- und Zytokinen, die eine Migration neutrophiler Granulozyten, eine Endozytose des geschädigten Gewebes und apoptotische Prozesse zur Folge haben (Ruiz-Ortega et al. 2006, Sironi et al. 2005).

Als einer der Stimulatoren für die Ausschüttung der Zytokine gilt Angiotensin, ein Mitglied des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Interessanterweise konnte in proximalen Tubulusepithelzellen aber keine signifikante Änderung der BMP-5-Transkription nach Stimulation mit Angiotensin-2 beobachtet werden. Die Transkription von BMP-5 scheint in proximalen Tubulusepithelzellen daher unabhängig von Angiotensin-2 zu sein.

Andere und sehr interessante Ergebnisse zeigten sich bezüglich der BMP-5 Transkription in Fibroblasten. Die Stimulation mit Angiotensin-2 in Fibroblasten, isoliert aus ursprünglich gesunden Nieren (TK-173-Zelllinie) führte zu einer vermehrten Transkription von BMP-5. Die Angiotensin-2-Stimulation von Fibroblasten, gewonnen aus fibrotischen Nieren (TK-188-Zelllinie), führte hingegen zu einer weiteren Abnahme der BMP-5-mRNA-Spiegels.

Die unterschiedlichen Expressionslevel von BMP-5 in verschiedenen Krankheitsstadien könnten die jeweilige Regenerationsfähigkeit der Niere darstellen. Im frühen, gesunden Stadium könnten

potentiell nephroprotektive Faktoren exprimiert werden, diese regenerative Kapazität aber im weiteren Krankheitsverlauf verloren gehen.

Ähnlich zur Expression von BMP-5 in verschiedenen Krankheitsstadien sind für BMP-7 höhere Transkriptionsraten in proximalen Tubulusepithelzellen von Patienten mit beginnender Niereninsuffizienz und Proteinurie beschrieben. Patienten mit fortgeschrittener diabetischer Nephropathie zeigen eine verminderte Expression von BMP-7 in der Niere (Wang et al. 2001). Diese Beobachtungen lassen eine Induktion von körpereigenen Schutz- und Reparaturmechanismen in der Frühphase der Nierenschädigung vermuten, die im weiteren Krankheitsverlauf verloren gehen könnten.

4.3.2. BMP-7 besitzt keinen Einfluss auf die Transkription von BMP-5 in renalen Zelllinien

Die Familie der *Bone-Morphogenic-Proteine* umfasst eine Vielzahl an Proteinen, die essentiell in der Embryogenese und in pathologischen Prozessen sind (Kim und Choe 2011, Lissenberg-Thunnissen et al. 2011, Morrell 2010, Sage et al. 2010). Aus diesen Beobachtungen geht auch hervor, dass BMPs sich untereinander stark beeinflussen können. Besonders beschrieben wurde dieses in Chondrozyten, in denen BMP-7 die Transkription anderer BMPs erhöhte. Es liegen keine Daten zu induktiven Effekten auf weitere Mitglieder der BMP-Familie durch das nephroprotektive BMP-7 in der adulten Niere vor.

Um zu überprüfen, ob eine solche Interaktion auch in der Niere besteht, wurde die BMP-5-Transkription in Tubuluszellen und Fibroblasten nach Stimulation mit rekombinantem humanen BMP-7 untersucht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit nach Stimulation mit rhBMP-7 zeigen in den Zellkulturen von proximalen Tubulusepithelzellen HK-2 sowie den Fibroblasten TK-173 und TK-188 keine Änderung in der Transkription von BMP-5. Damit scheint BMP-7 seine anti-fibrotischen Effekte nicht über einen Regelkreis mit BMP-5 in renalen Zellen zu vermitteln.

4.4. Funktion von BMP-5

4.4.1. BMP-5 antagonisiert TGF- β 1- und TNF- α -induzierte Effekte

Das initiale Stadium der Nierenfibrose ist die Induktionsphase. Sie ist gekennzeichnet durch eine erhöhte Migration von inflammatorischen Zellen. Vor allem Makrophagen und Leukozyten migrieren in das Interstitium und schütten zahlreiche Zytokine aus, die zu einer Persistenz der Inflammationsreaktion und im weiteren Krankheitsverlauf zur Nierenfibrose führen (Kuncio et al. 1991, Kelly 1999, Kondo et al. 2001)

Insbesondere Zytokine wie TGF- β 1 und TNF- α sind potente Zytokine der Induktionsphase und bewirken eine Migration von Entzündungszellen ins Interstitium (Muller et al. 1992, Sean Eardley und Cockwell 2005). Es besteht eine Korrelation zwischen der Makrophageninfiltration und dem Ausmaß der Nierenfibrose (Nishida und Hamaoka 2008).

Aus weiteren Arbeiten dieser Arbeitsgruppe ist bekannt, dass TGF- β 1 und TNF- α in der hypertensiven Nephrosklerose deutlich vermehrt exprimiert werden und somit inflammatorische und pro-fibrotische Faktoren im Vergleich zur Normalniere erhöht sind (Tampe 2011). Auch Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen zeigen vermehrt inflammatorische Proteine im Plasma, neben C-reaktiven Protein und den Interleukinen auch TNF- α (Lee und Kalluri 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden in einem Makrophagen-Migrationsassay die Auswirkungen von rhTGF- β 1, rhTNF- α und rhBMP-5 auf die Migration der Zellen untersucht.

Nach Stimulation mit rhTGF- β 1 zeigte sich das zu erwartende Ergebnis einer signifikanten Migration der Makrophagen. Bei der Ko-Stimulation der Makrophagen mit rhTGF- β 1 und rhBMP-5 wurde eine verminderte Migrationsrate im Vergleich zur Stimulation mit rhTGF- β 1 alleine beobachtet.

BMP-5 konnte somit den TGF- β 1-induzierten migratorischen Effekt der Makrophagen reduzieren. Das Ergebnis der ebenfalls durchgeführten Ko-Stimulation mit rhTGF- β 1 und rhBMP-7 zeigte eine signifikante Reduktion der rhTGF- β 1-induzierten Migrationsrate von Makrophagen durch rhBMP-7.

Dieses Ergebnis stimmt mit den bisher beschriebenen anti-fibrotischen Effekten von BMP-7 überein. In Tiermodellen und in Zellkulturen konnte eine Antagonisierung der TGF- β 1-induzierten Effekte durch BMP-7 beschrieben werden. (Bramlage et al. 2010, Zeisberg 2006, Bechtel und Zeisberg 2009). In weiterführenden Arbeiten dieser Arbeitsgruppe ließen sich in proximalen Tubulusepithelzellen HK-2 ebenfalls eine Antagonisierung der TGF- β 1-induzierten Veränderungen durch BMP-5 beobachten (Tampe 2011).

Ähnlich zu der TGF- β 1-induzierten Migration von Makrophagen zeigte sich nach Stimulation mit rhTNF- α ebenfalls eine hohe Migrationsrate der Makrophagen. In Ko-Stimulation mit rhBMP-5 war diese rhTNF- α -induzierte Migration deutlich vermindert. BMP-5 antagonisiert die TNF- α -vermittelte Migration von Makrophagen.

In weiterführende Arbeiten dieser Arbeitsgruppe konnte in proximalen Tubulusepithelzellen HK-2 eine Minderung der TNF- α -induzierten Apoptose durch BMP-5 gezeigt werden. TNF- α -neutralisierende Effekte sind ebenfalls für das eng verwandte BMP-7 in proximalen Tubulusepithelzellen nachgewiesen worden (Tampe 2011).

Die Induktion inflammatorischer Prozesse könnte durch BMP-5 vermindert werden und einen therapeutischen Ansatz in der Frühphase der hypertensiven Nephrosklerose bieten. Intensive weiterführende Studien *in vivo* müssten folgen.

4.4.2. BMP-5 übt keinen Einfluss auf die Mitoserate von TK-173-Fibroblasten aus

Die Proliferation von Fibroblasten, die vor allem durch TGF- β 1 induziert wird, scheint ein weiterer wichtiger Mechanismus in der Progredienz der Nephrosklerose zu sein. Unklar ist die Bedeutung von BMP-5 bei der Proliferation von Fibroblasten. In dieser Arbeit fand sich kein Effekt nach Zugabe von rekombinantem humanen BMP-5 auf die Proliferation renaler Fibroblasten der TK-173-Zelllinie.

Im Gegensatz hierzu konnte sehr wohl eine erhöhte Migrationsrate von *early endothelial outgrowth cells* (eEOC), einer Subpopulation von Progenitorzellen in der Niere durch BMP-5 beobachtet werden (Patschan et al. 2013). Zudem konnte in diesen Zellen bei Stimulation von BMP-5 auch eine verminderte Zellapoptose sowie -nekrose gesehen werden.

Beeindruckend sind in diesem Zusammenhang die Beobachtungen im Mausmodell, die auch unsere Ergebnisse erklären dürften. Während im Maus-Modell des akuten Nierenversagens eEOC, die mit BMP-5 behandelt wurden, die renale Funktion verbessert werden konnten und die Proteinurie vermindert wurde, zeigten sich im Modell des chronischen Nierenversagens bei 5/6 -nephrektomierten Mäusen nach Zugabe von eEOC eine Steigerung der Proteinurie und der renalen Fibrose. Mäuse mit chronischer Niereninsuffizienz, denen eEOC zugeführt wurden, die nicht mit BMP-5 behandelt wurden, zeigten eine verminderte Proteinurie und eine Reduktion der renalen Fibrose (Patschan et al. 2013). So scheint BMP-5 in Abhängigkeit vom Zelltyp und dem Erkrankungsstadium seine protektive Funktion auszuüben. Auf die hypertensive Nephrosklerose bezogen, könnte dieses die oben genannte Hypothese bestätigen, dass BMP-5 in der Frühphase einen regenerativen Einfluss ausübt, während dieser in der Spätphase nicht mehr gelingt.

4.4.3. Einfluss von BMP-5 auf die Migration und Proliferation

Daten zur Funktion von BMP-5 liegen speziell für die Niere nicht vor. Die vorhandenen Daten stammen vornehmlich aus dem Skelettsystem, der Neurologie, der Haut sowie der Karzinogenese. Hierbei sind die beschriebenen Funktionen durch BMP-5 bezüglich der Migration und Proliferation uneinheitlich und teilweise konträr.

Anabole Eigenschaften durch BMP-5 wurden in der Neurologie, Dermatologie und im Skelettsystem beschrieben. So stimuliert BMP-5 in zentralen und peripheren Neuronen dendritisches Wachstum (Beck et al. 2001). In epidermalen Zellkulturen wird nach Zugabe von rekombinantem BMP-5 eine Zunahme an Zahl und Größe von Stammzellen beobachtet (Kangsamaksin und Morris 2011), und die regenerative Kapazität dieser Gewebe scheint gesteigert zu werden. In Knorpelgewebe scheint BMP-5 ein wichtiger Regulator der Chondrozytenproliferation und Differenzierung zu sein. So induziert BMP-5 die Zellproliferation und

Knorpelmatrixsynthese (Snelling et al. 2010, Mailhot et al. 2008). Patienten mit chronisch-degenerativen Gelenkserkrankungen wie Osteoarthritis und rheumatoide Arthritis, zeigen eine verminderte BMP-5-Expression im Synovialgewebe. Damit könnte ein Verlust an regenerativen Fähigkeiten in diesem Gewebe verbunden sein (Bramlage et al. 2006). Unterstützt wird die Annahme durch Daten der Arbeitsgruppe von Teng. Die Ausschaltung der intakten Signalkaskade von BMP-5 (*Smad 4-knock-out-Mäuse*) führte zu einer defekten Chondrozytenreifung und Knorpelproduktion (Teng et al. 2011).

Eine verminderte Proliferations- und Mitoserate durch BMP-5 wird vor allem in der Onkologie beschrieben. Neben einer erniedrigten Expression von BMP-5 in Nebennierenkarzinomen zeigte die Arbeitsgruppe von Johnsen, dass die Stimulation der Nebennierenkarzinomzellen mit BMP-5 zu einer verminderten Proliferations- und Mitoserate der Krebszellen führte und dass die Steroidgenese von adrenokortikalen Tumorzellen *in vitro* vermindert werden konnte (Johnsen et al. 2009).

Die vollständige Funktion von BMP-5 im adulten Organismus bleibt unverstanden.

In der Niere übt BMP-5 vermutlich in der Frühphase einen protektiven Einfluss aus. Es wirkt der TGF- β 1- und TNF- α - induzierten Migration von Makrophagen entgegen. In der späten Phase der Nierenveränderung scheint es keinen wesentlichen Einfluss mehr zu haben.

4.5. Expression von BMP-2

Ein weiteres Mitglied der TGF- β -Superfamilie ist das *Bone-Morphogenetic-Protein-2* (BMP-2). Dieses Protein scheint in der Embryogenese unabdingbar zu sein. So versterben BMP-2-defiziente Mäuse aufgrund von kardialen Defekten früh in der Embryonalphase intrauterin. Eine weitere Beteiligung von BMP-2 in der Embryogenese konnte aufgrund der frühen Letalität nicht beobachtet werden (Cain et al. 2008, Ducky und Karsenty 2000). In zahlreichen Studien konnte die zentrale Rolle von BMP-2 in der Differenzierung von embryonalen Stammzellen zu Knorpel-, Osteoblasten und Adipozyten-Zelllinien gezeigt werden (Varga und Wrana 2005, zur Nieden et al. 2005, Watabe und Miyazono 2009). Ebenfalls reguliert BMP-2 die Stammzellproliferation zur osteogenen Linie im adulten Organismus (Hogan 1996a, Li et al. 2003).

Aufgrund der Fähigkeit von BMP-2, als einzelnes Protein die ganze Kaskade der Knorpel- und Knochenformation *in vivo* zu aktivieren, wurden die osteoinduktiven Effekte von BMP-2 in zahlreichen Studien untersucht und beschrieben. Dabei induziert BMP-2 eine Vielzahl an Prozessen, die zur Proliferation, Differenzierung und Migration von mesenchymalen Stammzellen führen und somit zur Knochenheilung im Adulten. Dies führte schließlich zur klinischen Zulassung von rekombinantem BMP-2 in der Therapie der Pseudarthrosen langer Röhrenknochen.

Ein wichtiger Prozess dabei ist die Vaskularisation (Gerber et al. 1999, Carano und Filvaroff 2003). So geht die Bildung von neuen Gefäßen der Ausbildung knöcherner Strukturen voraus und ist in allen Stadien der Knochenheilung essentiell zur Gewebereparatur und Homöostase (Maes et al. 2006, Street et al. 2002, Fang et al. 2005).

4.5.1. BMP-2 wird in der humanen adulten Niere transkribiert

Da BMP-2 in der Embryogenese eine zentrale Rolle spielt und die Fähigkeit besitzt, zahlreiche Zellen zur Differenzierung, Proliferation und Migration zu aktivieren, wäre im Rahmen von Gewebereparaturen bei Nierenschädigungen eine Rolle von BMP-2 denkbar. *Bone-Morphogenetic-Proteine* werden in der adulten Niere exprimiert. Für BMP-7 ist ein regeneratives Potential vornehmlich auf proximale Tubulusepithelzellen der Niere beschrieben. Die Rolle von BMP-2 in der adulten Niere ist bisher kaum untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals die Transkription von BMP-2 in der humanen adulten Niere nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich die Transkriptionsrate von BMP-2 insgesamt sehr niedrig und tubulointerstitiell höher als glomerulär. Die Arbeitsgruppe von Simone konnte in der Immunfluoreszenz der adulten humanen Niere ein weit gestreutes Expressionsmuster von BMP-2 nachweisen und bestätigen, dass BMP-2 tubulär und glomerulär exprimiert wird (Simone et al. 2012).

4.5.2. BMP-2 wird in humanen renalen Zelllinien transkribiert

Die Transkription von BMP-2 wurde in verschiedenen humanen Zelllinien der Niere untersucht. Das Ergebnis war der Nachweis einer Transkription von BMP-2 in distalen und proximalen Tubulusepithelzellen sowie Fibroblasten der Zelllinie TK-173.

Fibroblasten der TK-188-Zelllinie, die ursprünglich aus fibrotischen Nieren stammen, transkribieren kein BMP-2. Der Verlust von BMP-2 als protektiven Faktor im fortgeschrittenen Krankheitsstadium könnte eine Ursache dafür sein.

Die BMP-2-Expression in der Niere wird durch verschiedene Arbeiten bestätigt. Simone und Mitarbeiter beschreiben diese in adulten renalen Progenitorzellen. Adulte Progenitorzellen entsprechen mesenchymalen Vorläuferzellen, die aus der Bowmanschen Kapsel in humanem Gewebe isoliert wurden (Simone et al. 2012, Sagrinati et al. 2006, Dekel et al. 2006).

Piscione gelang der Nachweis einer BMP-2-Expression in Zellen des Sammelrohres von Mäusen, Gambaro in Zellen der Henle'schen Schleife, Yang konnte in renalen Fibroblasten von Ratten BMP-2 detektieren und Pache gelang der Nachweis einer BMP-2-Expression in murinen Podozyten (Piscione et al. 2001, Gambaro et al. 2004, Yang S et al. 2009, Pache et al. 2006).

Iwasaki beschrieb neben der Expression von BMP-2 in epithelialen Zellen der Niere auch eine Expression von BMP-2 in Osteoblasten, hämatopoetischen Zellen, vaskulären Endothelzellen, Fibroblasten, Keratinozyten sowie in zahlreichen weiteren Geweben wie Lunge, Muskel, Leber, Magen, Kolon, Prostata und neuronalem Gewebe (Iwasaki et al. 1995). Weitere Gewebe wie Herz, Pankreas, Sklera und Ovar exprimieren ebenfalls BMP-2 (Schultheiss et al. 1997, Kleef et al. 1999, Wang et al. 2011, Soda et al. 1998).

Zusammenfassend lässt sich ein ubiquitäres Verteilungsmuster von BMP-2 im Organismus feststellen und eine essentielle Rolle von BMP-2 in der Embryogenese und im Adulten vermuten.

4.5.3. BMP-2 wird bei der hypertensiven Nephrosklerose vermindert transkribiert

Die Expression von BMP-2 bei renalen Erkrankungen ist bisher kaum untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Vergleich von nephrosklerotischem und gesundem Gewebe hinsichtlich der BMP-2-Transkription durchgeführt.

Es zeigte sich eine verminderte Transkription von BMP-2 tubulointerstitiell bei nephrosklerotisch verändertem Gewebe im Vergleich zum Gesunden. Glomerulär ließ sich kein signifikanter Unterschied bei niedriger Transkriptrate feststellen. BMP-2 zeigt ein ähnliches Verteilungsmuster zu BMP-5 und BMP-7 (Bramlage et al. 2010).

Vergleichbare Daten für BMP-2 bei renalen Erkrankungen liegen bisher kaum vor. So berichtet die Arbeitsgruppe von Simone et al., dass im Modell des akuten Nierenversagens in humanen adulten renalen Progenitorzellen eine erhöhte Expression von BMP-2 im Vergleich zum

Gesunden festgestellt werden konnte (Simone et al. 2012). Somit könnte BMP-2 in der frühen Phase der Nierenschädigung an Reparaturmechanismen der Niere beteiligt sein. Salama konnte bei Patienten mit Harnwegsentzündungen und Patienten mit Nierensteinen im Serum der erkrankten Patienten eine erhöhte Konzentration von BMP-2 feststellen (Salama et al. 2012). Der zugrundeliegende Mechanismus ist nicht bekannt.

Weitere Daten über BMP-2 bei chronischen Nierenerkrankungen liegen nicht vor.

Die Minderung von BMP-2 in nephrosklerotischen Nieren lassen einen Verlust des in der Embryonalphase essentiellen Proteins vermuten.

4.6. Regulation von BMP-2

4.6.1. Einfluss des RAAS auf die Transkription von BMP-2 *in vitro*

Die Aktivierung des RAAS und Ausschüttung von Angiotensin-2 wird als wichtiger Mechanismus in der Entstehung der tubulointerstitiellen Fibrose gesehen. Die Folgen sind eine Migration von inflammatorischen Zellen und eine Sekretion von pro-fibrotischen Zytokinen (Ruiz-Ortega et al. 2006, Sironi et al. 2005, Burns et al. 2010). Dabei spielen Fibroblasten eine zentrale Rolle in der Produktion der ECM und Progression der Nierenfibrose. Eine Stimulation von BMP-2 durch Angiotensin-2 konnte vor allem in Gefäßzellen nachgewiesen werden. Bei oxidativem Stress, Inflammation und Hyperglykämie zeigte sich eine Erhöhung der BMP-2 Expression in der Intima von Gefäßen. Diese erhöhte BMP-2-Expression konnte durch die Stimulation mit Angiotensin-2 ausgelöst werden. Vermutet wird daher eine Angiotensin-2-induzierte Beteiligung von BMP-2 an der Reparatur geschädigter Gefäße (Nakaoka et al. 1997, Emmanuele et al. 2003, Amini et al. 2012, Parhami et al. 1997, Fukui et al. 2003, Rifas et al. 2003, Zhang et al. 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Effekt von Angiotensin-2 auf die Transkription von BMP-2 in Fibroblasten und proximalen Tubulusepithelzellen untersucht. In TK-173-Fibroblasten zeigte sich eine signifikant höhere Transkription von BMP-2. Dieses Ergebnis ist ähnlich zur Transkription von BMP-5 in Fibroblasten nach Stimulation mit Angiotensin-2. Interessanterweise zeigte sich in proximalen Tubulusepithelzellen HK-2 keine Änderung in der Transkription von BMP-2 nach Stimulation mit Angiotensin-2. Dieses Ergebnis weist ebenfalls Ähnlichkeiten zur Regulation von BMP-5 in proximalen Tubulusepithelzellen HK-2 auf. Während BMP-7 seine regenerativen Effekte vornehmlich auf das Tubulusepithel ausübt (Motazed et al. 2008), scheint BMP-2 auf Fibroblasten des Tubulointerstitiums zu wirken. Vergleichbare Literatur zur Expression von BMP-2 in Assoziation mit Angiotensin-2 in der humanen Niere fehlt bisher.

4.6.2. BMP-5 und -7 üben keinen Einfluss auf die BMP-2-Transkription aus

Aus der Osteogenese ist bekannt, dass BMP-2 eine wichtige Rolle als Promotor zur Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in Chondrozyten und Osteoblasten einnimmt. Dabei triggert BMP-2 eine ganze Kaskade an Expressionen weiterer Mitglieder der BMP-Familie.

Yeh et al. konnten im Mausmodell zeigen, dass zahlreiche Interaktionen der *Bone-Morphogenetic-Proteine* untereinander sowie in Kombination mit weiteren Mediatoren zu einer Regeneration von Knorpel und Knochen führen können. Beispielsweise führte die Stimulation von Chondrozyten mit BMP-7 zu einer Verminderung der Expression an BMP-4, -5, -6 und einer Erhöhung der Expression von BMP-2. Dies steigert die regenerative Kapazität des Knochens und Knorpels (Yeh und Lee 2002) und führte bereits zu einer klinischen Zulassung von rekombinantem BMP-2 und BMP-7.

In unseren Versuchen zeigte sich kein Effekt der BMP-2-Transkription nach Stimulation mit rhBMP-5 in distalen Tubulusepithelzellen sowie Fibroblasten. Ebenfalls wurde bei Stimulation mit dem nephroprotektivem rhBMP-7 kein signifikanter Effekt auf die Transkription von BMP-2 in Fibroblasten beobachtet. Lediglich eine Tendenz zur erhöhten Expression von BMP-2 war zu erkennen, die sich jedoch bei hoher Standardabweichung als nicht signifikant erwies.

Die Ergebnisse für BMP-2 zeigen die Abhängigkeit von Differenzierungsstadium, Zelltyp und vorhandenen Mediatoren. Die Regulation von BMP-2 scheint nach den Ergebnissen der aktuellen Arbeit in den untersuchten Zellreihen unabhängig von BMP-5 und BMP-7 zu sein. Zum besseren Verständnis der Funktion und Regulation müssten weitere Untersuchungen in der adulten humanen Niere folgen.

4.7. Funktion von BMP-2

4.7.1. Proliferativer Einfluss von BMP-2 auf renale Fibroblasten TK-173

BMP-2 wird in zahlreichen embryonalen und adulten Geweben exprimiert und besitzt eine hohe Potenz in der Induktion von Proliferation und Migration in verschiedenen Geweben. Beispielhaft sei die verbesserte Wundheilung der Haut durch die BMP-2-induzierte Proliferation von Keratinozyten genannt (Hwang et al. 2001, Yan et al. 2010).

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von BMP-2 auf die Proliferation von renalen Fibroblasten untersucht. Hierbei konnte nach Gabe von rhBMP-2 keine Änderungen in der Mitoserate von humanen TK-173-Fibroblasten beobachtet werden. Anscheinend wird die Fibroblastenproliferation in der humanen Niere von BMP-2 nicht beeinflusst.

Für BMP-2 in der Pathologie der Nierenfibrose sind lediglich Ergebnisse aus Zellkulturversuchen vorhanden. So inhibiert BMP-2 dosisabhängig die TGF- β 1-induzierte Erhöhung von

Fibronectin als Marker der extrazellulären Matrix (ECM) in Fibroblasten und mindert die TGF- β 1-induzierte Migration von renalen Fibroblasten im Rattenmodell. Die Arbeitsgruppe von Simone zeigte in Zellkulturversuchen mit humanen adulten renalen Progenitorzellen, dass diese nach Stimulation mit rhBMP-2 vermehrt die Proteine Fibronectin und Kollagen-1 exprimierten, die zu den Bestandteilen der ECM gehören. Diese pro-fibrotischen Effekte nach Stimulation von proximalen Tubulusepithelzellen mit rhBMP-2 konnte die Arbeitsgruppe von Simone nicht beobachten (Simone et al. 2012). Ähnlich zu BMP-5 zeigt sich, dass BMP-2 keinen Einfluss auf Tubulusepithelzellen ausübt.

Vergleichbar zu den Ergebnissen von BMP-5 scheint auch BMP-2 somit zwar einen Einfluss auf Progenitorzellen in der Frühphase der Schädigung zu haben, nicht jedoch auf die ausgereiften Fibroblasten oder Tubulusepithelzellen.

4.7.2. Einfluss von BMP-2 auf die Migration und Proliferation

Die kontroverse Datenlage bei der Funktion von BMP-2 in der Karzinogenese unterstreicht die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen hinsichtlich der zeitlichen und räumlichen Aktivität des Proteins im adulten Organismus.

Die Karzinogenese ist durch erhöhte Migrations- und Proliferationsraten gekennzeichnet und ein wesentliches Merkmal ist die Fähigkeit zur Bildung von neuen Gefäßen. BMP-2 wird sowohl als Inhibitor wie auch Stimulator des Tumorwachstums beschrieben. Letztendlich kann keine definitive Zuordnung von BMP-2 als pro- oder anti-karzinogenes Protein gemacht werden.

Einige Studien zeigten, dass durch die Aktivierung des BMP-Signalwegs verschiedenen Tumorzellen migratorische und proliferative Eigenschaften verliehen wurden. Beispielsweise schien BMP-2 die Motilität von Prostata-Krebszellen zu vermitteln, und eine funktionelle Überexpression von BMP-2 in Brustkrebszellen förderte die Invasion in Knochen und Tumorwachstum (Feeley et al. 2006, Clement et al. 2005).

Im Gegensatz dazu konnte nach Stimulation von humanen renalen Karzinomzellen mit BMP-2 ein antiproliferativer Effekt *in vivo* aufgrund eines Zellzyklusarrests in der G1-Phase festgestellt werden. Allerdings waren dazu extrem hohe Konzentrationen von 300 ng/ml BMP-2 nötig, bei 100ng/ml konnte kein signifikanter Effekt gesehen werden (Wang et al. 2012). In unserer Arbeit wurden maximale Konzentrationen von 100 ng/ml an rhBMP-2 verwendet. In humanen Osteosarkomzellen hemmten bereits 30 μ g/ml rekombinantes BMP-2 das Tumorwachstum und induzierten knöcherne Formationen. In humanen Myelomzellen inhibierte rekombinantes BMP-2 mit 50 ng/ml die Proliferation dieser Zellen und induziert die Apoptose (Kawamura et al. 2002).

Es gibt widersprüchliche Aussagen von *in vivo*- und *in vitro*-Studien zu der Signifikanz von BMP-2 in der Begünstigung der Tumorgenese und Metastasierung, was wahrscheinlich die komplexen Interaktionen von BMP-2 in der zellulären Entwicklung widerspiegelt. Unterschiede in der Expression von BMP-2 bei verschiedenen Tumorarten können lediglich charakteristisch

für einen Zelltyp oder ein Gewebe sein, nicht jedoch als Ursache des Karzinoms betrachtet werden. Bisher konnte für Patienten, die klinisch mit rekombinantem BMP-2 behandelt wurden, kein erhöhtes Karzinomrisiko im Vergleich zur Normalbevölkerung festgestellt werden (Cooper und Kou 2013).

Es scheint, dass BMP-2 in Abhängigkeit von Zelltyp, Differenzierungsstadium und dem umgebenden Milieu unterschiedliche Effekte auf die Proliferation, Differenzierung und Migration von Zellen ausübt und Änderungen in der Expression von BMP-2 Ergebnis intrazellulärer Ereignisse sind.

5. Zusammenfassung

Bone-Morphogenetic-Proteine (BMP) besitzen eine umfangreiche Funktion in der Embryogenese und Organogenese sowie bei der Gewebsregeneration im adulten Organismus. Allen BMP ist die grundlegende Koordination verschiedenster Zellen durch Chemotaxis und Migration sowie das Zusammenspiel von Modulatoren und Inhibitoren zur Proliferation und Differenzierung gemeinsam.

BMP-7 ist an der Nephrogenese beteiligt und besitzt protektive und regenerative Fähigkeiten in der adulten Niere. Das eng verwandte BMP-5 ist ebenfalls an der Nephrogenese beteiligt, wurde aber bisher in der adulten humanen Niere nicht untersucht. BMP-2 ist in der Embryogenese unabdingbar. Es induziert die Differenzierung, Migration und Proliferation embryonaler Stammzellen und ist essentiell in der Knochenentwicklung. Die Rolle von BMP-2 in der adulten Niere ist unklar.

Ziel dieser Arbeit war es, die Expression, Funktion und Regulation von BMP-2 und BMP-5 in der adulten humanen Niere, bei der hypertensiven Nephrosklerose und in verschiedenen renalen Zelllinien zu untersuchen.

In dieser Arbeit konnte erstmalig die Expression von BMP-5 in der adulten humanen Niere nachgewiesen werden. Die Transkription fand vornehmlich im Tubulointerstitium statt, glomerulär fand sich eine sehr geringe Transkriptionsrate. In der nephrosklerotischen Niere wurde BMP-5 tubulointerstitiell gegenüber gesunden Nieren vermindert exprimiert. *In vitro* gelang der Nachweis einer BMP-5-Transkription in humanen proximalen und distalen Tubulusepithelzellen sowie in Fibroblasten der TK-173- und TK-188-Zellreihe, die ursprünglich aus gesunden bzw. fibrotisch veränderten Nieren stammen.

Angiotensin-2 (AT-2) als Mitglied des endogenen RAAS und wichtiger Mediator in der Progression der Nierenfibrose zeigte keinen direkten Effekt auf die Transkription von BMP-5 in proximalen Tubulusepithelzellen HK-2. Auf Fibroblasten übte Angiotensin-2 in Abhängigkeit vom Krankheitsstadium entgegengesetzte Effekte aus. So induzierte AT-2 in TK-173-Fibroblasten aus gesunden Nieren dosisabhängig eine signifikante Erhöhung der BMP-5-Transkription. In TK-188-Fibroblasten aus fibrotischen Nieren minderte AT-2 die BMP-5-Transkription.

Aufgrund der zentralen Bedeutung von BMP-7 in der Nephrogenese und dessen protektiven und regenerativen Funktionen in der adulten humanen Niere sowie der bekannten zahlreichen Interaktionen der *Bone-Morphogenetic-Proteine* miteinander wurde der Einfluss von BMP-7 auf BMP-5 untersucht. Die Transkription von BMP-5 wird in den renalen Zelllinien HK-2, TK-173 und TK-188 durch das nephroprotektive rhBMP-7 nicht beeinflusst.

Der initiale Schritt zur Nierenfibrose ist gekennzeichnet durch die Inflammation. Dabei wird das Tubulointerstitium von zahlreichen Entzündungszellen, unter anderem von Makrophagen, infiltriert und führt zu einer progressiven Fibrosierung und zu einem Umbau der Niere.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die durch die pro-inflammatorischen und profibrotischen Zytokine TGF- β 1 und TNF- α induzierte Migration von Makrophagen durch BMP-5 vermindert wurde.

Ähnlichen Transkriptionsmustern unterlag das pluripotente BMP-2 in der adulten humanen Niere. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass BMP-2 in der adulten humanen Niere tubulointerstitiell und glomerulär exprimiert wird. In der nephrosklerotisch veränderten humanen Niere zeigte sich gegenüber gesunden humanen Nieren tubulointerstitiell eine signifikant verminderte Transkription.

Ähnlich zu BMP-5, zeigte sich eine erhöhte BMP-2 Transkription in TK-173 Fibroblasten nach Stimulation mit Angiotensin-2. In proximalen Tubulusepithelzellen HK-2 zeigten sich keine Änderungen im Transkriptionslevel für BMP-2.

Die Stimulation der renalen Zelllinien mit dem nephroprotektivem rhBMP-7 führte tendenziell zu einer Erhöhung der Transkriptionsrate von BMP-2, die jedoch aufgrund der hohen Standardabweichungen nicht signifikant waren. Auf die Proliferation von TK-173-Fibroblasten übte BMP-2 keinen Effekt aus.

Die Ergebnisse zeigen, dass BMP-2 und BMP-5 in der adulten humanen Niere transkribiert werden. Bei der hypertensiven Nephrosklerose ist die Transkription beider Proteine vermindert. Ursächlich könnte Angiotensin-2 sein, das zu einer verminderten Transkription von BMP-2 und -5 in Fibroblasten aus gesunden Nieren (TK-173) führt. BMP-5 besitzt zudem eine anti-inflammatorische Wirkung und reduziert die TGF- β 1- und TNF- α -induzierte Migration von Makrophagen. In Zusammenschau mit der Literatur, in der ein Effekt von BMP-2 und -5 vor allem auf Progenitorzellen beschrieben wird, scheinen beide Proteine daher vor allem in der Frühphase der Nierenschädigung eine aktive Rolle zu spielen. Die Bedeutung von BMP-2 und -5 in späteren Krankheitsphasen scheint geringer zu sein. Hierbei wird BMP-5 in Fibroblasten aus fibrotischen Nieren (TK-188) durch Angiotensin-2 nicht mehr beeinflusst. Auch die Proliferation von Fibroblasten oder Tubulusepithelzellen wird durch BMP-2 und -5 nicht mehr beeinflusst.

BMP-2 und -5 scheinen insbesondere in der Frühphase der hypertensiven Nephrosklerose eine wichtige Rolle zu spielen. Hierbei konnte in Zellkulturversuchen insbesondere für BMP-5 eine protektive Funktion nachgewiesen werden. Zur Abschätzung des therapeutischen Potentials dieser Proteine sind Untersuchungen der Regulationsmechanismen in weiterführenden Studien notwendig.

6. Anhang

6.1. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Δ Ct	delta-Ct
$\Delta\Delta$ Ct	delta-delta-Ct
Abb.	Abbildung
ACE	<i>angiotensin converting enzyme</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AT-2	Angiotensin-2
BMP	<i>Bone-Morphogenetic-Protein</i>
BMP-2	<i>Bone-Morphogenetic-Protein-2</i>
BMP-5	<i>Bone-Morphogenetic-Protein-5</i>
BMP-7	<i>Bone-Morphogenetic-Protein-7</i>
BMPR-1	<i>Bone-Morphogenetic-Protein-Rezeptor Typ-1</i>
BMPR-2	<i>Bone-Morphogenetic-Protein-Rezeptor Typ-2</i>
BrdU	5-Bromo-2'-Deoxyuridin
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	Desoxyribonukleinsäure
Ct	<i>cycle threshold</i> = Schwellenwert
DAPI	Diamidino-2-phenylindol
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	extrazelluläre Matrix
eEOC	<i>early endothelial outgrowth cells</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
FCS	fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphatdehydrogenase
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HK	<i>human kidney</i>
HKG	<i>housekeeping gene</i> = Haushaltsgen

IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
kD	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
M	Molar
min	Minute
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natronlauge
nm	Nanometer
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PMSF	Phenylmethansulfonsäurefluorid
PPIA	Peptidylprolyl-Isomerase A
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RPMI-Medium	<i>Roswell Park Institute Memorial-Medium</i>
RT	Raumtemperatur
rhBMP-2	rekombinantes humanes BMP-2
rhBMP-5	rekombinantes humanes BMP-5
rhBMP-7	rekombinantes humanes BMP-7
rhTGF-β1	rekombinantes humanes TGF-β1
rhTNF-α	rekombinantes humanes TNF-α
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
rtPCR	<i>real-time PCR</i>
s	Sekunde
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TK	<i>Tübingen kidney</i>
TGF-β	<i>transforming-growth-factor-β</i>
TGF-β1	<i>transforming-growth-factor-β1</i>
TNF-α	<i>tumor-necrosis-factor-α</i>
Temed	Tetramethylethyldiamin
TMB	Tetramethylbenzidin
SDS	Natriumdodecylsulfat
VSMC	<i>vascular smooth muscle cell</i>

6.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Diagnoseverteilung der Patienten bei Therapiebeginn	S. 2
Abbildung 2:	TGF- β ist ein multifunktionales Zytokin in essentiellen Zellprozessen	S.7
Abbildung 3:	Die TGF- β Superfamilie und die phylogenetische Verwandtschaft	S.8
Abbildung 4:	60A-Familie der TGF- β -Superfamilie	S.9
Abbildung 5:	Transkription von BMP-5 im Tubulointerstitium	S.34
Abbildung 6:	Transkription von BMP-5 in den Glomeruli	S.35
Abbildung 7:	rtPCR auf BMP-5 nach 12h Stimulation von HK-2 mit AT-2	S.37
Abbildung 8:	rtPCR auf BMP-5 nach 12h Stimulation von TK-173 mit AT-2	S.37
Abbildung 9:	rtPCR auf BMP-5 nach 12h Stimulation von TK-188 mit AT-2	S.38
Abbildung 10:	rtPCR auf BMP-5 nach 12h Stimulation von HK-2 mit rhBMP-7	S.39
Abbildung 11:	rtPCR auf BMP-5 nach 12h Stimulation von TK-173 mit rhBMP-7	S.39
Abbildung 12:	rtPCR auf BMP-5 nach 12h Stimulation von TK-188 mit rhBMP-7	S.40
Abbildung 13:	Makrophagen-Migrationassays nach Stimulation mit rhTGF- β 1, rhTGF- β 1 in Ko-Stimulation mit rhBMP-5 bzw. rhBMP-7	S.41
Abbildung 14:	Makrophagen-Migrationassays nach Stimulation mit rhTNF- α , rhTNF- α in Ko-Stimulation mit rhBMP-5	S.42
Abbildung 15:	Proliferationsassay nach 12h Stimulation von TK-173 mit rhBMP-5	S.43
Abbildung 16:	Proliferationsassay nach 12h Stimulation von TK-173 mit AT-2	S.43
Abbildung 17:	Transkription von BMP-2 im Tubulointerstitium	S.44
Abbildung 18:	Transkription von BMP-2 in den Glomeruli	S.45
Abbildung 19:	rtPCR auf BMP-2 nach 12h Stimulation von HK-2 mit AT-2	S.47
Abbildung 20:	rtPCR auf BMP-2 nach 12h Stimulation von TK-173 mit AT-2	S.47
Abbildung 21:	rtPCR auf BMP-2 nach 12h Stimulation von HK-2 mit rhBMP-5	S.48
Abbildung 22:	rtPCR auf BMP-2 nach 12h Stimulation von TK-173 mit rhBMP-5	S.49
Abbildung 23:	rtPCR auf BMP-2 nach 12h Stimulation von TK-173 mit rhBMP-7	S.49
Abbildung 24:	Proliferationsassay nach 12h Stimulation von TK-173 mit rhBMP-2	S.50

6.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	rtPCR auf BMP-2	S.25
Tabelle 2:	rtPCR auf BMP-5	S.25
Tabelle 3:	verwendete Primer für die rtPCR	S.27
Tabelle 4:	verwendete <i>housekeeping genes</i> für die rtPCR	S.28
Tabelle 5:	Versuchsaufbau des Makrophagen-Migrationsassay	S.32
Tabelle 6:	Stimulanzen im Proliferationsassay bei TK-173-Fibroblasten	S.32

7. Literaturverzeichnis

Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP (2012): Differential analysis of peripheral blood- and bone marrow-derived endothelial progenitor cells for enhanced vascularization in bone tissue engineering. *J Orthop Res* 30, 1507-1515.

Baer PC, Nockher WA, Haase W, Scherberich JE (1997): Isolation of proximal and distal tubule cells from human kidney by immunomagnetic separation. Technical note. *Kidney Int* 52, 1321-1331.

Baid-Agrawal S, Frei UA (2007): Living donor renal transplantation: recent developments and perspectives. *Nat Clin Pract Nephrol* 3, 31-41.

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

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

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

Bohle A, Bader R, Grund KE, Mackensen S, Neunhoeffler J (1977): Serum creatinine concentration and renal interstitial volume. Analysis of correlations in endocapillary (acute) glomerulonephritis and in moderately severe mesangioproliferative glomerulonephritis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 375, 87-96.

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

Bohle A, Muller GA, Wehrmann M, Mackensen-Haen S, Xiao JC (1996): Pathogenesis of chronic renal failure in the primary glomerulopathies, renal vasculopathies, and chronic interstitial nephritides. *Kidney Int* 54, 2-9.

Bonsib SM: Atlas of Medical Renal Pathology. Springer Science Media, New York 2013, 147-150.

- Border WA, Noble NA (1994): Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *New Engl J Med* 331, 1286-1292.
- Bramlage CP, Häupl T, Kaps C, Ungethüm U, Krenn V, Pruss A, Müller GA, Strutz F, Burmester GR (2006): Decrease in expression of bone morphogenetic proteins 4 and 5 in synovial tissue of patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 8, 58.
- Bramlage CP, Tampe B, Koziolok M, Maatouk I, Bevanda J, Bramlage P, Ahrens K, Lange K, Schmid H, Cohen CD, Kretzler M, Müller GA (2010): Bone Morphogenetic Protein (BMP)-7 expression is decreased in human hypertensive nephrosclerosis. *BMC Nephrol* 11, 31.
- Bramlage CP, Müller GA, Tampe B, Bevanda J, Maatouk I, Koziolok M, Lange K, Ahrens K, Schmid H, Cohen CD, Bramlage P, Kretzler M, Strutz F (2011): The role of bone morphogenetic protein-5 (BMP-5) in human nephrosclerosis. *J Nephrol* 24, 647-655.
- Brewster UC, Perazella MA (2004): The Renin-Angiotensin-Aldosterone System and the Kidney: Effects on Kidney Disease. *Am J Med* 116, 263-272.
- Burns WC, Velkoska E, Dean R, Burrell LM, Thomas MC (2010): Angiotensin II mediates epithelial-to mesenchymal transformation in tubular cells by ANG 1-7/MAS-1-dependent pathways. *Am J Physiol Renal Physiol* 299, 585-593.
- Bustin SA (2000): Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25, 169-193.
- Cain JE, Hartwig S, Bertram JF, Rosenblum ND (2008): Bone Morphogenetic protein signalling in the developing kidney: present and future. *Differentiation* 76, 831-842.
- Carano RA, Filvaroff EH (2003): Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today* 1, 980-989.
- Celeste AJ, Iannazzi JA, Taylor RC, Hewick RM, Rosen V, Wang EA, Wozney JM (1990): Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci* 87, 9843-9847.
- Churg J, Sobin LH (1982): Benign nephrosclerosis. In: Churg J, ed. *Renal Disease - Classification and Atlas of Glomerular Diseases*. Igaku-Shoin, Tokyo, 211-224.

Clement JH, Raida M, Sanger J, Bicknell R, Liu J, Naumann A, Geyer A, Waldau A, Hortschansky P, Schmidt A, Harris AL (2005): Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) induces in vitro invasion and in vivo hormone independent growth of breast carcinoma cells. *Int J Oncol* 27, 401-407.

Cohen CD, Frach K, Schlondorff D, Kretzler M (2002): Quantitative gene expression analysis in renal biopsies: a novel protocol for a high-throughput multicenter application. *Kidney Int* 61, 133-40.

Cooper GS, Kou TD (2013): Risk of Cancer Following Lumbar Fusion Surgery with Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 (rh-BMP-2). *Spine* 2013 Jul 23. Published ahead of print.

Corriere MA, Rogers CM, Eliason JL, Faulk J, Kume T, Hogan BL, Guzman RJ (2008): Endothelial Bmp4 is induced during arterial remodeling: effects on smooth muscle cell migration and proliferation. *J Surg Res* 145, 142-149.

Csomor P, Liktor B, Liktor B, Szekanecz Z, Sziklai I, Karosi T (2012): Expression of bone morphogenetic protein 2, 4, 5, and 7 correlates with histological activity of otosclerotic foci. *Acta Otolaryngol* 132, 624-631.

Dekel B, Zangi L, Shezen E, Reich-Zeliger S, Eventov-Friedman S, Katchman H, Jacob-Hirsch J, Amariglio N, Rechavi G, Margalit R, Reisner Y (2006): Isolation and Characterization of Nontubular Sca-1+ Lin-Multipotent Stem/Progenitor Cells from Adult Mouse Kidney. *JASN* 17, 3300-3314.

Dennler S, Goumans MJ, ten Dijke P (2002): Transforming growth factor beta signal transduction. *J Leukoc Biol* 71, 731-740.

Die Verwendung der Abbildung 1, S. 732 in modifizierter Form erfolgte mit freundlicher Genehmigung des *Journal of Leukocyte Biology*.

Deutsche Stiftung Organspende (2012): Jahresbericht 2012, 26-32.

erhältlich unter: <http://www.dso.de/servicecenter/downloads/jahresberichte-und-grafiken.html>

Dhore CR, Cleutjens J, Lutgens E, Cleutjens K, Geussens P, Kitslaar P, Tordoir J, Spronk H, Vermeer C, Daemen M (2001): Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 1998-2003.

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

Die Verwendung der Abbildung 1, S. 2208 in modifizierter Form erfolgte mit freundlicher Genehmigung der *Nature Publishing Group*.

Dudley AT, Lyons KM, Robertson EJ (1995): A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes Dev* 9, 2795-2807.

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

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

Emmanuele L, Ortmann J, Doerflinger T, Traupe T, Barton M (2003): Lovastatin stimulates human vascular smooth muscle cell expression of bone morphogenetic protein-2, a potent inhibitor of low-density lipoprotein-stimulated cell growth. *Biochem Biophys Res Commun* 302, 67-72.

Eurotransplant (2012): Annual report 2012, 65-82.

erhältlich unter: http://www.eurotransplant.org/cms/index.php?page=annual_reports

Fang TD, Salim A, Xia W, Nacamuli RP, Guccione S, Song HM, Carano RA, Filvaroff EH, Bednarski MD, Giaccia AJ, Longaker MT (2005): Angiogenesis is required for successful bone induction during distraction osteogenesis. *J Bone Miner Res* 20, 1114-1124.

Feeley BT, Krenek L, Liu N, Hsu WK, Gamradt SC, Schwarz EM, Huard J, Lieberman JR (2006): Overexpression of noggin inhibits BMP-mediated growth of osteolytic prostate cancer lesions. *Bone* 38, 154-166.

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

erhältlich unter: <http://www.bundesverband-niere.de/1906/jahresberichte-quasi-niere/>

Die Verwendung der Abbildung 30, S.35 erfolgte mit freundlicher Genehmigung des Bundesverband Niere e.V.

- Fogo AB (2000): The Role of Angiotensin II and Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Progressive Glomerulosclerosis. *Am J Kidney Dis* 35, 179-188.
- Fogo AB, Breyer JA, Smith MC, Cleveland WH, Agodoa L, Kirk KA, Glasscock R (1997): Accuracy of the diagnosis of hypertensive nephrosclerosis in African Americans: a report from the African American Study of Kidney Disease (AASK) Trial. AASK Pilot Study Investigators. *Kidney Int* 51, 244-252.
- Fukui N, Zhu Y, Maloney WJ, Clohisy J, Sandell LJ (2003): Stimulation of BMP-2 expression by proinflammatory cytokines IL-1 and TNF-alpha in normal and osteoarthritic chondrocytes. *J Bone and Joint Surg* 85, 59-66.
- Gambaro G, D'Angelo A, Fabris A, Tosetto E, Anglani F, Lupo A (2004): Crystals, Randall's plaques and renal stones: do bone and atherosclerosis teach us something? *J Nephrol* 17, 774-777.
- Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N (1999): VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 5, 623-628.
- Go AS, Chertow GM, Fan D (2004): Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events and hospitalization. *N Engl J Med* 351, 1296-1305.
- Godin RE, Robertson EJ, Dudley AT (1999): Role of BMP family members during kidney development. *Int J Dev Biol* 43, 405-411.
- Gould SE, Day M, Jones SS, Dorai H (2002): BMP-7 regulates chemokine, cytokine, and hemodynamic gene expression in proximal tubule cells. *Kidney Int* 61, 51-60.
- Harris RC, Neilson EG (2006): Toward a unified theory of renal progression. *Annu Rev Med* 57, 365-380.
- Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P (1997): TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390, 465-471.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R (1992): Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 10, 413-417.

- Hogan BL (1996a): Bone morphogenetic proteins: Multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 10, 1580–1594.
- Hogan BL (1996b): Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev* 6, 432-438.
- Holdsworth SR, Summers SA (2008): Role of mast cells in progressive renal diseases. *J Am Soc Nephrol* 19, 2254-2261.
- Hsu CY, Iribarren C, McCulloch CE, Darbinian J, Go AS (2009): Risk factors for end-stage renal disease: 25-year follow-up. *Arch Intern Med* 169, 342-350.
- Hu C, Kang BY, Megyesi J, Kaushal GP, Safirstein RL, Mehta JL (2009): Deletion of LOX-1 attenuates renal injury following angiotensin II infusion. *Kidney Int* 76, 521-527.
- Hwang EA, Lee HB, Tark KC (2001): Comparison of bone morphogenetic protein receptors expression in the fetal and adult skin. *Yonsei Med J* 42, 581-586.
- Iwasaki S, Tsuruoka N, Hattori A, Sato M, Tsujimoto M, Kohno M (1995): Distribution and characterization of specific cellular binding proteins for bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem* 270, 5476-5482.
- Jin Y, Tipoe GL, Liong EC, Lau TY, Fung PC, Leung KM (2001): Overexpression of BMP-2/4, -5 and BMPR-IA associated with malignancy of oral epithelium. *Oral Oncol* 37, 225-233.
- Johnsen IK, Kappler R, Auernhammer CJ, Beuschlein F (2009): Bone morphogenetic proteins 2 and 5 are down-regulated in adrenocortical carcinoma and modulate adrenal cell proliferation and steroidogenesis. *Cancer Res* 69, 5784-5792.
- Johnson RJ, Alpers CE, Yoshimura A, Lombardi D, Pritzl P, Floege J, Schwartz SM (1992): Renal injury from angiotensin II-mediated hypertension. *Hypertension* 19, 464-474.
- Juncos LA, Garvin J, Carretero OA, Ito S (1995): Flow modulates myogenic responses in isolated microperfused rabbit afferent arterioles via endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest* 95, 2741-2748.

- Kagami S, Border WA, Miller DE, Noble NA (1994): Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor-beta expression in rat glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 93, 2431-2437.
- Kang DH, Kanellis J, Hugo C, Truong L, Anderson S, Kerjaschki D, Schreiner GF, Johnson RJ (2002): Role of the microvascular endothelium in progressive renal disease. *J Am Soc Nephrol* 13, 806–816.
- Kangsamaksin T, Morris RJ (2011): Bone morphogenetic protein 5 regulates the number of keratinocyte stem cells from the skin of mice. *J Invest Dermatol* 131, 580-585.
- Kawamura C, Kizaki M, Ikeda Y (2002): Bone morphogenetic protein (BMP)-2 induces apoptosis in human myeloma cells. *Leuk Lymphoma* 43, 635-639.
- Kazama I, Mahoney Z, Miner JH, Graf D, Economides AN, Kreidberg JA (2008): Podocyte-derived BMP7 is critical for nephron development. *J Am Soc Nephrol* 19, 2181-2191.
- Kelly CJ (1999): Cellular immunity and the tubulointerstitium. *Semin Nephrol* 19, 182-187.
- Kim M, Choe S (2011): BMPs and their clinical potentials. *BMB Rep* 44, 619-634.
- King JA, Marker PC, Seung KJ, Kingsley DM (1994): BMP-5 and the molecular, skeletal, and soft tissue alterations in short ear mice. *Dev Biol* 166, 112-122.
- Kingsley DM, Bland AE, Grubber JM, Marker PC, Russell LB, Copeland NG, Jenkins NA (1992): The mouse short ear skeletal morphogenesis locus is associated with defects in a bone morphogenetic member of the TGF beta superfamily. *Cell* 71, 399-410.
- Kingsley DM (1994): The TGF- β superfamily: New members, new receptors and genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 8, 133-146.
- Kitten AM, Kreisberg JI, Olson MS (1999): Expression of osteogenic protein-1 mRNA in cultured kidney cells. *J Cell Physiol* 181, 410-415.
- Klahr S, Morrissey J (1998): Angiotensin II and gene expression in the kidney. *Am J Kidney Dis* 31, 171-176.

- Klahr S, Ishidoya S, Morrissey J (1995): Role of angiotensin II in the tubulointerstitial fibrosis of obstructive nephropathy. *Am J Kidney Dis* 26, 141-146.
- Kleeff J, Maruyama H, Ishiwata T, Sawhney H, Friess H, Buchler MW, Korc M (1999): Bone morphogenetic protein 2 exerts diverse effects on cell growth in vitro and is expressed in human pancreatic cancer in vivo. *Gastroenterology* 116, 1202-1216.
- Kondo S, Kagami S, Kido H, Strutz F, Muller GA, Kuroda Y (2001): Role of mast cell tryptase in renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 12, 1668-1676.
- Kopp JB (2000): BMP receptors in kidney. *Kidney Int* 58, 2237-2238.
- Kudo N, Ogose A, Ariizumi T, Kawashima H, Hotta T, Hatano H, Morita T, Nagata M, Siki Y, Kawai A, Hotta Y, Hoshino M, Endo N (2009): Expression of bone morphogenetic proteins in giant cell tumor of bone. *Anticancer Res* 29, 2219-2225.
- Kuncio GS, Neilson EG, Haverty T (1991): Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *Kidney Int* 39, 550-556.
- Lee SB, Kalluri R (2010): Mechanistic connection between inflammation and fibrosis. *Kidney Int* 119, 22-26.
- Li RH, Bouxsein ML, Blake CA, D'Augusta D, Kim H, Li XJ, Wozney JM, Seeherman HJ (2003): rhBMP-2 injected in a calcium phosphate paste (alpha-BSM) accelerates healing in the rabbit ulnar osteotomy model. *J Orthop Res* 21, 997-1004.
- Lissenberg-Thunnissen SN, de Gorter DJ, Sier CF, Schipper IB (2011): Use and efficacy of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Int Orthop* 35, 1271-1280.
- Liu F, Ventura F, Doody J, Massagué J (1995): Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs): Extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol Cell Biol* 15, 3479-3486.
- Luke RG (1999): Hypertensive nephrosclerosis: pathogenesis and prevalence. *Nephrol Dial Transplant* 14, 2271-2278.

- Luo G, Hofmann C, Bronckers AL, Sohocki M, Bradley A, Karsenty G (1995): BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes Dev* 9, 2808-2820.
- Maes C, Coenegrachts L, Stockmans I, Daci E, Luttun A, Petryk A, Gopalakrishnan R, Moermans K, Smets N, Verfaillie CM, Carmeliet P, Bouillon R, Carmeliet G (2006): Placental growth factor mediates mesenchymal cell development, cartilage turnover, and bone remodeling during fracture repair. *J Clin Invest* 116, 1230-1242.
- Mailhot G, Yang M, Mason-Savas A, Mackay CA, Leav I, Odgren PR (2008): BMP-5 expression increases during chondrocyte differentiation in vivo and in vitro and promotes proliferation and cartilage matrix synthesis in primary chondrocyte cultures. *J Cell Physiol* 214, 56-64.
- Marcantoni C, Jafar TH, Oldrizzi L, Levey AS, Maschio G (2000): The role of systemic hypertension in the progression of nondiabetic renal disease. *Kidney Int.* 57, 44-48.
- Massagué J (1990): The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 6, 597-641.
- Massagué J (1998): TGF- β signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67, 753-791.
- Massagué J, Weis-Garcia F (1996): Serine/threonine kinase receptors: Mediators of transforming growth factor beta family signals. *Cancer Surv* 27, 41-64.
- Menon V, Sarnak MJ (2005): The epidemiology of chronic kidney disease stages 1 to 4 and cardiovascular disease: A high risk combination. *Am J Kidney Dis* 45, 223-232.
- Mezzano SA, Ruiz-Ortega M, Egido J (2001): Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension* 38, 635-638.
- Morrell NW (2010): Role of bone morphogenetic protein receptors in the development of pulmonary arterial hypertension. *Adv Exp Med Biol* 661, 251-264.
- Motazed R, Colville-Nash P, Kwan JT, Dockrell ME (2008): BMP-7 and proximal tubule epithelial cells: activation of multiple signaling pathways reveals a novel anti-fibrotic mechanism. *Pharm Res* 25, 2440-2446.

- Muller GA, Markovic-Lipkovski J, Frank J, Rodemann HP (1992): The role of interstitial cells in the progression of renal diseases. *J Am Soc Nephrol* 2, 198-205.
- Muller 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.
- Mulligan RC, Berg P (1981): Factors governing the expression of a bacterial gene in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 1, 449-459.
- Nadasdy T, Laszik Z, Blick KE, Johnson DL, Silva FG (1994): Tubular atrophy in the end-stage kidney: A lectin and immunohistochemical study. *Hum Pathol* 25, 22-28.
- Nakaoka T, Gonda K, Ogita T, Otawara-Hamamoto Y, Okabe F, Kira Y, Harii K, Miyazono K, Takuwa Y, Fujita T (1997): Inhibition of rat vascular smooth muscle proliferation in vitro and in vivo by bone morphogenetic protein-2. *J Clin Invest* 100, 2824-2832.
- National Kidney Foundation (2002): K/DOQI clinical practical guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification. *Am J Kidney Dis* 39, 1-266.
- zur Nieden NI, Kempka G, Rancourt DE, Ahr HJ (2005): Induction of chondro-, osteo- and adipogenesis in embryonic stem cells by bone morphogenetic protein-2: Effect of cofactors on differentiating lineages. *BMC Dev Biol* 5, 1-12.
- Nishida M, Hamaoka K (2008): Macrophage phenotype and renal fibrosis in obstructive nephropathy. *Nephron Exp Nephrol* 110, 31-36.
- Ng YY, Huang TP, Yang WC, Chen ZP, Yang AH, Mu W, Nikolic-Paterson DJ, Atkins RC, Lan HY (1998): Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in progressive tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats. *Kidney Int* 54, 864-876.
- Oxburgh L, Dudley AT, Godin RE, Koonce CH, Islam A, Anderson DC, Bikoff EK, Robertson EJ (2005): BMP4 substitutes for loss of BMP7 during kidney development. *Dev Biol* 286, 637-646.
- Ozkaynak E, Schnegelsberg PN, Jin DF, Clifford GM, Warren FD, Drier EA, Oppermann H (1992): Osteogenic protein-2. A new member of the transforming growth factor-beta superfamily expressed early in embryogenesis. *J Biol Chem* 267, 25220-25227.

Pache G, Schäfer C, Wiesemann S, Springer E, Liebau M, Reinhardt HC, August C, Pavenstädt H, Bek MJ (2006): Upregulation of Id-1 via BMP-2 receptors induces reactive oxygen species in podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol* 291, 654-662.

Parhami F, Morrow AD, Balucan J, Leitinger N, Watson AD, Tintut Y, Berliner JA, Demer LL (1997): Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiation: A possible explanation for the paradox of arterial calcification in osteoporotic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 680-687.

Patschan D, Krupincza K, Patschan S, Zhang Z, Hamby C, Goligorsky MS (2006): Dynamics of mobilization and homing of endothelial progenitor cells after acute renal ischemia: modulation by ischemic preconditioning. *Am J Physiol Renal Physiol* 291, 176-185.

Patschan D, Schwarze K, Lange A, Meise N, Henze E, Becker JU, Patschan S, Müller GA (2013): Bone morphogenetic protein-5 and early endothelial outgrowth cells (eEOCs) in acute ischemic kidney injury (AKI) and 5/6-chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 305, 314-322.

Piscione TD, Phan T, Rosenblum ND (2001): BMP7 controls collecting tubule cell proliferation and apoptosis via Smad1-dependent and -independent pathways. *Am J Physiol Renal Physiol* 280, 19-33.

Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB (1999): Myofibroblasts. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol* 277, C1-C9.

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.

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

Reddi AH (1992): Regulation of cartilage and bone differentiation by bone morphogenetic proteins. *Curr Opin Cell Biol* 4, 850-855.

Remuzzi G, Ruggenenti P, Perico N (2002): Chronic renal diseases: renoprotective benefits of renin-angiotensin system inhibition. *Ann Intern Med* 136, 604-615.

Ricardo SD, van Goor H, Eddy AA (2008): Macrophage diversity in renal injury and repair. *J Clin Invest* 118, 3522-3530.

Rifas L, Arackal S, Weitzmann MN (2003): Inflammatory T cells rapidly induce differentiation of human bone marrow stromal cells into mature osteoblasts. *J Cell Biochem* 88, 650-659.

Ritz E (2006): Heart and kidney: fatal twins? *Am J Med* 119, 31-39.

Romagnoli M, Belguise K, Yu Z, Wang X, Landesman-Bollag E, Seldin DC, Chalbos D, Barillé-Nion S, Jézéquel P, Seldin ML, Sonenshein GE (2012): Epithelial-to-mesenchymal transition induced by TGF- β 1 is mediated by Blimp-1-dependent repression of BMP-5. *Cancer Res* 1, 6268-6278.

Ruberte E, Marty T, Nellen D, Affolter M, Basler K (1995): An absolute requirement for both the type II and type I receptors, punt and thick veins for dpp signaling in vivo. *Cell* 80, 889-897.

Ruester C, Wolf G (2006): Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Progression of Renal Disease. *J Am Soc Nephrol* 17, 2985-2991.

Ruggenenti P, Schieppati A, Remuzzi G (2001): Progression, remission, regression of chronic renal diseases. *Lancet* 357, 1601-1608.

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

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

Sage AP, Tintut Y, Demer LL (2010): Regulatory mechanisms in vascular calcification. *Nat Rev Cardiol* 7, 528-536.

Sagrinati C, Netti GS, Mazzinghi B, Lazzeri E, Liotta F, Frosali F, Ronconi E, Meini C, Gacci M, Squecco R, Romagnani P (2006): Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys. *J Am Soc Nephrol* 17, 2443-2456.

Salama RH, Alghasham A, Mostafa MS, El-Moniem AE (2012): Bone morphogenetic protein-2 will be a novel biochemical marker in urinary tract infections and stone formation. *Clin Biochem* 45, 766-769.

Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC (2003): Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: A statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, Epidemiology and Prevention. *Circulation* 108, 2154–2169.

Schnaper HW, Jandeska S, Runyan CE, Hubchak SC, Basu RK, Curley JF, Smith RD, Hayashida T (2009): TGF-beta signal transduction in chronic kidney disease. *Front Biosci* 14, 2448-2465.

Schultheiss TM, Burch JB, Lassar AB (1997): A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis. *Genes Dev* 15, 451-462.

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

Segura J, Garcia-Donaire JA, Praga M, Ruilope LM (2006): Chronic kidney disease as a situation of high added risk in hypertensive patients. *J Am Soc Nephrol* 17, 136-140.

Simone S, Cosola C, Loverre A, Cariello M, Sallustio F, Rascio F, Gesualdo L, Schena FP, Grandaliano G, Pertosa G (2012): BMP-2 induces a profibrotic phenotype in adult renal progenitor cells through Nox4 activation. *Am J Physiol* 303, 23-34.

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

Snelling SJ, Hulley PA, Loughlin J (2010): BMP5 activates multiple signaling pathways and promotes chondrogenic differentiation in the ATDC5 growth plate model. *Growth Factors* 28, 268-79.

Soda H, Raymond E, Sharma S, Lawrence R, Cerna C, Gomez L, Timony GA, Von Hoff DD, Izbicka E (1998): Antiproliferative effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on human tumor colony-forming units. *Anticancer Drugs* 9, 327-331.

- Solloway MJ, Robertson EJ (1999): Early embryonic lethality in Bmp5;Bmp7 double mutant mice suggests functional redundancy within the 60A subgroup. *Development* 126, 1753-1768.
- Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV Jr, Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, van Bruggen N, Redmond HP, Carano RA, Filvaroff EH (2002): Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci USA* 23, 9656-9661.
- Strutz F, Neilson EG (1994): The role of lymphocytes in the progression of interstitial disease. *Kidney Int Suppl* 45, 106-110.
- Strutz F, Zeisberg M (2006): Renal fibroblasts and myofibroblasts in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 17, 2992-2998.
- Strutz F, Okada H, Lo CW, Danoff T, Carone RL, Tomaszewski JE, Neilson EG (1995): Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J Cell Biol* 130, 393-405.
- Sugimoto H, Grahovac G, Zeisberg M, Kalluri R (2007): Renal fibrosis and glomerulosclerosis in a new mouse model of diabetic nephropathy and its regression by bone morphogenic protein-7 and advanced glycation end product inhibitors. *Diabetes* 56, 1825-1833.
- Tampe B: Die Rolle der Bone Morphogenetic Proteine (BMP) -5 und -7 in der humanen Normalniere und bei der hypertensiven Nephropathie. Med. Diss. Göttingen 2011.
- Teng Y, Kanasaki K, Bardeesy N, Sugimoto H, Kalluri R (2011): Deletion of Smad4 in fibroblasts leads to defective chondrocyte maturation and cartilage production in a TGF β type II receptor independent manner. *Biochem Biophys Res Commun* 22, 633-639.
- Tilleman H, Hakim V, Novikov O, Liser K, Nashelsky L, Di Salvio M, Krauthammer M, Scheffner O, Maor I, Mayseless O, Meir I, Kayam G, Sela-Donenfeld D, Simeone A, Brodski C (2010): Bmp5/7 in concert with the mid-hindbrain organizer control development of noradrenergic locus coeruleus neurons. *Mol Cell Neurosci* 45, 1-11.
- Urist MR (1965): Bone: Formation by autoinduction. *Science* 150, 893-899.
- Varga AC, Wrana JL (2005): The disparate role of BMP in stem cell biology. *Oncogene* 29, 5713-5721.

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

Virtanen S, Alarmo EL, Sandström S, Ampuja M, Kallioniemi A (2011): Bone morphogenetic protein -4 and -5 in pancreatic cancer-novel bidirectional players. *Exp Cell Res* 10, 2136-2146.

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

Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T, Israel DI, Hewick RM, Kerns KM, LaPan P, Luxenberg DP, McQuaid D, Moutsatsos IK, Nove J, Wozney JM (1990): Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci* 87, 2220-2224.

Wang L, Park P, Zhang H, La Marca F, Claeson A, Than K, Rahman S, Lin CY (2012): BMP-2 inhibits tumor growth of human renal cell carcinoma and induces bone formation. *Int J Cancer* 131, 1941-1950.

Wang Q, Zhao G, Xing S, Zhang L, Yang X (2011): Role of bone morphogenetic proteins in form-deprivation myopia sclera. *Mol Vis* 8, 647-657.

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

Watabe T, Miyazono K (2009): Roles of TGF- β family signaling in stem cell renewal and differentiation. *Cell Res* 19, 103-115.

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

Wolf G (1998): Link between angiotensin II and TGF-beta in the kidney. *Miner Electrolyte Metab* 24, 174-180.

- 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, Neilson EG (1996): From converting enzyme inhibition to angiotensin II receptor blockade: New insight on angiotensin II receptor subtypes in the kidney. *Exp Nephrol* 4, 8-19.
- Wozney JM (1992): The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Dev* 32, 160-167.
- Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA (1988): Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities. *Science* 242, 1528-1534.
- Wynn TA (2008): Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 214, 199-210.
- Yan C, Grimm WA, Garner WL, Qin L, Travis T, Tan N, Han YP (2010): Epithelial to mesenchymal transition in human skin wound healing is induced by tumor necrosis factor-alpha through bone morphogenic protein-2. *Am J Pathol* 176, 2247-2258.
- Yang S, Pei L (2009): Influence of rhBMP-2 on the renal tissue of rat with renal ischemia reperfusion injury and its molecular mechanism. *Yao Xue Xue Bao* 44, 1089-1094.
- Yang YL, Liu YS, Chuang LY, Guh JY, Lee TC, Liao T, Hung MY, Chiang TA (2009): Bone Morphogenetic Protein-2 antagonizes renal interstitial fibrosis by promoting catabolism of type I Transforming Growth Factor- β receptors. *Endocrinology* 150, 727-740.
- Yeh LCM, Lee JC (2002): Differential effects of osteogenic protein-1 (BMP-7) on gene expression of BMP and GDF family members during differentiation on the mouse MC615 chondrocyte cells. *J Cell Phys* 191, 298-309.
- Zeisberg M (2006): Bone morphogenic protein-7 and the kidney: current concepts and open questions. *Nephrol Dial Transplant* 21, 568-573.
- Zeisberg M, Kalluri R (2004): The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis. *J Mol Med* 82, 175-181.

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

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

Zhang H, Bradley A (1996): Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. *Development* 122, 2977-2986.

Zhang M, Zhou SH, Zhao SP, Liu QM, Li XP, Shen XQ (2008): Irbesartan attenuates Ang II-induced BMP-2 expression in human umbilical vein endothelial cells. *Vasc Med* 13, 239-245.

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

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

Zucchelli P, Zuccala A (1993): The diagnostic dilemma of hypertensive nephrosclerosis: the nephrologist's view. *Am J Kidney Dis* 21, 87-91

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. G. A. Müller danke ich für die Möglichkeit, in seiner Abteilung Nephrologie und Rheumatologie zu promovieren. Herrn Prof. Dr. med. F. Strutz danke ich für die Begleitung und zahlreichen Diskussionsmöglichkeiten.

Ferner möchte ich meinem Doktorvater PD Dr. med. C. Bramlage für die Überlassung des Themas und die intensive Betreuung meiner Promotion danken.

Den medizinisch-technischen Assistentinnen Swantje Wehn und Christina Stanischa danke ich für die hervorragende Einarbeitung und ihre unerschütterliche Geduld.