

Aus der Klinik für Nephrologie und Rheumatologie

(Prof. Dr. med. M. Zeisberg)

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Sezernierte Proteindisulfidisomerase ERp57 als potenziell profibrotischer Faktor in der Nierenschädigung

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Silvia Aufmkolk

aus

Arnsberg

Göttingen 2022

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in: Prof. Dr. rer. nat. H. Dihazi

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. rer. nat. B. Schwappach-Pignataro

Prüfungskommission

Referent/in: Prof. Dr. rer. nat. H. Dihazi

Ko-Referent/in:

Drittreferent/in:

Datum der mündlichen Prüfung:

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Sezernierte Proteindisulfidisomerase ERp57 als potentiell profibrotischer Faktor in der Nierenschädigung" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung	1
1.1 Nierenfibrose	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Ätiologie.....	1
1.1.3 Pathomechanismus.....	2
1.1.4 Therapie	5
1.2 EMT-Marker	6
1.2.1 Vimentin	6
1.2.2 Alpha-Smooth Muscle Actin.....	7
1.2.3 S100A4/FSP-1	7
1.2.4 Fibronectin.....	8
1.2.5 E-Cadherin	8
1.2.6 Integrin α V	10
1.3 Proteindisulfidisomerase ERp57.....	10
1.4 Ziel der Arbeit.....	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Material.....	16
2.1.1 Chemikalien	16
2.1.2 Antikörper	19
2.1.3 Primer.....	19
2.1.4 Kits.....	20
2.1.5 Zusammensetzung selbst hergestellter Lösungen und Puffer.....	21
2.1.6 Verbrauchsmaterial	23
2.1.7 Geräte	25
2.1.8 Wissenschaftliche Softwares	26
2.2 Methoden.....	27
2.2.1 Zellkultur	27
2.2.2 ERp57-Behandlung.....	29
2.2.3 Probengewinnung.....	29
2.2.4 Proteinextraktion aus Zellüberständen	30
2.2.5 MTT-Test	31
2.2.6 Annexin V-Test	32
2.2.7 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung.....	34
2.2.8 Gewinnung der Proteine	35

2.2.9	Proteinbestimmung nach Bradford.....	35
2.2.10	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	36
2.2.11	Western Blot.....	37
2.2.12	RNA-Isolation, cDNA-Synthese und qPCR.....	38
3	Ergebnisse.....	43
3.1	Einfluss von sERp57 auf die Zellviabilität.....	43
3.2	Apoptose-Aktivität.....	45
3.3	Einfluss von sERp57 auf das Intermediärfilament Vimentin.....	47
3.4	Einfluss von sERp57 auf E-Cadherin.....	53
3.5	Inkonsistente Fibronectinexpression.....	57
3.6	Expression von Alpha-Smooth Muscle Actin.....	58
3.7	Regulation auf Genebene.....	59
3.8	Behandlung mit latentem TGF- β 1 und ERp57.....	61
4	Diskussion.....	65
4.1	ERp57-Behandlung nimmt Einfluss auf Vimentin.....	65
4.2	ERp57-Behandlung beeinflusst die E-Cadherin-Funktion.....	66
4.3	Alpha-Smooth Muscle Actin-Expression in Kontrollzellen.....	68
4.4	Profibrotischer Einfluss von TGF- β 1.....	68
4.5	Kritische Betrachtung der Methoden und Auswertungen.....	69
4.5.1	Fehlende Positiv-Kontrolle.....	69
4.5.2	MDCK- und TK173-Zellen unter FCS-freien Bedingungen.....	70
4.5.3	Auswertung der Western Blots.....	70
4.5.4	Ungenauigkeit der ddCT-Methode.....	71
5	Zusammenfassung.....	72
6	Literaturverzeichnis.....	74

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die EMT in vier Schritten	3
Abbildung 2: TGF- β 1-Signalweg	5
Abbildung 3: 2D-Gel-Analyse von TK173- bzw. HK2-Übeständen	12
Abbildung 4: Fibronectin-Expression mit (unten) und ohne (oben) ERp57-Knockdown	13
Abbildung 5: Die Rolle von PDI in der Thrombozytenaggregation und -akkumulation.....	14
Abbildung 6: Befüllung der 96-Well-Platten für den MTT-Test	32
Abbildung 7: MTT-Test von HK2-Zellen	43
Abbildung 8: MTT-Test von MDCK-Zellen.....	44
Abbildung 9: MTT-Test von TK173-Zellen.....	44
Abbildung 10: Apoptose-Test der HK2-Zellen	46
Abbildung 11: Apoptose-Test der MDCK-Zellen.....	46
Abbildung 12: Apoptose-Test der TK173-Zellen.....	47
Abbildung 13: Indirekte Vimentin-Immunfluoreszenzfärbung von HK2-Zellen	48
Abbildung 14: Indirekte Vimentin-Immunfluoreszenzfärbung von MDCK-Zellen	48
Abbildung 15: Indirekte Vimentin-Immunfluoreszenzfärbung von TK173-Zellen	48
Abbildung 16: HK2 Vimentin-Western Blot	50
Abbildung 17: MDCK Vimentin-Western Blot	51
Abbildung 18: TK173 Vimentin-Western Blot	53
Abbildung 19: Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von MDCK-Zellen.....	54
Abbildung 20: Relativer Anteil der Zellen mit interzellulärem Kontaktverlust.....	55
Abbildung 21: MDCK E-Cadherin-Western Blot	57
Abbildung 22: Fibronectin-Western Blot.....	58
Abbildung 23: Alpha-Smooth Muscle Actin-Färbung von HK2-Zellen.....	58
Abbildung 24: Alpha-Smooth Muscle Actin-Färbung von MDCK Zellen	59
Abbildung 25: Alpha-Smooth Muscle Actin-Färbung von TK173-Zellen	59
Abbildung 26: Ergebnisse der qPCR-Analyse der HK2-Zellen.....	60
Abbildung 27: Ergebnisse der qPCR-Analyse der MDCK-Zellen	60
Abbildung 28: Ergebnisse der qPCR-Analyse der TK173-Zellen	61
Abbildung 29: MDCK E-Cadherin-Western Blot nach TGF- β 1-Behandlung	63
Abbildung 30: MDCK Fibronectin-Western Blot nach TGF- β 1-Behandlung.....	64

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien	16
Tabelle 2: Verwendete Antikörper.....	19
Tabelle 3: Verwendete Primer	19
Tabelle 4: Verwendete Kits.....	20
Tabelle 5: Zusammensetzung der Lösungen und Puffer	21
Tabelle 6: Verwendetes Verbrauchsmaterial	23
Tabelle 7: Verwendete Geräte	25
Tabelle 8: Verwendete wissenschaftliche Softwares	26
Tabelle 9: Schema zur Erstellung einer Eichkurve.....	36

Abkürzungsverzeichnis

BMP-7	<i>bone morphogenetic protein 7</i>
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
CKD	chronische Nierenerkrankung
Ct	<i>cycle threshold</i>
CTF	C-terminales Fragment
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol, Dihydro-chlorid
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dublecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC	extrazelluläre Cadherin-Wiederholungen
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERp	<i>endoplasmatic reticulum protein</i>
EZM	Extrazellulärmatrix
FCS	fetales Kälberserum
HK2	<i>human kidney-2</i>
LAP	latent-assoziiertes Protein
LTBP	<i>latent tgf-β binding protein</i>
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney</i>
MEM	Minimum Essential Medium
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Molekulargewicht
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDI	Proteindisulfidisomerase
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propodium-Iodid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SERCA	Calciumpumpe des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums
sERp57	sezerniertes ERp57

SLC *small latent complex*

TGF *transforming growth factor*

UPR *unfolded protein response*

α -SMA *Alpha-Smooth Muscle Actin*

1 Einleitung

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der sezernierten Proteindisulfidisomerase ERp57 (sERp57) und dem möglichen Einfluss von dieser auf die renale Fibrose. Die nächsten Abschnitte geben einen Überblick über das Krankheitsbild der Nierenfibrose und über bisherige Erkenntnisse zu ERp57 (*endoplasmatic reticulum protein 57*).

1.1 Nierenfibrose

Viele Menschen sind heutzutage von chronischen Nierenerkrankungen (CKD) betroffen, bei denen es oft im Verlauf zur renalen Fibrose kommt. Das heißt, es kommt zu einer progressiven Ansammlung von Extrazellulärmatrix (EZM) in den Glomeruli und im Interstitium (Nogueira et al. 2017). Vereinfacht kann man sagen, dass es sich bei der Nierenfibrose um eine fehlerhafte Wundheilung infolge einer chronischen Erkrankung handelt (Liu 2006).

1.1.1 Epidemiologie

Die Bedeutung von chronischen Nierenerkrankungen, welche eine geschätzte Prävalenz von weltweit acht bis 16 % haben, hat in den letzten Jahrzehnten zugenommen (Jha et al. 2013). Während chronische Nierenerkrankungen 1990 an 27. Stelle der weltweit häufigsten Todesursachen gelistet waren, belegten sie 2010 bereits Platz 18. Dies ergab die *Global Burden of Disease Study*, welche 2012 in *The Lancet* veröffentlicht wurde (Lozano et al. 2012). Im Jahr 2012 stellten sie schätzungsweise 1,5 % der weltweiten Todesursachen dar (Qi and Yang 2018).

1.1.2 Ätiologie

Die Nierenfibrose kann viele unterschiedliche Ursachen haben, hierzu gehören beispielsweise Diabetes mellitus, arterielle Hypertension oder auch entzündliche und infektiöse Erkrankungen der Niere. Diese Erkrankungen können letztendlich alle zur renalen Fibrose führen, wobei Diabetes mellitus weltweit gesehen die häufigste Ursache darstellt (Nogueira et al. 2017; Jha et al. 2013).

1.1.3 Pathomechanismus

Wird das Nierengewebe geschädigt, setzt ein Reparaturmechanismus ein. Diese Wundheilung kann außer Kontrolle geraten und es kommt zur erhöhten Synthese von Extrazellulärmatrix. Neben der erhöhten Extrazellulärmatrix-Synthese kommt es gleichzeitig zum verminderten Abbau der EZM, sodass ein Ungleichgewicht zwischen Synthese und Abbau herrscht (Nogueira et al. 2017). Es kommt vor allem zu Ansammlungen von Kollagen I und III sowie Fibronectin im interstitiellen Raum (Zeisberg and Neilson 2010). Die Entstehung der renalen Fibrose kann in drei Schritte unterteilt werden. Hierzu gehören die Induktions-, die Inflammations- sowie die Post-Inflammationsphase. Neben der Ausschüttung von Chemokinen, der Einwanderung von mononuklearen Zellen, Freisetzung profibrotischer Cytokine und Fibroblastenaktivierung/-proliferation, wird zur Induktionsphase ebenfalls der Prozess der Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) gezählt (Strutz and Neilson 2003).

Es gibt viele Hinweise, dass es in Verbindung mit einer Organfibrose zu derartigen Transitionen kommt. Während einer EMT verliert eine epitheliale Zelle ihre Zellpolarität und nimmt einen mesenchymalen Phänotyp an, der es ihr erlaubt, reichlich EZM zu produzieren. Um eine EMT nachzuweisen, konnten verschiedene Marker ausfindig gemacht werden. Hierzu gehören zum einen cytoplasmatische und extrazelluläre Proteine, deren Expression im Rahmen der EMT zunehmen und zum anderen epitheliale Proteine, bei denen die Expression infolge abnimmt. Vimentin, Alpha-Smooth Muscle Actin (α -SMA), Kollagen I und S100A4 sind nur wenige Beispiele der hochregulierten Proteine. Zellkontakte wie E-Cadherin werden hingegen abgebaut (Kalluri and Weinberg 2009). Genau genommen handelt es sich aber meist nicht um eine vollständige Transition, sondern um eine partielle EMT. Das bedeutet, es werden sowohl epitheliale als auch mesenchymale Marker exprimiert, sodass die Zelle phänotypisch nicht gänzlich den Myofibroblasten zuzuordnen ist. Aber auch die partielle Transition führt zur Beeinträchtigung der normalen Zellfunktionen und führt zur Freisetzung von Cytokinen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die transformierenden Zellen in der G2-Phase des Zellzyklus verharren, sodass hierdurch das Reparations- und Regenerationsvermögen eingeschränkt wird (Lovisa et al. 2015; Zhou and Liu 2016).

Bei Myofibroblasten handelt es sich um veränderte Fibroblasten, die die Fähigkeit der Kontraktion besitzen und α -SMA exprimieren, sodass sie den glatten Muskelzellen ähneln (Meister 1998). Nach einem Gewebeschaden kommt es zur Differenzierung dieses Zelltyps, welcher eine Rolle in der Reparatur geschädigten Gewebes, aber auch im Rahmen tumoröser

Prozesse spielt (Hinz et al. 2007). Man geht davon aus, dass die Myofibroblasten einen Großteil der Matrix sezernieren (Humphreys 2018). Bezüglich der Herkunft von Myofibroblasten gibt es neben der EMT weitere Ursprünge: So wurden als mögliche Ursprungszellen nicht nur epitheliale Zellen, sondern auch residente Fibroblasten, aus dem Knochenmark stammende Fibroblasten, endotheliale Zellen und Perizyten ausfindig gemacht (Lovisa et al. 2016).

Nicht alle Zellen, die profibrotischen Bedingungen ausgesetzt sind, transformieren in der Folge. Kommt es beispielsweise durch den Einfluss vom *transforming growth factor β 1* (TGF- β 1), einem der bisher wichtigsten bekannten Initiatoren der EMT, zur Aktivierung der epithelialen Zellen, scheinen diese entweder Apoptose zu begehen oder sie transformieren zu mesenchymalen Zellen. Beide Wege führen aber bezüglich der Nierenfibrose letztendlich zum Funktionsverlust des renalen Tubulussystems (Zeisberg and Kalluri 2004).

Eine Arbeit von Yang und Liu (2001) stellt die EMT in vier großen Schritten dar, welche nacheinander ablaufen. Hierzu gehört der Verlust von Zelladhäsionen, die Synthese von α -SMA mitsamt einer Restrukturierung des Aktins, die Zerstörung der Basalmembran und die erhöhte Zellmigration und -invasion, was in Abbildung 1 zu sehen ist.

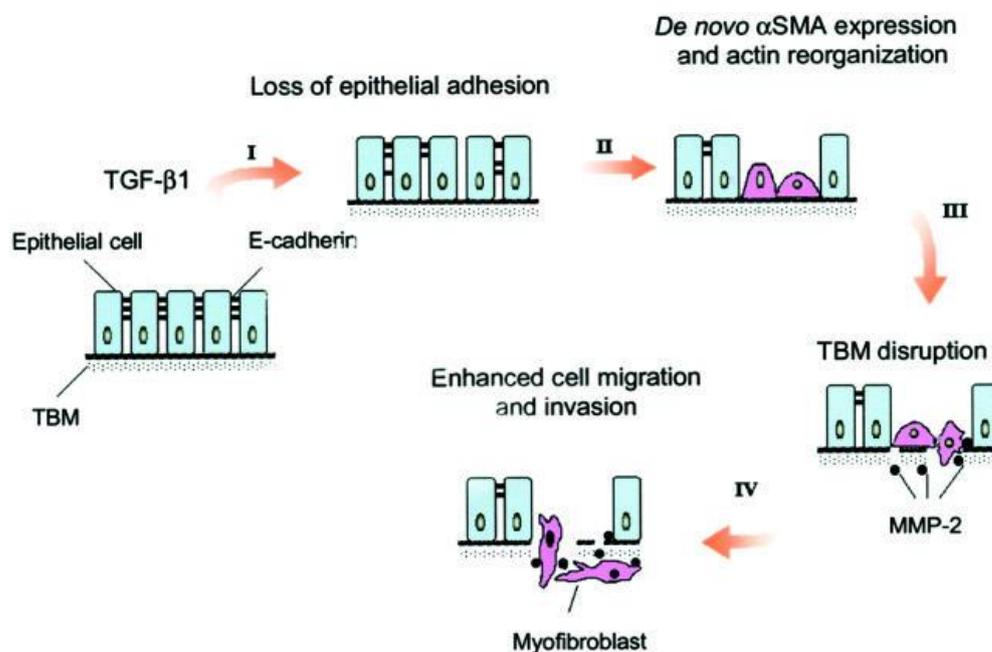


Abbildung 1: Die EMT in vier Schritten (Yang and Liu 2001). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung vom Elsevier Verlag.

Nicht nur in Bezug auf die Organfibrose gibt es Hinweise, dass die EMT eine große Rolle spielt. Zu ähnlichen Prozessen kommt es im Rahmen der Wundheilung und der Geweberegeneration. Während die EMT im Rahmen dieser drei Prozesse (Fibrose, Wundheilung, Geweberegeneration) als Typ 2 bezeichnet wird, sind daneben noch die EMT Typ 1 (Implantation, Embryogenese und Organentwicklung) sowie Typ 3 (maligne Prozesse) bekannt (Kalluri and Weinberg 2009).

1.1.3.1 Die Rolle von Cytokinen in der Nierenfibrose

Eine große Bedeutung im Rahmen der Fibrose kommt den Cytokinen zu. In der Induktionsphase der Fibrose kommt es beispielsweise zur Ansammlung von einkernigen Zellen, welche durch die Ausschüttung verschiedener Cytokine und schließlich Chemokine veranlasst wird.

Zu den wichtigen proinflammatorischen Cytokinen gehören zum Beispiel Interleukin-1 und der Tumornekrosefaktor- α , welche meist vermehrt bei glomerulär-entzündlichen Prozessen anzutreffen sind (Strutz and Neilson 2003).

Zu den bisher relevantesten Cytokinen in der renalen Fibrose zählt außerdem der Transforming Growth Factor β , welcher im Folgenden näher betrachtet werden soll. Bei der TGF- β -Familie handelt es sich um eine Gruppe von Cytokinen. Säuger exprimieren drei Isoformen dieser Familie: TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3. Diese haben u.a. eine große Bedeutung in der Embryogenese, im Wachstum, bei Entzündungsprozessen und Reparaturmechanismen (Clark and Coker 1998).

In der Organfibrose spielt besonders TGF- β 1 eine große Rolle, so auch in der Nierenfibrose. Zunächst liegt TGF- β 1 aber durch die Bindung an das latent-assoziierte Protein (LAP) als latenter Komplex vor (Meng et al. 2015). Es wird als großer latenter Komplex sezerniert, welcher aus dem TGF- β 1-Dimer, dem latent-assoziierten Protein (LAP) und dem *latent tgf- β binding protein* (LTBP) besteht. Der Komplex aus LAP und TGF- β 1-Dimer wird auch als *small latent complex* (SLC) bezeichnet. Um TGF- β 1 zu aktivieren, muss die Verbindung zum LAP aufgehoben werden. Hierzu sind bereits verschiedene Möglichkeiten bekannt. Zum Beispiel konnte TGF- β 1 in der Zellkultur durch verschiedene Integrine aktiviert werden, aber auch pH-Änderungen oder Hitze scheinen eine Aktivierung von latentem TGF- β 1 initiieren zu können (Fontana et al. 2005). Ist das TGF- β 1 nun von seinem Komplex gelöst und damit aktiviert, kann es an den TGF- β -Rezeptor Typ-II binden. Hierdurch wird die Phosphorylierung des TGF- β -Rezeptors Typ-I ausgelöst und es bildet sich ein heterodimerer Rezeptor. Anschließend kommt es im Cytoplasma zur Phosphorylierung der Proteine SMAD2 und

SMAD3, welche dann zusammen mit SMAD4 als Komplex in den Zellkern eindringen können. Dort nehmen sie Einfluss auf Transkriptionsfaktoren und regulieren so die Synthese verschiedener Proteine (Hayashi and Sakai 2012). Dieser Signalweg ist in Abbildung 2 dargestellt.

Die Aktivität von TGF- β 1 kann also nicht nur durch eine gesteigerte Synthese erhöht werden, sondern auch durch eine gesteigerte Aktivierung des latenten TGF- β 1 (Liu 2006). Über diesen beschriebenen SMAD2/SMAD3-abhängigen Signalweg kann TGF- β 1 eine EMT auslösen (Kalluri and Weinberg 2009).

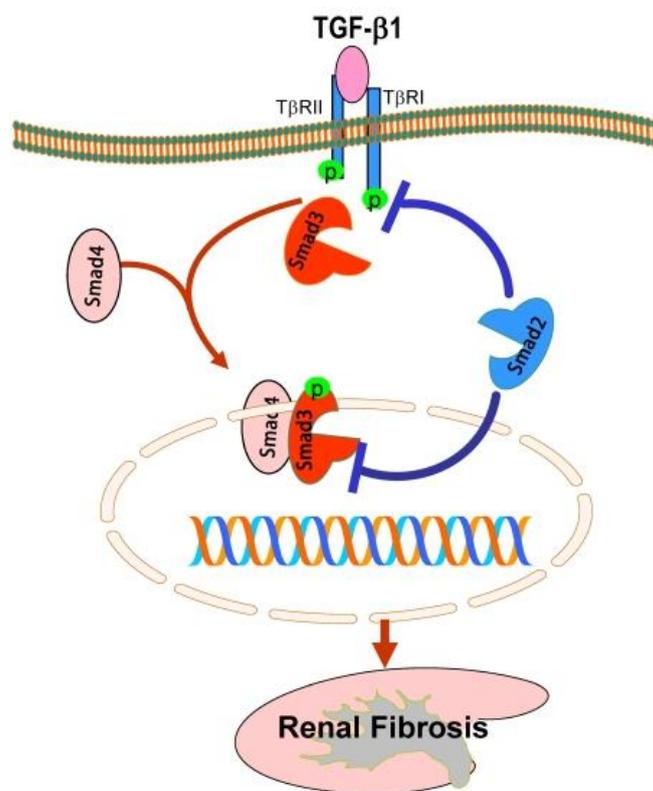


Abbildung 2: TGF- β 1-Signalweg (Lan 2011). CC BY-NC-ND 3.0

1.1.4 Therapie

Die chronischen Nierenerkrankungen zeigen einen progressiven Verlauf, sodass es schließlich zum Nierenversagen kommt, was die Dialyse bzw. eine Nierentransplantation lebensnotwendig macht (Liu 2006). Bisher war es klinisch nicht möglich, eine Nierenfibrose zu

heilen. Auch das Aufhalten der Erkrankung konnte in den letzten Jahren kaum Erfolge bringen. Es gibt aber erste Therapieansätze, die erfolgsversprechend erscheinen. Im Labor gab es schon erfolgreiche Versuche die Nierenfibrose zu stoppen, indem beispielsweise am TGF- β 1-Signalweg angegriffen wurde, was klinisch aber noch keinen Durchbruch bringen konnte (Shihab 2007). Hierbei scheinen vor allem die anti-inflammatorischen Eigenschaften des TGF- β , die es neben den profibrotischen Eigenschaften besitzt, ein Problem darzustellen (Liu 2006). Auch der Angriff am Integrin α v β 6, welches die Fähigkeit besitzt, TGF- β zu aktivieren, scheint ein vielversprechender Ansatz zu sein. Einen Vorteil gegenüber dem direkten Eingriff am TGF- β erhofft man sich dadurch, dass dieses Integrin hauptsächlich in geschädigtem Gewebe vorkommt und so auch hauptsächlich dort eingegriffen wird (Hahm et al. 2007).

1.2 EMT-Marker

Wie zuvor bereits erwähnt, gibt es zum einen Marker für mesenchymale Zellen z.B. S100A4 und zum anderen für epitheliale Zellen wie das E-Cadherin (Kalluri and Weinberg 2009). Auf einige dieser Marker soll im Folgenden näher eingegangen werden, da sie auch in der vorliegenden Arbeit genutzt wurden.

1.2.1 Vimentin

Das Protein Vimentin gehört zu den Typ III-Intermediärfilamenten. Intermediärfilamente machen einen Hauptbestandteil des Cytoskeletts aus und sind in nahezu allen Zellen von Wirbeltieren zu finden. Neben dem Cytoplasma kommen Intermediärfilamente auch im Zellkern vor, wo sie einen Bestandteil des Kernskeletts darstellen (Eriksson et al. 2009). Im Cytoplasma sind Intermediärfilamente v.a. perinukleär anzutreffen und scheinen so den Zellkern in seiner Position zu halten. Besonders in Zellmembranregionen mit Zellkontakten gibt es Anzeichen dafür, dass die Intermediärfilamente dort Kontakt zur Zelloberfläche haben und so möglicherweise Zellkern und Zelloberfläche verbinden. Sie scheinen also einen Einfluss auf Zellintegrität und Zellform zu besitzen (Goldmann et al. 1996). Das Typ III-Intermediärfilament Vimentin zählt zu den mesenchymalen Markern und scheint auch als Marker für eine EMT geeignet zu sein (Kalluri and Weinberg 2009).

In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass mehrere Vimentin-Formen existieren, welche laut den Untersuchungen von Buchmaier et al. (2013) unabhängig voneinander reguliert

werden können. Insgesamt konnten vier Formen aufgefunden gemacht werden, welche als Vimentin I bis IV bezeichnet werden. In der Nomenklatur handelt es sich bei Vimentin I (46kDa) um die Form mit dem geringsten Molekulargewicht (MW), gefolgt von Vimentin II (48kDa), Vimentin III (50kDa) und schließlich Vimentin IV (54kDa), welches das höchste MW vorweist. Die Expression dieser Formen kann durch osmotischen Stress reguliert werden. Es gibt außerdem Anzeichen dafür, dass die Vimentin-Formen mit dem höheren MW eine Rolle bei der Abwehr von pro-apoptotischen Einflüssen spielen. Sie werden in der Zellkultur nach Apoptoseinduktion vermehrt exprimiert (Buchmaier et al. 2013).

Eine andere Arbeit aus dem Jahr 2001 zeigt dagegen, dass Vimentin durch verschiedene Caspasen in andere Formen aufgespalten wird. Hier wurde beispielsweise die Aufspaltung von einem 57kDa-Protein in die 48kDa Form durch Aktivität der Caspase 3 beschrieben. Diese Spaltung scheint bei der Apoptose-Induktion eine Rolle zu spielen (Byun et al. 2001).

1.2.2 Alpha-Smooth Muscle Actin

Ein weiterer der drei Hauptbestandteile des inneren eukaryotischen Cytoskeletts sind die Aktin-Mikrofilamente, welche der Zelle Beweglichkeit verleihen. Die Aktine können in drei große Klassen eingeteilt werden: α -, β und γ -Isoformen. Der größte Anteil der Aktine ist im Cytoplasma zu finden, aber zum Teil ist es auch im Zellkern lokalisiert. Während quergestreifte Muskeln die größten Mengen an Aktin vorweisen, kommt es auch in „Nicht-Muskelzellen“ vor, wo es unter anderem an verschiedenen Transportvorgängen beteiligt ist (dos Remedios et al. 2003). Insgesamt sind bei Säugern sechs verschiedene Isoformen mit unterschiedlichen Funktionen bekannt, darunter das alpha-Smooth Muscle Actin (Perrin and Ervasti 2010). Im gesunden Nierengewebe ist α -SMA nur in den glatten Muskelzellen der Gefäße zu finden. Im Rahmen verschiedener Nierenerkrankungen exprimieren aber auch andere Zelltypen dieses Protein und differenzieren sich zu Myofibroblasten (Badid et al. 2001). Alpha-Smooth Muscle Actin stellt einen der wichtigsten Marker für die Myofibroblasten dar (Humphreys 2018). Durch eine erhöhte Expression von α -SMA scheinen Zellen eine erhöhte Kontraktilität zu besitzen, was in einer Arbeit von Hinz et al. (2001) untersucht wurde.

1.2.3 S100A4/FSP-1

S100A4, auch als Fibroblasten-spezifisches Protein 1 (FSP-1) bekannt, gehört zur S100-Familie. Es besteht aus 101 Aminosäuren und besitzt eine Größe von etwa 11,5kDa (Boye and Maelandsmo 2010). Bei den S100-Proteinen handelt es sich um Ca^{2+} -bindende Proteine.

S100A4 hat unterschiedliche Funktionen und existiert sowohl im Zellinneren, dort eher als Dimer, als auch extrazellulär, wo es vermutlich eher als Oligomer parakrin fungiert. Die S100-Proteine scheinen keine eigene enzymatische Aktivität zu besitzen, sondern üben ihre Funktion über die Aktivitätsregulation ihrer Bindungspartner aus.

Zum einen wird S100A4 als Marker für Fibroblasten angesehen und zum anderen auch als Marker für eine EMT bei epithelialen Zellen. Bezüglich der renalen Fibrose konnte die Expression von S100A4 in vivo bei renalen Tubuluszellen im Rahmen einer EMT nachgewiesen werden (Schneider et al. 2008). Während diese EMT, und damit der Anstieg von S100A4, beispielsweise durch TGF- β 1 initiiert werden kann, zeigt eine Arbeit von Zeisberg et al. (2003), dass dieser Anstieg durch die Behandlung von Zellen mit dem bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) rückgängig gemacht werden kann.

Eine große Rolle spielt S100A4 außerdem im Rahmen von Tumorerkrankungen, vor allem bezüglich der Metastasierung. So gibt es viele Hinweise dafür, dass das Protein hier durch Eingriffe in Prozesse, wie Migration und Angiogenese, Einfluss nimmt (Boye and Maelandsmo 2010).

1.2.4 Fibronektin

Fibronektin ist ein Glykoprotein und liegt meist als Dimer vor, welches aus zwei durch Disulfidbrücken miteinander verbundenen, 250kDa-großen Untereinheiten besteht. Es gibt verschiedene Isoformen, die durch alternatives Splicen alle aus demselben Gen hervorgehen. Fibronektin existiert in zwei Formen: In der löslichen Plasma-Form und in der weniger löslichen zellulären Form (Pankov and Yamada 2002). Während die Plasma-Form von Hepatozyten synthetisiert wird, kann das zelluläre Fibronektin von verschiedenen Zellen synthetisiert werden, so zum Beispiel von Endothelzellen, Fibroblasten und Myozyten (To und Midwood 2011). Als Bestandteil der Extrazellulärmatrix hat Fibronektin verschiedene Funktionen. So spielt es beispielsweise eine Rolle in der Wundheilung und Blutstillung (Potts and Campbell 1996). Wie zuvor bereits beschrieben, kommt es im Rahmen einer Fibrose zu einer verstärkten Ansammlung von EZM, wo es neben Kollagen auch zu einer verstärkten Ablagerung von Fibronektin kommt (To und Midwood 2011).

1.2.5 E-Cadherin

E-Cadherin gehört zur Familie der Cadherine, welche klassischerweise Transmembranmoleküle darstellen und calciumabhängige Zell-Zell-Kontakte bilden. Cadherine spielen aber

nicht nur eine Rolle als Adhäsionsmoleküle, sondern können neben Zellmigration auch Morphogenese und das Cytoskelett beeinflussen (Angst et al. 2001). Man kann die Cadherine in verschiedene Gruppen einteilen, darunter die klassischen Cadherine, zu denen das E-Cadherin zählt. Weitere Gruppen sind die desmosomalen Cadherine, die atypischen Cadherine, die Protocadherine und die Cadherin-ähnlichen Proteine. E-Cadherin, was für epitheliales Cadherin steht, wird vor allem in epithelialen Zellen exprimiert. Zusammen mit den Zonula adherens helfen die E-Cadherine bei der Bildung einer polarisierten, dichten Zellschicht. Die klassischen Cadherine bilden Homodimere und haben neben dem transmembranösen Teil einen intra- und extrazellulären Teil. Der intrazelluläre Teil bildet einen Komplex mit p120 und β -Catenin, was wiederum mit α -Catenin in Verbindung steht. Das α -Catenin kann eine Verbindung zum Cytoskelett der Zelle herstellen. Der extrazelluläre Teil der klassischen Cadherine besteht aus fünf extrazellulären Cadherin-Wiederholungen (EC), welche über Calcium-Bindungen miteinander verbunden sind (Gumbiner 2005). Im Rahmen der interzellulären Bindung der klassischen Cadherine zweier benachbarter Zellen handelt es sich meist um homophile Bindungen, was bedeutet, dass eine Zelle mit einer Zelle der gleichen Cadherin-Form interagiert (Boggon et al. 2002). Für diese homophilen Adhäsionen scheint besonders die EC1 eine wichtige Rolle zu spielen (van Roy and Berx 2008). Bezüglich des genauen Aufbaus der Bindungen zwischen den Cadherinen gibt es verschiedene Modelle. Es gibt Hinweise darauf, dass es bezüglich der Cadherine einen ähnlichen Regulationsmechanismus gibt, wie er bei den Integrinen als so genanntes *inside-out signaling* bekannt ist. Hierbei kommt es durch die Bindung von Talin an den cytoplasmatischen Teil des Integrins zu einer extrazellulären Konformationsänderung und damit zu einer Änderung der Affinität zu Bestandteilen der EZM (Gumbiner 2005). Es gibt Hinweise dafür, dass die cytoplasmatische Region des E-Cadherins, welche für die Bindung zu β -Catenin besonders wichtig ist, starke Phosphorylierungen aufweist. Ferner scheinen diese Phosphorylierungen Einfluss auf die Bindung von E-Cadherin zu β -Catenin zu nehmen und so auch die Zell-Zell-Adhäsionen zu beeinflussen. In vitro konnte nachgewiesen werden, dass die Bindung von β -Catenin und E-Cadherin durch die Phosphorylierungen verstärkt wird (Lickert et al. 2000).

Im Rahmen einer Epithelial-mesenchymalen Transition kommt es zur Abnahme der E-Cadherin Expression (Zeisberg and Neilson 2009).

1.2.6 Integrin αV

Integrine sind heterodimere Transmembran-Glykoproteine, welche die EZM mit dem Cytoplasma verbinden. Sie bestehen aus α - und β -Untereinheiten. Die Integrine können in drei große Gruppen eingeteilt werden: Kollagen-, Laminin- und Arginin-Glycin-Asparaginsäure-bindende Rezeptoren. Neben der Stabilisierung der EZM-Zell-Bindung haben Integrine beispielsweise Einfluss auf Proliferation, Migration und Zelldifferenzierung und haben so auch in Bezug auf renale Schädigungen eine große Bedeutung. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich hauptsächlich mit dem Arginin-Glycin-Asparaginsäure-bindenden Integrinen. Das Integrin $\alpha\beta 6$ besitzt die Fähigkeit, TGF- β zu aktivieren. Somit führt es zu einer erhöhten Menge an aktivem TGF- β und nimmt Einfluss auf die Fibrose. Im Gegensatz dazu senkt das ebenfalls zu den Arginin-Glycin-Asparaginsäure-bindenden Rezeptoren gehörende Integrin $\alpha\beta 8$ die Konzentration von aktivem TGF- β (Pozzi and Zent 2013). Integrin $\alpha\beta 6$ wird in der Niere hauptsächlich auf epithelialen Zellen exprimiert, wobei es im gesunden Nierengewebe nur in geringen Mengen vorhanden ist. Kommt es zur Nierenerkrankung, steigt die Konzentration. Während zuvor bereits erwähnt wurde, dass Integrin $\alpha\beta 6$ TGF- β aktivieren kann, konnte in der Zellkultur auch gezeigt werden, dass TGF- β wiederum die Expression von Integrin $\alpha\beta 6$ fördert. Im Mausmodell konnte durch das Blockieren des Integrin $\alpha\beta 6$ -Rezeptors ein potentieller Nutzen bezüglich der renalen Fibrose demonstriert werden (Hahm et al. 2007). Auch eine Arbeit von Henderson et al. (2013) gibt vielversprechende Hinweise darauf, dass der Angriff am Integrin- αV ein möglicher Behandlungsansatz in der Fibrose sein könnte. So zeigte sich bei Zellen von Mäusen mit Myofibroblasten-spezifischer Integrin αV -Deletion eine Hemmung der Fibrose. Dies konnte neben der Niere auch in der Leber und Lunge beobachtet werden. In Leber und Lunge konnte auch der Einsatz eines Antagonisten für Integrin- αV diesen vielversprechenden Ansatzpunkt untermauern.

1.3 Proteindisulfidisomerase ERp57

Bei ERp57 handelt es sich um ein Mitglied der Familie der Proteindisulfidisomerasen (PDI), die hauptsächlich im endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert sind. Dort übernimmt ERp57 beispielsweise die Aufgabe der Faltung von neu synthetisierten Glykoproteinen, bevor diese das ER verlassen. Das ERp57-codierende humane Gen ist als PDIA3 bekannt. Die Mitglieder der Proteindisulfidisomerase-Familie ähneln strukturell den Thioredoxinen, zeigen aber eine deutlich höhere Komplexität, welche ihnen weitere Funktionen ermöglicht. Die bisher bekannteste Proteindisulfidisomerase ist PDI (Turano et al. 2011). Zu dieser kann

ERp57 mit 33% identischen Aminosäuresequenzen die meisten Übereinstimmungen vorweisen. Beide Enzyme können Reduktionen, Isomerisierungen und Oxidationen katalysieren, wobei PDI bezüglich der Reduktion und Isomerisierung *in vitro* eine höhere Effizienz zeigt (Frickel et al. 2004). ERp57 besteht aus 4 Domänen (a, b, b', a'), wobei die b'-Domäne die größten Unterschiede zwischen PDI und ERp57 vorweist. Aus dieser Domäne resultiert auch die Bindung von ERp57 zu Calretikulin und Calnexin, welche bei PDI nicht vorhanden ist, aber für die Aktivität von ERp57 essenziell ist. Während also über die b'-Domäne und zum Teil auch über die b-Domäne eine Bindung zu Calretikulin/Calnexin besteht, können die a- und a'-Domäne die Isomerase-Aktivität ausüben.

Neben der Faltung von Glykoproteinen assoziiert ERp57 beispielsweise auch mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-I, wodurch es am strukturellen Aufbau dieser MHC-Moleküle beteiligt ist und zum anderen katalytische Funktionen übernimmt (Turano et al. 2011).

Des Weiteren gab es in der Vergangenheit Hinweise darauf, dass ERp57 Einfluss auf die Calciumpumpe des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums (SERCA) 2b hat und dadurch die Frequenz der SERCA 2b-bedingten Calciumkonzentrationsschwankungen reduziert (Li and Camacho 2004).

Man findet ERp57 nicht ausschließlich im ER, sondern auch im Cytoplasma, an der Zelloberfläche, im Kern und in den Mitochondrien, wo es verschiedene Funktionen übernimmt (Turano et al. 2011).

ERp57 gilt als ER-Stressprotein, es konnte nach profibrotischer TGF- β 1-Behandlung von Fibroblasten vermehrt nachgewiesen werden (Dihazi et al. 2013). ER-Stress bedeutet, dass sich viele ungefaltete Proteine im ER ansammeln, wodurch es zur *unfolded protein response* (UPR) kommt. Ziel dieser Antwort ist es, das ER wieder in seinen normalen Zustand zu bringen. Um dieses Ziel zu erreichen, werden vermehrt Proteine exprimiert, die wiederum bei der Faltung von Proteinen sowie bei der Beseitigung von fehlgefalteten Proteinen beteiligt sind, hierzu gehört u.a. ERp57 (Xu et al. 2005). Ein Hinweis auf die Relevanz von ER-Stress-Proteinen bezüglich der Nierenfibrose konnte durch die proportional zum Fibrosestadium ansteigenden Stressproteine, inklusive ERp57, in Proteinextrakten von Mäuse-Nieren gewonnen werden. Im Milieu des Extrazellulärraums kommt es oft zur Schädigung der Disulfidbrücken von EZM-Proteinen, weshalb die Vermutung besteht, dass es hier Proteine gibt, die davor schützen. Diese Hypothese von Dihazi et al. (2013) wird durch die Ergebnisse

der Behandlung von Fibroblasten sowie proximalen Tubuluszellen mit profibrotischen Cytokinen gestützt. Hier zeigte sich, wie in Abbildung 3 zu sehen ist, eine vermehrte Sekretion von ERp57 in den Überstand, was vermuten lässt, dass ERp57 einen Einfluss auf die EZM-Proteine besitzt. Es konnte außerdem festgestellt werden, dass die sezernierte Form eine veränderte Struktur zeigt.

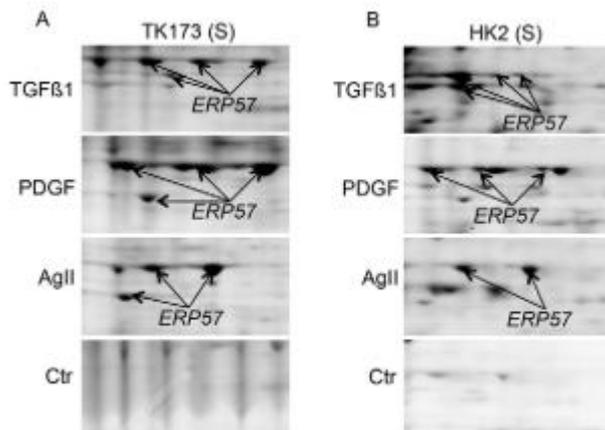


Abbildung 3: 2D-Gel-Analyse von TK173- bzw. HK2-Überständen nach Behandlung mit verschiedenen profibrotischen Cytokinen (Dihazi et al. 2013). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung vom *The Company of Biologists* Verlag.

Diese Ergebnisse deuten das mögliche Potential von sERp57 als Frühmarker der renalen Fibrose an. Weitere Untersuchungen an Urinproben von Diabetes-Patienten zeigten, dass ERp57 ausschließlich im frühen Nephropathiestadium (in den ersten sieben Wochen) sezerniert wird und die Sekretion im fortgeschrittenen Stadium wieder abnimmt. Des Weiteren zeigt die Immunfluoreszenzfärbung von TK173-Zellen der Abbildung 4 eine deutlich geringere Fibronectin-Expression nach ERp57-knockdown, was wiederum die wichtige Rolle von ERp57 bezüglich der EZM-Proteine unterstreicht (Dihazi et al. 2013).

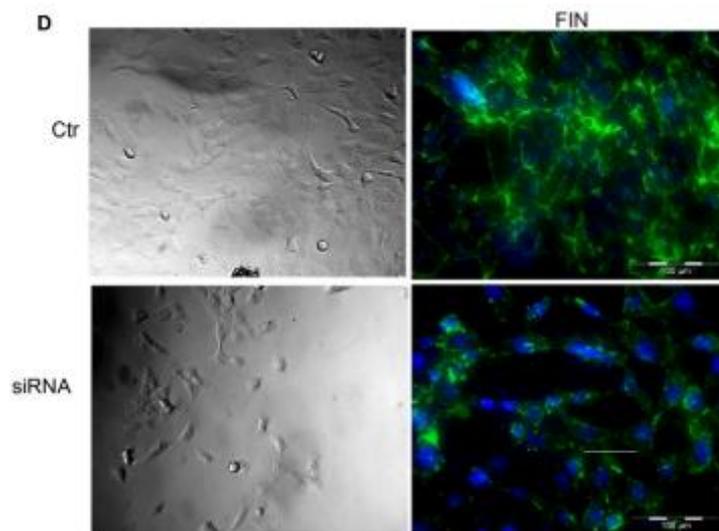


Abbildung 4: Fibronektin-Expression mit (unten) und ohne (oben) ERp57-Knockdown (Dihazi et al. 2013). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung vom *The Company of Biologists* Verlag.

Während diese Ergebnisse die ersten Ansätze für eine mögliche Relevanz von ERp57 bezüglich der Behandlung der Nierenfibrose darstellen, konnten in der Thrombosebehandlung bzw. -prävention schon erste in-vivo-Erfolge durch eine PDI-Hemmung erzielt werden (Jasuja et al. 2012). Neben dem PDI spielen auch ERp57 und ERp5 eine Rolle in der Plättchenaggregation. Es konnte gezeigt werden, dass ERp57 nach der Plättchenaktivierung sezerniert und auf der Thrombozytenoberfläche gebunden wird. Die Relevanz von diesem Plättchen-gebundenen ERp57 wird durch die beobachtete, verlängerte Schwanzblutungszeit bei Mäusen mit Plättchen-spezifischem-ERp57-Knockout unterstrichen. Es ergaben sich Hinweise, dass es weitere Quellen für ERp57 gibt, die nach kurzer Zeit das Defizit durch den Plättchen-spezifischen-ERp57-Knockout teilweise kompensieren können. Denkbar wären hier beispielsweise endotheliale Zellen, die ERp57 sezernieren. Vermutlich ist das ERp57 auf der Thrombozytenoberfläche in der Lage, Integrin α Ib β 3 zu aktivieren (Wang et al. 2013). Dieses α Ib β 3 kann dann die Thrombozytenansammlung fördern. Über einen ähnlichen Effekt scheint PDI die Thrombusbildung zu beeinflussen. Eine Studie mit Thrombozyten-spezifischen-PDI-Knockout-Mäusen und Laser-induzierten Gefäßverletzungen von Kim et al. deutet an, dass Thrombozyten-spezifisches PDI nicht essentiell für die initiale Thrombozytenaggregation ist, sondern für das Thrombuswachstum (Kim et al. 2013). Es

wird vermutet, dass das für diesen initialen Schritt benötigte PDI aus anderen intravaskulären Zellen stammt. Diese Zusammenhänge sind in Abbildung 5 dargestellt (Cho 2013).

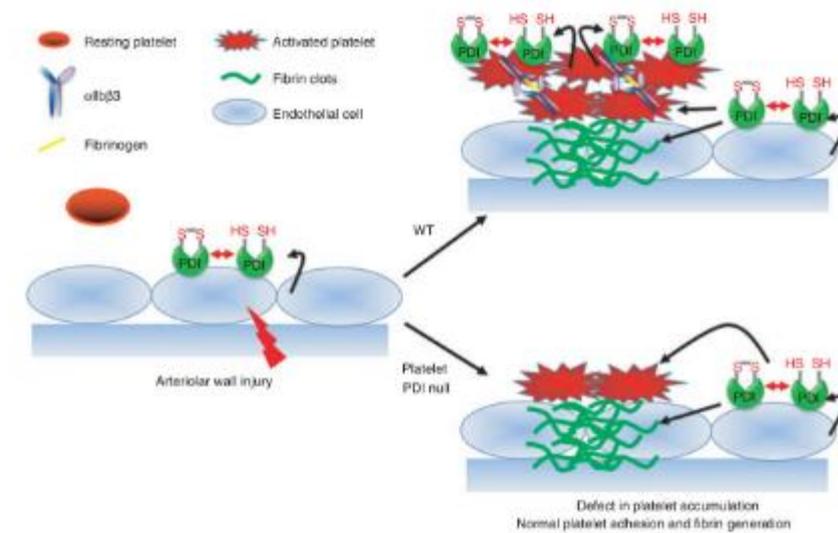


Abbildung 5: Die Rolle von PDI in der Thrombozytenaggregation und -akkumulation. Thrombozyten ohne *platelet-PDI* können keine weitere Plättchenakkumulation initiieren, die initiale Aggregation findet aber statt (Cho 2013). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung vom *John Wiley and Sons* Verlag.

Neben der Relevanz bezüglich der Organfibrose- und der Thromboseforschung könnte ERp57 möglicherweise außerdem eine Rolle in der Krebstherapie spielen. Trivedi et al. (2016) konnten eine Abnahme der ERp57-Expression in HL60-Zellen, Zellen der akuten myeloischen Leukämie, nach Shikonin-Behandlung zeigen. Bei Shikonin handelt es sich um ein Naphtochinon, was u.a. antineoplastische Effekte zeigt. Im Gegensatz zu gesunden Kontrollzellen konnte die HL60-Zelllinie ohne Behandlung eine starke ERp57-Expression vorweisen. Nach ERp57-Überexpression konnte eine Abnahme der Shikonin-induzierten Apoptose beobachtet werden. Ein ERp57-knockdown dagegen führte zu einer Zunahme der Shikonin-induzierten Apoptose. Dies deutet einen möglichen Behandlungsansatz der akuten myeloischen Leukämie (AML) durch Shikonin und dem zusätzlichen Angriff von ERp57 an.

Die Proteindisulfidisomerasen scheinen also potenzielle Angriffspunkte für die Therapie verschiedener Krankheitsbilder zu sein, was sie zu einem spannenden und vielversprechenden Forschungsthema macht.

1.4 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, einen möglichen profibrotischen Effekt von sezerniertem ERp57 auf die Niere zu untersuchen. Besonders der Einfluss von sERp57 auf die Proliferation und Migration renaler Zellen soll untersucht werden. In der Vergangenheit konnte bereits gezeigt werden, dass ERp57 im Rahmen der Nierenfibrose eine Rolle spielt. Beispielsweise wird durch das profibrotische TGF- β die Expression und Sekretion von ERp57 beeinflusst. So liegt die Vermutung nahe, dass sezerniertes ERp57 auch selbst Einfluss auf fibrotische Umbauprozesse der Niere nimmt.

Da es immer noch kaum Therapiemöglichkeiten der Nierenfibrose gibt, ist es wichtig, den Pathomechanismus genau zu verstehen. Sollte sich bestätigen, dass sezerniertes ERp57 Fibrose induzieren kann bzw. eine essenzielle Rolle in der Fibrose spielt, könnte hier ein potenzieller Angriffspunkt zur Inhibition des fibrotischen Umbaus liegen.

2 Material und Methoden

In diesem Kapitel werden die verwendeten Materialien inklusive Hersteller aufgelistet. Außerdem werden die angewandten Methoden beschrieben und erläutert.

2.1 Material

Die folgenden Auflistungen geben Auskunft über die verwendeten Chemikalien, das Material sowie die verwendeten Geräte in der vorliegenden Arbeit.

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid Rotiphorese Gel 30	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Ampuva	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Bovines Serum Albumin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Bromophenol Blue sodium salt	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
CHAPS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Chloroform	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol, Dihydrochlorid)	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
DNase I	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
DPBS	Gibco by Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
DTT ($\geq 99\%$)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Chemikalie	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco by Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
EDTA Tritiplex III	Merck KGaA, Darmstadt
Essigsäure 100 %	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol absolut	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol 99 % vergällt	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen
EUKITT	O. Kindler GmbH, Freiburg
Fetal calf serum	PAA Laboratories GmbH; Cölbe
Gentamycin 100 mg/ml	Gibco by Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
L-Glutamin 0,2 M	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Glycerin für die Fluoreszenzmikroskopie	Merck KGaA, Darmstadt
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Goat Serum	Gibco by Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Harnstoff	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
HCl 37 % rauchend	Merck KGaA, Darmstadt
Kaleidoskope Precision plus Protein Marker	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Meliseptol	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100X)	Gibco by Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
B-Mercaptoethanol 50 mM	Gibco by Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Methanol ≥ 99 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Milchpulver fettarm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Chemikalie	Hersteller
Minimum Essential Medium (MEM)	Gibco by Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels (12 %, 7,5 %)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Mowiol	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Gibco by Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Ponceau S Solution (0.2 %)	SERVA, Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Protein Assay Dye Reagents Concentrate	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Recombinant Human ERp57 protein (ab92937)	abcam, Cambridge (Vereinigtes Königreich)
Recombinant Human Latent TGF-beta 1 Protein (299LI)	Research and Diagnostic Systems, Inc., Minneapolis (USA)
TGFβ1, active human recombinant (90900-10)	BPS Bioscience, San Diego (USA)
TRIS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Trizol	Life Technologies by Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Trypsin	Gibco by Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Tween 20	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Wasserbadkonservierer AKASOLV Aqua Care	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

2.1.2 Antikörper

Tabelle 2: Verwendete Antikörper

Antikörper	Hersteller
Alpha-Smooth Muscle Actin Antibody Mouse (A2547 M)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
β -Actin Antibody Mouse (A5541)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
E-Cadherin Antibody Rabbit (24E10)	Cell Signaling Technology, Cambridge (Vereinigtes Königreich)
Fibronectin Antibody Goat (F1509)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 555 (ab150079)	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (ab150117)	Invitrogen, by Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Vimentin Antibody Mouse Dako (Vim3B4)	Agilent Technologies, Santa Clara (USA)

2.1.3 Primer

Tabelle 3: Verwendete Primer

Primer	Sequenz	Hersteller
ACTA2 human	F 5'-AAG CAC AGA GCA AAA GAG GAA T-3' R 5'-ATG TCG TCC CAG TTG GTG AT-3'	Microsynth AG, Balgach (Schweiz)
ACTA2 Hund		Primerdesign, Southampton (Vereinigtes Königreich)
CDH1 Hund		Primerdesign, Southampton (Vereinigtes Königreich)
FN1 human	F 5'-ACA ACA CCG AGG TGA CTG AGA C-3' R 5'-GGA CAC AAC GAT GCT TCC TGA G-3'	Microsynth AG, Balgach (Schweiz)

Primer	Sequenz	Hersteller
FN1 Hund		Primerdesign, Southampton (Vereinigtes Königreich)
GAPDH hu- man		Primerdesign, Southampton (Vereinigtes Königreich)
GAPDH Hund		Primerdesign, Southampton (Vereinigtes Königreich)
ITGAV human	F 5'-AGG AGA AGG TGC CTA CGA AGC T-3' 5'-GCA CAG GAA AGT CTT GCT AAG GC-3'	Microsynth AG, Balgach (Schweiz)
ITGAV Hund		Primerdesign, Southampton (Vereinigtes Königreich)
S100A4 human	F 5'-TCT TTC TTG GTT TGA TCC TGA CT-3' R 5'-AGT TCT GAC TTG TTG AGC TTG A-3'	Microsynth AG, Balgach (Schweiz)
S100A4 Hund		Primerdesign, Southampton (Vereinigtes Königreich)

2.1.4 Kits

Tabelle 4: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
Alexa Fluor® 488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit	Life Technologies by Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Invitrogen™ PureLink™ RNA Mini Kit	Ambion by Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
MTT Test cell proliferation Kit I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Schneller SYBR™ Green Mastermix	Applied Biosystem by Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

2.1.5 Zusammensetzung selbst hergestellter Lösungen und Puffer

Tabelle 5: Zusammensetzung der Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Zusammensetzung/Vorgehen
Medium für HK2- und TK173-Zellen:	<ul style="list-style-type: none"> - 500 ml DMEM - 50 ml FCS - 5 ml Pen/Strep - 5 ml L-Glutamin (0,2M)
Medium für MDCK-Zellen	<ul style="list-style-type: none"> - 500 ml DMEM - 50 ml FCS - 5 ml Pen/Strep - 5 ml L-Glutamin 0,2M - 5 ml MEM Non Essential Amino Acid
Trypsin-Gebrauchslösung:	<ul style="list-style-type: none"> - 0,825 g EDTA - 50 ml Trypsin 10x - 450 ml DPBS 300 mosmol
Harnstofflysepuffer	<ul style="list-style-type: none"> - 50 ml ddH₂O - 28,5 g Urea (9,5 M) - 1 g CHAPS (2 %)
Proteaseninhibitorlösung	<ul style="list-style-type: none"> - 348,4 mg Phenylmethylsulfonylfluorid - 10 ml absolutes Ethanol
Probenpuffer (4x):	<ul style="list-style-type: none"> - 4,3 ml ddH₂O - 2,5 ml 1,5 M TRIS/HCl pH 6,8 - 5 ml Glycerin - 8 ml SDS (10 %) - 200 µl Bromphenolblau

Lösung/Puffer	Zusammensetzung/Vorgehen
Sammelgel (4 %):	<ul style="list-style-type: none"> - 15 ml ddH₂O - 6,3 ml 1,5 M Tris/HCl pH 6,8 - 3,9 ml Acrylamid - 250 µl SDS 10 % - 25 µl TEMED - 125 µl APS 10 %
Trenngel (12 %):	<ul style="list-style-type: none"> - 14 ml ddH₂O - 10 ml 1,5 M Tris/HCl pH 8,8 - 16 ml Acrylamid - 400 µl SDS 10 % - 30 µl TEMED - 200 µl APS 10 %
Elektrophoresepuffer 5x:	<ul style="list-style-type: none"> - 30 g TRIS - 144 g Glycin - 10 g SDS - Auf 2 l mit ddH₂O auffüllen
Elektrophoresepuffer 1x:	<ul style="list-style-type: none"> - 200 ml Elektrophoresepuffer 5x - 800 ml ddH₂O
Waschpuffer 5x:	<ul style="list-style-type: none"> - 12,11 g TRIS - 58,16 g NaCl - 1700 ml ddH₂O - pH-Wert mit 37 % „rauchender HCl“ auf 7,5 einstellen - 10 ml Tween20 - auf 2 l auffüllen
Waschpuffer 1x:	<ul style="list-style-type: none"> - 200 ml Waschpuffer 5x - 800 ml ddH₂O

Lösung/Puffer	Zusammensetzung/Vorgehen
Transferpuffer 5x:	<ul style="list-style-type: none"> - 30,3 g TRIS (250 mM) - 144 g Glycin (1,92 M) - 5 g SDS - Auf 2 l mit ddH₂O auffüllen
Transferpuffer 1x:	<ul style="list-style-type: none"> - 200 ml Transferpuffer 5x - 200 ml Methanol - 600 ml ddH₂O
Milch-Blockpuffer	<ul style="list-style-type: none"> - 100 ml Waschpuffer 1x - 5 g Milchpulver

2.1.6 Verbrauchsmaterial

Tabelle 6: Verwendetes Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Auslaufpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml) steril	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Combitips advanced (0,5 ml, 5 ml, 10 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Cryotubes 1,8 ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Falcon Culture Slides (8-Well)	Corning Incorporated, Corning (USA)
Falcon Zellkulturplatten	Corning Incorporated, Corning (USA)
Falcon 5 ml Round Bottom Polystyrene Test Tube	Corning Incorporated, Corning (USA)
Filterpapier	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Foam Pads 4,8 x 11 cm	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Lever and Casting Stands Mini Protean 3	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Kimtech Wischtücher	Kimberly-Clark Professional, Roswell (USA)

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Küvetten	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Menzel Deckgläser	Thermo Scientific Menzel by Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystem by Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Optical Adhesive Covers	Applied Biosystem by Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Pasteur-Pipetten	BRAND GmbH + CO KG, Wertheim
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Pipettenspitzen mit Dualfilter	Eppendorf AG, Hamburg
Rührspatel	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Schraubröhre, 50 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Schraubröhre, 15 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Sterilfilter	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Tubes 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Tubes 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Tubes 0,6 ml (Nuclease-frei)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Tubes 0,2 ml	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
T75-Zellkulturflaschen	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Vivaspin 20	Sartorius AG, Göttingen
Zellkulturplatten	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Zellkulturplatten	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster (Österreich)

2.1.7 Geräte

Tabelle 7: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
BD FACS Aria II Flow Cytometry Cell Sorter	BD (Becton, Dickinson and Company), Franklin Lakes (USA)
CO2-Inkubator NAPCO Series 5400	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Elektrophorese-Kammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Fluorescent Image Analyser FLA-5100	Fujifilm Life Science; Tokio (Japan)
Kühlzentrifuge 3-18K	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz
Kühlzentrifuge 1-15PK	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz
Lambda 25 UV-VIS Spektrometer	PerkinElmer, Waltham (Vereinigte Staaten)
Magnetrührer IKA IKAMAG RCT	IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Jena
Fluoreszenzmikroskop Olympus IX71	Olympus, Shinjuku (Japan)
Multipipette	Eppendorf AG, Hamburg
Netzteil (LKB Bromma 2301 Macrodrive 1)	LKB Vertriebs GmbH, Wien (Österreich)
pH-Meter PB-11	Sartorius AG, Göttingen
Pipettierhelfer, <i>accu-jet® pro</i>	BRAND GmbH + CO KG, Wertheim
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Plattenzentrifuge Perfect Spin P	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
PHOmo Microplate Reader	Autobio Diagnostics, China
Power Supply U-RFL-T	Olympus, Shinjuku (Japan)
Prior Proscan II Controller	Prior Scientific, Cambridge (Vereinigtes Königreich)

Gerät	Hersteller
Schüttelwasserbad 1083	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Sicherheitswerkbank CA/REV6	CleanAir by Baker, Utrecht (Niederlande)
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Applied Biosystem by Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Thermo Scientific Spektralphotometer Nano Drop 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham/Vereinigte Staaten
Thermocycler	Eppendorf AG, Hamburg
Thermomixer Comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Vortexer REAX 200	Heidolph Instruments, Schwabach
Waagen	Sartorius, Göttingen
Wärmeofen Lab Shaker/Modell Kühner	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Zentrifuge 5415D	Eppendorf AG, Hamburg

2.1.8 Wissenschaftliche Softwares

Tabelle 8: Verwendete wissenschaftliche Softwares

Software	Hersteller
CellD	Olympus, Shinjuku (Japan)
Citavi 6	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil (Schweiz)
FACSDiva Version 6.1.3/Version 9.0.1	BD (Becton, Dickinson and Company), Franklin Lakes (USA)
GraphPad Prism 8	GraphPad Software Inc., San Diego (USA)
ImageJ	National Institut of Health, Bethesda (USA)
Image Reader FLA 5000	Fujifilm, Tokio (Japan)
Microsoft Office Excel 2016	Microsoft Corporation, Redmond (USA)

Microsoft Office Word 2016

Microsoft Corporation, Redmond (USA)

StepOne Software v2.3

Applied Biosystems by Thermo Fisher
Scientific, Waltham (USA)

2.2 Methoden

Im Folgenden werden die verwendeten Methoden, die zur Untersuchung der Fragestellung angewendet wurden, sowie die Auswertung von diesen näher beschrieben. Hierzu wird meist kurz das jeweilige Prinzip der Methode dargestellt und anschließend das genaue Vorgehen für die vorliegende Arbeit beschrieben.

2.2.1 Zellkultur

Für die vorliegende Arbeit wurden drei Zelllinien genutzt: Die Human Kidney-2 (HK2)-, TK173- und Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) -Zelllinien. Bei der HK2-Zelllinie handelt es sich um humane, gesunde, immortalisierte Epithelzellen aus dem proximalen Nierentubulus (Ryan et al. 1994). TK173-Zellen stellen humane, gesunde, renale Fibroblasten dar (Strutz et al. 2001), während die MDCK-Zellen einst von einem Hund gewonnen wurden und die morphologischen Eigenschaften von distalen Tubuluszellen besitzen (Rindler et al. 1979).

Die Zellen wurden in T75-Zellkulturflaschen in zellspezifischem Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator kultiviert. Für die Zelllinien HK2 und TK173 wurde zu Duplecco's Modified Eagle Medium (DMEM) von Gibco 10 % fetales Kälberserum (FCS), 1 % L-Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin hinzugefügt. Für die MDCK-Zellen wurde dagegen das Minimum Essential Medium (MEM) mit den gleichen oben genannten Zusätzen genutzt. Zusätzlich wurde hier noch 1 % Gentamicin und 1 % MEM-Non-Essential Amino Acid Solution zugegeben. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen entweder mit frischem Medium versorgt oder bei erhöhter Konfluenz zusätzlich aufgesplittet. Für den „Splittvorgang“ wurde zunächst das alte Medium abgesaugt und die Flaschen wurden mit jeweils 5 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gespült, um so das Medium komplett zu entfernen. Dann wurde je 1,5 ml von einer Trypsin-EDTA-Lösung für einige Sekunden in die Flaschen gegeben und durch Schwenken gleichmäßig auf die Zellen verteilt, was dafür sorgt, dass sich die Zellen von der Oberfläche lösen. Da die MDCK-Zellen auf diese Weise immer noch stark

hafteten, wurden sie teilweise zuvor noch in 1,5 ml EDTA-Lösung für fünf bis zehn Minuten bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Nachdem das Trypsin wieder abgesaugt wurde, wurden die Zellen durch Klopfen auf die Flasche endgültig von der Oberfläche gelöst, sodass sie im zellspezifischem Medium resuspendiert werden konnten. Nun konnte die gewünschte Menge der Zellsuspension in der Flasche belassen bzw. in eine neue Flasche gegeben werden und mit zellspezifischem Medium auf 10 ml aufgefüllt werden. Im Verlauf der Arbeit wurde auf die EDTA-Vorbehandlung der MDCKs verzichtet und die Kulturflaschen stattdessen nach Absaugen des Trypsins noch für fünf bis zehn Minuten bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.1 Einfrieren von Zellen

Zum Teil wurden Zellen bei -80 °C eingefroren, um sie zu einem späteren Zeitpunkt weiter zu nutzen. Hierzu wurde zunächst zellspezifisches Medium und Dimethylsulfoxid (DMSO) in einem Verhältnis von 5:6 vermischt und bei 4 °C kühl gestellt. Nun wurden die einzufrierenden Zellen wie oben bereits beschrieben vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und jeweils in 5 ml zellspezifischem Medium resuspendiert, um sie dann in eine Schraubröhre zu überführen. Anschließend wurde die Suspension bei 4 °C und 1200 rpm (revolutions per minute) für fünf Minuten zentrifugiert, sodass sich ein Zellpellet am Boden bildete. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet erneut in 5 ml zellspezifischem Medium resuspendiert. Zu dieser Suspension wurde nun die DMSO-Lösung hinzugefügt. Das Ganze wurde auf mehrere Cryotubes aufgeteilt und bei -80 °C bis zum erneuten Auftauen eingefroren.

2.2.1.2 Auftauen von Zellen

Um die bei -80 °C eingefrorenen Zellen wieder zu kultivieren, wurden die Zelllösungen in den Cryotubes zunächst im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Es wurden 5 ml des zellspezifischen Mediums vorbereitend in eine Schraubröhre gegeben und anschließend wurde hiervon etwas zur Zellsuspension überführt. Nun wurde etwas der Zellsuspension in die Schraubröhre gegeben. Dieser Schritt wurde mehrmals wiederholt und so wurde die Zellsuspension langsam mit dem Medium in der Schraubröhre vermischt. Anschließend wurde bei 4 °C und 1200 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 5 ml des zellspezifischen Mediums resuspendiert und jeweils auf die gewünschte Anzahl von Zellkulturflaschen verteilt.

2.2.2 ERp57-Behandlung

Bevor die Zellen mit ERp57 behandelt wurden, musste zunächst die gewünschte Zellmenge im entsprechenden Kulturgefäß kultiviert werden. Vor einer Behandlung der Zellen wurde am Vortag eine FCS-Freisetzung vorgenommen. So sollte sichergestellt werden, dass mögliche Behandlungseffekte nicht durch Inhaltsstoffe des FCS beeinflusst wurden. Hierzu wurde zunächst das FCS-Medium abgesaugt und anschließend wurden die Zellen mit PBS gespült, woraufhin dieses wieder abgesaugt wurde. Nun erhielten die Zellen ihr zellspezifisches Medium ohne FCS-Zusatz. In der Regel wurde nach ca. drei und sechs Stunden erneut das Medium gewechselt, um eine vollständige FCS-Freiheit sicherzustellen. Am nächsten Tag konnte dann bei subkonfluenter Zelldichte die Behandlung erfolgen. Das rekombinante ERp57 wurde in entsprechender Konzentration (meist 200 ng/ml bzw. 1 µg/ml) in das FCS-freie zellspezifische Medium gegeben und die Lösung wurde vermischt, um eine homogene Verteilung des Proteins sicherzustellen. Im Anschluss wurde das alte Medium von den Zellen abgesaugt und die Behandlungslösung in entsprechender Menge aufgetragen. Gleichzeitig wurde auch bei den Kontrollzellen nochmal das Medium gewechselt, um gleiche Bedingungen zu gewährleisten. Die FCS-Freisetzungen erfolgten in einem Mindestabstand von drei Stunden, z.T. wurde der dritte Vorgang auch noch am Behandlungstag, mindestens aber im Abstand von drei Stunden zur Behandlung, durchgeführt.

2.2.3 Probengewinnung

Zum Ernten von Zellen wurden diese in der Regel in T75-Kulturflaschen kultiviert und behandelt. Meistens wurden die Zellen nach 72 h Behandlungszeit geerntet. Das Medium wurde abgenommen und für einen eventuellen späteren Gebrauch bei -20 °C eingefroren. Die Zellen wurden anschließend mit PBS gespült und wie oben beschrieben mit der Trypsin- und ggf. vorher mit der EDTA-Lösung inkubiert.

Nachdem die Zellen abgeklopft wurden, konnten sie kurzzeitig in zellspezifischem FCS-Medium resuspendiert werden, wobei der Proteinanteil des FCS die Trypsinreaktion stoppen sollte, um eine Schädigung der Zellen zu verhindern (Schrödel 2009).

Als nächstes wurde die Zellsuspension in ein Schraubenröhrchen gegeben, um sie anschließend bei 4 °C und 1200 rpm für fünf Minuten zu zentrifugieren. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in ca. 5 ml PBS resuspendiert, woraufhin es erneut zentrifugiert wurde und dieser Waschvorgang anschließend noch ein weiteres Mal wiederholt wurde.

Nachdem das Zellpellet also zweimal mit PBS gewaschen wurde, konnte es je nach gewünschter Verwendung weiterverarbeitet werden.

2.2.4 Proteinextraktion aus Zellüberständen

Um das von den Zellen sezernierte Fibronectin zu untersuchen, erfolgten Proteinextraktionen aus den Zellüberständen mittels Zentrifugalkonzentratoren und anschließender Chloroform-Methanol-Fällung.

Hierbei trennt man die unpolaren Bestandteile, welche sich im Chloroform lösen, von den polaren Bestandteilen, die anschließend im Methanol zu finden sind. Nach Zugabe von Methanol, Chloroform und doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) sowie anschließender Zentrifugation bilden sich drei Phasen aus. Die mittlere Phase, also die Phase zwischen Methanol und Chloroform, enthält Nukleinsäuren und die Proteine (Sapcariu et al. 2014).

Zunächst wurden die Überstände der verschiedenen Zellen mit einem Volumen von meist 60 ml bei 2000 rpm und 4 °C für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine neue Röhre überführt und das Pellet wurde verworfen, so konnten Zelltrümmer entfernt werden. Dann erfolgte die Einengung mittels Zentrifugalkonzentratoren bei 4700 rpm und 4 °C bis auf ein Restvolumen von ein bis zwei Millilitern. Aus diesem Restvolumen wurden durch Chloroform-Methanol-Fällung die Proteine extrahiert. Hierzu wurden je 200 µl in kleine Tubes pipettiert, woraufhin 800 µl Methanol hinzugegeben wurde und das Ganze durch Vortexen vermischt wurde. Weiter erfolgte die Zugabe von 200 µl Chloroform und erneutes Vortexen. Als letztes wurde noch 600 µl ddH₂O hinzugegeben und alles wurde erneut gevortext. Das Methanol und Chloroform waren zuvor bei -20 °C gelagert und während der Arbeit auf Eis aufbewahrt. Nun wurde das Gemisch aus Überstand, Methanol, Chloroform und ddH₂O bei 14000 rpm und 4 °C für eineinhalb Minuten zentrifugiert, wodurch sich die drei Phasen ausbildeten. Die obere Phase wurde nun abgenommen und verworfen, woraufhin die erneute Zugabe von 800 µl Methanol folgte. Nachdem das Gemisch wieder gevortext wurde, erfolgte die Zentrifugation bei 14000 rpm, 4 °C für zwei Minuten. Am Gefäßboden bildete sich ein kleines Pellet mit den Proteinen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 µl Methanol resuspendiert. Die einzelnen Proben konnten jetzt zusammengeführt werden und wurden erneut für zwei Minuten bei den oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Dieser letzte Vorgang wurde wiederholt, bis sich die gesamte Probe in einem Gefäß befand und nochmal zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde wieder abgenommen und das Pellet getrocknet. Nun wurde es in Harnstoffpuffer

inklusive DTT und Proteaseninhibitor aufgenommen. Das Lösen der Pellets erfolgte über mehrere Stunden bei 4 °C. Zum Schluss wurde die Probe kurz zentrifugiert, der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C eingefroren.

2.2.5 MTT-Test

Grundlage für den MTT-Test ist die Umwandlung von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in dunkelblaues Formazansalz durch lebende Zellen und die anschließende photometrische Messung. Da das Formazansalz nicht komplett löslich ist, wird ein weiterer Schritt benötigt, durch den die vollständige Löslichkeit gewährleistet wird. Die gemessenen Werte der optischen Dichte stellen sich proportional zur Anzahl an lebenden Zellen dar (Mosmann 1983).

Zur Durchführung des MTT-Proliferations-Assays für die vorliegende Arbeit wurden zunächst Zellen auf 96-Well-Platten ausgesät. Zuvor wurde bereits die passende Zellzahl pro Well getestet, die eine FCS-Freisetzung bei subkonfluenter Besiedlung am folgenden Tag möglich machte: Pro Well wurden schließlich ca. 2000 TKs bzw. 1500 MDCKs und HKs ausgesät. Insgesamt wurden je Zelllinie jeweils 45 Wells (9x5) mit Zellsuspension gefüllt und neun mit reinem Zellmedium. Wie bereits erwähnt, folgte am nächsten Tag die FCS-Freisetzung und am darauffolgenden Tag die Behandlung, wie in Kapitel 2.2.2. beschrieben. Dabei wurden 15 Wells (3x5) als Kontrolle nur mit FCS-freiem Medium versetzt, 15 weitere Wells (3x5) wurden mit 200 ng/ml ERp57 behandelt sowie die übrigen 15 (3x5) mit einer ERp57-Konzentration von 1 µg/ml. Eine Reihe von neun Wells (9x1) ohne Zellen, über den mit Zellen besiedelten Wells (9x5), wurde mit FCS-freiem Medium befüllt. Nach der entsprechenden Behandlungszeit wurde in alle 54 befüllten Wells je 10 µl der MTT-*solution* gegeben, sodass das MTT nun durch die viablen Zellen umgewandelt werden konnte. Nach vier Stunden Inkubation im dunklen Wärmeschrank wurde nach Herstellerangabe jeweils 100 µl der *disolubalisation*-Lösung hinzugegeben und die Platten über Nacht im Wärmeschrank inkubiert, um das Formazansalz zu lösen. Am nächsten Tag erfolgte dann die photometrische Messung mittels Microplate-Readers bei 595 nm.

Zur Auswertung wurde jeweils die Absorption des reinen Mediums der entsprechenden Spalte subtrahiert und anschließend die Mittelwerte der Extinktionen jeder Gruppe gebildet. Die Subtraktion war nötig, da das Zellmedium selbst ein gewisses Absorptionsspektrum besitzt. Um weitere Fehlerquellen zu minimieren, wurden jeweils fünf Werte der einzelnen

Gruppen unberücksichtigt gelassen, da sich bei genauerer Betrachtung herausstellte, dass die Wells, welche am Rand der Platte lagen, eine höhere optische Dichte aufwiesen. Die Anordnung auf der 96-Well-Platte ist in Abbildung 6 zu sehen. Schließlich konnten die einzelnen Gruppen (Kontrolle, 200 ng/ml, 1 µg/ml) miteinander verglichen werden.

Für jede Zelllinie wurde das gesamte Verfahren mindestens einmal wiederholt, zum Teil auch zweimal, sodass pro Zelllinie, Behandlungsgruppe und Zeitfenster jeweils zwanzig bis dreißig Werte in die Auswertung flossen. Die Mittelwerte der 24 h-Kontrolle wurden jeweils mit 100 % als Referenzwert gesetzt, sodass für alle Werte der prozentuale Wert bezogen auf diesen 24 h-Kontrollmittelwert bestimmt wurde. Diese prozentualen Werte wurden anschließend in der zweifachen Varianzanalyse und im Tukey-Test auf statistische Signifikanz untersucht.

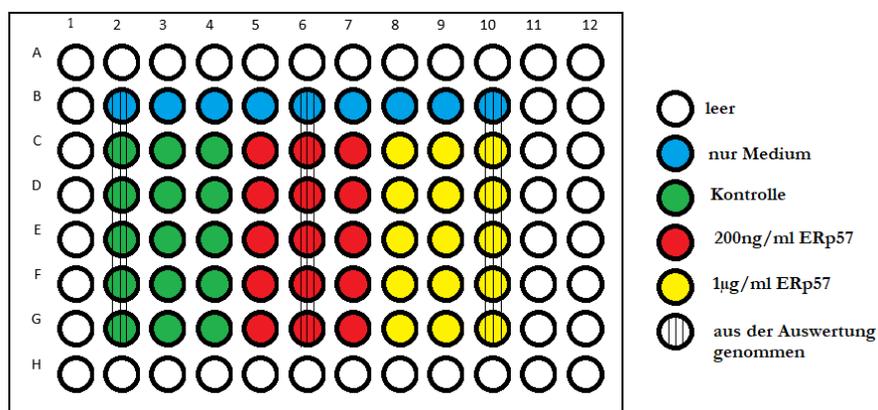


Abbildung 6: Befüllung der 96-Well-Platten für den MTT-Test. (Quelle: eigene Darstellung)

2.2.6 Annexin V-Test

Das Prinzip des Annexin V-Tests beruht auf der unterschiedlichen Membranpermeabilität bzw. auf Änderungen der Zelloberfläche von vitalen, apoptotischen und nekrotischen Zellen. Kommt es zur Apoptose, so gelangt das Protein Phosphatidylserin an die Zelloberfläche, welches normalerweise im Zellinneren liegt. Da Annexin Phosphatidylserin bindet, können apoptotische Zellen mit Fluoreszenz-markiertem Annexin detektiert werden. Hierbei werden aber nicht nur die früh-apoptotischen Zellen, sondern zusätzlich nekrotische Zellen detektiert, da bei diesen die Membranpermeabilität zunimmt und das Annexin auch hier Zugang zum Phosphatidylserin erhält. Um auch die früh-apoptotische von den nekrotischen Zellen unterscheiden zu können, kann Fluoreszenz-gebundenes Propidium-Iodid (PI) verwendet werden, was nur die nekrotischen Zellen mit verminderter Membranintegrität detektiert. So

ist eine Unterscheidung von vitalen, früh-apoptotischen und nekrotischen Zellen möglich (Vermees et al. 1995).

Die Zellen wurden für den Apoptose-Test zunächst auf 6-Well-Platten ausgesät. Pro Gruppe wurden jeweils drei Wells (Replikate) angelegt. Insgesamt wurden 18 Wells pro Zelllinie und Zeitpunkt benötigt: Drei für die Kontrolle, jeweils drei für die beiden Behandlungskonzentrationen und insgesamt neun für die Einzelfärbungen (PI und Annexin) bzw. die Negativ-Kontrolle. Am darauffolgenden Tag erfolgte dann wie üblich die FCS-Freisetzung bei subkonfluenter Zelldichte, sodass am dritten Tag die Behandlung stattfinden konnte. Für jede Zelllinie wurde der Annexin V-Test nach 24 h, 48 h und 72 h-Behandlungszeit durchgeführt. Am Test-Tag wurde dann das Medium der einzelnen Wells in ein entsprechendes Schraubentröhrchen überführt. Für die beiden Einzelfärbungen, die Negativ-Kontrolle sowie die normale Kontrolle konnten je vier Wells in dasselbe Röhrchen überführt werden. Anschließend wurden die einzelnen Wells mit PBS gespült, was daraufhin ebenfalls in die entsprechenden Röhrchen gegeben wurde. Dann wurden die Wells für wenige Sekunden mit der Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert und ggf. vorher mit EDTA-Lösung (MDCKs) behandelt (siehe Kapitel 2.2.1.). Nachdem die Trypsin-Lösung abgenommen wurde, wurde vorsichtig unter die Platten geklopft, um die Zellen von der Oberfläche zu lösen, sodass sie nun in jeweils 1 ml FCS-Medium resuspendiert werden konnten. Hier wurde wieder das Medium mit FCS genutzt, um die Trypsin-Reaktion zu stoppen und so eine zu lange Einwirkung und einen damit verbundenen Zellschaden zu verhindern. Die Zellsuspensionen wurden nun wieder in das entsprechende Röhrchen überführt. Unter dem Mikroskop wurde kontrolliert, ob die Wells zellfrei waren. Dann wurde die Zellsuspension inklusive dem Überstand und PBS bei 1200 rpm und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert, sodass sich ein Zellpellet am Röhrchen-Boden bildete. Der Überstand konnte nun abgesaugt werden und die Pellets mit jeweils 100 µl bzw. 400 µl Annexin Binding Buffer 1x resuspendiert werden. Anschließend wurden jeweils 100 µl der Suspension in die entsprechenden Polystyrol-Röhrchen überführt (insgesamt 18). In zwölf Tubes (3x Kontrolle, 3x 200 ng, 3x 1 µg, 3x Annexin-Einzelfärbung) wurden nun jeweils 2 µl Annexin (Alexa Flour 488 annexin V) zugegeben. Außerdem wurden in ebenfalls zwölf Tubes (3x Kontrolle, 3x 200 ng, 3x 1 µg, 3x PI) je 1 µl der PI-Lösung hinzugegeben. Nun wurden alle Tubes für 15 Minuten im Dunkeln inkubiert, woraufhin nochmal 200 µl des Annexin Binding Buffer 1x zugegeben wurde. Dann erfolgte die cytometrische Messung mit dem BD FACS Aria II Flow Cytometry Cell Sorter. Für die anschlie-

Bende Auswertung wurden nur die früh-apoptotischen Zellen berücksichtigt, welche Annexin gebunden hatten, aber kein PI (Annexin+/PI-). Die hier erhaltenen Prozentwerte wurden mittels zweifacher Varianzanalyse und Tukey-Tests statistisch analysiert.

2.2.7 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Bei der indirekten Immunfluoreszenzfärbung handelt es sich um eine „Zwei-Schritt-Technik“. Zunächst bindet ein primärer Antikörper das gesuchte Antigen. Dieser primäre Antikörper wird anschließend von einem Fluoreszenz-markierten sekundären Antikörper detektiert und sichtbar gemacht, was mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops untersucht werden kann (Odell und Cook 2013).

Zur Durchführung dieser indirekten Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen zunächst auf 8-Well-Chamber-Slides ausgesät. Am nächsten oder zum Teil erst am übernächsten Tag erfolgte die FCS-Freisetzung und am darauffolgenden Tag die Behandlung. Nach 72 h (HK2 und TK173) bzw. 48 h (MDCK) wurden die Zellen mit Methanol oder 4 %igem Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Hierzu wurde zunächst das Medium abgenommen und die Zellen für dreimal fünf Minuten in PBS auf einer Wippe gewaschen. Nach Abnahme des PBS wurde 200 µl Methanol bzw. PFA-Lösung in jedes Well gegeben. Die mit Methanol zu fixierenden Zellen wurden für dreißig Minuten bei -20 °C eingefroren. Die mit PFA zu fixierenden Zellen wurden für dreißig Minuten bei Raumtemperatur auf einer Wippe platziert. Nach diesem Fixiervorgang wurde das Methanol bzw. PFA abgenommen und die Zellen wurden erneut zweimal fünf Minuten in PBS gewaschen. Nun wurde 200 µl 10 %iges Ziegen Serum in jedes Well gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf der Wippe geschwenkt, woraufhin das Ziegen Serum wieder entfernt wurde. Es erfolgten wieder zwei zehnmütige Waschvorgänge mittels PBS. In dieser Zeit konnten bereits die Antikörper für die zu untersuchenden Proteine in 10 %igem Ziegen Serum angesetzt werden. Von diesen Antikörper-Lösungen wurde nach Abnahme des PBS 200 µl in sechs der acht Wells gegeben (je drei Kontroll-Wells und drei Wells mit ERp57-Behandlung). In die zwei übrigen Wells wurde 200 µl Ziegen Serum ohne Antikörper gegeben, um hier später eine unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers auszuschließen. Nun wurden die Chamber-Slides über Nacht im 4 °C-kalten Kühlraum auf einer Wippe platziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen dreimal für zehn Minuten mit PBS gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde in 10 %igem Ziegen Serum angesetzt und nach dem Waschvorgang auf die Zellen gegeben (200 µl/Well). Um die vollständige Verteilung des sekundären Antikörpers zu gewährleisten, wurden die Slides erneut

für eine Stunde bei Raumtemperatur auf der Wippe geschwenkt. Zur vollständigen Entfernung des nicht gebundenen Antikörpers, folgten drei fünfminütige Waschgänge mit PBS. Von einer DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol, Dihydrochlorid)-Lösung wurde zur Kernfärbung 200 µl pro Well aufpipettiert und die Slides wurden bei 37 °C geschwenkt. Nach einem letzten fünfminütigen Waschgang wurden die Slides zum Mikroskopieren vorbereitet. Auf jedes Well wurde ein Tropfen Moviol-Lösung gegeben und das Deckgläschen konnte aufgesetzt werden. Zur Fixierung des Deckgläschen wurde EUKIT^T verwendet. Nach einer kurzen Trocknungszeit wurden die Slides mikroskopiert.

2.2.8 Gewinnung der Proteine

Um Proteinproben für spätere Western Blots zu erhalten, wurde das gewonnene Zellpellet (siehe 2.2.3) in Harnstoff-Lysepuffer aufgenommen und für circa dreißig Minuten auf Eis gestellt. Dem Lysepuffer wurde zuvor frisch 10 % dTT und 1 % einer Proteaseninhibitor-Lösung beigefügt. Im Anschluss wurde die Suspension zweimal für dreißig Minuten bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand jeweils abgenommen, während das entstandene Pellet verworfen werden konnte. Das fertige Zelllysate wurde dann bis zum Gebrauch bei -20 °C eingefroren.

2.2.9 Proteinbestimmung nach Bradford

Eine Proteinbestimmung nach Bradford war nötig, um später die Gele für eine Elektrophorese gleichmäßig beladen zu können.

Bei der Proteinbestimmung nach Bradford wird ausgenutzt, dass sich der Coomassie-Brillant-Blau-G 250 Farbstoff normalerweise rot darstellt. Kommt es aber zur Bindung mit einem Protein, verändert sich die Farbe von rot zu blau und gleichzeitig verändert sich so das Extinktionsmaximum (Bradford 1976). Dieser Farbumschlag entsteht durch die Bindungen der Proteine an die anionische Form, wodurch wiederum vermehrt Kationen in Anionen umgewandelt werden. So nimmt die Absorption im Bereich von 470 nm (Kationen) ab und im Bereich von 595 nm (Anionen) zu (Compton und Jones 1985).

Für die Proteinbestimmung nach Bradford wurde eine beliebige Menge der Bradford-Lösung von Bio-Rad mit der vierfachen Menge an doppelt destilliertem Wasser verdünnt und für einige Minuten mit Hilfe des Magnetrührers vermischt. Im Anschluss wurde mit dieser ver-

dünnten Bradford-Lösung und einer BSA (Bovines Serumalbumin)-Lösung mit einer Konzentration von 1 g/l eine Eichkurve erstellt. Hierfür wurden die Lösungen nach dem folgenden Schema (Tabelle 1) in Küvetten pipettiert:

Tabelle 9: Schema zur Erstellung einer Eichkurve

Bradford-Lösung in μl	BSA-Lösung in μl
1000	0
998	2
996	4
994	6
992	8
990	10

Die Küvetten ohne BSA wurden als *blanks* benötigt. Es erfolgte eine Doppelbestimmung, das heißt, von jeder Konzentration wurden zwei Küvetten benötigt. Nach gründlicher Durchmischung mittels Rührstab und zehnmütiger Inkubation bei Raumtemperatur und Abdeckung zum Lichtschutz erfolgte die photometrische Messung bei 595 nm. Von den Werten der Doppelbestimmung wurde jeweils der Mittelwert gebildet und die Eichkurve konnte erstellt werden. Im Anschluss wurde die zu bestimmende Proteinlösung verdünnt und beispielsweise 5 μl zu 995 μl der Bradford-Lösung in eine Küvette pipettiert. Auch hier wurde eine Inkubationszeit von zehn Minuten eingehalten und die anschließende Absorptionsmessung durchgeführt. Mithilfe der zuvor ermittelten Eichkurve konnte nun die Proteinkonzentration der Lösung bestimmt werden.

2.2.10 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese nutzt man die Möglichkeit, dass geladene Moleküle durch eine Matrix mit angelegtem elektrischem Feld wandern können. Als Matrix kann man beispielsweise ein Polyacrylamid-Gel verwenden, was sich vor allem eignet, wenn es sich bei den Molekülen um Proteine handelt. Die diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, eine der beliebtesten dieser Methoden, trennt die Proteine nach ihrer Größe auf. (Hames 2010).

Die Gelelektrophorese wurde auch in dieser Arbeit zur Auftrennung der Proteinproben genutzt. Hierzu wurden vorher Gele mit einem Acrylamid-Gehalt von 12 % bzw. 8 % für das Trenngel und mit einem Gehalt von 4 % für das Sammelgel gegossen (siehe 3.1.9 für Zusammensetzung). Zum Teil wurden auch Fertiggele genutzt. Nachdem die Proteinbestimmung nach Bradford erfolgt war, wurden die Proben für die Elektrophorese aus in der Regel 60 µg Protein und 5 µl 4-fach Probenpuffer hergestellt. Um ein gleichmäßiges Volumen zu erhalten, wurden die Proben jeweils mit ddH₂O auf 20 µl aufgefüllt. Die Gele wurden in den Elektrophoresekammern mit Elektrophoresepuffer umspült, woraufhin die einzelnen Gel-taschen beladen werden konnten. Im Anschluss wurde zunächst eine Spannung von 120 V angelegt, welche später nach Erreichen der Proteinproben im Trenngel auf bis zu 200 V gesteigert werden konnte. Während der gesamten Elektrophorese wurde die Elektrophorese-Kammer mithilfe von Eis gekühlt. Sobald die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet.

2.2.11 Western Blot

Mit dem Western Blot hat man die Möglichkeit, die Proteine, die in der Gelelektrophorese anhand ihres Molekulargewichts fraktioniert wurden, zu detektieren. Hierzu erfolgt im Anschluss an die Gelelektrophorese der elektrophoretische Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran. Hier können die Proteine auf verschiedene Art und Weise nachgewiesen werden, beispielsweise mithilfe von Antikörpern (Burnette 1981; Towbin et al. 1979).

Im Anschluss an die oben beschriebene Gelelektrophorese erfolgte also der Western Blot. Zunächst wurde das „Transfer-Sandwich“ zusammengebaut. Die Schwämme, Filterpapiere und die Nitrozellulosemembran wurden zunächst in Transferpuffer (Zusammensetzung: siehe Kapitel 2.1.5) eingeweicht. Das Sandwich wurde anschließend in der Reihenfolge Schwamm, Filterpapiere, Gel, Nitrozellulose-Membran, Filterpapiere und Schwamm zusammengesetzt. Nun wurde diese Transferkammer inklusive Transferpuffer, Sandwich und Eisblock über Nacht bei 4 °C an eine Spannungsquelle mit 40 V angeschlossen.

Am nächsten Tag wurde die Membran zunächst in Ponceau-Rot eingelegt und anschließend mit Essigsäure und Waschpuffer gespült. Hierdurch wurden die Proteinbanden sichtbar und es konnte visuell eine gleichmäßige Ladung bestätigt werden. Nachdem die Membran einige Minuten getrocknet wurde, wurden die freien Bindungsstellen auf der Membran für zwei Stunden in 5 %iger Magermilchlösung bei 37 °C auf einem Schüttler geblockt. Nach dem Block-Vorgang konnte der entsprechende primäre Antikörper, welcher zuvor in 5 %iger

Milch bzw. 5 %iger BSA-Lösung angesetzt wurde, auf die Membran gegeben werden. Zur Inkubation wurde die Membran über Nacht bei 4 °C auf einer Wippe deponiert, sodass die Antikörper-Lösung immer wieder über die Membran gleiten konnte. Um den primären Antikörper sichtbar zu machen, wurde die Membran am nächsten Tag zunächst dreimal für zehn Minuten bei 37 °C mit Waschpuffer auf dem Schüttler gewaschen, um den nicht gebundenen Primärantikörper zu entfernen. Dann wurde der entsprechende sekundäre Fluoreszenz-Antikörper, passend zum Host des Primärantikörpers, in 5 %iger Milch angesetzt und anschließend auf die Membran gegeben. Nun wurde erneut bei 37 °C für zwei Stunden auf dem Schüttler inkubiert, woraufhin erneut ein dreiteiliger Waschvorgang bei 37 °C folgte. Bevor die Membran dann mit dem Fluorescent Image Analyser FLA-5100 bei der entsprechenden Wellenlänge und bei einer Spannung zwischen 575 und 700 V gescannt wurde, wurde sie unter Druckluft getrocknet.

2.2.11.1 Auswertung der Western Blots

Die Auswertung der Western Blots erfolgte mit der Bildanalysesoftware ImageJ. Hierüber wurden die Intensitäten der einzelnen Banden des Western Blots bestimmt. Anschließend erfolgte die Anpassung dieser Intensitäten an die Beladung der Bahnen. Hierzu wurden die einzelnen Intensitäten auf ihre jeweilige β -Aktin-Bandenintensität angepasst. Dieser Schritt erfolgte jeweils für Behandlung und Kontrolle, um ungleiche Beladungen der Gelbahnen auszugleichen. Die so entstandenen Intensitäten sollten nun relativ zur Kontrolle betrachtet werden, um die Replikate miteinander vergleichen zu können. Hierfür wurden die jeweiligen Werte durch den Wert der Kontrolle dividiert, sodass die Kontrolle den Wert 1 erhielt. Die so ermittelten Werte der Behandlungen der verschiedenen Replikate konnten im Anschluss mittels Einstichproben-t-Tests durch die Analyse-Software GraphPads auf Signifikanz überprüft werden und graphisch dargestellt werden.

2.2.12 RNA-Isolation, cDNA-Synthese und qPCR

Die quantitative Echtzeit-PCR ermöglicht eine Quantifizierung von Genfragmenten in Echtzeit und beruht auf dem Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR). Eine Möglichkeit zur Durchführung dieser Methode ist die Nutzung des fluoreszierenden Farbstoffs SYBR Green. Dieser lagert sich in doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (DNA) ein. Am Ende jedes PCR-Zyklus kann so das Fluoreszenzsignal detektiert werden, welches proportional zur Menge der doppelsträngigen DNA zunimmt. Im Verlauf der qPCR wird in einem bestimmten Zyklus ein Schwellenwert erreicht, welcher als Ct (*cycle threshold*)-Wert bezeichnet

wird. Hier erreicht das Fluoreszenzsignal eine gewisse Intensität. Die relative Genexpression kann anschließend mit Hilfe dieser Ct-Werte bestimmt werden. Ein Problem, welches bei der Nutzung von SYBR Green auftreten kann, stellt die Anlagerung von SYBR Green in eventuell entstandene Primer-Dimere dar. Hier kann eine Schmelzkurve helfen, um die Existenz derartiger, ungewollter Produkte auszuschließen. Um solch eine Schmelzkurve zu generieren, werden die entstandenen DNA-Fragmente einer kontinuierlichen Temperaturerhö-
hung ausgesetzt und die Schmelztemperatur, bei der nur noch die Hälfte der ursprünglichen Helixstruktur vorhanden ist, wird bestimmt. Handelt es sich um lediglich ein DNA-Frag-
ment, erhält man auch nur einen Wert als Schmelztemperatur. Sind dagegen noch weitere DNA-Fragmente entstanden, erhält man weitere Werte (Holzapfel und Wickert 2007).

Die qPCR-Analyse der vorliegenden Arbeit erfolgte in mehreren Schritten. Zunächst wurden die Zellen wieder für 72 h mit ERp57 behandelt. Auch hier wurden unbehandelte Zellen als Kontrolle mitgeführt. Im Anschluss mussten die Zellen geerntet werden, um die Ribonukle-
insäure (RNA) zu isolieren. Diese RNA wurde dann in cDNA (komplementäre DNA) um-
geschrieben, mit welcher dann die eigentliche PCR vorgenommen werden konnte. Für jede Zelllinie wurden mindestens drei biologische Replikate hergestellt, von welchen dann jeweils drei Wells der PCR-Platte pro Gen befüllt wurden.

2.2.12.1 RNA-Isolation

Die vorgenommene RNA-Isolation beruht auf der *single step*-Methode, welche bereits in den 80er Jahren von Chomzynski und Sacchi beschrieben wurde und 2006 nochmal neu veröf-
fentlicht wurde. Bei dieser Methode macht man sich zu Nutzen, dass extrahierte RNA und DNA im sauren Milieu voneinander getrennt werden können. Zur Homogenisierung und Extraktion werden eine Denaturierungslösung mit u.a. Guanidiniumthiocyanat und eine Chloroformlösung benötigt. Nach Kühlung und Zentrifugation befindet sich die RNA in der oberen wässrigen Phase, während die DNA und Proteine in der unteren und mittleren Phase vorzufinden sind. Im nächsten Schritt sieht das Protokoll die Fällung mittels Isopro-
panol und der Denaturierungslösung vor. Im Anschluss soll ein Waschvorgang mit 75 %i-
gem Ethanol erfolgen. Zum Schluss kann die isolierte RNA gelöst werden und spektromet-
risch die Konzentration und Reinheit bestimmt werden (Chomczynski and Sacchi 2006).

In dieser Arbeit wurde das Protokoll leicht abgeändert. Die RNA-Isolation erfolgte mit TRIzol, Chloroform, 75 %igem Ethanol sowie mithilfe des PureLink RNA Mini Kit von Life Technologies.

Das Ernten der Zellen erfolgte mithilfe von Trypsin und anschließender Inaktivierung durch FCS-haltiges Medium. Nach Zentrifugation und Entfernung des Mediums, wurde das Zellpellet zweimal mit PBS gewaschen und zentrifugiert.

Das gereinigte Zellpellet wurde nun in 750 µl TRIzol resuspendiert und für ca. fünf Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurde 250 µl Chloroform hinzugefügt und das Ganze durch Invertieren gemischt. Nach kurzer Inkubation (drei Minuten) bei Raumtemperatur wurde für 15 Minuten bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert, sodass die Suspension in drei Phasen aufgeteilt wurde. In der Zwischenzeit wurden RNase-freie Tubes mit je 200 µl absolutem Ethanol vorbereitet. Nach abgeschlossener Zentrifugation wurde jeweils die obere Phase, welche die RNA enthielt (Hummon et al. 2007), abgenommen und im Ethanol resuspendiert. Anschließend wurde das Ganze in ein *spin cartridge* gefüllt und bei 12000 rpm und 4 °C für eine Minute zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde das *collection tube* verworfen und das *spin cartridge* in ein frisches *collection tube* umgesteckt und auf Eis gestellt. Auf das *spin cartridge* wurde 700 µl *wash buffer I* aus dem Kit gegeben und erneut zentrifugiert (12.000 rpm, 4 °C, 1 min). Als nächstes wurde das *collection tube* geleert. Auf das *spin cartridge* wurden nun 500 µl *wash buffer II* gegeben und erneut zentrifugiert. Hierauf erfolgte die erneute Ausleerung des *collection tubes* sowie die Zugabe von 500 µl *wash buffer II* mit darauffolgender Zentrifugation. Nach diesem Schritt wurde das *collection tube* durch ein Ungebrauchtes ausgetauscht und es erfolgte eine weitere 1,5-minütige Zentrifugation. Nun wurde das *collection tube* durch ein *recovery tube* ausgetauscht und für zwei Minuten bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Im Anschluss erfolgte je nach geschätzter RNA-Menge die Zugabe von 20 bis 50 µl RNase-freiem Wasser in das *spin cartridge* und eine erneute Ruhephase bei Raumtemperatur für eine Minute. Im letzten Schritt der RNA-Isolation wurde erneut bei 12000 rpm und 4 °C für eineinhalb Minuten zentrifugiert, sodass sich danach die RNA im *recovery tube* befand und das *spin cartridge* verworfen werden konnte. Das Tube mit der RNA wurde nun bei -80 °C bis zum weiteren Gebrauch eingefroren.

2.2.12.2 cDNA-Synthese

Um aus der zuvor gewonnenen RNA die gewünschte cDNA zu gewinnen, wurden zunächst mithilfe einer DNase von Sigma mögliche DNA-Verunreinigungen entfernt. Eingesetzt wurden jeweils ein bis fünf Mikrogramm der RNA. Um das benötigte Volumen zu ermitteln, wurde die RNA-Konzentration zunächst mit dem Spektralphotometer bestimmt. Die anschließend eingesetzte Menge RNA wurde mit Nuklease-freiem Wasser auf 7 µl aufgefüllt, um dann je 1 µl Reaktionspuffer und DNase hinzuzugeben. Das Ganze wurde nun nach

kurzer Zentrifugation für 15 Minuten bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Als nächstes folgte die Zugabe von 1 μ l Stopp-Puffer und erneute Zentrifugation sowie eine zehnmünütige Inkubation bei 70 °C im Thermocycler. Nach Abkühlung auf Eis, wurde die eigentliche cDNA-Synthese gestartet, bei welcher das Kit von Thermo Scientific genutzt wurde. Zunächst erfolgte die Zugabe von 1 μ l der Primermischung (Oligo dt). Nach kurzer Zentrifugation wurden die Proben bei 65 °C für fünf Minuten im Thermocycler inkubiert und anschließend wieder auf Eis gekühlt. Im letzten Schritt wurden nacheinander 4 μ l *5x reaction buffer*, 1 μ l RNAse Inhibitor, 2 μ l dNTP und 2 μ l der Reversen Transkriptase hinzugefügt. Nach kurzer Zentrifugation erfolgte die Inkubation bei 45 °C für eine Stunde sowie im Anschluss 70 °C für fünf Minuten im Thermocycler. Daraufhin wurde die fertige cDNA bis zum weiteren Gebrauch bei -80 °C gelagert.

2.2.12.3 qPCR

Für die eigentliche qPCR, dessen Prinzip bereits erläutert wurde (s.o.), wurde zunächst ein Mix aus dem Fast SYBR Green Reagenz (10 μ l/Well), dem Primer (300 nM) sowie Nuklease-freiem Wasser hergestellt. Hiervon konnten später 17 μ l/Well eingesetzt werden. Die cDNA wurde so verdünnt, dass von der Ursprungs-RNA eine Konzentration von 10 ng/ μ l vorlag, wovon schließlich 3 μ l, also 30 ng, je Well eingesetzt wurden. Der Mix und die verdünnte cDNA wurden nacheinander in eine 96-Well-PCR-Platte pipettiert und zentrifugiert. Im Anschluss wurde die qPCR im StepOnePlus™ Real-Time PCR System gestartet. Hierzu wurde eine initiale Denaturierungszeit von zehn Minuten bei 95 °C gewählt, gefolgt von vierzig Runden, bestehend aus einer 20-sekündigen Denaturierungszeit bei 95 °C sowie der 30-sekündigen *annealing*-Zeit bei 60 °C. Die Ergebnisse konnten schließlich mithilfe der StepOne Software v2.3 betrachtet werden.

2.2.12.4 Auswertung mittels 2^{-ddCt} -Methode

Für die Auswertung der qPCR wurde die 2^{-ddCt} -Methode verwendet. Hierbei wird die relative Änderung des Zielgens der behandelten Zellen in Bezug auf die Kontrollzellen bestimmt. Um den ddCt-Wert zu bilden, wird zunächst der dCt-Wert bestimmt, in dem die Differenz des Ct-Werts des Zielgens und des Referenzgens (*GAPDH*) gebildet wird. Anschließend wird die Differenz von dCt der Behandlung und dCt der Kontrolle gebildet, so dass man ddCt erhält. Im letzten Schritt erfolgt die Bildung der Potenz: 2^{-ddCt} . Diese Verhältniswerte wurden mit Hilfe des Einstichproben-t-Tests auf statistische Signifikanz überprüft.

Die Quantifizierung mittels 2^{-ddCT} setzt einige Annahmen voraus: So sollte die Effizienz der Amplifikation des Ziel- und Referenzgens gleich sein. Dieses kann mit Hilfe von unterschiedlicher Verdünnung der cDNA überprüft werden. Außerdem setzt die Analyse mit Hilfe von ddCt das Mitführen eines *housekeeping*-Gens voraus, wie beispielweise *GAPDH*. Auch andere *housekeeping*-Gene sind möglich. Voraussetzung hierfür ist, dass die Expression durch die Behandlung unbeeinflusst bleibt (Livak and Schmittgen 2001).

3 Ergebnisse

In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der durchgeführten Experimente dargestellt.

3.1 Einfluss von sERp57 auf die Zellviabilität

Die Durchführung der MTT-Proliferations-Tests erfolgte, wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben. Die Abbildungen 7 bis 9 zeigen jeweils die prozentualen Werte der optischen Dichten. Die Kontrolle nach 24 h stellt den Referenzwert mit 100 % dar. Für alle drei Zellreihen zeigte sich eine Abnahme der Extinktionen und somit der Viabilität durch die ERp57-Behandlung. Dieser Effekt nahm durch eine steigende ERp57-Konzentration zu. Die statistische Auswertung mittels Two-Way-ANOVA zeigte v.a. bei den TK173-Zellen starke statistische Signifikanzen bezüglich der Ergebnisse. Aber auch bei den HK2- und MDCK-Zellen konnten statistisch signifikante Unterschiede ausgemacht werden.

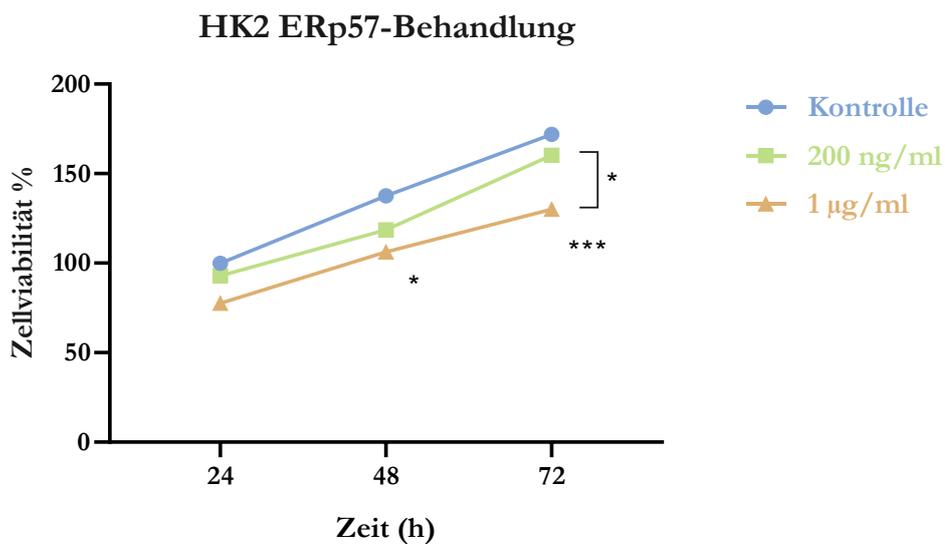


Abbildung 7: MTT-Test von HK2-Zellen. HK2-Zellen wurden für 24, 48 und 72 h mit 200 ng/ml bzw. 1 µg/ml ERp57 behandelt. Bezogen auf die Kontrolle zeigt sich eine abnehmende Viabilität. Im zeitlichen Verlauf ist bei allen drei Gruppen eine Zunahme zu erkennen. Die Liniendiagramme zeigen jeweils den Mittelwert, prozentual zum Mittelwert der 24 h-Kontrolle. Die statistische Analyse erfolgte mittels zweifacher Varianzanalyse und Tukey-Tests, (*) $p \leq 0,05$ (**) $p \leq 0,01$ (***) $p \leq 0,001$ (****) $p \leq 0,0001$.

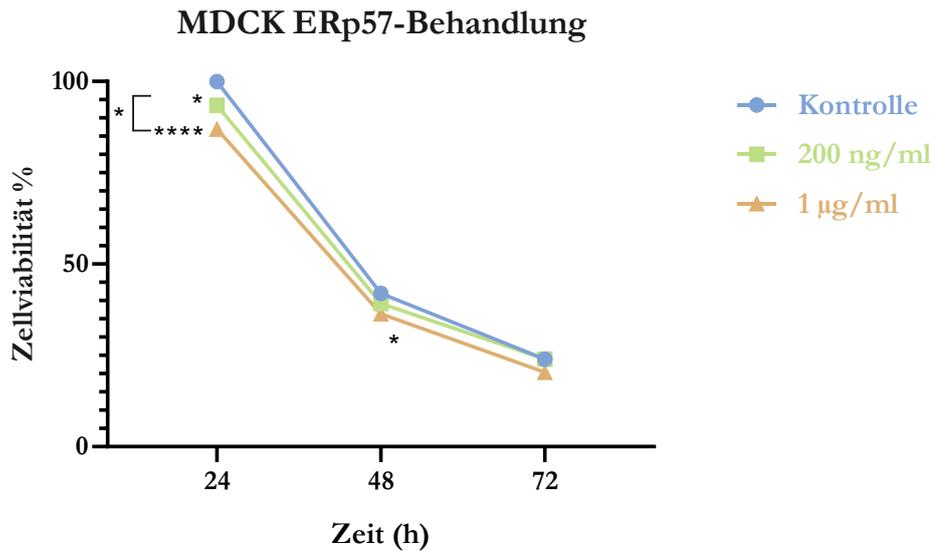


Abbildung 8: MTT-Test von MDCK-Zellen. MDCK-Zellen wurden für 24, 48 und 72 h mit 200 ng/ml bzw. 1 µg/ml ERp57 behandelt. Bezogen auf die Kontrolle zeigt sich eine leicht abnehmende Viabilität. Im zeitlichen Verlauf ist bei allen drei Gruppen eine deutliche Abnahme zu erkennen. Die Liniendiagramme zeigen jeweils den Mittelwert, prozentual zum Mittelwert der 24 h-Kontrolle. Die statistische Analyse erfolgte mittels zweifacher Varianzanalyse und Tukey-Tests, (*) $p \leq 0,05$ (**) $p \leq 0,01$ (***) $p \leq 0,001$ (****) $p \leq 0,0001$.

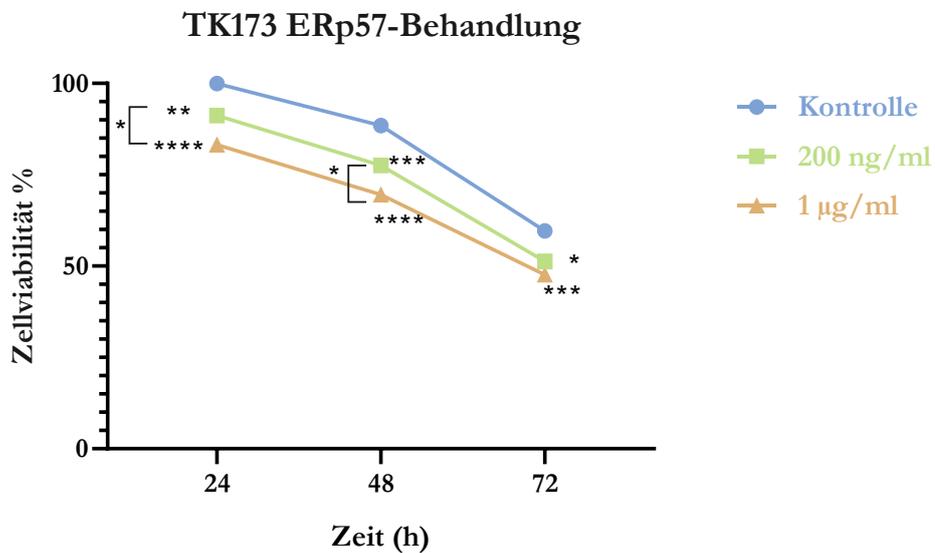


Abbildung 9: MTT-Test von TK173-Zellen. TK173-Zellen wurden für 24, 48 und 72 h mit 200 ng/ml bzw. 1 µg/ml ERp57 behandelt. Bezogen auf die Kontrolle zeigt sich eine abnehmende Viabilität. Im zeitlichen Verlauf ist bei allen drei Gruppen eine Abnahme zu erkennen. Die Liniendiagramme zeigen jeweils den Mittelwert, prozentual zum Mittelwert der 24 h-Kontrolle. Die statistische Analyse erfolgte mittels zweifacher Varianzanalyse und Tukey-Tests, (*) $p \leq 0,05$ (**) $p \leq 0,01$ (***) $p \leq 0,001$ (****) $p \leq 0,0001$.

3.2 Apoptose-Aktivität

Im Apoptose-Test, welcher mit Hilfe von Annexin V und PI, wie in Kapitel 2.2.6 beschrieben, durchgeführt wurde, zeigten sich schwache, nicht ganz eindeutige Effekte zwischen Kontrolle und den Behandlungen mit ERp57. Die statistische Auswertung mittels zweifacher Varianzanalyse (Faktoren: Zeit und Behandlung) ergab bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ nur wenige, statistisch signifikante Unterschiede, wenn man allein den Faktor der Behandlung berücksichtigt. Dort ergab sich nur für die MDCK-Zellen eine statistische Signifikanz. Der Tukey-Test bestätigte diesen signifikanten Unterschied schließlich für die Ergebnisse nach 72 h. Während die Varianzanalyse für den Faktor Behandlung bei den HK2- und TK173-Zellen keine statistische Signifikanz nachweisen konnte, zeigte sich im Tukey-Test bei den HK2- nach 24 h bzw. bei den TK173-Zellen nach 72 h ein statistisch signifikanter Unterschied. Während bei den MDCK-Zellen nach 72 h eine Abnahme der früh-apoptotischen Zellen durch die ERp57-Behandlung zu verzeichnen war, ergab sich bei den TK173-Zellen die Tendenz des gegenteiligen Effekts.

Der Faktor Zeit zeigte in der zweifachen Varianzanalyse bei allen drei Zelllinien einen starken statistisch signifikanten Effekt. Im Tukey-Test zeigte sich dann bei den MDCK- und den TK173-Zellen lediglich zwischen 24 und 48 h sowie bei den HK2-Zellen zwischen 48 und 72 h keine statistische Signifikanz. Die folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse der drei Zelllinien.

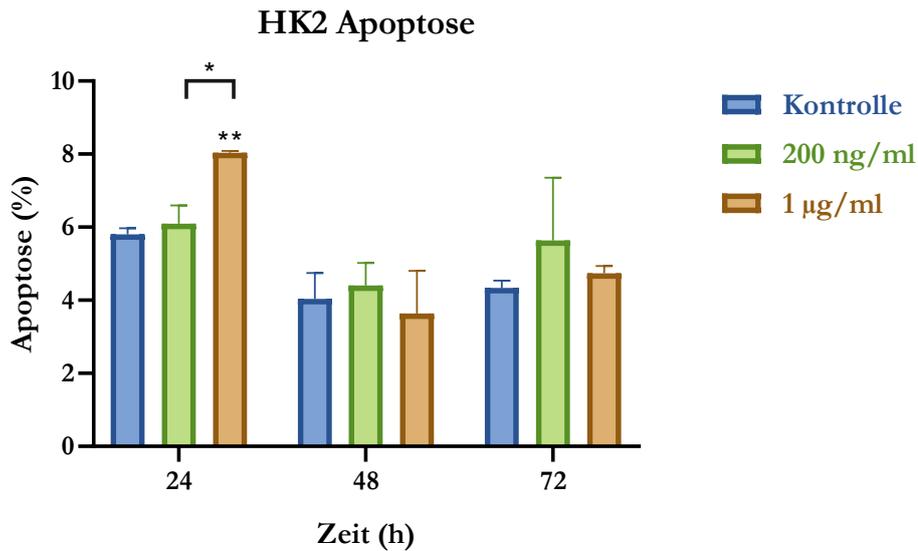


Abbildung 10: Apoptose-Test der HK2-Zellen. HK2-Zellen wurden für 24, 48 und 72 h mit 200 ng/ml bzw. 1 µg/ml ERp57 behandelt. Im Anschluss wurde ein Annexin V-Test durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte der früh-apoptotischen Zellen (Annexin+/PI-) in Prozent im Säulendiagramm mit Standardabweichung. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifacher Varianzanalyse und Tukey-Tests: (*) $p \leq 0,05$ (**) $p \leq 0,01$ (***) $p \leq 0,001$ (****) $p \leq 0,0001$.

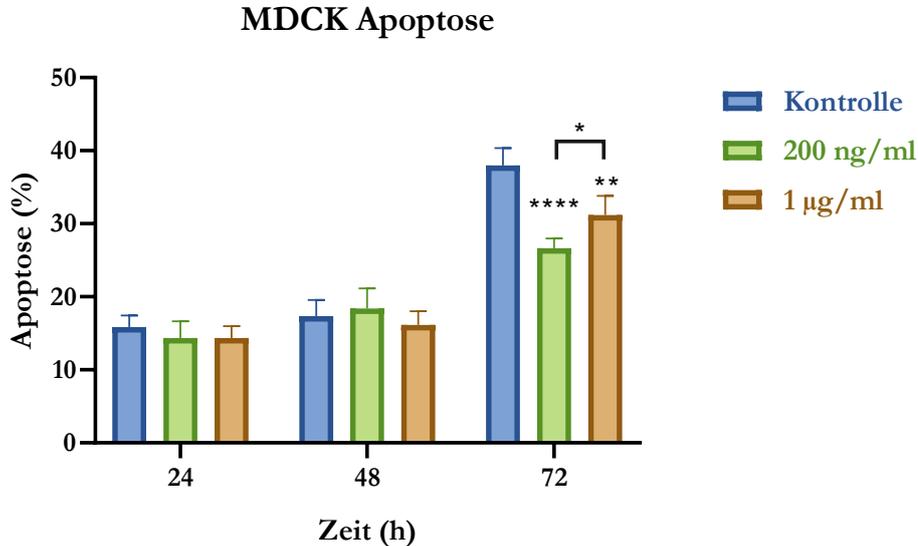


Abbildung 11: Apoptose-Test der MDCK-Zellen. MDCK-Zellen wurden für 24, 48 und 72 h mit 200 ng/ml bzw. 1 µg/ml ERp57 behandelt. Im Anschluss wurde ein Annexin V-Test durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte der früh-apoptotischen Zellen (Annexin+/PI-) in Prozent im Säulendiagramm mit Standardabweichung. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifacher Varianzanalyse und Tukey-Tests: (*) $p \leq 0,05$ (**) $p \leq 0,01$ (***) $p \leq 0,001$ (****) $p \leq 0,0001$.

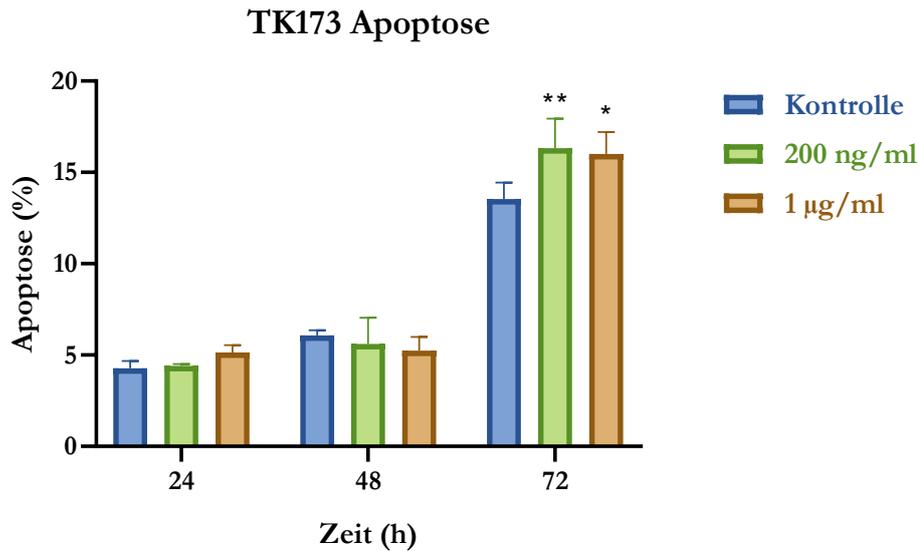


Abbildung 12: Apoptose-Test der TK173-Zellen. TK173-Zellen wurden für 24, 48 und 72 h mit 200 ng/ml bzw. 1 µg/ml ERp57 behandelt. Im Anschluss wurde ein Annexin V-Test durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte der früh-apoptotischen Zellen (Annexin+/PI-) in Prozent im Säulendiagramm mit Standardabweichung. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifacher Varianzanalyse und Tukey-Tests: (*) $p \leq 0,05$ (**) $p \leq 0,01$ (***) $p \leq 0,001$ (****) $p \leq 0,0001$.

3.3 Einfluss von sERp57 auf das Intermediärfilament Vimentin

Die Expression von Vimentin wurde mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung und Western Blots untersucht.

Sowohl in den Kontrollen als auch in den Behandlungen der drei Zelllinien konnte Vimentin in der Immunfluoreszenz angefärbt werden. Ein deutlicher Unterschied zwischen Behandlungen und Kontrollen konnte hier nicht festgestellt werden.

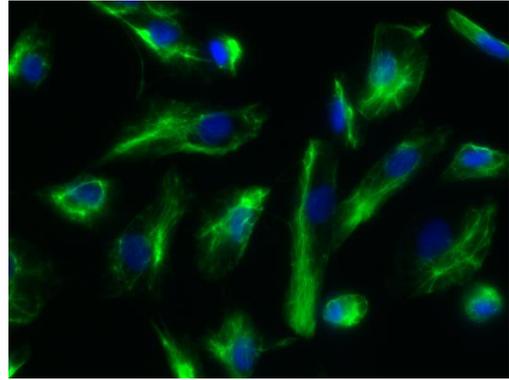
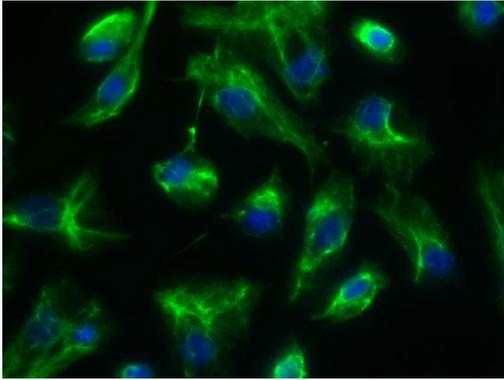


Abbildung 13: Indirekte Vimentin-Immunfluoreszenzfärbung von HK2-Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit 200 ng/ml ERp57 (rechts) und unbehandelter Kontrolle (links). Die Vimentin-Filamente sind grün dargestellt, die Zellkerne in blau (DAPI).

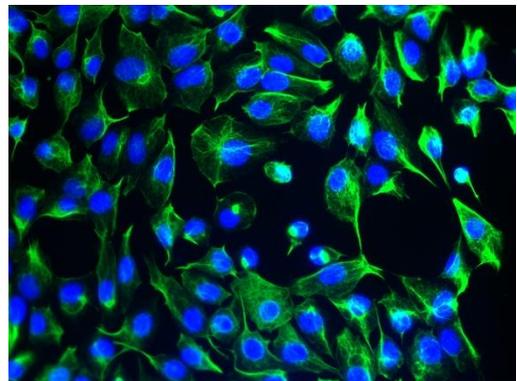
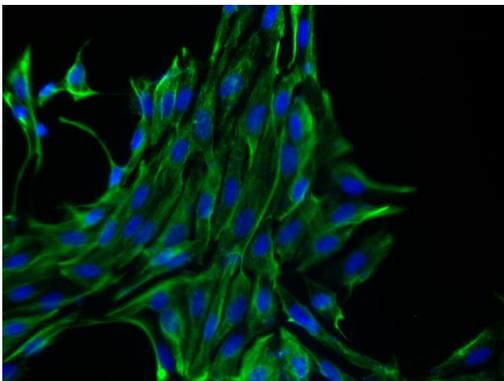


Abbildung 14: Indirekte Vimentin-Immunfluoreszenzfärbung von MDCK-Zellen nach 48-stündiger Behandlung mit 200 ng/ml ERp57 (rechts) und unbehandelter Kontrolle (links). Die Vimentin-Filamente sind grün dargestellt, die Zellkerne in blau (DAPI).

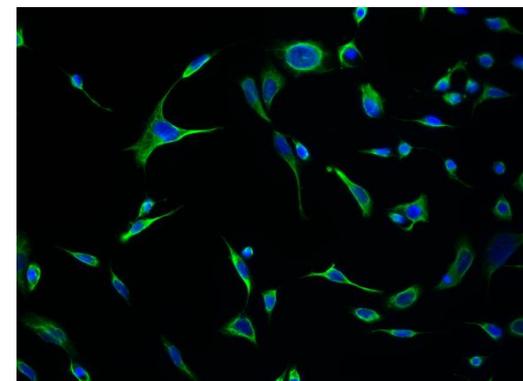
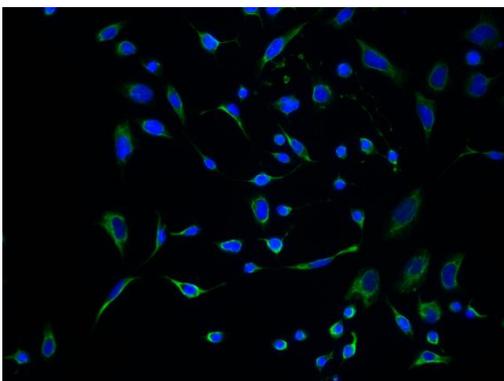
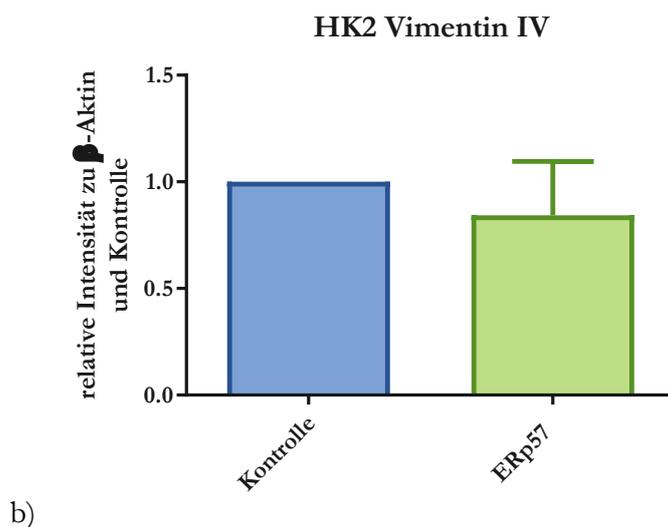
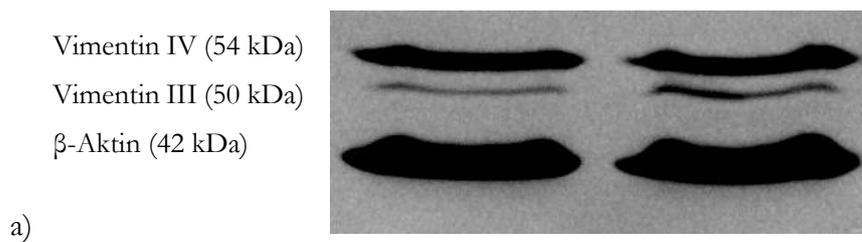
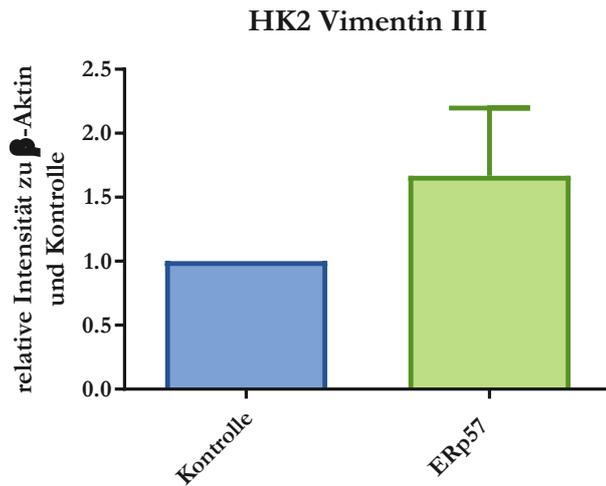


Abbildung 15: Indirekte Vimentin-Immunfluoreszenzfärbung von TK173-Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit 200 ng/ml ERp57 (rechts) und unbehandelter Kontrolle (links). Die Vimentin-Filamente sind grün dargestellt, die Zellkerne in blau (DAPI).

In allen drei Zelllinien zeigte der Western Blot einen Einfluss von sERp57 auf das Intermediärfilament Vimentin, indem es einzelne Formen zu regulieren scheint, vor allem aber bei den MDCK-Zellen. Es konnten mit dem Antikörper von Agilent Technologies mehrere Formen detektiert werden. Die Expression von Vimentin IV in den TK173- und MDCK-Zellen nimmt durch die Behandlung ab, während es in der Expression von Vimentin III kaum Unterschiede zu verzeichnen gab. Zum Teil konnte bei den MDCK- und TK-173-Zellen auch noch eine dritte und vierte Form nachgewiesen werden (Vimentin II, Vimentin I). Wenn dies der Fall war, konnte man hier eine zunehmende Expression erkennen. Bei den HK2-Zellen wurde ausschließlich Vimentin IV und III detektiert, wobei es für Vimentin III eine zunehmende Tendenz durch die Behandlung zu beobachten gab.

Bei den HK2-Zellen ergab der Einstichproben-t-Test bei einem Signifikanzniveau von 0,05 keine statistische Signifikanz.

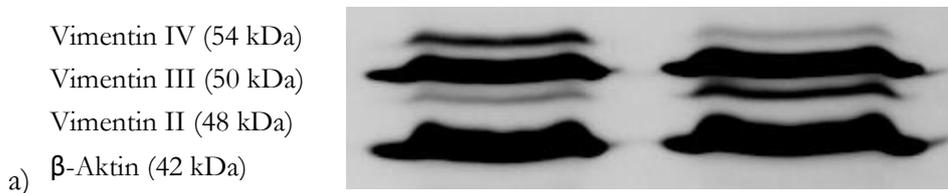




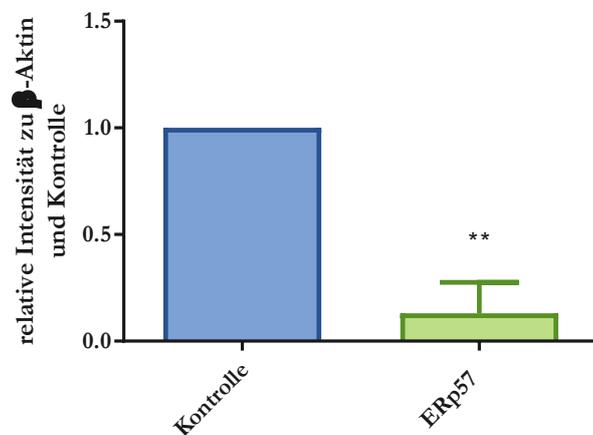
c)

Abbildung 16: HK2 Vimentin-Western Blot a: Vimentin-Western Blot von ERp57-behandelten HK2-Zellen (rechts) und unbehandelter Kontrolle (links) mit β -Aktin als Ladungskontrolle (untere Bande). b/c: Relative Intensitäten der Vimentin-Western Blots von ERp57 behandelten HK2-Zellen zu β -Aktin und zur Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Statistisch ausgewertet mittels Einstichproben-t-Tests, (*) $p \leq 0,05$ (**) $\leq 0,01$ (***) $p \leq 0,001$ (****) $p \leq 0,0001$.

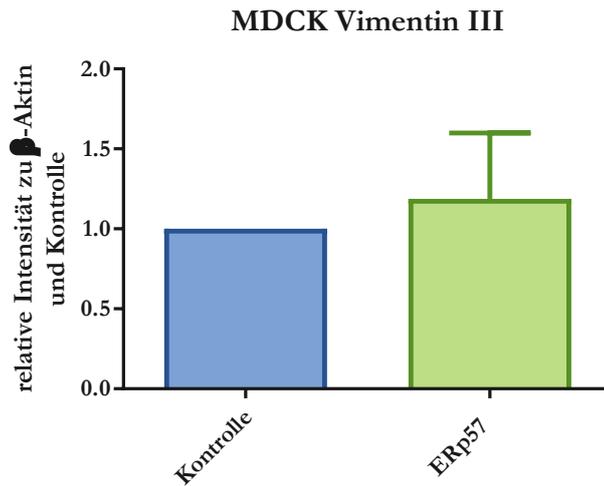
Besonders ausgeprägt erscheint die Herunterregulierung von Vimentin IV bei den MDCKs. Hier ergab der Einstichproben-t-Test ein statistisch signifikantes Ergebnis.



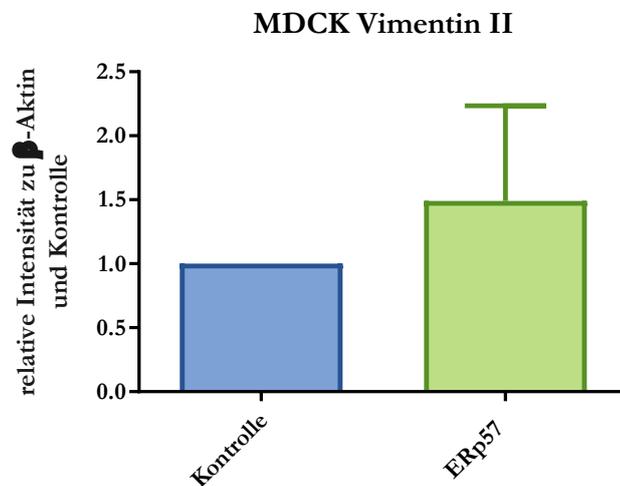
MDCK Vimentin IV



b)



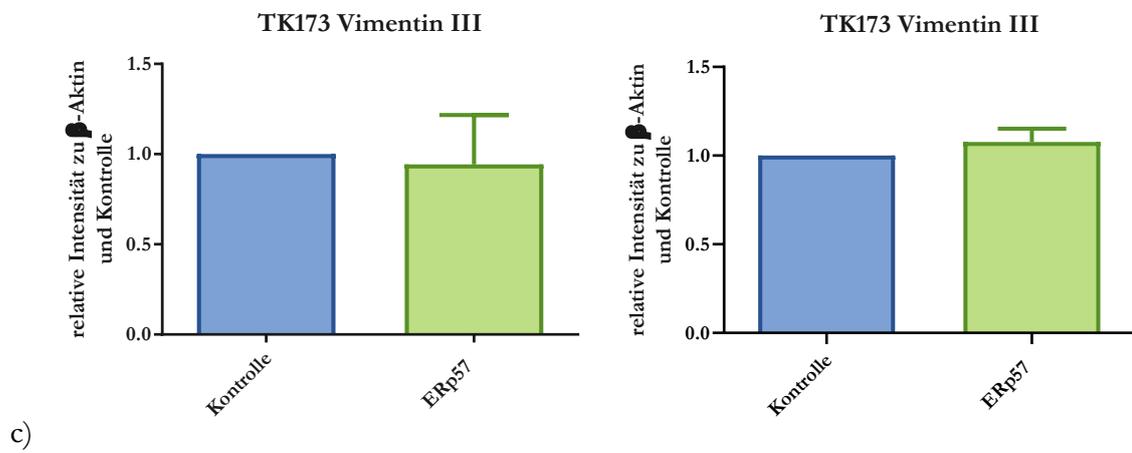
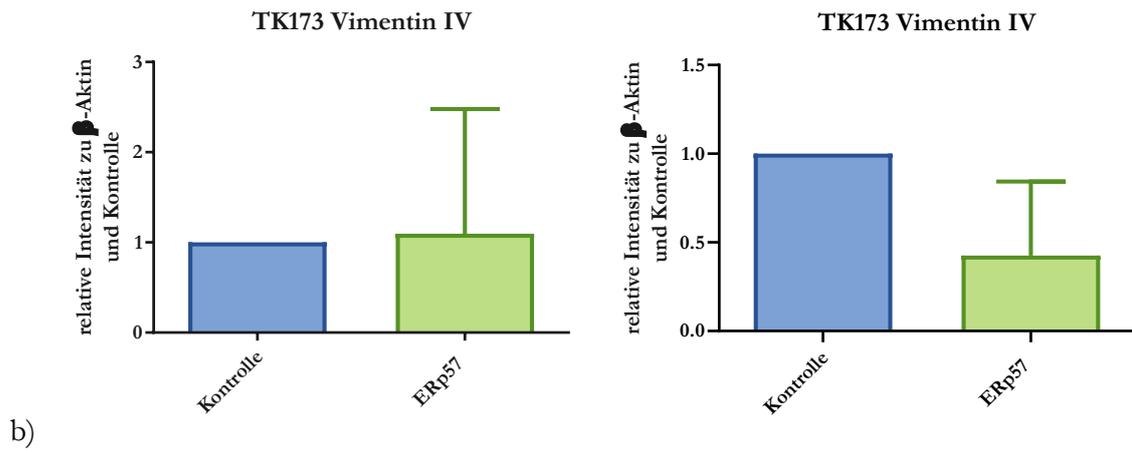
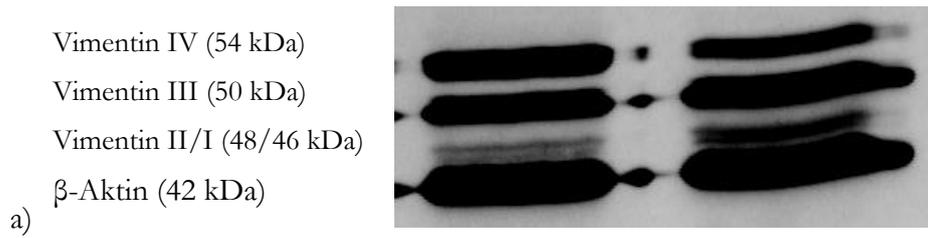
c)

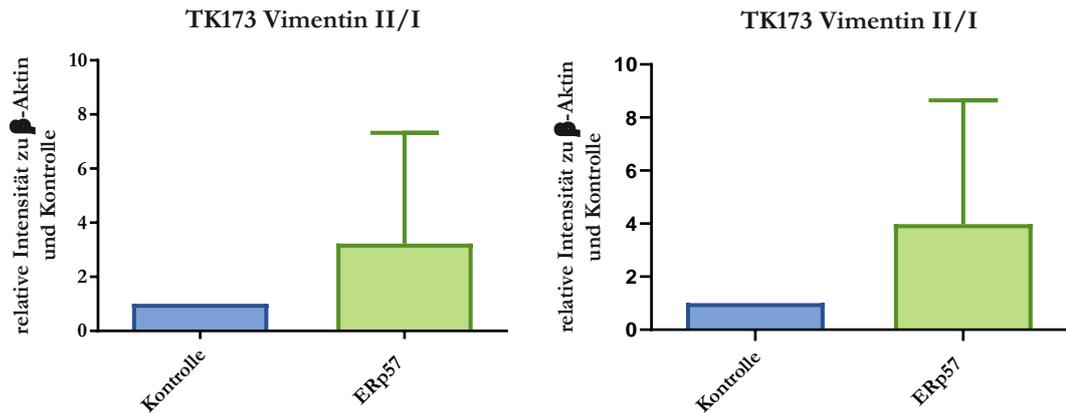


d)

Abbildung 17: MDCK Vimentin-Western Blot a: Vimentin-Western Blot von ERp57-behandelten MDCK-Zellen (rechts) und unbehandelter Kontrolle (links) mit β -Aktin als Ladungskontrolle (untere Bande). b/c/d: Relative Intensitäten der einzelnen Vimentin-Banden im Western Blot von ERp57 behandelten MDCK-Zellen zu β -Aktin und zur Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Statistisch ausgewertet mittels Einstichproben-t-Tests, (*) $p \leq 0,05$ (**) $\leq 0,01$ (***) $p \leq 0,001$ (****) $p \leq 0,0001$.

Betrachtet man den Vimentin Western Blot der TK173-Zelllinie, so erkennt man auch hier eine Abnahme von Vimentin IV und eine Zunahme von Vimentin II und I (Abbildung 18a). Bezüglich Vimentin IV erkennt man diese Ergebnisse in den Säulendiagrammen zunächst nicht, da eins der vier Replikate anders ausfiel und so das Ergebnis stark beeinflusst, weshalb auf der rechten Seite jeweils die Säulendiagramme mit Ausschluss dieses Ausreißers dargestellt werden.





d)

Abbildung 18: TK173 Vimentin-Western Blot a: Vimentin-Western Blot von ERp57-behandelten TK173-Zellen (rechts) und unbehandelter Kontrolle (links) mit β -Aktin als Ladungskontrolle (untere Bande) b/c/d: Relative Intensitäten der Vimentin-Western Blots von ERp57 behandelten MDCK-Zellen zu β -Aktin und zur Kontrolle. Links: $n=4$, rechts: $n=3$ ohne Ausreißer. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Statistisch ausgewertet mittels Einstichproben-t-Tests bzw. Einstichproben-Wilcoxon-Tests, (*) $p \leq 0,05$ (**) $\leq 0,01$ (***) $p \leq 0,001$ (****) $p \leq 0,0001$.

3.4 Einfluss von sERp57 auf E-Cadherin

Auch das Adhäsionsprotein E-Cadherin wurde in der indirekten Immunfluoreszenzfärbung sowie im Western Blot bei den MDCK-Zellen untersucht.

Die Färbung zeigte sowohl in der Kontrolle als auch in der Behandlung eine deutliche E-Cadherin-Expression. Die Zellen der Behandlung verloren allerdings den Kontakt zueinander und nahmen eine rundlichere Struktur an, was in den Kontrollzellen nicht in gleichem Ausmaß zu beobachten war.

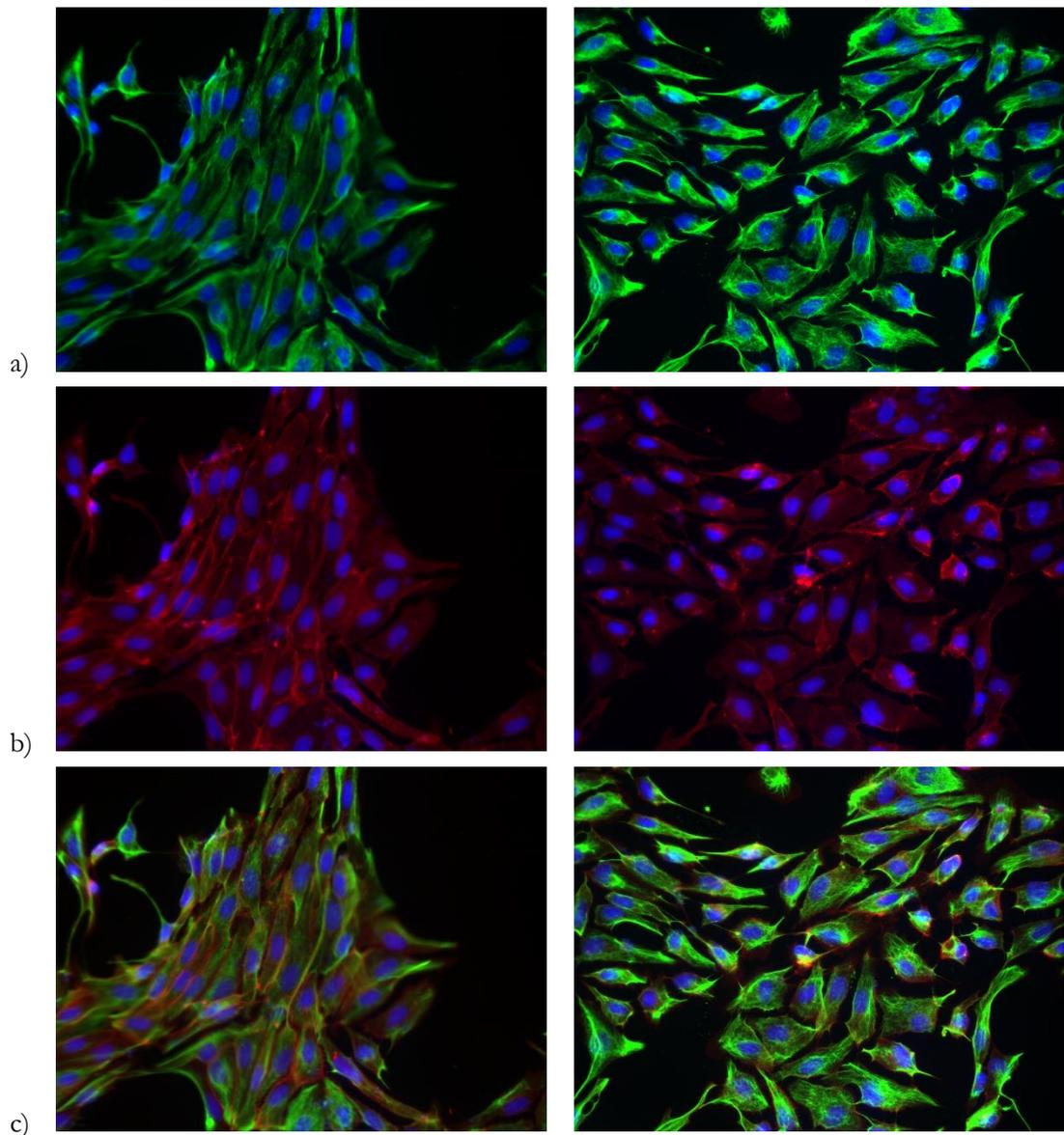


Abbildung 19: Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von MDCK-Zellen nach 48-stündiger Behandlung mit 200 ng/ml ERp57 (rechts) und unbehandelter Kontrolle (links). E-Cadherin ist in rot dargestellt, Vimentin in grün, die Zellkerne in blau (DAPI). a) Vimentin b) E-Cadherin c) Vimentin und E-Cadherin.

Um den interzellulären Kontaktverlust zu quantifizieren und zu vergleichen, wurden jeweils die Zellen mit Kontaktverlust gezählt und durch die Gesamtanzahl der Zellen dividiert. Die Ergebnisse sind im Säulendiagramm in Abbildung 20 dargestellt. Zellen wurden als Kontaktverlust gewertet, wenn etwa mindestens 50 % der Zellmembran frei lag. Bei Zellen, die am Rand eines Verbundes lagen, wurde der nach außen gerichtete Teil der Zelle unberücksichtigt gelassen.

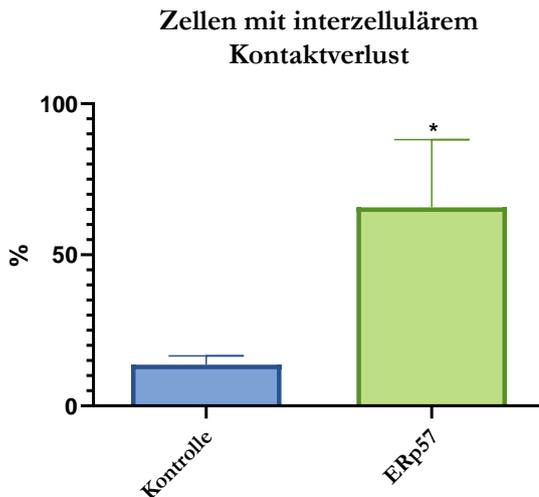
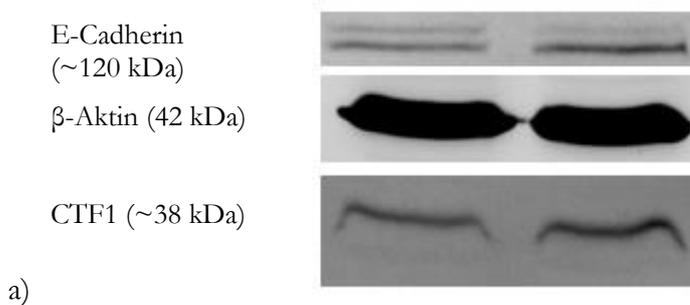
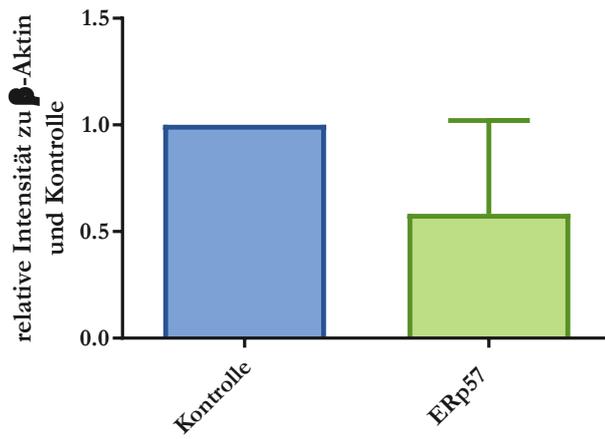


Abbildung 20: Relativer Anteil der Zellen mit interzellulärem Kontaktverlust von Kontrolle und ERp57-behandelten Zellen. Statistisch ausgewertet mittels t-Tests, (*) $p \leq 0,05$ (**) $\leq 0,01$ (***) $p \leq 0,001$ (****) $p \leq 0,0001$.

In den Ergebnissen der Western Blots lässt sich eine Zunahme der E-Cadherin-Expression nach ERp57-Behandlung erkennen. Mit dem verwendeten Antikörper von Cell Signaling ließen sich im Bereich zwischen 100 und 150 kDa zwei Banden nachweisen. Wertet man diese Banden getrennt voneinander aus, zeigt sich die Zunahme lediglich bei der unteren Bande, wohingegen die obere Bande durch die Behandlung eher an Intensität verliert. Eine weitere Bande wurde im Bereich der 37 kDa-Markerbande detektiert, wobei es sich um das 38 kDa-große C-terminale Fragment (CTF)1 handeln könnte, welches durch extrazelluläre Metalloproteasen generiert wird (Ferber et al. 2008). Hier erkennt man zwischen Kontrolle und Behandlung aber kaum Unterschiede. Des Weiteren zeigten sich durch Verwendung des oben genannten Antikörpers noch zwei weitere Banden im Bereich zwischen 50 und 75 kDa, dessen Ursprünge aber unklar sind.

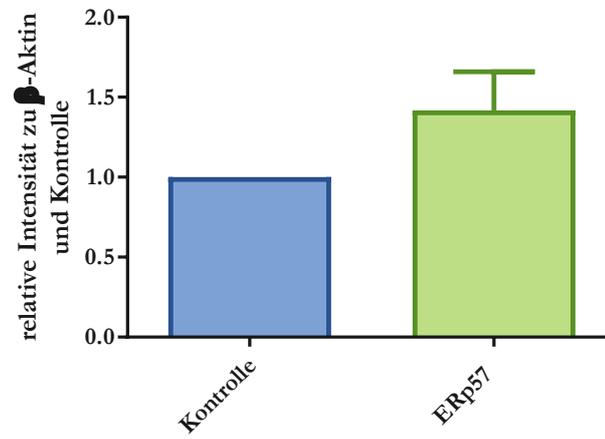


MDCK E-Cadherin obere Bande



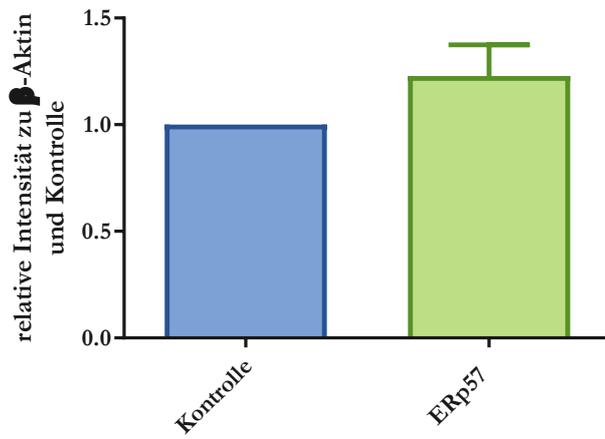
b)

MDCK E-Cadherin untere Bande

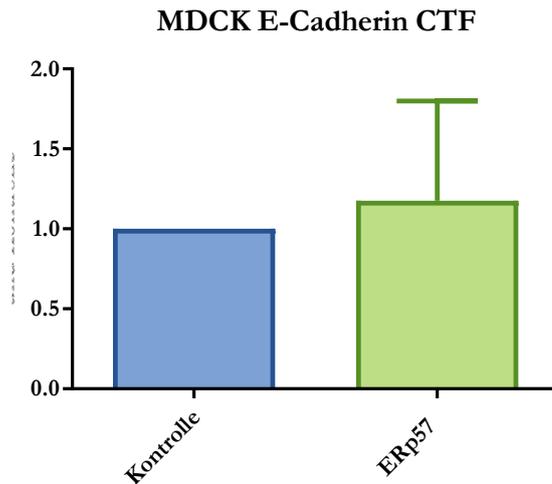


c)

MDCK E-Cadherin gesamt



d)



e)

Abbildung 21: MDCK E-Cadherin-Western Blot a: E-Cadherin-Western Blot von ERp57-behandelten MDCK-Zellen (rechts) und unbehandelter Kontrolle (links) mit β -Aktin als Ladungskontrolle. b/c/d/e: Relative Intensitäten der oberen E-Cadherin-Bande/ der unteren E-Cadherin-Bande/ Gesamt-E-Cadherin Expression (obere und untere Bande)/der CTF1-Bande in Western Blots von ERp57-behandelten MDCK-Zellen zu β -Aktin und zur Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Statistisch ausgewertet mittels Einstichproben-t-Tests bzw. Einstichproben-Wilcoxon-Tests, (*) $p \leq 0,05$ (**) $\leq 0,01$ (***) $p \leq 0,001$ (****) $p \leq 0,0001$.

3.5 Inkonsistente Fibronektinexpression

Bei der Untersuchung von Fibronektin im Zelllysate mittels Western Blots zeigten sich starke Schwankungen in den einzelnen Replikaten aller Zelllinien, sodass es schwer ist, eine Aussage über den Einfluss von sezerniertem ERp57 auf die Fibronektin-Expression bzw. -synthese zu machen, sodass hier auf eine ausführliche Darstellung dieser Ergebnisse verzichtet wird. Stattdessen zeigt die Abbildung 22 die Western Blot-Analyse des Fibronektins im Überstand. Hier konnte aber entsprechend keine Ladungskontrolle durchgeführt werden und es erfolgte lediglich die Untersuchung in jeweils einem Replikat, weshalb keine statistische Auswertung erfolgte. Es sind keine eindeutigen Unterschiede zwischen den jeweiligen Kontrollen und Behandlungen sichtbar.

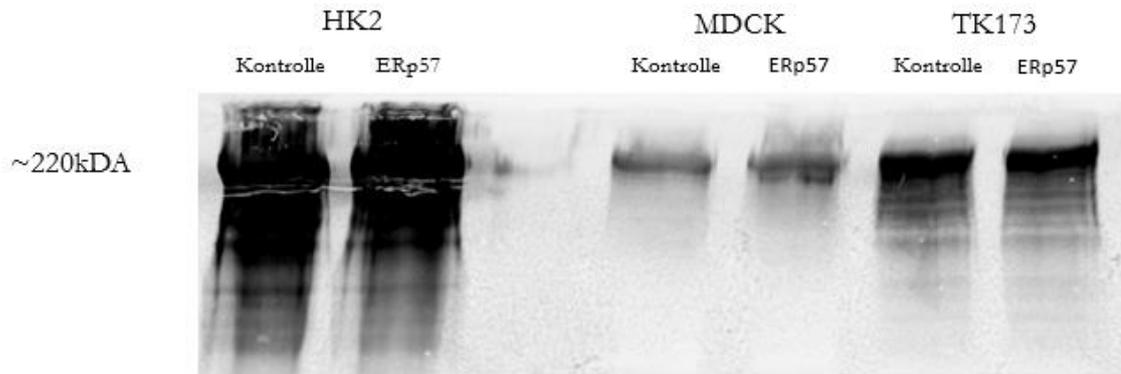


Abbildung 22: Fibronectin-Western Blot aus den Überständen von ERp57-behandelten Zellen und unbehandelter Kontrollen.

3.6 Expression von Alpha-Smooth Muscle Actin

Während die HK2-Zellen kaum eine Expression von α -SMA zeigten, erkennt man bei den MDCKs eine deutliche Expression sowohl in der Kontrolle als auch in der Behandlung.

Auch die Färbungen der TK173-Zellen zeigen eine α -SMA-Expression in Kontrolle und Behandlung. Wesentliche Unterschiede durch die Behandlung scheint es nicht zu geben.

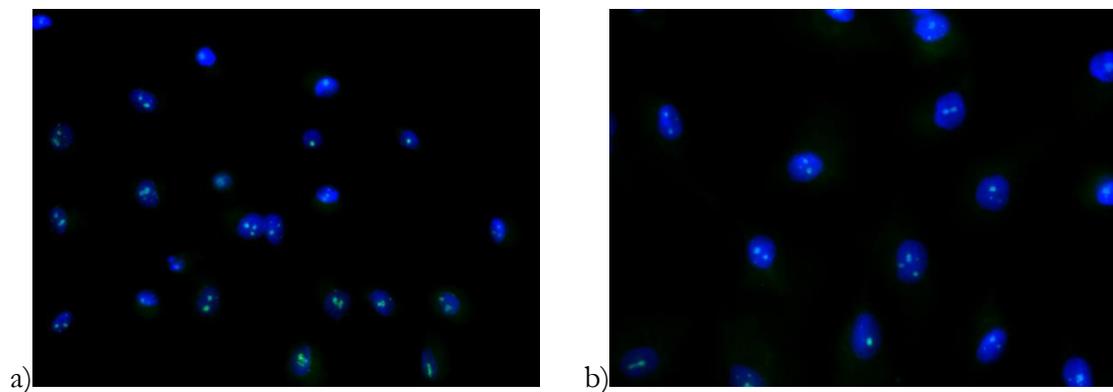


Abbildung 23: Alpha-Smooth Muscle Actin-Färbung von HK2-Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit 200 ng/ml ERp57 (b) und unbehandelter Kontrolle (a). α -SMA ist grün dargestellt, die Zellkerne in blau (DAPI).

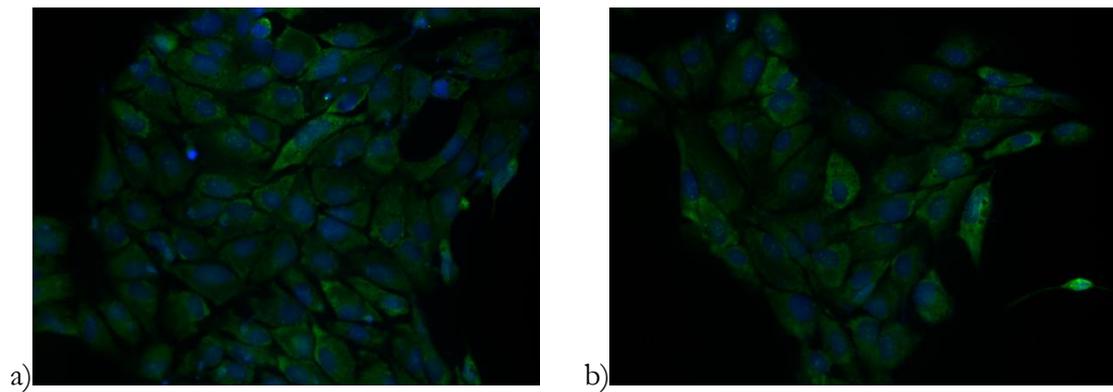


Abbildung 24: Alpha-Smooth Muscle Actin-Färbung von MDCK Zellen nach 48-stündiger Behandlung mit 200 ng/ml ERp57 (b) und unbehandelter Kontrolle (a). α -SMA ist in grün dargestellt, die Zellkerne in blau (DAPI).

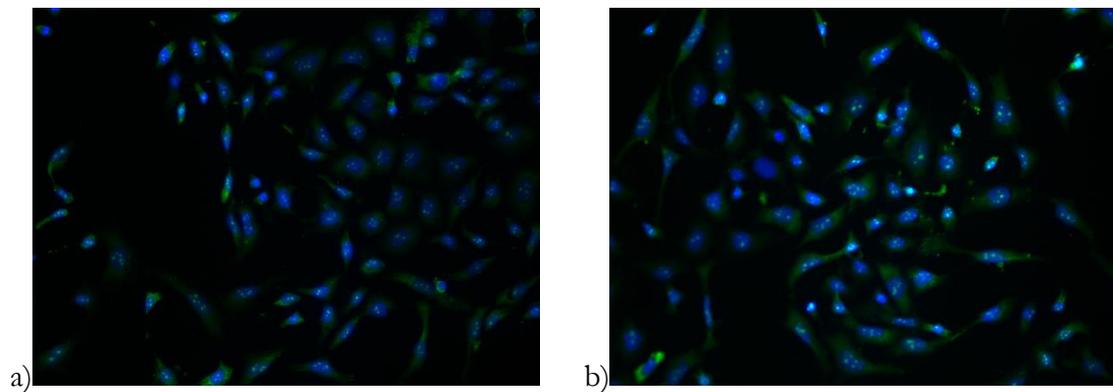


Abbildung 25: Alpha-Smooth Muscle Actin-Färbung von TK173-Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit 200 ng/ml ERp57 (b) und unbehandelter Kontrolle (a). α -SMA ist in grün dargestellt, die Zellkerne in blau (DAPI).

3.7 Regulation auf Genebene

In der qPCR wurden jeweils die Genexpressionen von verschiedenen Fibrosemarkern untersucht. Die Gene für α -SMA (*ACTA2*), S100A4, Integrin α V (*ITGAV*) und Fibronectin (*FN1*) wurden bei allen drei Zelllinien untersucht sowie für die MDCK-Zellen zusätzlich E-Cadherin (*CDH1*). In der statistischen Auswertung durch den Einstichproben-t-Test ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede, wobei es bei den TK173- und MDCK-Zellen für alle Gene (einschließlich *CDH1*) eine zunehmende Tendenz zu geben scheint.

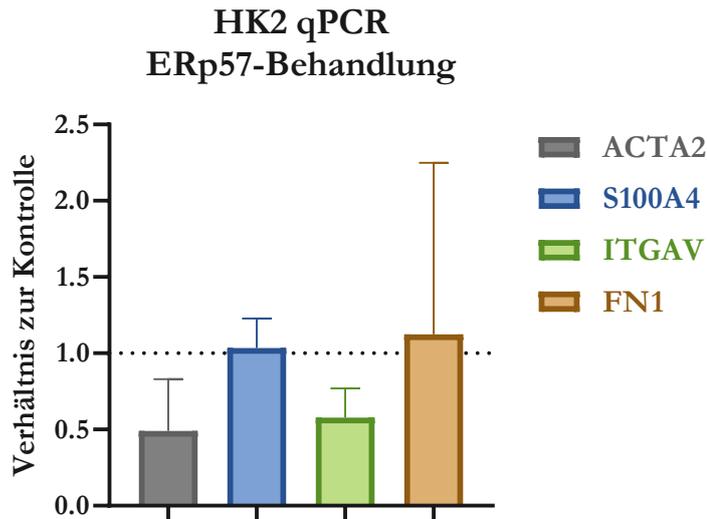


Abbildung 26: Ergebnisse der qPCR-Analyse der HK2-Zellen. Dargestellt sind die Ergebnisse der 2^{-ddCt} -Methode als Mittelwerte mit Standardabweichung. Statistisch ausgewertet mittels Einstichproben-t-Tests, (*) $p \leq 0,05$ (**) $p \leq 0,01$ (***) $p \leq 0,001$ (****) $p \leq 0,0001$.

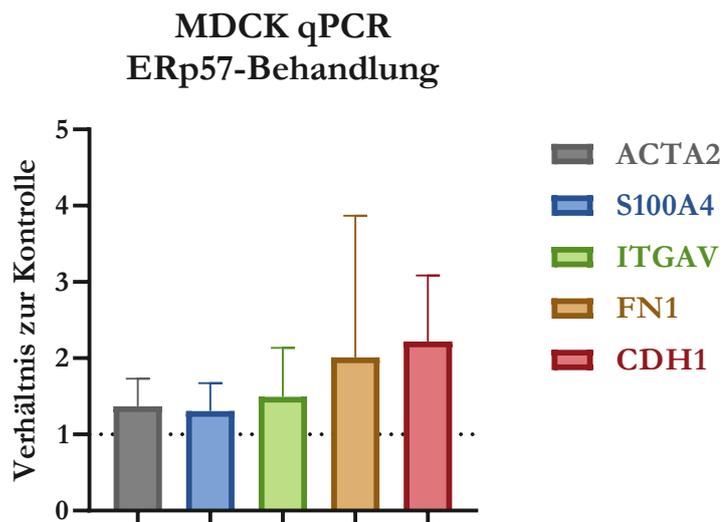


Abbildung 27: Ergebnisse der qPCR-Analyse der MDCK-Zellen. Dargestellt sind die Ergebnisse der 2^{-ddCt} -Methode als Mittelwerte mit Standardabweichung. Statistisch ausgewertet mittels Einstichproben-t-Tests, (*) $p \leq 0,05$ (**) $p \leq 0,01$ (***) $p \leq 0,001$ (****) $p \leq 0,0001$.

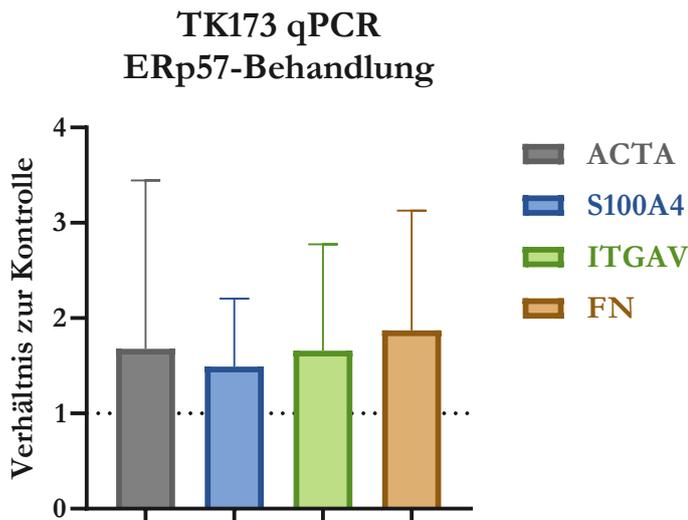
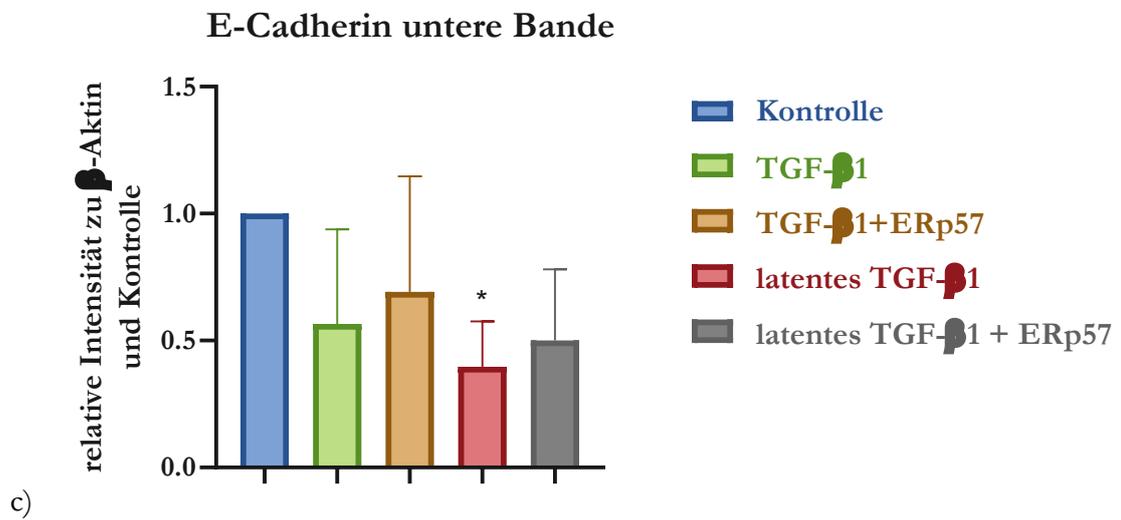
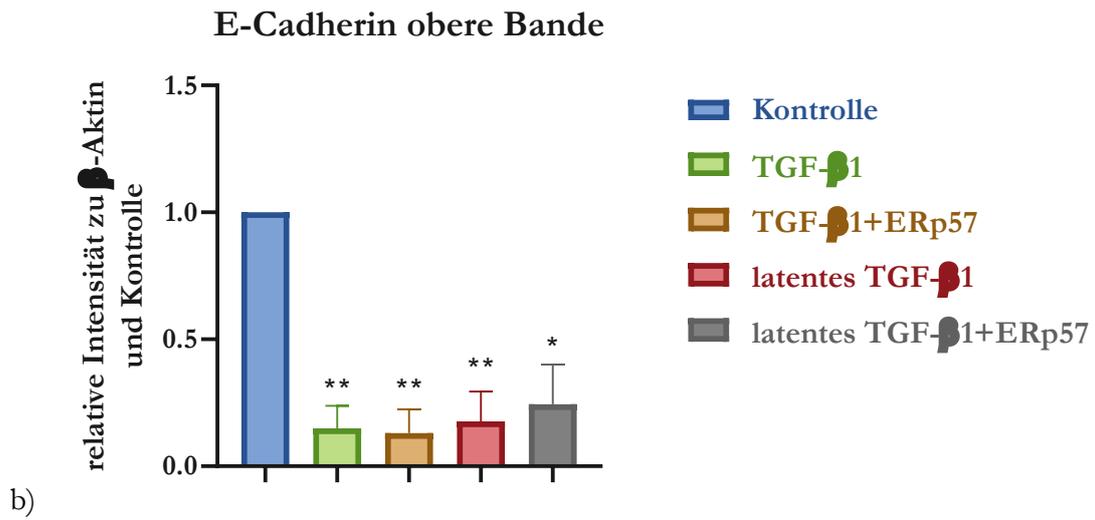
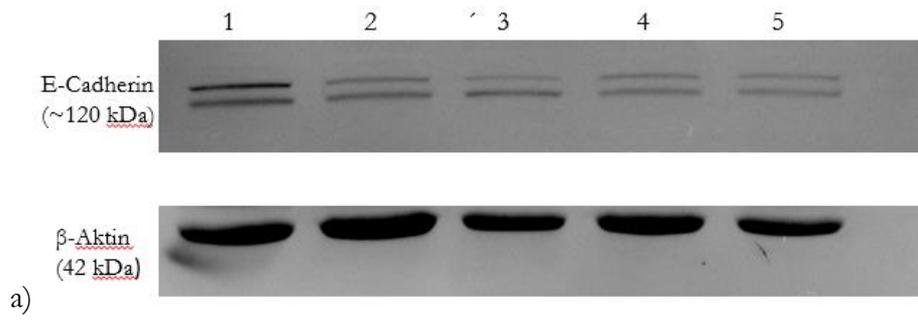


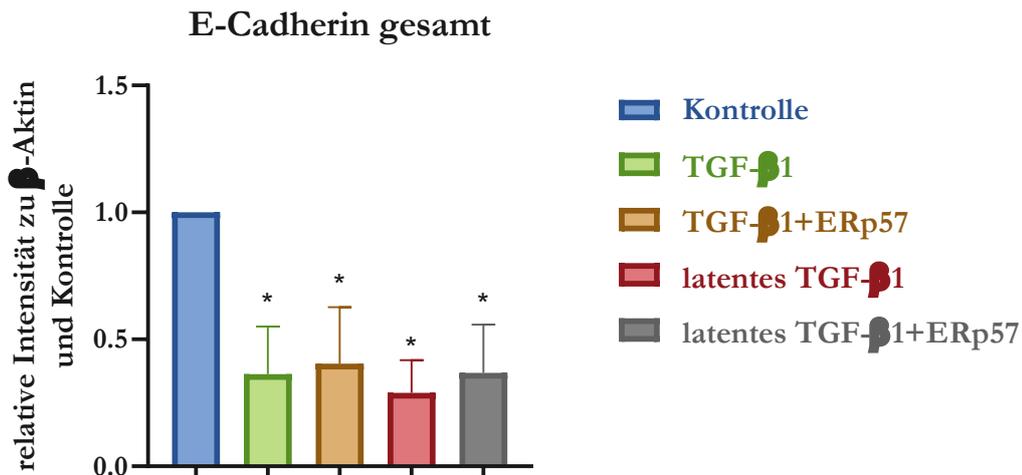
Abbildung 28: Ergebnisse der qPCR-Analyse der TK173-Zellen. Dargestellt sind die Ergebnisse der 2^{-ddCt} -Methode als Mittelwerte mit Standardabweichung. Statistisch ausgewertet mittels Einstichproben-t-Tests, (*) $p \leq 0,05$ (**) $p \leq 0,01$ (***) $p \leq 0,001$ (****) $p \leq 0,0001$.

3.8 Behandlung mit latentem TGF- β 1 und ERp57

Um eine mögliche Aktivierung von latentem TGF- β 1 durch ERp57 zu untersuchen, wurden verschiedene Behandlungen im Western Blot betrachtet: 1. Kontrollzellen, 2. mit TGF- β 1 behandelte Zellen, 3. mit TGF- β 1 und ERp57 behandelte Zellen, 4. mit latentem TGF- β 1 behandelte Zellen und 5. Zellen, die mit latentem TGF- β 1 und ERp57 behandelt wurden. Bis auf die Kontrollzellen wurden zunächst alle Gruppen für 24 h mit aktivem TGF- β 1 behandelt. Zur 3. Gruppe wurde anschließend 200 ng/ml ERp57 hinzugefügt. Bei der vierten und fünften Gruppe wurde das TGF- β 1 nach 24 h abgenommen und durch latentes TGF- β 1 ersetzt. Die fünfte Gruppe erhielt zusätzlich 200 ng/ml ERp57. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen geerntet und die entsprechenden Proteinproben im Western Blot untersucht.

Es zeigte sich eine Abnahme der E-Cadherin-Expression in allen Behandlungen, die sich beim Gesamt-E-Cadherin sowie bei der oberen E-Cadherin-Bande in Bezug auf die Kontrolle im Einstichproben-t-Test als statistisch signifikant herausstellte. Zwischen den unterschiedlichen Behandlungen konnten in der einfachen Varianzanalyse keine statistisch signifikanten Unterschiede ausgemacht werden.

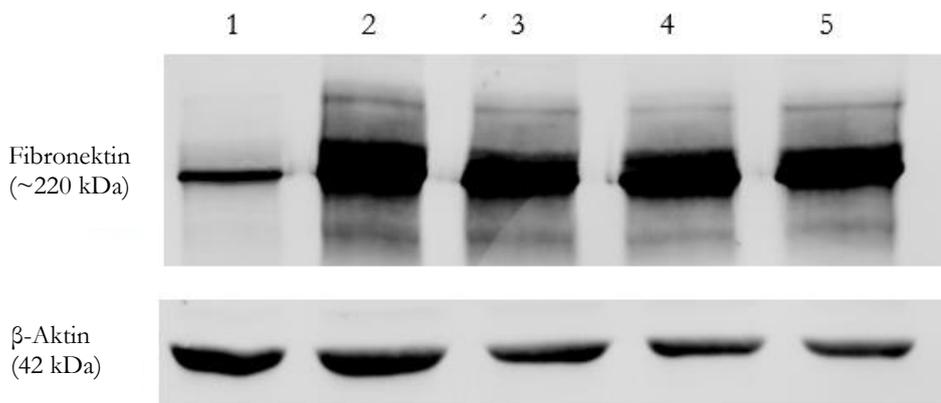




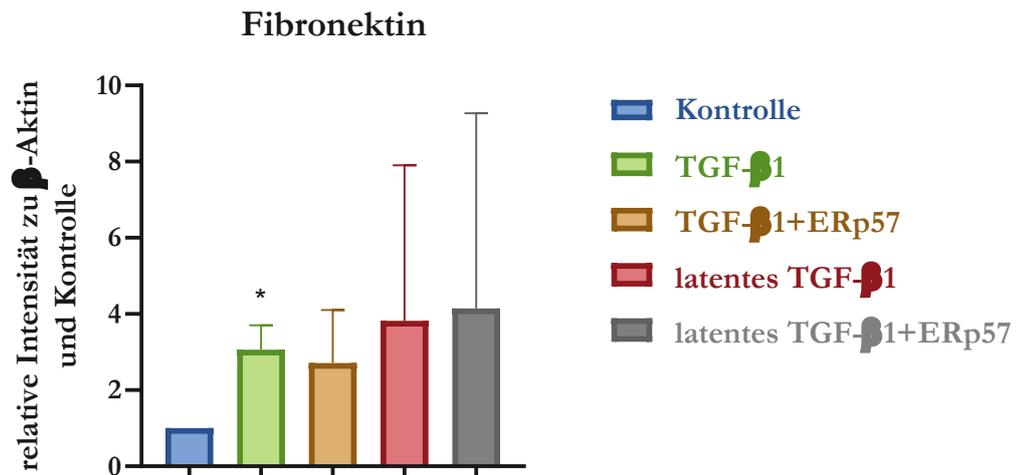
d)

Abbildung 29: MDCK E-Cadherin-Western Blot nach TGF- β 1-Behandlung. a: E-Cadherin-Western Blot von unterschiedlich behandelten MDCK-Zellen und Kontrolle (1: unbehandelt 2: TGF- β 1-Behandlung für 48 h 3: TGF- β 1-Behandlung für 24 h, dann TGF- β 1 und ERp57-Behandlung (200 ng/ml) für 24 h 4: TGF- β 1-Behandlung für 24 h, dann Behandlung mit latentem TGF- β 1 für 24 h 5: TGF- β 1-Behandlung für 24 h, dann Behandlung mit latentem TGF- β 1 und ERp57 (200 ng/ml) für 24 h mit β -Aktin als Ladungskontrolle (untere Bande) b/c/d: Relative Intensitäten der oberen E-Cadherin-Bande/ der unteren E-Cadherin-Bande/der Gesamt-E-Cadherin-Expression (obere und untere Bande) in Western Blots von unterschiedlich behandelten MDCK-Zellen zu β -Aktin und zur Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Statistisch jeweils ausgewertet mittels Einstichproben-t-Tests bezogen auf die Kontrolle (=1) bzw. die Behandlungen untereinander mittels einfacher Varianzanalyse und Tukey-Tests, (*) $p \leq 0,05$ (**) $\leq 0,01$ (***) $p \leq 0,001$ (****) $p \leq 0,0001$.

Neben der E-Cadherin-Expression wurde außerdem die Fibronektin-Expression aus dem Zelllysate untersucht. Hier zeigte sich bei allen Behandlungen eine deutliche Zunahme des Fibronektins im Vergleich zur Kontrolle. Unterschiede durch die zusätzliche ERp57-Behandlung konnten nicht erkannt werden.



a)



b)

Abbildung 30: MDCK Fibronektin-Western Blot nach TGF- β 1-Behandlung. a: E-Cadherin-Western Blot von unterschiedlich behandelten MDCK-Zellen und Kontrolle (1: unbehandelt 2: TGF- β 1-Behandlung für 48 h 3: TGF- β 1-Behandlung für 24 h, dann TGF- β 1 und ERp57-Behandlung (200 ng/ml) für 24 h 4: TGF- β 1-Behandlung für 24 h, dann Behandlung mit latentem TGF- β 1 für 24 h 5: TGF- β 1-Behandlung für 24 h, dann Behandlung mit latentem TGF- β 1 und ERp57 (200 ng/ml) für 24 h mit β -Aktin als Ladungskontrolle (untere Bande) b: Relative Intensitäten der Fibronektin-Expression. von unterschiedlich behandelten MDCK-Zellen zu β -Aktin und zur Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Statistisch jeweils ausgewertet mittels Einstichproben-t-Tests bezogen auf die Kontrolle (=1) bzw. die Behandlungen untereinander mittels einfacher Varianzanalyse und Tukey-Tests, (*) $p \leq 0,05$ (**) $p \leq 0,01$ (***) $p \leq 0,001$ (****) $p \leq 0,0001$.

4 Diskussion

In den folgenden Abschnitten erfolgt die Diskussion über die gewonnenen Ergebnisse sowie eine kritische Betrachtung der Methoden und Auswertungen. Besonderer Fokus liegt hier auf den Vimentin- und E-Cadherin-Expressionen. Hier gibt es starke Hinweise darauf, dass sie durch die Behandlung mit ERp57 beeinflusst werden.

4.1 ERp57-Behandlung nimmt Einfluss auf Vimentin

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass eine Behandlung von renalen Zellen mit ERp57 *in vitro* einen Einfluss auf die Expression der Vimentin-Formen ausübt. Die Bedeutung dieser Regulation hängt u.a. vom Ursprung der einzelnen Formen ab, wozu verschiedene Hypothesen denkbar sind.

Eine mögliche Erklärung für das Vorkommen der unterschiedlichen Vimentin-Formen stellt die Aufspaltung durch Caspasen dar. Byun et al. geben in ihrer Arbeit aus dem Jahr 2001 Hinweise darauf, dass Vimentin ein Substrat verschiedener Caspasen ist und im Rahmen apoptotischer Vorgänge gespalten wird (Byun et al. 2001). Sollte hier der Ursprung der verschiedenen Vimentin-Formen liegen, wäre das ein Hinweis darauf, dass sERp57 Caspasen aktiviert bzw. Apoptose induziert. Diese Annahmen stimmen aber nicht eindeutig mit den Ergebnissen der durchgeführten Apoptose-Tests der vorliegenden Arbeit überein. Hier gab es keinen klaren Hinweis darauf, dass es durch die ERp57-Behandlung zu verstärkter Apoptose kommt.

Ergebnisse von Buchmaier et al. (2013) widersprechen der oben aufgeführten Hypothesen, da es dort Hinweise für eine unabhängige Regulation der einzelnen Formen gibt, was eher gegen die Entstehung der verschiedenen Vimentin-Formen durch Caspasen spricht.

Festzuhalten bleibt, dass die Behandlung der Zellen mit ERp57 in dieser Arbeit einen Einfluss auf die Expression von verschiedenen Vimentin-Formen zu besitzen scheint. Ob hier ein Einfluss auf die Caspase-Aktivität oder ein anderer Mechanismus die Ursache darstellt, lässt sich nicht sicher sagen. Auch die funktionellen Eigenschaften der einzelnen Formen müssten näher untersucht werden, um dieser Regulation eine bessere Bedeutung zuordnen zu können. Dies wäre auch wichtig, um die Ergebnisse bezüglich der Ausgangsfrage dieser Arbeit besser zu bewerten. Da im Western Blot mehrere Formen nachgewiesen werden konnten, die zum Teil durch die ERp57-Behandlung zunehmen und zum anderen Teil dadurch abnehmen, kann hierdurch keine klare Schlussfolgerung bezüglich einer möglichen

EMT gezogen werden. Hier hätte man eine Expressionszunahme von mesenchymalen Markern erwartet, so auch von Vimentin. Zur besseren Beurteilung bezüglich der Ausgangsfrage sollte deshalb auch untersucht werden, inwiefern sich die Expressionen der einzelnen Formen durch gesicherte profibrotische Bedingungen verändern.

4.2 ERp57-Behandlung beeinflusst die E-Cadherin-Funktion

Die indirekten Immunfluoreszenzfärbungen zeigen, dass E-Cadherin nach 48-stündiger ERp57-Behandlung sowohl in den Kontrollzellen als auch in den behandelten Zellen exprimiert wird. Trotzdem scheinen die behandelten Zellen aber den Kontakt zueinander zu verlieren und nehmen eine rundliche Form an. Da die Zellen aufgrund des starken Zelluntergangs für die Immunfluoreszenzfärbungen nur für 48 h mit ERp57 behandelt wurden, wäre eine längere Behandlung sinnvoll, um zu überprüfen, ob im weiteren Verlauf auch eine geringere E-Cadherin-Expression und ein intrazellulärer Abbau zu sehen wäre, was deutlich für einen profibrotischen Einfluss sprechen würde.

Die Ergebnisse der E-Cadherin-Western Blots zeigen im Bereich zwischen 100 und 150 kDA zwei verschiedene Banden, die durch den E-Cadherin Antikörper von Cell Signaling detektiert werden. Auch eine Arbeit, die 2020 veröffentlicht wurde, zeigt bei Verwendung des gleichen Antikörpers die zwei Banden bei einer Brustkrebs-Zelllinie im entsprechenden Bereich im Western Blot. Die Bedeutung der zwei Banden wurde dort aber nicht weiter untersucht (Farasani and Darbre 2020).

In der vorliegenden Arbeit wäre es wichtig, die strukturellen Unterschiede dieser beiden Formen zu kennen, um die Ergebnisse besser interpretieren zu können.

Eine Möglichkeit wäre, dass es sich bei den beiden Formen zum einen um die 135 kDA-Form und zum anderen um die 120 kDA-Form handelt. Eine Arbeit aus dem Jahr 1991 von Shore et Nelson hat sich mit diesen verschiedenen Formen beschäftigt. Sie fanden heraus, dass E-Cadherin in MDCK-Zellen als Vorläuferprotein mit einem MW von 135 kDa synthetisiert wird und in dieser Form nicht an der Zelloberfläche exprimiert wird. So stellten sie die Hypothese auf, dass E-Cadherin als 135 kDa-Vorläuferprotein synthetisiert wird, was zunächst intrazellulär in die reife 120 kDa-Form umgewandelt werden muss, bevor es an der Zelloberfläche exprimiert wird.

Handelt es sich in den Western Blots der vorliegenden Arbeit also um die 135- und 120 kDa-Formen, nimmt besonders die 120 kDa-Form durch die ERp57-Behandlung zu, was bedeuten könnte, dass sezerniertes ERp57 Einfluss auf die Umwandlung vom Vorläuferprotein in das auf der Zelloberfläche exprimierte E-Cadherin hätte. Gleichzeitig zeigt sich, wenn auch statistisch nicht signifikant, eine Abnahme der 135 kDa-Form, also des Vorläuferproteins, was bedeutet, dass weniger Vorläuferprotein durch die Behandlung mit ERp57 gebildet würde. Bezieht man diese Hypothese auf die Ausgangsfrage dieser Arbeit, spricht die Zunahme der 120 kDa-Form zunächst einmal gegen einen profibrotischen Einfluss von sERp57 auf die MDCK-Zellen. Im Rahmen der Fibrose würde man schließlich eher eine Abnahme der E-Cadherin-Expression erwarten. Möglich wäre aber auch, dass durch die Behandlung mit ERp57 zum einen die Expression bzw. Synthese des Vorläuferproteins gehemmt wird und zum anderen die Umwandlung in die aktive Form (120 kDa), als eine Art Abwehrreaktion auf die potenziell profibrotischen Einflüsse, zunimmt. Dieses Szenario wäre wiederum mit einem profibrotischen Einfluss von sERp57 vereinbar, v.a. wenn man gleichzeitig die Immunfluoreszenzfärbungen anschaut. Weiter bleibt aber noch die Zunahme des *CDH1*-Gens in der qPCR zu diskutieren. Diese Zunahme spricht zunächst wieder gegen den profibrotischen Einfluss. Betrachtet man aber gleichzeitig die Hinweise, die auf eine Abnahme des Vorläuferproteins hindeuten, könnte man annehmen, dass eine posttranslationale Modifikation stattfindet und die Expression verhindert. Möglich wäre auch, dass sERp57 an diesem Prozess beteiligt ist. So wäre es denkbar, dass die Umwandlung von der Vorläufer- in die reife Form durch den interzellulären Kontaktverlust induziert wird und gleichzeitig auch die Genexpression als eine Art Gegenregulation ansteigt, um die verlorenen Kontakte wieder herzustellen. Zusätzlich wird posttranslational aber die Expression verhindert.

Eine andere mögliche Erklärung ist, dass es sich bei der unteren Bande bereits um ein Abbau- bzw. Spaltprodukt der oberen Bande handelt, welche dann die 120 kDa-Form darstellen würde. Hierzu passt auch der Verlust der interzellulären Kontakte. Betrachtet man aber zu dieser Hypothese die verfügbare Literatur, findet man als größtes Abbau-/Spaltprodukt lediglich eine 100 kDa-Form (Rios-Doria et al. 2003). Die untere Bande des Western Blots stellte sich aber deutlich über der 100 kDa-Bande des Markers dar.

Ferner gibt es starke Hinweise darauf, dass die Glykosylierung von E-Cadherin ebenfalls Einfluss auf seine Funktion nimmt (Pinho et al. 2011). Auch hierin könnte also der Unterschied zwischen den zwei verschiedenen E-Cadherin-Banden liegen.

Festzuhalten bleibt, dass sERp57 *in vitro* einen Einfluss auf E-Cadherin von MDCK-Zellen ausübt und die interzellulären Kontakte schwächt. Hier gibt es verschiedene denkbare Ursachen, die näher untersucht werden sollten. Insgesamt scheint es sich um einen komplexen Prozess zu handeln, sodass die Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungen von E-Cadherin auf den ersten Blick widersprüchlich erscheinen. Ähnlich wie bei Vimentin gilt es auch hier zu klären, worin der Unterschied zwischen den beiden im Western Blot detektierten Banden liegt.

4.3 Alpha-Smooth Muscle Actin-Expression in Kontrollzellen

Zur Untersuchung der α -SMA Expression wurden für alle drei Zelllinien indirekte Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt. Außerdem wurde das entsprechende Gen auch in der qPCR betrachtet. Normalerweise wird α -SMA im gesunden Nierengewebe nur in glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert und wird erst bei der Differenzierung zu Myofibroblasten auch in anderen Zelltypen exprimiert (Badid et al. 2001). In den Färbungen und der qPCR zeigt sich aber sowohl bei den Kontrollzellen der MDCK-Zelllinie als auch bei den Kontrollzellen der TK173-Zelllinie bereits ohne Behandlung ein Nachweis von α -SMA. Außerdem ergab auch die qPCR der HK2-Zellen den Nachweis des Gens für α -SMA, hier zeigte die Färbung allerdings kaum exprimiertes α -SMA. Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, ob der genutzte Antikörper bzw. die genutzten Primer wirklich spezifisch genug für den reinen Nachweis von α -SMA sind. In Bezug auf den möglichen profibrotischen Einfluss lässt sich so schwer eine Aussage treffen. Normalerweise hätte man erwartet, dass es bei den Kontrollzellen zu keiner Expression kommt. Eine dann durch die Behandlung auftretende Expression hätte für einen profibrotischen Effekt gesprochen. Die qPCR der MDCK- und TK173-Zellen zeigten leichte Zunahmen der Genexpression, welche sich aber nicht als statistisch signifikant herausstellten. Die HK2-Zellen zeigten durch die ERp7-Behandlung eine leichte, ebenfalls statistisch nicht signifikante Abnahme der *ACTA2*-Genexpression. Zusammenschauend muss hier auch eine mögliche Verunreinigung der Proben als Ursache für den Nachweis von α -SMA in Betracht gezogen werden.

4.4 Profibrotischer Einfluss von TGF- β 1

Die Behandlung der MDCK-Zellen mit TGF- β 1 zeigte im Western Blot eindeutigere Ergebnisse als die Behandlung mit ERp57 und bestätigte die bereits weit verbreitete Annahme, dass TGF- β 1 profibrotisch wirkt. Im Western Blot zeigte sich eine eindeutige Abnahme des

E-Cadherins, wobei auch hier die Abnahme der oberen Bande deutlicher ausfiel als die Abnahme der unteren Bande, welche aber ebenfalls zu beobachten war. Außerdem wurde durch die Behandlung eine starke Zunahme des Fibronektins im Zellysate ausgelöst.

Da TGF- β 1 als latenter Komplex sezerniert wird, muss er zunächst aktiviert werden, um seine Wirkung zu entfalten. Hierbei scheint Integrin α V eine wichtige Rolle zu spielen (Fontana et al. 2005). In dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob sERp57 ebenfalls eine Rolle bei der Aktivierung von latentem TGF- β 1 spielt. Die Behandlung der Zellen mit latentem TGF- β 1 hatte ähnlich starke Auswirkungen auf die abnehmende Expression von E-Cadherin sowie die ansteigende Expression von Fibronektin, wie die dauerhafte Behandlung mit aktivem TGF- β 1. Möglicherweise hat es sich bei dem genutzten latentem TGF- β 1 nicht wirklich um die latente Form gehandelt. Eine andere mögliche Erklärung wäre, dass die latente Form auch ohne Zugabe von ERp57 in ihre aktive Form umgewandelt wurde, da durch die Vorbehandlung mit aktivem TGF- β 1 der profibrotische Vorgang bereits im Gang war. Auch denkbar wäre, dass die zu sehenden Effekte allein durch die Behandlung der ersten 24 h induziert wurden und die weitere Behandlung mit aktivem TGF- β 1 keine zusätzlichen Effekte brachte. Durch die Tatsache, dass die mit latentem TGF- β 1 behandelten Zellen (Gruppe 4 in Abbildung 29/30) keine geringeren profibrotischen Effekte zeigen als die übrigen behandelten Zellen, lässt sich der Versuch bezüglich einer möglichen Aktivierung des latenten TGF- β 1 durch sERp57 kaum bewerten. In Zukunft sollte daran gearbeitet werden, diesen Versuch zu optimieren. Man könnte beispielsweise versuchen, auf die Vorbehandlung mit aktivem TGF- β 1 zu verzichten. Alternativ kann auch das verwendete latente TGF- β 1 durch ein anderes Produkt ausgetauscht werden. Generell zeigen die Ergebnisse dieser Western Blots aber, dass der Effekt durch TGF- β 1 viel stärker und eindeutiger ist als die zuvor durchgeführten Versuche mit reiner ERp57-Behandlung.

4.5 Kritische Betrachtung der Methoden und Auswertungen

Im Folgenden sollen die durchgeführten Methoden sowie die statistische Auswertung der vorliegenden Arbeit kritisch betrachtet werden und Schwächen aufgezeigt werden, die bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden sollten.

4.5.1 Fehlende Positiv-Kontrolle

Abschließend betrachtet wäre es zur Interpretation der Ergebnisse sinnvoll gewesen, eine Positiv-Kontrolle mitzuführen. In dieser Arbeit wurde immer eine unbehandelte Negativ-

Kontrolle mitgeführt, um Effekte durch sERp57 zu erkennen. Da es in der Fragestellung besonders um den Einfluss von sERp57 in Bezug auf die renale Fibrose geht, wäre es hilfreich gewesen, eine weitere Gruppe mitzuführen, die durch eine gewisse Behandlung klare fibrotische Eigenschaften vorweist. Hier bietet sich beispielsweise eine Behandlung mit TGF- β 1 an. In den Western Blots, in denen die Aktivierung von latentem TGF- β 1 untersucht werden sollte, wurde eine Positiv-Kontrolle mitgeführt. Betrachtet man nun die Ergebnisse der Vimentin- und E-Cadherin Western Blots, in denen es zur Detektion verschiedener Banden und unterschiedlicher Regulationen durch sERp57 gekommen ist, hätte das Mitführen einer Positiv-Kontrolle hilfreich sein können, um diese Ergebnisse besser zu interpretieren. In Zukunft sollte das berücksichtigt werden und über das Mitführen einer Positiv-Kontrolle für alle Versuche nachgedacht werden.

4.5.2 MDCK- und TK173-Zellen unter FCS-freien Bedingungen

Serum im Medium der Zellkulturen nimmt Einfluss auf gewisse Prozesse der Zelle, weshalb auch in dieser Arbeit für die Untersuchungen auf das Serum verzichtet wurde.

In den durchgeführten Untersuchungen zeigte sich bei den MDCK-Zellen bei Verwendung von FCS-freiem Minimum Essential Medium ein starker Unterschied im Vergleich zur Verwendung von FCS-haltigem Medium. Unter FCS-freien Bedingungen konnte hier bereits unter dem Mikroskop ein starker Zelluntergang beobachtet werden. Dies wird auch durch den zeitlichen Verlauf des MTT- sowie Apoptose-Tests belegt. Es ergab sich also nicht nur eine Abnahme der Proliferationsrate, sondern sogar ein Zelluntergang. Auch der MTT- sowie Apoptose-Test der TK173-Zellen lassen hier einen ähnlichen Effekt, wenn auch etwas schwächer ausgeprägt, erahnen.

Die MDCK- und TK173-Zelllinien scheinen also unter FCS-freien Bedingungen sehr labil zu sein, was bei der Betrachtung der Ergebnisse bedacht werden sollte. Bei zukünftigen Arbeiten mit diesen Zelllinien, vor allem mit der MDCK-Zelllinie, sollte zunächst an besseren Wachstumsbedingungen auch ohne den Zusatz von FCS gearbeitet werden.

4.5.3 Auswertung der Western Blots

Ursprünglich wurden Western Blots nur dazu genutzt, das Vorhandensein bestimmter Proteine nachzuweisen, ohne eine Quantifizierung vorzunehmen (Taylor and Posch 2014).

Auch heute handelt es sich noch um eine semiquantitative Methode, sodass eine statistische Auswertung kritisch gesehen werden sollte und die Werte lediglich als Tendenz anzunehmen

sind. In der vorliegenden Arbeit kam außerdem erschwerend hinzu, dass in einer Reihe der Western Blots fünf unterschiedliche Proben untersucht wurden. Besonders dort kam es zu Schwierigkeiten, die einzelnen Lanes mit der gleichen Proteinmenge zu beladen. Es kam immer wieder zu stärkeren Schwankungen bei der Beladung einzelner Proben, was die statistische Auswertung der Western Blots zusätzlich negativ beeinflusst hat.

Zur Auswertung der Western Blots wurde β -Aktin als Ladungskontrolle verwendet. Hierzu wurde angenommen, dass die Behandlung der Zellen keinen Einfluss auf die Expression des β -Aktins hat, sodass die Konzentration in Kontrolle und Behandlungen gleich ist. Diese Methode, das heißt die Nutzung von β -Aktin als so genannte *internal loading control*, wird aber teilweise kritisch angesehen. So zeigt eine Arbeit aus dem Jahr 2006, dass β -Aktin nicht immer bedenkenlos genutzt werden sollte. Besonders bei größeren Proteinmengen konnte bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen von MDA-MB-231 Zellen keine Veränderung der Bandenintensität des β -Aktins erkannt werden (Dittmer and Dittmer 2006).

Außerdem sollte man darüber nachdenken, die Anzahl der Replikate zu erhöhen. Da es immer wieder Ausreißer gab, sind diese bei einer relativ geringen Anzahl an Replikaten ($n=3-4$) schwer zu kompensieren und nehmen so einen großen Einfluss auf die Ergebnisse.

4.5.4 Ungenauigkeit der ddCT-Methode

In der vorliegenden Arbeit wurde die ddCT-Methode zur relativen Quantifizierung der Genexpressionen genutzt. Hierzu ist normalerweise das Vorliegen einer optimalen Effizienz notwendig, was bedeutet, dass die Zielsequenzen während jedem PCR-Zyklus verdoppelt werden. Liegt diese optimale Effizienz nicht vor, ist es möglich, bei der relativen Quantifizierung eine Effizienzkorrektur vorzunehmen. Kleine Abweichungen in der PCR-Effizienz können zu großen Abweichungen im Ergebnis führen (Holzapfel und Wickert 2007). In dieser Arbeit wurde die Effizienz nicht überprüft, sodass keine optimale Effizienz garantiert werden kann, welche aber zur Auswertung angenommen wurde, da auch keine eventuell notwendige Effizienzkorrektur vorgenommen wurde.

Eine weitere Schwäche der durchgeführten qPCR könnte die Auswahl des Referenzgens *GAPDH* darstellen. Ein derartiges Gen sollte mitgeführt werden, um Schwankungen in der Menge der zuvor eingesetzten RNA auszugleichen (Livak and Schmittgen 2001). Die Nutzbarkeit von *GAPDH* als Referenzgen wird jedoch von Holzapfel und Wickert aufgrund von Pseudogenen und einer möglichen Regulierung als „eingeschränkt“ bezeichnet (Holzapfel und Wickert 2007).

5 Zusammenfassung

Die Pathogenese der Chronischen Nierenerkrankungen und der daraus folgenden renalen Fibrose ist komplex und ist noch immer nicht komplett verstanden. Die heutigen Therapiemöglichkeiten sind stark limitiert und die ansteigende Prävalenz der Chronischen Nierenerkrankungen macht eine effiziente Therapie immer notwendiger. Um derartige Therapiemaßnahmen zu entwickeln, ist es wichtig, die Prozesse hinter dem fibrotischen Umbau der Niere zu verstehen. In vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass ERp57 eine Rolle in der Nierenfibrose spielt und es im Rahmen von dieser zur Sekretion von ERp57 kommt. Ziel dieser Arbeit war es, einen möglichen Einfluss von sERp57 auf verschiedene Zellen der Niere und einen möglichen profibrotischen Effekt zu untersuchen. Es hat sich gezeigt, dass ERp57 einen Einfluss auf die Zellviabilität besitzt. Durch Behandlung von renalen Zellen *in vitro* mit ERp57, konnte eine Viabilitätsabnahme im MTT-Assay beobachtet werden. Eindeutige Effekte auf das Apoptose-Verhalten konnten dagegen nicht gezeigt werden. Es zeigte sich aber, dass die TK173- und die MDCK-Zellen Schwierigkeiten mit den FCS-freien Bedingungen haben, was bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden muss.

Die Expression von möglichen Fibrosemarkern wurde im Western Blot untersucht. Hier zeigte sich, dass ERp57 die Expression verschiedener Vimentin-Formen beeinflusst. Die unterschiedliche Bedeutung dieser einzelnen Formen sollte weiter untersucht werden, um hier die Bedeutung von sERp57 besser einschätzen zu können.

In der E-Cadherin-Immunfluoreszenzfärbung war ein Verlust der interzellulären Kontakte bei gleichzeitig noch vorhandener E-Cadherin Expression erkennbar. Außerdem war zu erkennen, dass die behandelten Zellen eine rundlichere Form annehmen. Die E-Cadherin Expression der MDCK-Zellen zeigte sowohl im Western Blot als auch in der qPCR einen Anstieg. Im Western Blot konnten zwei Banden im Bereich zwischen 100 und 150 kDa detektiert werden. Betrachtet man diese beiden Banden getrennt voneinander, nimmt die Expression der oberen Bande eher ab, wohingegen die untere Bande zuzunehmen scheint.

Bei den übrigen untersuchten Markern in der qPCR bei den MDCK-Zellen war außerdem eine Zunahme, wenn auch statistisch nicht-signifikant, der Genexpressionen zu verzeichnen, was mit einem fibrotischen Phänotyp vereinbar ist.

Bei den TK173-Zellen zeigte sich nach ERp57-Behandlung ein Anstieg der Fibrosemarker in der qPCR, was auch hier als Hinweis für einen profibrotischen Einfluss von sERp57 gewertet werden kann. Allerdings ergaben sich auch hier statistisch keine Signifikanzen.

Eindeutige Beweise dafür, dass der Einfluss von sezerniertem ERp57 zu einem fibrotischen Phänotyp führt, konnten also zusammenfassend nicht gefunden werden. Jedoch konnten weitere Hinweise ausfindig gemacht werden. Die Arbeit zeigt, dass sERp57 einen Einfluss auf MDCK-Zellen und einen eher schwächeren Effekt auf TK173-Zellen ausübt, wohingegen die Wirkung auf HK2-Zellen nicht eindeutig erscheint. Der Einfluss von einer Behandlung mit ERp57 ist in jedem Fall schwächer als die TGF- β 1-Behandlung, sodass sERp57 vermutlich eher eine kleinere Rolle im Rahmen der Fibrose spielt. Die aufgezeigten Ansätze zeigen, dass eine weitere Untersuchung dieser Fragestellung sinnvoll wäre, um den Pathomechanismus der Nierenfibrose und Einflussfaktoren weiter aufzuklären. Um Ergebnisse dieser Arbeit besser deuten zu können, wäre vor allem eine Untersuchung der Bedeutung der unterschiedlichen Vimentin-Formen sowie eine längere Behandlung der Zellen mit ERp57 hilfreich. Auch die mögliche Aktivierung von TGF- β 1 durch sERp57 sollte erneut in optimierter Weise untersucht werden.

6 Literaturverzeichnis

- Angst BD, Marcozzi C, Magee AI (2001): The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J Cell Sci* 114, 629–641
- Badid C, Vincent M, Fouque D, Laville M, Desmoulière A (2001): Myofibroblast: a prognostic marker and target cell in progressive disease. *Ren Fail* 23, 543–549
- Boggon TJ, Murray J, Chappuis-Flament S, Wong E, Gumbiner BM, Shapiro L (2002): C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science* 296, 1308–1313
- Boye K, Maelandsmo GM (2010): S100A4 and metastasis: a small actor playing many roles. *Am J Pathol* 176, 528–535
- Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248–254
- Buchmaier BS, Bibi A, Müller GA, Dihazi GH, Eltoweissy M, Kruegel J, Dihazi H (2013): Renal cells express different forms of vimentin: the independent expression alteration of these forms is important in cell resistance to osmotic stress and apoptosis. *PLoS One* 8, e68301
- Burnette WN (1981): “Western Blotting”: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112, 195–203
- Byun Y, Chen F, Chang R, Trivedi M, Green KJ, Cryns VL (2001): Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis. *Cell Death Differ* 8, 443–450
- Cho J (2013): Protein disulfide isomerase in thrombosis and vascular inflammation. *J Thromb Haemost* 11, 2084–2091
- Chomczynski P, Sacchi N (2006): The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* 1, 581–585
- Clark DA, Coker R (1998): Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Int J Biochem Cell Biol* 30, 293–298
- Compton SJ, Jones CG (1985): Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem* 151, 369–374
- Dihazi H, Dihazi GH, Bibi A, Eltoweissy M, Mueller CA, Asif AR, Rubel D, Vasko R, Mueller GA (2013): Secretion of ERP57 is important for extracellular matrix accumulation

and progression of renal fibrosis, and is an early sign of disease onset. *J Cell Sci* 126, 3649–3663

Dittmer A, Dittmer J (2006): Beta-actin is not a reliable loading control in Western blot analysis. *Electrophoresis* 27, 2844–2845

dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, Nosworthy NJ (2003): Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev* 83, 433–473

Eriksson JE, Dechat T, Grin B, Helfand B, Mendez M, Pallari H-M, Goldman RD (2009): Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. *J Clin Invest* 119, 1763–1771

Farasani A, Darbre PD (2020): Long-term exposure to triclosan increases migration and invasion of human breast epithelial cells in vitro. *J Appl Toxicol*, 1–12

Ferber EC, Kajita M, Wadlow A, Tobiansky L, Niessen C, Ariga H, Daniel J, Fujita Y (2008): A Role for the Cleaved Cytoplasmic Domain of E-cadherin in the Nucleus*. *J Biol Chem* 283, 12691–12700

Fontana L, Chen Y, Prijatelj P, Sakai T, Fässler R, Sakai LY, Rifkin DB (2005): Fibronectin is required for integrin α v β 6-mediated activation of latent TGF- β complexes containing LTBP-1. *FASEB J* 19, 1798–1808

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

Goldmann RD, Khuon S, Chou YH, Opal P, Steinert PM (1996): The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity. *J Cell Biol* 134, 971–983

Gumbiner BM (2005): Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 622–634

Hahm K, Lukashev ME, Luo Y, Yang WJ, Dolinski BM, Weinreb PH, Simon KJ, Chun Wang L, Leone DR, Lobb RR et al. (2007): α v β 6 integrin regulates renal fibrosis and inflammation in Alport mouse. *Am J Pathol* 170, 110–125

Hames, B. D. (Hrsg.) (2010): Gel electrophoresis of proteins: A practical approach, 3. Auflage; Oxford University Press, Oxford, New York 2010

Hayashi H, Sakai T (2012): Biological Significance of Local TGF- β Activation in Liver Diseases. *Front Physiol* 3, 1–11

- Henderson NC, Arnold TD, Katamura Y, Giacomini MM, Rodriguez JD, McCarty JH, Pellicoro A, Raschperger E, Betsholtz C, Ruminiski PG et al. (2013): Targeting of α v integrin identifies a core molecular pathway that regulates fibrosis in several organs. *Nat Med* 19, 1617–1624
- Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C (2001): Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell* 12, 2730–2741
- Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat M-L, Gabbiani G (2007): The Myofibroblast: One Function, Multiple Origins. *Am J Pathol* 170, 1807–1816
- Holzapfel B, Wickert L (2007): Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Biol. Unserer Zeit* 37, 120–126
- Hummon AB, Lim SR, Difilippantonio MJ, Ried T (2007): Isolation and solubilization of proteins after TRIzol extraction of RNA and DNA from patient material following prolonged storage. *Biotechniques* 42, 467-70, 472
- Humphreys BD (2018): Mechanisms of Renal Fibrosis. *Annu Rev Physiol* 80, 309–326
- Jasuja R, Passam FH, Kennedy DR, Kim SH, van Hessem L, Lin L, Bowley SR, Joshi SS, Dilks JR, Furie B et al. (2012): Protein disulfide isomerase inhibitors constitute a new class of antithrombotic agents. *J Clin Invest* 122, 2104–2113
- Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, Li Z, Naicker S, Plattner B, Saran R, Wang AY-M, Yang C-W (2013): Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet* 382, 260–272
- Kalluri R, Weinberg RA (2009): The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119, 1420–1428
- Kim K, Hahm E, Li J, Holbrook L-M, Sasikumar P, Stanley RG, Ushio-Fukai M, Gibbins JM, Cho J (2013): Platelet protein disulfide isomerase is required for thrombus formation but not for hemostasis in mice. *Blood* 122, 1052–1061
- Lan HY (2011): Diverse Roles of TGF- β /Smads in Renal Fibrosis and Inflammation. *Int J Biol Sci* 7, 1056–1067
- Li Y, Camacho P (2004): Ca²⁺-dependent redox modulation of SERCA 2b by ERp57. *J Cell Biol* 164, 35–46
- Lickert H, Bauer A, Kemler R, Stappert J (2000): Casein kinase II phosphorylation of E-cadherin increases E-cadherin/beta-catenin interaction and strengthens cell-cell adhesion. *J Biol Chem* 275, 5090–5095
- Liu Y (2006): Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int* 69, 213–217

- Livak KJ, Schmittgen TD (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–408
- Lovisa S, LeBleu VS, Tampe B, Sugimoto H, Vlodavsky K, Carstens JL, Wu C-C, Hagsos Y, Burckhardt BC, Pentcheva-Hoang T et al. (2015): Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis. *Nat Med* 21, 998–1009
- Lovisa S, Zeisberg M, Kalluri R (2016): Partial Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Other New Mechanisms of Kidney Fibrosis. *Trends Endocrinol Metab* 27, 681–695
- Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, Abraham J, Adair T, Aggarwal R, Ahn SY et al. (2012): Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 380, 2095–2128
- Meister P (1998): Myofibroblasten. *Der Pathologe* 19, 187–193
- Meng X-M, Tang PM-K, Li J, Lan HY (2015): TGF- β /Smad signaling in renal fibrosis. *Front Physiol* 6, 82
- Mosmann T (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55–63
- Nogueira A, Pires MJ, Oliveira PA (2017): Pathophysiological Mechanisms of Renal Fibrosis: A Review of Animal Models and Therapeutic Strategies. *In Vivo* 31, 1–22
- Odell ID, Cook D (2013): Immunofluorescence Techniques. *J Invest Dermatol* 133, 1–4
- Pankov R, Yamada KM (2002): Fibronectin at a glance. *J Cell Sci* 115, 3861–3863
- Perrin BJ, Ervasti JM (2010): The Actin Gene Family: Function Follows Isoform. *Cytoskeleton (Hoboken)* 67, 630–634
- Pinho SS, Seruca R, Gärtner F, Yamaguchi Y, Gu J, Taniguchi N, Reis CA (2011): Modulation of E-cadherin function and dysfunction by N-glycosylation. *Cell Mol Life Sci* 68, 1011–1020
- Potts JR, Campbell ID (1996): Structure and function of fibronectin modules. *Matrix Biol* 15, 313–20
- Pozzi A, Zent R (2013): Integrins in kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 24, 1034–1039
- Qi R, Yang C (2018): Renal tubular epithelial cells: the neglected mediator of tubulointerstitial fibrosis after injury. *Cell Death Dis* 9, 1126
- Rindler MJ, Chuman LM, Shaffer L, Saier MH (1979): Retention of differentiated properties in an established dog kidney epithelial cell line (MDCK). *J Cell Biol* 81, 635–648

- Rios-Doria J, Day KC, Kuefer R, Rashid MG, Chinnaiyan AM, Rubin MA, Day ML (2003): The role of calpain in the proteolytic cleavage of E-cadherin in prostate and mammary epithelial cells. *J Biol Chem* 278, 1372–1379
- Ryan MJ, Johnson G, Kirk J, Fuerstenberg SM, Zager RA, Torok-Storb B (1994): HK-2: an immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. *Kidney Int* 45, 48–57
- Sapcariu SC, Kanashova T, Weindl D, Ghelfi J, Dittmar G, Hiller K (2014): Simultaneous extraction of proteins and metabolites from cells in culture. *MethodsX* 1, 74–80
- Schneider M, Hansen JL, Sheikh SP (2008): S100A4: a common mediator of epithelial-mesenchymal transition, fibrosis and regeneration in diseases? *J Mol Med (Berl)* 86, 507–522
- Schrödel A (2009): Trypsinierung von Zellkulturzellen. *Biol. Unserer Zeit* 39, 234
- Shihab FS (2007): Do we have a pill for renal fibrosis? *Clin J Am Soc Nephrol* 2, 876–878
- Shore EM, Nelson WJ (1991): Biosynthesis of the cell adhesion molecule uvomorulin (E-cadherin) in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *J Biol Chem* 266, 19672–19680
- Strutz F, Neilson EG (2003): New insights into mechanisms of fibrosis in immune renal injury. *Springer Semin Immunopathol* 24, 459–476
- Strutz F, Zeisberg M, Renziehausen A, Raschke B, Becker V, van Kooten C, Müller G (2001): TGF-beta 1 induces proliferation in human renal fibroblasts via induction of basic fibroblast growth factor (FGF-2). *Kidney Int* 59, 579–592
- Taylor SC, Posch A (2014): The design of a quantitative western blot experiment. *Biomed Res Int* 2014, 361590
- To WS, Midwood KS (2011): Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair. *Fibrogenesis Tissue Repair* 4
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350–4354
- Trivedi R, Müller GA, Rathore MS, Mishra DP, Dihazi H (2016): Anti-Leukemic Activity of Shikonin: Role of ERP57 in Shikonin Induced Apoptosis in Acute Myeloid Leukemia. *Cell Physiol Biochem* 39, 604–616
- Turano C, Gaucci E, Grillo C, Chichiarelli S (2011): ERp57/GRP58: a protein with multiple functions. *Cell Mol Biol Lett* 16, 539–563
- van Roy F, Berx G (2008): The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci* 65, 3756–3788

- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C (1995): A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184, 39–51
- Wang L, Wu Y, Zhou J, Ahmad SS, Mutus B, Garbi N, Hämmerling G, Liu J, Essex DW (2013): Platelet-derived ERp57 mediates platelet incorporation into a growing thrombus by regulation of the α Ib β 3 integrin. *Blood* 122, 3642–3650
- Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC (2005): Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 115, 2656–2664
- Yang J, Liu Y (2001): Dissection of Key Events in Tubular Epithelial to Myofibroblast Transition and Its Implications in Renal Interstitial Fibrosis. *Am J Pathol* 159, 1465–1475
- Zeisberg M, Hanai J-i, 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, Kalluri R (2004): The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis. *J Mol Med (Berl)* 82, 175–181
- Zeisberg M, Neilson EG (2009): Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest* 119, 1429–1437
- Zeisberg M, Neilson EG (2010): Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 21, 1819–1834
- Zhou D, Liu Y (2016): Understanding the mechanisms of kidney fibrosis. *Nat Rev Nephrol* 12, 68–70

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Hassan Dihazi für die Betreuung meiner Promotionsarbeit, die Bereitstellung des Themas und für die Möglichkeit in seinem Labor zu arbeiten. Außerdem möchte ich mich bei dem gesamten Team der AG Dihazi bedanken, v.a. bei Christina Decker, die mir mit viel Geduld im Labor zur Seite stand und mir viele nötige Methoden erlernt hat. Ein weiterer Dank gilt Sabrina Becker für die geduldige Einweisung in das FACS-Gerät. Besonders möchte ich mich außerdem für die Unterstützung, den Austausch und die vielen gemeinsamen Stunden bei Sayman Kakkar bedanken, der gleichzeitig mit mir im Labor an seiner Promotionsarbeit gearbeitet hat und immer helfend zur Seite stand. Ein letzter Dank gilt Sandip Rath, der als Mitglied der Nachbararbeitsgruppe immer ein offenes Ohr und viele Tipps parat hatte.