

Aus der Klinik für Nephrologie und Rheumatologie
(Prof. Dr. med. M. Zeisberg)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Untersuchung der Rolle
des löslichen E-Cadherins
in der Nierenschädigung/-heilung**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Sayman Kakkar

aus

Kassel

Göttingen 2020

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

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

Ko-Betreuer: PD Dr. med. F. Bremmer

Prüfungskommission

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

Ko-Referent: PD Dr. med. F. Bremmer

Drittreferent: Prof. Dr. mult. T. Meyer

Datum der mündlichen Prüfung: 29.04.2021

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Untersuchung der Rolle des löslichen E-Cadherins in der Nierenschädigung/-heilung" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....
(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Kakkar S, Aufmkolk S, Müller GA, Dihazi H (2018): Investigation of the role of soluble E-cadherin in kidney injury/healing. Posterpräsentation im Rahmen des 10. Kongresses der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie 2018, Berlin, 27.09.-30.09.2018

Kakkar S, Müller GA, Dihazi H (2020): Soluble urine E-cadherin is an early marker for diabetic nephropathy and exhibit a stimulating effect on renal cells. *Internist* 61 (Suppl 1), 56

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung	1
1.1 Die Niere	1
1.2 Die chronische Nierenerkrankung	2
1.2.1 Die diabetische Nierenerkrankung	3
1.2.2 Die tubulointerstitielle Fibrose.....	5
1.2.3 Fibroblasten und Myofibroblasten.....	7
1.2.4 Die EMT in der renalen Fibrose.....	8
1.3 Das E-Cadherin	8
1.3.1 E-Cadherin und β -Catenin.....	10
1.3.2 Die proteolytische Spaltung des E-Cadherins	11
1.3.3 Das <i>soluble E-cadherin</i> (sE-cad).....	13
1.4 Das sE-cad als Frühmarker einer diabetischen Nephropathie.....	14
1.5 Die Fragestellung und Zielsetzung dieser Dissertation.....	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Material.....	16
2.2 Methoden.....	33
2.2.1 Zellkultur	33
2.2.2 Serumfreisetzung und Zellbehandlung.....	35
2.2.3 MTT-Zellviabilität-Assay	36
2.2.4 Annexin-V-Apoptose-Assay.....	37
2.2.5 Proteinbiochemische Analyse.....	39
2.2.6 <i>Real Time</i> quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR).....	46
2.2.7 Immunfluoreszenzfärbung und Fluoreszenzmikroskopie.....	51
2.2.8 Statistische Auswertung.....	53
3 Ergebnisse.....	54
3.1 Die TGF- β 1-Behandlung von MDCK-Zellen	54
3.1.1 Lichtmikroskopische Veränderungen von MDCK-Zellen nach TGF- β 1- und GM6001-Behandlung	54
3.1.2 Doppelimmunfluoreszenzfärbung von E-Cadherin und Vimentin in MDCK-Zellen nach 48-stündiger TGF- β 1- und GM6001-Behandlung.....	56
3.1.3 Nachweis von E-Cadherin-Fragmenten im Zellüberstand nach TGF- β 1-Behandlung von MDCK-Zellen.....	59
3.2 Die sE-cad-Behandlung renaler Zelllinien	61
3.2.1 Morphologische Veränderungen renaler Zelllinien nach sE-cad-Behandlung.....	61
3.2.2 Untersuchung der Zellviabilität renaler Zelllinien nach sE-cad-Behandlung.....	63

3.2.3	Quantifizierung der Apoptose nach sE-cad-Behandlung renaler Zelllinien.....	66
3.2.4	Expressionsregulation von E-Cadherin nach sE-cad-Behandlung von MDCK-Zellen.....	69
3.2.5	Expressionsregulation von β -Catenin nach sE-cad-Behandlung von MDCK-Zellen.....	71
3.2.6	Expressionsregulation von Fibrosemarkern nach sE-cad-Behandlung renaler Zelllinien.....	73
4	Diskussion.....	79
4.1	TGF- β 1-induzierte Spaltung des E-Cadherins in MDCK-Zellen.....	79
4.1.1	Annahme eines fibrotischen Phänotyps nach TGF- β 1-Behandlung von MDCK-Zellen.....	81
4.1.2	Nachweis eines E-Cadherin-Fragments im Zellüberstand von MDCK-Zellen nach TGF- β 1-Behandlung	81
4.2	Effekte des sE-cads auf die Viabilität und Apoptose renaler Zelllinien.....	83
4.3	Effekte des sE-cads auf die E-Cadherin-Expression in MDCK-Zellen	85
4.4	Effekte des sE-cads auf die β -Catenin-Expression in MDCK-Zellen.....	86
4.5	Effekte des sE-cads auf die Expression von Fibrosemarkern in renalen Zelllinien.....	87
4.5.1	Effekte des sE-cads auf die Vimentin-Expression in renalen Zelllinien.....	87
4.5.2	Effekte des sE-cads auf die <i>ACTA2</i> - und <i>S100A4</i> -Expression in renalen Zelllinien	88
4.5.3	Effekte des sE-cads auf die Expression und Sekretion von extrazellulären Matrixproteinen in renalen Zelllinien.....	89
4.5.4	Effekte des sE-cads auf die Expression von <i>SNAI1</i> und <i>SNAI2</i> in renalen Zelllinien.....	90
4.6	Protektive und schädigende Effekte des sE-cads auf renale Zellen.....	91
4.7	Limitationen dieser Arbeit und Ausblick.....	92
5	Zusammenfassung.....	94
6	Anhang.....	96
7	Literaturverzeichnis	102

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau des E-Cadherins	9
Abbildung 2: Kanonischer Wnt-Signalweg um β -Catenin.....	10
Abbildung 3: Spaltung des E-Cadherins.....	12
Abbildung 4: Reduktion des MTTs in Formazan	36
Abbildung 5: Einfluss der TGF- β 1- und GM6001-Behandlung auf den MDCK-Zellphänotyp.....	55
Abbildung 6: Doppelimmunfluoreszenzfärbung von E-Cadherin und Vimentin in MDCK-Zellen nach 48-stündiger TGF- β 1- und GM6001-Behandlung.....	57
Abbildung 7: Quantifizierung der Immunfluoreszenz von E-Cadherin nach 48-stündiger Behandlung von MDCK-Zellen mit TGF- β 1 und GM6001.....	58
Abbildung 8: Western-Blot-Analyse der extrazellulären E-Cadherin-Fragmente nach 48-stündiger TGF- β 1- und GM6001-Behandlung von MDCK-Zellen.....	60
Abbildung 9: Immunfluoreszenzfärbung von F-Aktin in MDCK- (A), HK 2- (B) und TK173-Zellen (C) nach 72-stündiger Behandlung mit 500 ng/ml sE cad.....	62
Abbildung 10: Zellviabilität von MDCK- (A), HK-2- (B) und TK173-Zellen (C) nach 24-, 48- und 72-stündiger sE-cad-Behandlung.....	65
Abbildung 11: Annexin-V-Apoptose-Assay von MDCK- (A), HK-2- (B) und TK173-Zellen (C) nach 72-stündiger sE-cad-Behandlung.....	67
Abbildung 12: Anteil apoptotischer Zellen nach 72-stündiger sE cad-Behandlung der MDCK- (A), HK 2- (B) und TK173-Zellen (C).....	68
Abbildung 13: Western-Blot-Analyse von E-Cadherin nach 72-stündiger sE-cad-Behandlung.....	69
Abbildung 14: Immunfluoreszenzfärbung von E-Cadherin in MDCK-Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit 500 ng/ml sE-cad.....	70
Abbildung 15: Quantifizierung der Immunfluoreszenz von E-Cadherin nach 72-stündiger Behandlung von MDCK-Zellen mit 500 ng/ml sE-cad.....	70
Abbildung 16: Western-Blot-Analyse von β -Catenin nach 72-stündiger sE-cad-Behandlung.....	71
Abbildung 17: Immunfluoreszenzfärbung von β -Catenin in MDCK-Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit 500 ng/ml sE-cad.....	72
Abbildung 18: Quantifizierung der Immunfluoreszenz von β -Catenin nach 72-stündiger Behandlung von MDCK-Zellen mit 500 ng/ml sE-cad.....	72
Abbildung 19: Western-Blot-Analyse von Vimentin nach 72-stündiger sE-cad-Behandlung.....	74
Abbildung 20: Relative Genexpression von <i>ACTA2</i> (A) und <i>S100A4</i> (B) in der qPCR mit <i>SYBR Green</i> nach sE-cad-Behandlung.....	75
Abbildung 21: Western-Blot-Analyse von Fibronectin im Zelllysate und Zellüberstand nach 72-stündiger sE-cad-Behandlung.....	77
Abbildung 22: Relative Genexpression von <i>SNAI1</i> (A) und <i>SNAI2</i> (B) in der qPCR mit <i>SYBR Green</i> nach sE-cad-Behandlung.....	78
Abbildung 23: TGF- β -/Smad-Signalweg.....	80

Abbildung A.1: Western-Blot-Analyse extrazellulärer E-Cadherin-Fragmente nach 48-stündiger TGF- β 1- und GM6001-Behandlung von MDCK-Zellen.....	96
Abbildung A.2: Western-Blot-Analyse extrazellulärer E-Cadherin-Fragmente nach 48-stündiger TGF- β 1- und GM6001-Behandlung von MDCK-Zellen.....	96
Abbildung A.3: Western-Blot-Analyse von E-Cadherin nach 72-stündiger sE-cad-Behandlung.	97
Abbildung A.4: Western-Blot-Analyse von E-Cadherin und aktivem, unphosphoryliertem β -Catenin nach 72-stündiger sE-cad-Behandlung.	97
Abbildung A.5: Western-Blot-Analyse von Vimentin und aktivem, unphosphoryliertem β -Catenin nach 72-stündiger sE-cad-Behandlung.	98
Abbildung A.6: Western-Blot-Analyse von Vimentin nach 72-stündiger sE-cad-Behandlung.	98
Abbildung A.7: Western-Blot-Analyse von Vimentin nach 72-stündiger sE-cad-Behandlung.	99
Abbildung A.8: Western-Blot-Analyse von Fibronektin nach 72-stündiger sE-cad-Behandlung.	99
Abbildung A.9: Western-Blot-Analyse von Fibronektin nach 72-stündiger sE-cad-Behandlung.	100
Abbildung A.10: Western-Blot-Analyse von Fibronektin nach 72-stündiger sE-cad-Behandlung.	100
Abbildung A.11: Western-Blot-Analyse von Fibronektin nach 72-stündiger sE-cad-Behandlung.	101
Abbildung A.12: Western-Blot-Analyse von Fibronektin nach 72-stündiger sE-cad-Behandlung.	101

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien.....	16
Tabelle 2: Zusammensetzung von Medien und Lösungen für die Zellkultur.....	20
Tabelle 3: Zusammensetzung von Lösungen und Puffer für die proteinbiochemische Analyse.....	21
Tabelle 4: Zusammensetzung weiterer verwendeter Lösungen.....	22
Tabelle 5: Testsubstanzen.....	23
Tabelle 6: Primärantikörper für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung und den Western-Blot.....	24
Tabelle 7: Sekundärantikörper für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung.....	25
Tabelle 8: Sekundärantikörper für den Western-Blot.....	25
Tabelle 9: Primer für humane Zielgene.....	26
Tabelle 10: Primer für Zielgene der MDCK-Zellen (Hund).....	26
Tabelle 11: Geräte.....	27
Tabelle 12: Verbrauchsmaterial.....	29
Tabelle 13: Wissenschaftliche Software.....	31
Tabelle 14: Verwendete Zelllinien.....	32
Tabelle 15: Zusammensetzung der verschiedenen konzentrierten Trenngele.....	42
Tabelle 16: Zusammensetzung des 4 %-igen Sammelgels.....	42
Tabelle 17: Pipettierschema für die Eichkurve zur Proteinbestimmung nach Bradford.....	43
Tabelle 18: cDNA-Synthese.....	48
Tabelle 19: Komponenten der qPCR.....	49
Tabelle 20: qPCR-Programm.....	50

Abkürzungsverzeichnis

1D-Gel	eindimensionales Gel
α -SMA	<i>alpha smooth muscle actin</i>
ADAM	<i>a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein</i>
AGE	<i>advanced glycation end products</i>
APS	Ammoniumperoxidsulfat
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>)
CK-1	Caseinkinase I
CKD	chronische Nierenerkrankung (<i>chronic kidney disease</i>)
CTF	C-terminales Fragment
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (<i>double-stranded deoxyribonucleic acid</i>)
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
FCS	fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FSP-1	<i>fibroblast specific protein 1</i>
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GSK-3 β	Glykogensynthasekinase 3 β
KDIGO	Kidney Disease: Improving Global Outcomes
KDOQI	Kidney Disease Outcome Quality Initiative
LEF	<i>lymphoid enhancer-binding factor</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PI	Propidiumiodid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

qPCR	<i>Real Time</i> quantitative Polymerase-Kettenreaktion (<i>real-time quantitative polymerase chain reaction</i>)
RIPA	Radioimmunpräzipitationsassay
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
TCF	<i>T-cell factor</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
UUO	unilaterale ureterale Obstruktion
VIM	Vimentin

1 Einleitung

1.1 Die Niere

Der Mensch besitzt in der Normvariante zwei im Retroperitoneum gelegene Nieren. Die Nieren erhalten etwa 20 % des Herzzeitvolumens und erfüllen wichtige exokrine und endokrine Funktionen (Stein und Fadem 1978). Die Funktionseinheit der Niere ist das Nephron. Die erwachsene Niere besteht im Durchschnitt aus einer Millionen Nephra (Hincliffe et al. 1991). Das Nephron besteht aus dem Nierenkörperchen und dem Tubulussystem (Scott und Quaggin 2015). Als Glomerulus wird ein Kapillarknäuel innerhalb des Nierenkörperchens bezeichnet, das am Gefäßpol von einer afferenten Arteriole gespeist wird und nach erfolgter Filtration in eine efferente Arteriole mündet (Pollak et al. 2014). Das Kapillarendothel des Glomerulus ist fenestriert und bekleidet die glomeruläre Basalmembran (Pollak et al. 2014). Der Glomerulus ist in die doppelwandige Bowman-Kapsel gestülpt, deren viszerales Epithel, die Podozyten, mit seinen Primär- und Sekundärfortsätzen eine Schlitzmembran ausbildet (Pollak et al. 2014). Diese bildet mit dem Kapillarendothel und der glomerulären Basalmembran die glomeruläre Filtrationsbarriere aus (Pollak et al. 2014). Gekennzeichnet ist diese durch eine Größen- und Ladungsselektivität aufgrund einer anionischen Glykokalyx (Curthoys und Moe 2014; Scott und Quaggin 2015). Durch die Filtration des Plasmavolumens entstehen hier täglich 160 bis 170 Liter Primärharn (Scott und Quaggin 2015). Antreibend für die glomeruläre Filtration ist der effektive Filtrationsdruck. Dieser entsteht aus der Differenz des onkotischen und des hydrostatischen Drucks der Kapillare und der Bowman-Kapsel (Pollak et al. 2014). Der Harnpol verbindet das Nierenkörperchen mit dem Tubulussystem (Pollak et al. 2014). Das Tubulussystem besteht aus dem proximalen Tubulus, dem Intermediärtubulus, dem distalen Tubulus, dem Verbindungstubulus und dem Sammelrohr. Im proximalen Tubulus erfolgt der größte Teil der Resorption aus dem Primärharn: Etwa zwei Drittel des Wassers und des Natriumchlorids werden hier resorbiert. Aminosäuren und Glukose werden zu 99,8 % resorbiert (Curthoys und Moe 2014). Der proximale Tubulus ist wesentlich am Säure-Base-Haushalt beteiligt: Bikarbonat wird zu etwa 70 bis 90 % resorbiert, Protonen werden luminal sezerniert (Curthoys und Moe 2014). Die folgende Henle-Schleife besteht aus der *Pars recta* des proximalen Tubulus, dem Intermediärtubulus und der *Pars recta* des distalen Tubulus. Mithilfe des Gegenstromprinzips erfolgt hier eine Konzentrierung des Sekundärharns (Dantzer et al. 2014). Wichtig für den Aufbau des Konzentrations-

gradienten ist, dass der dicke aufsteigende Schenkel der Henle-Schleife permeabel für Natrium, allerdings nicht für Wasser ist und der dünne absteigende Schenkel permeabel für Wasser ist (Dantzler et al. 2014; Mount 2014). Im distalen Tubulus erfolgt eine Aldosteron-abhängige Natrium-Resorption über den $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ -Kotransporter im frühen Segment und über den epithelialen Na^+ -Transporter im späten Segment (Subramanya und Ellison 2014). Diese Änderungen dienen der genauen Abstimmung des Sekundärharns (Curthoys und Moe 2014). Im weiteren Tubulussystem findet eine ähnliche Natrium- und Wasserrückresorption statt (Pearce et al. 2015). An den Schaltzellen des Sammelrohrs geschehen weitere Änderungen des Säure-Base-Haushalts (Roy et al. 2015). Die Niere kann durch diese Filtrations-, Resorptions- und Sekretionsprozesse den Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Base-Haushalt steuern und harnpflichtige Substanzen ausscheiden (Hoening und Zeidel 2014; Scott und Quaggin 2015). Änderungen des Wasser- und Elektrolythaushalts beeinflussen das periphere Plasmavolumen und somit den Blutdruck (Scott und Quaggin 2015). Dieser wird zudem durch die Renin-Sekretion und die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems reguliert (Curthoys und Moe 2014). Weitere endokrine Funktionen der Niere sind die Erythropoetin-Synthese und die Aktivierung des Calcitriols durch die 1α -Hydroxylase, wodurch die Niere maßgeblich am Kalziumstoffwechsel beteiligt ist (Curthoys und Moe 2014).

1.2 Die chronische Nierenerkrankung

Die chronische Nierenerkrankung (CKD) beschreibt eine über mindestens drei Monate persistierende Abnahme der renalen Funktion. In der Regel geht diese mit einer Abnahme der glomerulären Filtrationsrate (GFR) $< 90 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ Körperoberfläche oder dem Nachweis einer Nierenschädigung in der Histologie, der Bildgebung, dem Urin oder dem peripheren Blut einher. Die CKD kann daher die glomeruläre, die tubuläre oder die endokrine Nierenfunktion betreffen (KDIGO 2013). Trotz unterschiedlicher Ätiologie und Pathogenese ist die CKD durch eine Progression bis zur terminalen Niereninsuffizienz und eventuellen Nierenersatztherapie gekennzeichnet (Remuzzi et al. 2006).

In der *Global Burden of Disease Study 2013* zeigt sich das globale Ausmaß der CKD: Weltweit leiden etwa 470 bis 500 Millionen Menschen an einer chronischen Nierenerkrankung (Mills et al. 2015; Vos et al. 2015). Dies entspricht etwa 10,4 % aller Männer und 11,8 % aller Frauen (Glasscock et al. 2017). Im Jahr 2010 waren weltweit 2,62 Millionen Patienten dialysepflichtig (Liyanage et al. 2015). In Deutschland zählte man im Jahr 2017 85000 dialysepflichtige Patienten (Potthoff et al. 2018).

Die Ursachen der CKD sind vielfältig. Die diabetische Nephropathie zählt mit der vaskulären Nephropathie und den Glomerulonephritiden zu den häufigsten Ursachen in Deutschland: In der *GCKD Study 2015* war die diabetische Nephropathie mit 15 % die dritthäufigste Ursache einer moderaten CKD, definiert als GFR von 30 bis 60 ml/min/1,73 m² Körperoberfläche, im Jahr 2012 (Titze et al. 2015). Daten der QuaSi-Niere aus dem Jahr 2006 listeten den Diabetes mellitus als häufigste Ursache der dialysepflichtigen Niereninsuffizienz mit 28 % und gleichrangig zu den Glomerulonephritiden als häufigste Ursache der terminalen Niereninsuffizienz mit 23 % (Frei und Schober-Halstenberg 2008).

Die chronische Nierenerkrankung ist ein Risikofaktor für eine terminale Niereninsuffizienz, für kardiovaskuläre Folgeerkrankungen und assoziiert mit einer erhöhten Mortalität (KDIGO 2013). Im unbehandelten Krankheitsverlauf entwickeln sich eine Hypervolämie, eine arterielle Hypertonie, eine metabolische Azidose, eine Hyperkaliämie, eine renale Anämie, ein sekundärer Hyperparathyreoidismus und eine renale Osteopathie. Im Endstadium kommt es durch die Retention und Akkumulation harnpflichtiger Substanzen zur Urämie (KDIGO 2013).

1.2.1 Die diabetische Nierenerkrankung

Die diabetische Nephropathie ist mit der diabetischen Retinopathie und diabetischen Neuropathie eine Manifestation der diabetischen Mikroangiopathie, einer typischen Folge des Diabetes mellitus (International Diabetes Federation 2017).

Weltweit waren im Jahr 2017 etwa 425 Millionen Menschen im Alter von 20 bis 79 Jahren mit einer Prävalenz von 8,8 % an Diabetes mellitus erkrankt, darunter etwa 90 % an Typ-2-Diabetes (International Diabetes Federation 2017). Im Jahr 2045 rechnet man weltweit mit 629 Millionen Diabetikern. Dies entspricht einen Anstieg des Absolutwerts um 48 % bei einer Prävalenz von 9,9 % (International Diabetes Federation 2017). Etwa 30 % der Typ-1-Diabetiker und 40 % der Typ-2-Diabetiker entwickeln bei genetischer Prädisposition eine diabetische Nephropathie (Reutens 2013; Alicic et al. 2017). Somit ist von einem Anstieg der diabetischen Nephropathie auszugehen (Vos et al. 2015).

Die diabetische Nephropathie ist assoziiert mit einer arteriellen Hypertonie, einem progredienten Abfall der GFR und einer Proteinurie, bis hin zum nephrotischen Syndrom (Skena und Gesualdo 2005).

In der klinischen Praxis wird die Mikroalbuminurie zum Screening auf eine diabetische Nephropathie verwendet (National Kidney Foundation 2007). Die Mikroalbuminurie tritt

nach Veränderungen der glomerulären Basalmembran auf (Kanwar et al. 2011). Es kommt zum Verlust von Heparansulfat und zur Glykierung sulfatierter Proteoglykane, wodurch die negativen Ladungen der glomerulären Basalmembran abnehmen und das negativ geladene Albumin filtriert wird (Brownlee 1995; Kanwar et al. 2011). Bei Typ-2-Diabetikern ist die Mikroalbuminurie mit einer Makroalbuminurie, einer terminalen Niereninsuffizienz und kardiovaskulären Folgeerkrankungen assoziiert (Alicic et al. 2017). Daten der *United Kingdom Prospective Diabetes Study* zum Typ-2-Diabetes zeigen, dass die 10-Jahres-Überlebensrate bei Mikroalbuminurie um 16 % geringer ist als ohne Nephropathie (Adler et al. 2003). Die jährliche Todesrate ist bei persistierender Mikroalbuminurie höher als die Progressionsrate zur Makroalbuminurie (Adler et al. 2003). Kardiovaskuläre Ereignisse stellen dabei die wesentliche Todesursache dar (Adler et al. 2003). Diabetiker zählen somit zur kardiovaskulären Hochrisikogruppe (National Kidney Foundation 2007).

Eine persistierende Hyperglykämie induziert verschiedene profibrotische und proinflammatorische Effekte: die Synthese von *transforming growth factor beta* (TGF- β), die Synthese von Angiotensin II und Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), das Generieren von *advanced glycation end products* (AGE), die Aktivierung des Proteinkinase-C-Signalwegs, die Synthese von Diacylglycerin und die Metabolisierung der Glukose über alternative Stoffwechselwege, wie den Polyol-Weg oder den Hexosamin-Weg (Wolf 2004; Kanwar et al. 2011; Lin et al. 2018). Insbesondere AGEs induzieren Änderungen der Proteinstruktur und -funktion und sind mit der Aktivierung verschiedener profibrotischer Signalwege assoziiert (Brownlee 1995; Kanwar et al. 2011). *In vitro* induzieren sie die TGF- β 1-Synthese und die Aktivierung des TGF- β -/Smad-Signalwegs in Glomeruluszellen (Li et al. 2004).

Pathophysiologisch manifestiert sich im Frühstadium der diabetischen Nephropathie eine glomeruläre Hyperfiltration bei strukturell nachweisbarer glomerulärer Hypertrophie (Skena und Gesualdo 2005). Die glomeruläre Hyperfiltration resultiert aus dem Anstieg des intraglomerulären Drucks bei Abnahme des Widerstands in der afferenten Arteriole durch verschiedene vasoaktive Mediatoren und Zunahme des Widerstands in der efferenten Arteriole durch eine vermehrte Synthese von Angiotensin II (Anderson et al. 1985; Wolf 2004). Es folgen eine mesangiale Zellproliferation und -hypertrophie sowie eine Vermehrung der extrazellulären Matrix im Mesangium (Kanwar et al. 2011). Die Basalmembranen der Glomeruli, Tubuli und Kapillaren verbreitern sich: Die Glykierung der extrazellulären Matrix erschwert die Degradation und führt zur Akkumulation dieser (Fioretto und Mauer 2007; Alicic et al. 2017). Es kommt zu einem Verlust von Podozyten

und der Verschmelzung der podozytären Fußfortsätze (Fioretto und Mauer 2007; Alicic et al. 2017). Im weiteren Verlauf entwickelt sich eine Glomerulosklerose und tubulointerstitielle Fibrose (Kanwar et al. 2011). Beschrieben ist zudem eine Hyalinisierung der afferenten Arteriolen (Kanwar et al. 2011).

1.2.2 Die tubulointerstitielle Fibrose

Histopathologisch zeichnen sich chronische Nierenerkrankungen trotz unterschiedlicher Ätiologie und Pathogenese durch eine zunehmende tubulointerstitielle Fibrose mit Entzündungsinfiltrat und peritubulärer Gefäßrarefizierung sowie einer tubulären Dilatation und Atrophie aus (Kuncio et al. 1991; Strutz und Müller 1999).

Die Fibrose folgt dabei einem initialen inflammatorischen Stimulus bei Schädigung des Tubulointerstitiums (Kuncio et al. 1991). Die Fibrogenese soll, analog zum Modell der Wundheilung, zur Restitution der Organfunktion nach initialer Schädigung und Inflammation führen (Strutz und Müller 1999). Dies beinhaltet das Beseitigen der Noxe, das Abräumen des Entzündungsinfiltrates, die Proliferation und Regeneration des geschädigten Tubulusepithels und das Remodeling der extrazellulären Matrix (Liu 2006). Eine solche Restitution ist bei einer akuten Nierenschädigung beschrieben (Liu 2006). Eine chronische Entzündung durch eine andauernde oder wiederholte Organschädigungen führt hingegen zur renalen Fibrose (Kuncio et al. 1991). Die renale Fibrose ist das Resultat einer Dysbalance zwischen der Synthese und dem Abbau der extrazellulären Matrix (Liu 2006). Die exzessive Akkumulation der qualitativ veränderten extrazellulären Matrix im Tubulointerstitium verdrängt zunehmend das renale Parenchym und vermindert so die renale exkretorische Funktion (Zeisberg und Neilson 2010). Das Ausmaß der tubulointerstitiellen Fibrose korreliert stärker mit der renalen exkretorischen Funktion und der individuellen Prognose als glomeruläre Veränderungen (Schainuck et al. 1970; Zeisberg und Neilson 2010). Ursächlich dafür ist das quantitative Überwiegen des Tubulointerstitiums gegenüber den Glomeruli im humanen Nierengewebe (Nath 1998).

Die renale Fibrogenese wird nach Strutz und Müller (1999) in die Induktionsphase, die Phase der inflammatorischen Matrixsynthese und die Phase der postinflammatorischen Matrixsynthese eingeteilt:

In der Induktionsphase sezernieren Tubulusepithelzellen nach einer Schädigung Chemokine, wie *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1) und *regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted* (RANTES) (Mezzano et al. 2004). Die Synthese und Sekretion dieser Chemokine ist abhängig von der Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs (Mezzano et al. 2004;

Zeisberg und Neilson 2010). Aktivierend wirken u. a. die Proteinurie, Angiotensin II, AGEs, ROS und die Hyperglykämie (Wolf 2004; Lin et al. 2018). Mononukleäre Zellen werden durch den hohen Chemokin-Gradienten zum geschädigten Tubulusepithel gelotst (Liu 2006). Nach Infiltration des Tubulointerstitiums sezerniert das Entzündungsinfiltrat profibrotische Zytokine, wie TGF- β , *platelet derived growth factor* (PDGF), *fibroblast growth factor 2* (FGF-2) (Alvarez et al. 1992; Alpers et al. 1993; Strutz et al. 2000; Strutz und Zeisberg 2006). Interstitielle Fibroblasten werden dadurch aktiviert. Sie proliferieren und differenzieren in der Folge zu Myofibroblasten. Die Aktivität des Entzündungsinfiltrats kann durch die Freisetzung von ROS, Stickstoffmonoxid und proinflammatorischer Zytokine sowie die Aktivierung des Komplementsystems zur weiteren Schädigung führen (Eardley und Cockwell 2005).

Die Phase der inflammatorischen Matrixsynthese ist gekennzeichnet durch eine anhaltende Zytokin-Sekretion des Entzündungsinfiltrats und einer vermehrten Synthese einer veränderten extrazellulären Matrix durch Myofibroblasten. Die extrazelluläre Matrix besteht v. a. aus Kollagen Typ I, Typ III, dem ansonsten nur in der Basalmembran vorkommenden Typ IV, Typ VI, Fibronektin und Proteoglykanen (Kuncio et al. 1991; Eddy 1996; Grande und López-Novoa 2009; Zeisberg und Neilson 2010). Die hochregulierten Proteaseinhibitoren *tissue inhibitor of metalloproteinase 1* (TIMP-1) und Plasminogenaktivator-Inhibitor 1 (PAI-1) und Quervernetzungen zwischen Matrixproteinen vermindern zudem den Abbau der extrazellulären Matrix (Eddy 1996; Strutz und Müller 1999; Liu 2006). Während sich zu Beginn der Fibrose am Ort der ursprünglichen Schädigung ein Fokus ausbildet, breitet sie sich durch die anhaltende Entzündungsreaktion diffus aus (Neilson et al. 1984; Zeisberg und Neilson 2010).

Die postinflammatorische Matrixsynthese beschreibt die Matrixsynthese nach Beseitigung des ursprünglichen Entzündungsstimulus. Verursacht wird diese durch die Sekretion profibrotischer Zytokine durch geschädigte Tubulusepithelzellen und der autokrinen Proliferation aktivierter Fibroblasten durch FGF-2 (Strutz und Müller 1999).

Die postinflammatorische Matrixsynthese macht deutlich, dass die Progredienz der CKD v. a. in frühen Stadien abhängig von der Grunderkrankung und einer eventuellen kausalen Therapie ist (Strutz und Müller 1999; KDIGO 2013). Im weiteren Verlauf ist die Progredienz großteils unabhängig von der eigentlichen Ursache (Strutz und Müller 1999; KDIGO 2013).

1.2.3 Fibroblasten und Myofibroblasten

Fibroblasten sind mesenchymale Zellen mit spindelförmiger Gestalt, die extrazelluläre Matrixproteine synthetisieren und im Tubulointersitium lokalisiert sind (Strutz und Zeisberg 2006). Interstitielle Fibroblasten werden im Rahmen der renalen Fibrose aktiviert. Die Aktivierung erfolgt durch die Wirkung von Wachstumsfaktoren, wie TGF- β , FGF-2, PDGF oder *connective tissue growth factor*, oder über Stimuli, wie die Hyperglykämie, den AGEs, den ROS oder dem aktivierten Komplementsystem (Qi et al. 2006). Die Interaktion mit Leukozyten und Makrophagen oder Integrinen aktiviert ebenfalls die Fibroblasten (Qi et al. 2006). Bei Aktivierung proliferieren diese und differenzieren eventuell zu Myofibroblasten (Grande und López-Novoa 2009). Aktivierte Fibroblasten und Myofibroblasten synthetisieren im Wesentlichen die extrazelluläre Matrix und nehmen auf diese Weise eine zentrale Rolle in der Fibrogenese ein (Grande und López-Novoa 2009). Myofibroblasten sind Fibroblasten mit Ähnlichkeiten zu glatten Muskelzellen. Durch eine *De-novo*-Expression von *alpha smooth muscle actin* (α -SMA) und der Ausbildung von Stressfasern unterscheiden sich die kontraktile Myofibroblasten von aktivierten Fibroblasten (Desmoulière et al. 2005). Die Zellpopulation der aktivierten Fibroblasten und Myofibroblasten hat einen heterogenen Ursprung aus interstitiellen Fibroblasten, glomerulären Mesangiumzellen, bestimmten Fibroblasten des Knochenmarks, Tubulusepithelzellen nach epithelial-mesenchymaler Transition (EMT), Endothelzellen nach endothelial-mesenchymaler Transition und vermutlich α -SMA⁺-Perizyten (Iwano et al. 2002; Liu 2006; Zeisberg et al. 2008; Humphreys et al. 2010; Zeisberg und Neilson 2010). Die einzelnen Zellpopulationen unterscheiden sich im Zeitpunkt ihrer Aktivierung: Interstitielle Fibroblasten und glomeruläre Mesangiumzellen werden in der Induktionsphase der renalen Fibrogenese aktiviert (Strutz und Müller 1999). Des Weiteren unterscheiden sich die Zellpopulationen in ihrer quantitativen Matrixsynthese: Interstitielle Fibroblasten tragen zum größten Teil zur Fibrosierung bei (Picard et al. 2008). Umstritten ist hingegen, ob und wie sehr die vom Tubulusepithel abstammenden Myofibroblasten zur Fibrosierung beitragen (Humphreys et al. 2010; Koesters et al. 2010; Fragiadaki und Mason 2011; Kriz et al. 2011; LeBleu et al. 2013).

1.2.4 Die EMT in der renalen Fibrose

Die EMT beschreibt den Verlust epithelialer Marker, wie E-Cadherin oder *Zonula occludens 1*, und das Akquirieren mesenchymaler Marker, wie Vimentin oder α -SMA (Grande und López-Novoa 2009; Lamouille et al. 2014). Diese Veränderung geht einher mit der Auflösung epithelialer Zelladhäsionen zum Zellverband und zur Basalmembran und der Änderung der kuboiden in eine spindelförmige Zellmorphologie nach einer zytoskelettalen Reorganisation (Liu 2004; Lamouille et al. 2014). Die Zellen sind gekennzeichnet durch eine *De-novo*-Expression von α -SMA und einer Zunahme der Invasivität und Zellmigration nach Verlust der Zellpolarität (Liu 2004; Lamouille et al. 2014). Nach der proteolytischen Degradation der Basalmembran migrieren die Zellen vom Tubulusepithel ins Interstitium (Grande und López-Novoa 2009; Lamouille et al. 2014). Dort differenzieren sie weiter zu Myofibroblasten und sind an der Matrixsynthese beteiligt (Grande und López-Novoa 2009).

Kalluri und Weinberg (2009) unterscheiden drei verschiedene Formen der EMT: Typ 1 während der Implantation, Gastrulation und Organogenese; Typ 2 im Rahmen der hier beschriebenen Fibrose und Wundheilung; und Typ 3 während der Metastasierung, Invasion und Progression maligner Neoplasien. Die EMT ist im Rahmen der renalen Fibrose kontrovers beschrieben: Verschiedene Autoren konnten eine vollständige EMT in *In-vivo*-Modellen der renalen Fibrose nur in geringem Ausmaß (LeBleu et al. 2013) oder gar nicht nachweisen (Humphreys et al. 2010; Koesters et al. 2010; Kriz et al. 2011). Kriz et al. (2011) führten aufgrund dieser Beobachtungen den Begriff der partiellen EMT ein. Dieser beschreibt eine morphologische Entdifferenzierung von Tubulusepithelzellen und die Hochregulation mesenchymaler Marker, geht allerdings nicht mit der Annahme eines mesenchymalen Phänotyps und der Synthese einer fibrotischen Matrix einher (Kriz et al. 2011).

1.3 Das E-Cadherin

Das E-Cadherin, auch L-CAM oder Uvomorulin, wird vom *CDH1*-Gen, lokalisiert auf dem Chromosom 16q22.1, kodiert und ist ein kalziumabhängiges Zelladhäsionsprotein mit einer relativen Molekülmasse von etwa 120 kDa (Shore und Nelson 1991; Berx et al. 1995; Grabowska und Day 2012). Als solches gehört es zur Familie der klassischen Cadherine und wird hauptsächlich epithelial exprimiert (Takeichi 1991). Der Aufbau des E-Cadherins ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

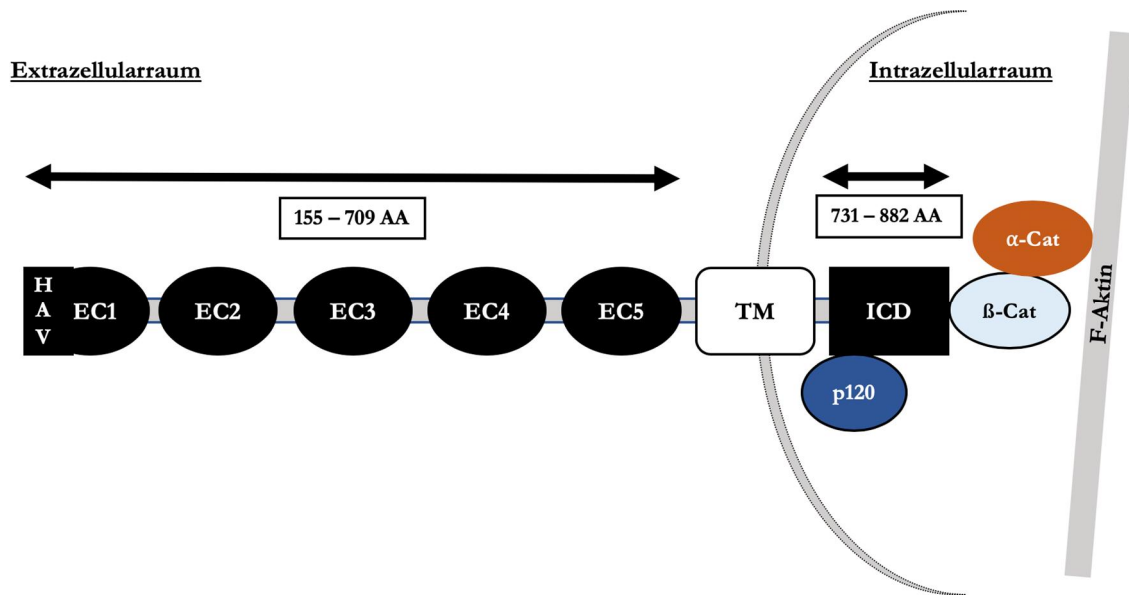


Abbildung 1: Schematischer Aufbau des E-Cadherins, basierend auf van den Bossche et al. (2012) und Hu et al. (2016). Das E-Cadherin besteht aus fünf Extrazellulärdomänen (EC), die sich aus den Aminosäuren 155-709 zusammensetzen, einer Transmembrandomäne (TM) und einer intrazellulären Domäne (ICD), bestehend aus den Aminosäuren 731-882 (van den Bossche et al. 2012). Die erste Extrazellulärdomäne verfügt über eine Histidin-Alanin-Valin-Sequenz (HAV), welche an der Zelladhäsion beteiligt ist (van den Bossche et al. 2012). Im Zytoplasma ist E-Cadherin assoziiert mit β-Catenin (β-Cat), α-Catenin (α-Cat) und p120-Catenin (p120). Über β- und α-Catenin besteht Anschluss zum Aktingerüst der Zelle (Hu et al. 2016).

E-Cadherin ist ein Typ-1-Transmembranprotein und besteht aus einer N-terminalen extrazellulären Region, die sich aus fünf sich wiederholenden Domänen zusammensetzt und Kalzium für die Aktivität als Zelladhäsionsmolekül benötigt (Grabowska und Day 2012; Hu et al. 2016). Die extrazelluläre Region ist glykosyliert (Berx et al. 1995). Es folgt eine Transmembrandomäne. E-Cadherin ist ein *Single-pass*-Protein (Berx et al. 1995). Die C-terminale zytoplasmatische Region ist konserviert und bildet durch die direkte Interaktion mit β- und γ-Catenin den Cadherin-Catenin-Komplex aus, welcher maßgeblich an der Zelladhäsion beteiligt ist (Berx et al. 1995; Grabowska und Day 2012; Hu et al. 2016). Im Weiteren interagieren β- und γ-Catenin mit α-Catenin, welches an Aktinfilamente bindet und so den Cadherin-Catenin-Komplex ans Aktingerüst verankert (Grabowska und Day 2012; Hu et al. 2016). Bei Funktionsverlust des Cadherin-Catenin-Komplexes ist der Verlust des epithelialen Phänotyps beschrieben (Nagafuchi und Takeichi 1989; Ozawa et al. 1989). An die intrazelluläre Domäne des E-Cadherins bindet zudem das p120-Catenin, welches bei eventueller nukleärer Translokation den Transkriptionssinhibitor Kaiso bindet (Cavallaro und Christofori 2004; Grabowska und Day 2012).

Durch die Dimerisierung benachbarter E-Cadherin-Moleküle entstehen Homodimere (Cavallaro und Christofori 2004; Cavallaro und Dejana 2011). Die Homodimere

benachbarter Zellen *trans*-interagieren miteinander homophil und bilden so die *Zonula adhaerens*, einen gürtelförmigen Zell-Zell-Kontakt, aus (Cavallaro und Christofori 2004; Cavallaro und Dejana 2011). Histidin-Alanin-Valin-Domänen, Tryptophan-Reste und hydrophobe Taschen innerhalb der ersten extrazellulären Domäne des E-Cadherins sind maßgeblich an der homophilen Interaktion beteiligt (Cavallaro und Christofori 2004). Die Funktionalität des E-Cadherins und der *Zonula adhaerens* ist abhängig vom Cadherin-Catenin-Komplex (Nagafuchi und Takeichi 1989; Ozawa et al. 1989). E-Cadherin führt durch die Adhäsion im epithelialen Zellverband und die intrazelluläre Verankerung an das Aktingerüst zur Zellpolarität, Zellintegrität und Kontakthemmung (Cavallaro und Christofori 2004; van Roy 2014). Zudem ist das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin an der Embryogenese und Immunantwort beteiligt (Berx et al. 1995). Es gilt traditionell als Tumorsuppressor (Berx et al. 1995).

1.3.1 E-Cadherin und β -Catenin

β -Catenin stabilisiert zum einen als Teil des Cadherin-Catenin-Komplexes die Zelladhäsion (Nagafuchi und Takeichi 1989; Ozawa et al. 1989), zum anderen nimmt β -Catenin eine zentrale Rolle im kanonischen Wnt-Signalweg ein (Kikuchi et al. 2006). Dieser konservierte Signalweg ist u. a. bedeutend in der Embryogenese, der renalen Organogenese oder der Tumordinvasion (Cavallaro und Christofori 2004; He et al. 2009; Hu et al. 2015). Der kanonische Wnt-Signalweg kann eine EMT induzieren (Kemler et al. 2004). Beschrieben sind eine Beteiligung dessen an der renalen Fibrogenese und eine Inhibition ist mit einer verminderten Akkumulation der extrazellulären Matrix assoziiert (He et al. 2009). Der Signalweg ist in Abbildung 2 dargestellt.

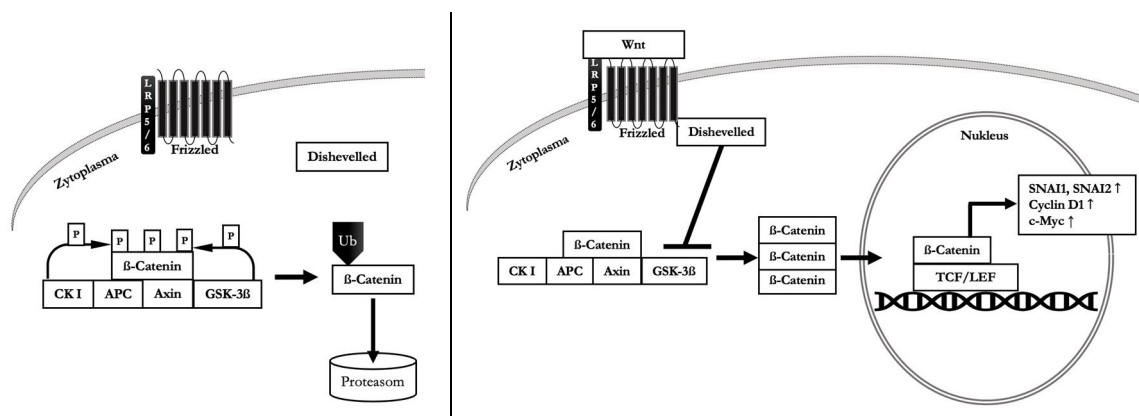


Abbildung 2: Kanonischer Wnt-Signalweg um β -Catenin, basierend auf Cavallaro und Christofori (2004). Links ist der proteasomale Abbau des β -Catenins bei Fehlen eines Wnt-Signals dargestellt, rechts die transkriptionelle Aktivität des Wnt-Signalwegs bei Vorliegen eines Wnt-Signals. Der Signalweg ist in Kapitel 1.3.1 ausführlich beschrieben.

E-Cadherin sequestriert β -Catenin an der Zellmembran und verhindert damit eine zytoplasmatische Akkumulation des β -Catenins (Lamouille et al. 2014). Bei E-Cadherin-Verlust akkumuliert das membrangebundene β -Catenin im Zytoplasma. Hier wird es im Komplex mit dem *Adenomatous-polyposis-coli*-Protein (APC), Axin, der Caseinkinase I (CK I) und der Glykogensynthasekinase 3β (GSK- 3β) von der GSK- 3β und CK I phosphoryliert und inaktiviert. Die folgende Ubiquitinylierung markiert β -Catenin für den proteasomalen Abbau (Cavallaro und Christofori 2004; Cavallaro und Dejana 2011). Bei einer simultanen Aktivierung des Wnt-Signalwegs durch das Binden von Wnt-Proteinen an den Rezeptor Frizzled und den Korezeptoren *lipoprotein related receptor protein 5/6* wird die GSK- 3β inhibiert (Hu et al. 2015). β -Catenin wird durch die Aktivierung von Dishevelled vom Komplex gelöst und transloziert in den Nukleus (Hu et al. 2015). β -Catenin ist ein Koaktivator von den Transkriptionsfaktoren der *T-cell factor* (TCF)-/*lymphoid enhancer-binding factor* (LEF)-Familie und ist beteiligt an der Transkription zahlreicher Zielgene (Kikuchi et al. 2006). Dazu zählen u. a. die Gene der Transkriptionsfaktoren *SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST1* und *ZEB1* (Surendran et al. 2005; Hu et al. 2016). Innerhalb des *SNAI2*-Promotors befindet sich eine Bindestelle für β -Catenin und LEF (Vallin et al. 2001). Der *CDH1*-Promotor besitzt zudem eine TCF/ β -Catenin-Bindungsstelle, wodurch die Genexpression herunterreguliert werden kann (Jamora et al. 2003).

1.3.2 Die proteolytische Spaltung des E-Cadherins

Der Verlust des E-Cadherins ist bei Tumorpatienten mit einer schlechten Prognose assoziiert und korreliert mit einer gesteigerten Invasivität, Entdifferenzierung und Metastasierung in vielen Tumoren (Banks et al. 1995; Cavallaro und Christofori 2004; Hu et al. 2016). Die wesentlichen Mechanismen des E-Cadherin-Verlusts sind die Inaktivierung der Transkription, die Hypermethylierung, die Mutationen innerhalb des *CDH1*-Gens, die Endozytose und der proteolytische Abbau (Cavallaro und Christofori 2004; Hu et al. 2016). Des Weiteren bewirkt die proteolytische Spaltung des E-Cadherins den Verlust von Zelladhäsionskontakten.

Durch die proteolytische Spaltung (Abbildung 3) entsteht ein extrazelluläres E-Cadherin-Fragment, welches als *soluble E-cadherin* (sE-cad) bzw. lösliches E-Cadherin bezeichnet wird (Grabowska und Day 2012). Dieses besteht aus den fünf sich wiederholenden extrazellulären Domänen und hat eine relative Molekülmasse von 80 bis 85 kDa (Grabowska und Day 2012). Gleichzeitig entsteht ein membrangebundenes C-terminales Fragment CTF1 mit einer relativen Molekülmasse von 38 kDa (Hu et al. 2016).

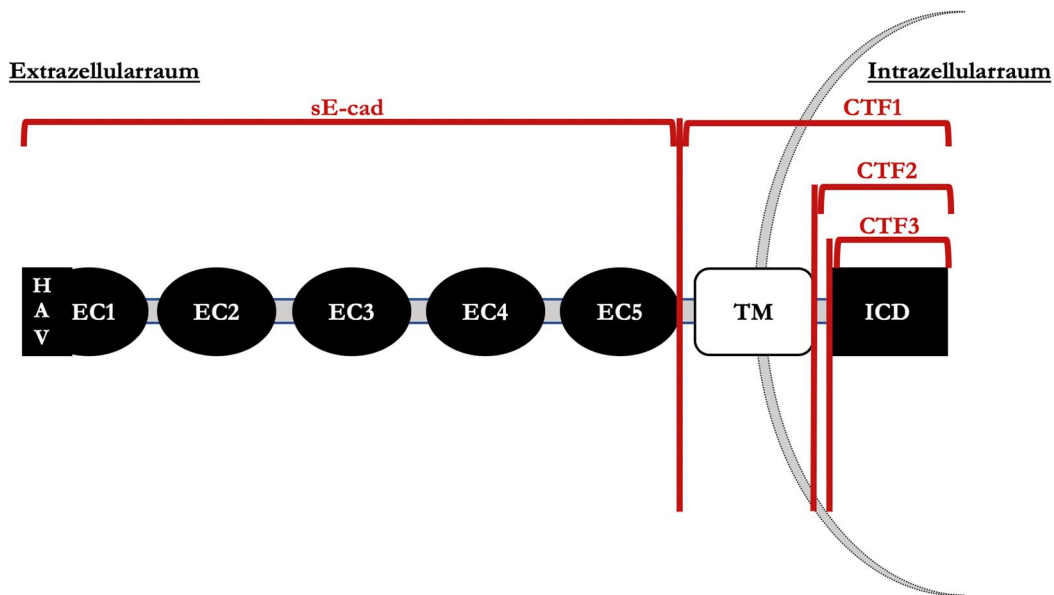


Abbildung 3: Spaltung des E-Cadherins, basierend auf Hu et al. (2016). Durch die Spaltung des E-Cadherins entsteht in der Regel das sE-cad und ein membranassoziiertes zyttoplasmatisches Fragment CTF1. Durch eine weitere Spaltung des CTF1 durch γ -Sekretasen entsteht das intrazelluläre CTF2. Im Rahmen der Apoptose entsteht das CTF3 durch die Caspase-3.

An diesem Prozess sind verschiedene Proteasen beteiligt, darunter die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 und MMP-14 (Grabowska und Day 2012). Matrix-Metalloproteinasen werden größtenteils als Proenzyme in den Extrazellulärraum sezerniert und durch eine limitierte Proteolyse aktiviert (Nawrocki-Raby et al. 2003). Diese Aktivierung wird von TIMP-1/-2 inhibiert (Nawrocki-Raby et al. 2003). Proteasen der *a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein* (ADAM)-Familie sind mit ADAM10, ADAM15 und ADAM17 an der Spaltung des E-Cadherins beteiligt (Najj et al. 2008; Grabowska und Day 2012; Hu et al. 2016). Die Serinprotease Plasmin kann E-Cadherin spalten (Grabowska und Day 2012). Ihre Aktivierung ist abhängig von Plasminogenaktivatoren und PAI-1/-2 (Ryniers et al. 2002). Im Weiteren können Kallikrein-7, bakterielle Proteasen, wie Gingipains, gastrointestinale Bakteriotoxine, das *Bacteroides-fragilis*-Toxin und aktive Cathepsine sE-cad produzieren (Grabowska und Day 2012; Hu et al. 2016).

Grabowska und Day (2012) vermuten das Vorhandensein verschiedener proteolytischer Kaskaden, deren gemeinsamer Endpunkt die Spaltung des E-Cadherins darstellt.

Im Rahmen des proteolytischen Abbaus können die intra- und extrazellulären Fragmente weiter gespalten werden (Banks et al. 1995). Auf diese Weise spalten γ -Sekretasen CTF1 von der Membran. Es entsteht ein 33 kDa schweres intrazelluläres Fragment CTF2, welches nach nukleärer Translokation die Desoxyribonukleinsäure (DNA) im Komplex mit

p120-Catenin binden und die Genexpression beeinflussen kann (Ferber et al. 2008; Grabowska und Day 2012; Hu et al. 2016). Die Caspase-3 kann im Rahmen der Apoptose das 29 kDa schwere Fragment CTF3 bilden (Steinhusen et al. 2001; Hu et al. 2016).

1.3.3 Das *soluble E-cadherin* (sE-cad)

Damsky et al. (1983) haben das 80 kDa schwere extrazelluläre E-Cadherin-Fragment sE-cad erstmalig im konditionierten Medium von MCF-7-Zellen detektiert. Seither ist die Rolle des sE-cads als potenzieller, jedoch unspezifischer Biomarker bei verschiedenen Erkrankungen erörtert worden. Wichtig ist, dass das sE-cad im Rahmen des physiologischen Proteinumsatzes und -abbaus von E-Cadherin auch bei Gesunden in Körperflüssigkeiten aufzufinden ist (Banks et al. 1995). Erhöhte sE-cad Konzentrationen in verschiedenen Körperflüssigkeiten sind bei zahlreichen malignen Erkrankungen, wie beispielsweise dem Magen- oder dem Urothelkarzinom, beschrieben und korrelieren teilweise mit der Tumorgroße, der Progression, der Rezidivwahrscheinlichkeit, der Metastasierung und anderen prädiktiven Faktoren (Griffiths et al. 1996; Gofuku et al. 1998; Protheroe et al. 1999; Hu et al. 2016). Erhöhte sE-cad-Konzentrationen sind zudem mit einer schlechten Prognose bei malignen Erkrankungen assoziiert (Katayama et al. 1994; Banks et al. 1995; Griffiths et al. 1996). Weiterhin sind erhöhte Serumkonzentrationen von sE-cad bei Hauterkrankungen, viralen oder bakteriellen Infektionen, der Sepsis oder dem Organversagen beobachtet worden (Matsuyoshi et al. 1995; Pittard et al. 1996; Grabowska und Day 2012).

Die *In-vitro*-Behandlung von Zellen mit dem sE-cad führt zu einer Aggregationsinhibition und der Induktion der Zellinvasion (Damsky et al. 1983; Wheelock et al. 1987; Noe et al. 2001; Ryniers et al. 2002). Nach der E-Cadherin-Spaltung wirkt das extrazelluläre Fragment parakrin (Noe et al. 2001) und verhindert laut Masterson und O'Dea (2007) als Pseudoligand des E-Cadherins die Ausbildung von Zelladhäsionskontakten. Die sE-cad-Behandlung stimuliert die Aktivität von MMPs und ADAMs und fördert so die Tumprogression (Grabowska und Day 2012; Hu et al. 2016). Zudem kann sE-cad an verschiedene Rezeptoren binden und durch die Aktivierung von Signalkaskaden die Proliferationsrate, Invasion und Migration steigern und die Apoptose inhibieren (Maretzky et al. 2005; Najy et al. 2008; Grabowska und Day 2012). Beschrieben sind Interaktionen mit Rezeptortyrosinkinasen der ErbB-Familie (Brouxhon et al. 2014).

1.4 Das sE-cad als Frühmarker einer diabetischen Nephropathie

Persson et al. (2016) zeigen in einer Metaanalyse zum Typ-2-Diabetes, dass die frühzeitige Intervention durch Inhibitoren des *angiotensin converting enzyme* oder Angiotensin-II-Rezeptorantagonisten das Risiko für eine Mikroalbuminurie signifikant reduziert. Koziolk et al. (2020) folgern daraus, dass es Biomarker bedarf, die eine solche frühzeitige Intervention indizieren und eine renale Schädigung vor dem Auftreten einer Mikroalbuminurie mit hoher Sensitivität anzeigen. Auf diese Weise kann nach Koziolk et al. (2020) eine eventuelle Progression zur terminalen Niereninsuffizienz verhindert und das hohe kardiovaskuläre Risiko vermindert werden.

Unsere Arbeitsgruppe hat deshalb in vorausgegangenen proteomischen Studien das Urinproteom von gesunden Patienten, Patienten mit Diabetes ohne Nephropathie, mit Mikroalbuminurie, mit Makroalbuminurie und Patienten mit nichtdiabetischer Proteinurie nach Eliminierung der sechs häufigsten Blutproteine (Albumin, Transferrin, IgG, IgA, Haptoglobin und α 1-Antitrypsin) verglichen (Dihazi et al. 2007; Koziolk et al. 2020). Dabei wurde das sE-cad als Frühmarker für Patienten mit Diabetes mellitus und einem hohen Risiko einer diabetischen Nephropathie validiert. Es differenziert Patienten mit einer diabetischen Nephropathie mit einer Mikro- oder Makroalbuminurie von Patienten anderer Studiengruppen. Es konnte gezeigt werden, dass die Urinkonzentration des sE-cads mit der Ausprägung der diabetischen Nephropathie korreliert und zwischen Früh- und Spätstadien dieser differenziert: die gesunde Kontrollgruppe mit einer sE-cad-Konzentration von $18,6 \pm 8,7$ ng/ml, Patienten mit Diabetes mellitus und hohem Risiko einer diabetischen Nephropathie mit einer Konzentration größer als 45 ng/ml, und Patienten mit einer diabetischen Nephropathie und einer Makroalbuminurie mit einer sE-cad-Konzentration von $77,8 \pm 55,2$ ng/ml (Koziolk et al. 2020).

In einer klinisch-prospektiven Studie korrelierte eine signifikante Zunahme der sE-cad-Urinkonzentration bei 70 % der Patienten mit einer Mikroalbuminurie und ereignete sich $20 \pm 12,5$ Monate vor dem Auftreten dieser (Koziolk et al. 2020). In Frühstadien der diabetischen Nephropathie korreliert die sE-cad-Konzentration signifikant mit der GFR, anders als die Albuminurie (Koziolk et al. 2020). Das sE-cad hat somit ein großes Potenzial als prognostischer Biomarker (Koziolk et al. 2020).

1.5 Die Fragestellung und Zielsetzung dieser Dissertation

Im Rahmen dieser Dissertation soll die Herkunft des im Urin detektierten sE-cads untersucht werden. Es stellt sich die Frage, ob das E-Cadherin-Fragment über die Blutzirkulation in den Urin gelangt oder von geschädigten Tubulusepithelzellen abgespalten wird.

Eine persistierende oder wiederholte Schädigung des Tubulointerstitiums führt durch die Aktivierung proinflammatorischer Signalkaskaden, wie dem TGF- β -/Smad-Signalweg (Abbildung 23), zur chronischen Inflammation und später zur Organfibrose (vgl. 1.2.2).

Zum Nachweis einer möglichen E-Cadherin-Spaltung infolge einer Aktivierung proinflammatorischer und -fibrotischer Signalkaskaden werden Zellen des distalen Tubulusepithels des Hundes (MDCK-Zellen) mit TGF- β 1 behandelt. Zur Untersuchung der Rolle der Matrix-Metalloproteinasen in der E-Cadherin-Spaltung nach erfolgter Zellaktivierung durch TGF- β 1 werden MDCK-Zellen zusätzlich mit dem Matrix-Metalloproteinase-Inhibitor GM6001 behandelt. Die MDCK-Zellen werden in dieser Versuchsreihe verwendet, da sie als einzige in dieser Dissertationsarbeit verwendete Zelllinie E-Cadherin exprimieren (Gaush et al. 1966; Nouwen et al. 1993).

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob die exogene Gabe von sE-cad protektiv oder schädigend auf renale Zellen wirkt. Distale Tubulusepithelzellen der Zelllinie MDCK, proximale Tubulusepithelzellen der Zelllinie HK-2 und renale interstitielle Fibroblasten der Zelllinie TK173 werden dafür *in vitro* mit sE-cad behandelt.

Untersucht werden nach der sE-cad-Behandlung die Zellviabilität und die Apoptose. Darüber hinaus sollen etwaige Veränderungen der Expression von E-Cadherin, von Fibrosemarkern und von *SNAI1* und *SNAI2* untersucht werden.

Zudem soll ein möglicher Effekt des sE-cads auf den hier dargestellten Signalweg um β -Catenin (Abbildung 2) untersucht werden. In MDCK-Zellen, welche anders als HK-2- und TK173-Zellen E-Cadherin exprimieren, sollen mögliche Expressionsänderungen des aktiven β -Catenins detektiert werden (Gaush et al. 1966; Nouwen et al. 1993).

2 Material und Methoden

2.1 Material

Tabelle 1: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
2-Propanol	Carl Roth, Karlsruhe
Acetonitril	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Acrylamid (30 %)	Carl Roth, Karlsruhe
Alexa Fluor 488 Annexin V	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Alexa Fluor 488 Annexin V/ Dead Cell Apoptosis Kit	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Alexa Fluor 488 Phalloidin	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampholyte-Stammlösung pH 3-10	Bio-Rad, München
Ampuwa Sterilwasser	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Annexin Binding Buffer (5 x)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cell Proliferation Kit I (MTT)	Roche Diagnostics, Mannheim
CHAPS	Carl Roth, Karlsruhe
Chloroform	Honeywell, Offenbach
Coomassie-Blau (5 x)	Carl Roth, Karlsruhe
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt

Chemikalie	Hersteller
Desoxyribonuclease I (DNase), Amplification Grade	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dithiothreitol (DTT)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
DNase I Reaktionspuffer (10 x)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
DNase I Stop Solution	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP)-Mix (10 mmol/l)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Doppelt destilliertes Wasser (ddH ₂ O)	Sartorius, Göttingen
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Dulbecco's PBS (w/o: Ca ²⁺ , Mg ²⁺)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Eindeckmittel (Eukitt)	O. Kindler & ORSAtec, Bobingen
Essigsäure (100 %)	Merck, Darmstadt
Ethanol (100 %)	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratorien, Pasching, Österreich
First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Formaldehyd	Fluka, Seelze
Gentamycin	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Goat Serum	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
IGEPAL CA-630 NP 40	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, Steinheim
M-MuLV Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
MEM Non-Essential Amino Acids (100 x)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt

Chemikalie	Hersteller
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Milchpulver fettarm	Carl Roth, Karlsruhe
Minimum Essential Medium	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Mounting Medium	Biozol, Eching
MTT Labeling Reagent	Roche Diagnostics, Mannheim
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumdesoxycholat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (10 %) (SDS)	Honeywell, Offenbach
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Nuklease-freies Wasser	Qiagen, Hilden
Oligo-dT-Primer	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
PCR-Primer	Microsynth Seqlab, Göttingen
PCR-Primer	Primerdesign, Southampton, UK
Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Fluka, Seelze
Ponceau S (0,2 %)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Precision Plus Protein Kaleidoscope Standard	Bio-Rad, München
Propidiumiodid (PI)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Protein Assay	Bio-Rad, München
Protein G Agarose	Roche Diagnostics, Mannheim
PureLink RNA Mini Kit	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Reaktionspuffer (Reverse Transcriptase, 5 x)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt

Chemikalie	Hersteller
RNase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
RNase Zap	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Salzsäure (rauchend, 37 %) (HCl _{aq})	Carl Roth, Karlsruhe
Solubilization solution (MTT)	Roche Diagnostics, Mannheim
SYBR Green Mastermix	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trifluoressigsäure	Merck, Darmstadt
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Trizol Reagent	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Trypsin 2,5 % (10 x)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Urea (Harnstoff)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Waschpuffer I (RNA-Isolation)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Waschpuffer II (RNA-Isolation)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt

Tabelle 2: Zusammensetzung von Medien und Lösungen für die Zellkultur

Medium oder Lösung	Weitere Bestandteile
<u>Zellkulturmedium:</u> Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	+ 10 % (v/v) fetales Kälberserum (FCS) + 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin + 2 mmol/l L-Glutamin
<u>Zellkulturmedium:</u> Minimum Essential Medium (MEM)	+ 10 % (v/v) FCS + 1 % (v/v) MEM Nonessential Amino Acids + 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin + 1 % (v/v) Gentamicin + 2 mmol/l L-Glutamin
<u>FCS-freies Medium:</u> DMEM	+ 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin + 2 mmol/l (w/v) L-Glutamin
<u>FCS-freies Medium:</u> MEM	+ 1 % (v/v) MEM Nonessential Amino Acids + 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin + 1 % (v/v) Gentamicin + 2 mmol/l (w/v) L-Glutamin
Trypsin-EDTA	0,25 % (v/v) Trypsin 0,53 mmol/l EDTA mit DPBS (w/o: Ca ²⁺ , Mg ²⁺) auffüllen

Tabelle 3: Zusammensetzung von Lösungen und Puffer für die proteinbiochemische Analyse

Lösung oder Puffer	Zusammensetzung
1,5 mol/l TRIS/HCl _{aq} pH 6,8	181,7 g/l TRIS mit HCl auf pH 6,8 einstellen
1,5 mol/l TRIS/HCl _{aq} pH 8,8	181,7 g/l TRIS mit HCl auf pH 8,8 einstellen
Elutionspuffer	Trifluoressigsäure/ddH ₂ O/Acetonitril: 1:20:20
Harnstoff-Lysepuffer	9,5 mol/l Urea (Harnstoff) 2 % (w/v) CHAPS 1 % (w/v) DTT (frisch hinzugeben) 2 % (v/v) Ampholyte (frisch hinzugeben) 10 nmol/l PMSF (frisch hinzugeben)
Probenpuffer (4 x)	4,3 ml ddH ₂ O 2,5 ml 1,5 mol/l TRIS/HCl (pH 6,8) 5 ml Glycerin 8 ml SDS (10 %) 200 µl Bromophenolblau 5 % Mercaptoethanol (frisch hinzugeben)
Radioimmunpräzipitationsassay-Puffer (RIPA-Puffer)	50 mmol/l TRIS/HCl (pH 7,4) 1 % (v/v) NP-40 0,5 % (w/v) Natriumdesoxycholat 0,1 % (w/v) SDS 150 mmol/l NaCl 2 mmol/l EDTA 50 mmol/l Natriumfluorid 10 nmol/l PMSF (frisch hinzugegeben)

Lösung oder Puffer	Zusammensetzung
Transferpuffer (5 x)	125 mmol/l TRIS 1,25 mol/l Glycin 0,5 % (w/v) SDS 20 % (v/v) Methanol (frisch hinzugeben)
TRIS-Glycin-Elektrophoresepuffer (5 x)	125 mmol/l TRIS 1,25 mol/l Glycin 0,5 % (w/v) SDS
Western-Blot-Waschpuffer (5 x)	50 mmol/l TRIS 0,5 mol/l NaCl 0,5 % (v/v) Tween 20 mit HCl auf pH 7,5 einstellen

Tabelle 4: Zusammensetzung weiterer verwendeter Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
Paraformaldehyd (4 %)	DPBS (1 x) unter Abzug auf 60 °C erhitzen 4 % (w/v) Formaldehyd hinzugeben pH bis zum Lösen des Formaldehyds mit Natronlauge erhöhen Lösung abkühlen und steril filtrieren mit Salzsäure auf pH 6,9 einstellen mit DPBS auffüllen
PI-Lösung	90 % (v/v) Annexin Binding Buffer 10 % (v/v) PI abgedunkelt und gekühlt aufbewahrt

Tabelle 5: Testsubstanzen

Testsubstanz	Hersteller
E-Cadherin, Human, Recombinant	Advanced BioMatrix, Carlsbad, Kalifornien, USA
Das humane, rekombinante E-Cadherin wurde in <i>E. coli</i> exprimiert. Laut Herstellerangaben wurde das Protein chromatographisch aufgetrennt und künstlich gefaltet. Es bestand nur aus der Ektodomäne des E-Cadherins (Aminosäuren 155-710) und glich somit dem sE-cad.	
TGFB1, active, Human, Recombinant	BPS Bioscience, San Diego, Kalifornien, USA
GM6001 (Ilomastat) MMP Inhibitor	Merck, Darmstadt

Tabelle 6: Primärantikörper für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung und den Western-Blot

Zielprotein	Methode	Verdünnung	Spezies	Hersteller
E-Cadherin	Immunfluoreszenz, Western-Blot	1:200 1:1000	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Frankfurt/Main
E-Cadherin	Immunpräzipitation, Western-Blot	1:100 1:250	Maus	Abcam, Cambridge, UK
β -Aktin	Western-Blot	1:2000	Maus	Sigma-Aldrich, Steinheim
β -Catenin	Western-Blot	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Frankfurt/Main
Non-phospho (active) β -Catenin	Immunfluoreszenz, Western-Blot	1:800 1:1000	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Frankfurt/Main
Cofilin	Western-Blot	1:1000	Kaninchen	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fibronektin	Western-Blot	1:2500	Ziege	Sigma-Aldrich, Steinheim
Vimentin	Immunfluoreszenz	1:400	Maus	Dako, Hamburg
Vimentin	Western-Blot	1:1000	Maus	Dako, Hamburg

Tabelle 7: Sekundärantikörper für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Sekundärantikörper	Verdünnung	Spezies	Hersteller
<i>Alexa Fluor 488</i> Anti-Maus	1:200	Ziege	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
<i>Alexa Fluor 488</i> Anti-Kaninchen	1:200	Ziege	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
<i>Alexa Fluor 555</i> Anti-Maus	1:400	Ziege	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
<i>Alexa Fluor 555</i> Anti-Kaninchen	1:400	Ziege	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt

Tabelle 8: Sekundärantikörper für den Western-Blot

Sekundärantikörper	Verdünnung	Spezies	Hersteller
<i>Alexa Fluor 647</i> Anti-Maus	1:2000	Ziege	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
<i>Alexa Fluor 647</i> Anti-Kaninchen	1:2000	Ziege	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
<i>Alexa Fluor 647</i> Anti-Ziege	1:2000	Esel	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
<i>Alexa Fluor 680</i> Anti-Maus	1:2000	Ziege	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt

Tabelle 9: Primer für humane Zielgene

Zielgene (human)		Sequenz (5' → 3')
<i>ACTA2</i>	Vorwärtsprimer	AAG CAC AGA GCA AAA GAG GAA T
	Rückwärtsprimer	ATG TCG TCC CAG TTG GTG AT
<i>S100A4</i>	Vorwärtsprimer	TCT TTC TTG GTT TGA TCC TGA CT
	Rückwärtsprimer	AGT TCT GAC TTG TTG AGC TTG
<i>SNAI1</i>	Vorwärtsprimer	GGC AAT TTA ACA ATG TCT GAA AAG G
	Rückwärtsprimer	GAA TAG TTC TGG GAG ACA CAT CG
<i>SNAI2</i>	Vorwärtsprimer	ACT CCG AAG CCA AAT GAC AA
	Rückwärtsprimer	CTC TCT CTG TGG GTG TGT GT

Die Sequenzen der humanen Zielgene wurden vom Microsynth Seqlab (Göttingen) synthetisiert. Die Referenz der in Tabelle 9 dargestellten Sequenzen sind vorhergegangene Arbeiten der Abteilung (Lovisa et al. 2015).

Tabelle 10: Primer für Zielgene der MDCK-Zellen (Hund)

Zielgene (Hund)		Sequenz (5' → 3')
<i>ACTA2</i>	Vorwärtsprimer	GAC CTT GAA GTA CCC GAT AGA A
	Rückwärtsprimer	CCT CGG TGA GCA GGG TG
<i>S100A4</i>	Vorwärtsprimer	GAC GGA TGA AGC CGC CTT C
	Rückwärtsprimer	GCA GGA CAG GAA GAC ACA GTA C
<i>SNAI1</i>	Vorwärtsprimer	CCA CTC AGA TGT CAA GAA GTA TCA G
	Rückwärtsprimer	CTT GGA GAG GCA GAA GGA GC
<i>SNAI2</i>	Vorwärtsprimer	CGC TCC TTC CTG GTC AAG AAG
	Rückwärtsprimer	GGA TCT CTG GTT GTG GTA TGA CA

Für die Arbeiten am Transkriptom der vom Hund stammenden MDCK-Zellen wurden die Primer von Primerdesign (Southampton, UK) designt und synthetisiert (Tabelle 10).

Als *housekeeper* bzw. Referenzgen wurde *GAPDH* verwendet und von Primerdesign (Southampton, UK) erworben.

Die lyophilisierten Primer wurden nach Herstellerangaben resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 11: Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Durchflusszytometer	FACSCanto II	BD Biosciences, Heidelberg
Elektrophoresekammer	Mini-PROTEAN 3 Cell	Bio-Rad, München
Feinwaage	1702	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenz-Laserscanner	Fuji FLA 5100	Fujifilm, Düsseldorf
Fluoreszenz- und Phasenkontrastmikroskop	Axiovert S100 TV	Carl Zeiss, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop	IX71	Olympus, Hamburg
Gefrierschrank (-20 °C)	MDF-U5312	PHC Europe, Etten-Leur, Niederlande
Gefrierschrank (-80 °C)	MDF-U76V-PE	PHC Europe, Etten-Leur, Niederlande
Gießstand	Mini-PROTEAN	Bio-Rad, München
Inkubationsschüttler	Lab-Therm	Adolf Kühner, Birsfelden (Basel), Schweiz
Inkubator	3548	Forma Scientific Inc., Marietta, Ohio, USA
Kryobehälter		Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Kühlschrank	7081 243-00	Liebherr, Bulle, Schweiz

Gerät	Modell	Hersteller
Kühlzentrifuge	3-18K	Sigma, Osterode
Kühlzentrifuge	1-1SRK	Sigma, Osterode
Lichtmikroskop	Axiovert 25	Carl Zeiss, Göttingen
Mehrfachdispenser	Multipette M4	Eppendorf, Hamburg
Mikroliterspritze		Hamilton Company, Bonaduz, Schweiz
Mikroskop	ID 03	Carl Zeiss, Göttingen
Mikrovolumen- Spektralphotometer	NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Neubauer-Zählkammer	Assistent	Hecht, Sondheim/Rhön
pH-Meter	PB-11	Sartorius, Göttingen
Photometer	Lambda 25	Perkin Elmer, Rodgau
Pipette	Reference	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Pipetus®	Hirschmann, Eberstadt
Real-Time PCR System	StepOnePlus	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Rührplatte	RCT IKAMAG	IKA, Staufen
Schüttler	Duomax 1030	Heidolph Instruments, Schwabach
Sterilbank	Biological Safety Cabinet Class II	NuAire, Plymouth, Minnesota, USA
Thermoblock	Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler	Mastercycler epgradient S	Eppendorf, Hamburg
Transferkassette	Mini Gel Holder Cassette	Bio-Rad, München
Ultraschallbad	Sonorex	Bandelin electronic, Berlin
Vakuumkonzentrator	Univapo 150 H	UniEquip, Planegg

Gerät	Modell	Hersteller
Voltmeter	2301 Macrodrive 1	LKB, Wien, Österreich
Vortexer	REAX Top 2000	Heidolph Instrument, Schwabach
Waage	Universal	Sartorius, Göttingen
Wärmeofen	Robbin Scientific, Model 400	Dunn Labortechnik GmbH
Wasserbad	1083	GFL, Burgwedel
Western-Blot-Modul	Mini Trans-Blot Central Core	Bio-Rad, München
Zentrifuge	5415D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge für PCR-Platten	PerfecteSpin P	PEQLAB, Erlangen

Tabelle 12: Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
6-Well-Zellkulturplatte	Greiner Bio-One, Frickenhausen
12-Well-Zellkulturplatte	Greiner Bio-One, Frickenhausen
8-Kammern-Kultur-Objektträger	Corning Life Sciences, Durham, North Carolina, USA
96-Well-Zellkulturplatte	Corning Life Sciences, Durham, North Carolina, USA
96-Well-PCR-Mikrotiterplatten	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Bottle Top Filter (Porengröße: 0,2 µm)	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläser (24 x 60 mm, #1)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Dispenserspitzen (5 ml, 10 ml)	Eppendorf, Hamburg
Einmal-Skalpell	pfm Medical, Köln
Einmalkanülen steril	B. Braun, Melsungen
Einmalküvetten	Sarstedt, Nümbrecht

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Einmalspritzen steril (10 ml)	BD Biosciences, Heidelberg
Eppendorf Reaktionsgefäße (0,6 ml)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Eppendorf Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Erlenmeyerkolben mit Ansatz	DURAN Glastechnik, Wertheim/Main
Fertiggel für SDS-PAGE 10 %	Bio-Rad, München
Fertiggel für SDS-PAGE 12 %	Bio-Rad, München
Filterspitzen	Eppendorf, Hamburg
Glasplatten zur Gelherstellung	Bio-Rad, München
Injektionsfilter steril (Porengröße: 0,2 µm)	Sarstedt, Nümbrecht
Klebefolie	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Kryoröhrchen (1,8 ml)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Kulturflaschen 75 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht
Kunststoffkamm	Bio-Rad, München
Laborflaschen	DURAN Glastechnik, Wertheim/Main
Nitrilhandschuhe unsterile	STARLAB, Hamburg
Nitrocellulose-Blotting-Membranen (Porengröße: 0,45 µm)	GE Healthcare, Solingen
Parafilm M	Hecht, Sondheim/Rhön
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	STARLAB, Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsröhrchen (15 ml; 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Rührspatel	Sarstedt, Nümbrecht
Rundboden-Polystyrolröhrchen (5 ml)	Corning Life Sciences, Durham, North Carolina, USA

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Schaumpolster für Transferkassette	Bio-Rad, München
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Ultrafiltrationseinheit Vivaspin 20 (5000 MWCO PES)	Sartorius, Göttingen
Whatman Filterpapier	GE Healthcare, Solingen

Tabelle 13: Wissenschaftliche Software

Wissenschaftliche Software	Hersteller
Analysis Doku Software	Soft Imaging Systems, Leinfelden
Cell D Imaging Software	Olympus, Hamburg
FACSDiva	BD Biosciences, Heidelberg
Graphpad Prism 8.0	Graphpad Software, San Diego, Kalifornien, USA
Image Reader FLA-5000	Fujifilm, Düsseldorf
ImageJ	National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA
Microsoft Office 2019	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
StepOne Software v2.3	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Zotero	Center for History and New Media, GMU, Virginia, USA

Tabelle 14: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Phänotypischer und funktioneller Ursprung	Spezies	Referenz
HK-2	Proximales Tubulusepithel (<i>Pars convoluta</i>), gesunde Niere Immortalisierung nach Transduktion mit v-E6/v-E7 (HPV 16)	Human	Ryan et al. 1994
MDCK	Distales Tubulusepithel, gesunde Niere	Hund	Gaush et al. 1966
TK173	Renale interstitielle Fibroblasten, gesunde Niere Immortalisierung nach Transfektion mit Plasmid pSV3gpt	Human	Müller et al. 1995

Die in Tabelle 14 aufgeführten Zelllinien unterschieden sich in ihrer E-Cadherin-Expression. HK-2-Zellen entstammen der *Pars convoluta* des proximalen Tubulusepithels und exprimieren daher kein E-Cadherin, sondern N-Cadherin (Nouwen et al. 1993). MDCK-Zellen, die aus dem distalen Tubulusepithel isoliert wurden, exprimieren hingegen E-Cadherin (Gaush et al. 1966; Nouwen et al. 1993). Es ist keine Expression des E-Cadherins in den renalen Fibroblasten der Zelllinie TK173 beschrieben (Müller et al. 1995).

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die MDCK-Zellen wurden in MEM, die HK-2-Zellen und TK173-Zellen in DMEM kultiviert. Zur Kultur wurden die Zellen in 75 cm² Kulturflaschen im Wärmeschrank bei 37 °C mit 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % Kohlenstoffdioxid gehalten.

Alle 48 Stunden wurden die Zellen bezüglich ihrer Konfluenz, morphologischer Veränderungen und eventueller Kontaminationen lichtmikroskopisch beurteilt.

Das zellspezifische Medium wurde alle 48 bis 72 Stunden gewechselt. Sämtliche Arbeiten an der Zellkultur erfolgten an einer Sterilbank mit Laminar-Flow-Technik.

2.2.1.1 Trypsinierung und Ernten der Zellen

Nach Erreichen einer Zelldichte von 85 % wurden die Zellen trypsinisiert, vom Flaschenboden abgelöst und auf neue Kulturflaschen verteilt. Dafür wurde das verbrauchte Zellmedium abgesaugt, die Zellen zweimal mit 5 ml *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (DPBS) gewaschen und für zwei Minuten mit 1,5 ml Trypsin-EDTA inkubiert. Das Trypsin-EDTA wurde abgesaugt und der Flaschenboden abgeklopft. Es wurde Medium zum Neutralisieren des Trypsin-EDTA hinzugegeben, um die gelösten Zellen in Suspension aufzunehmen. Diese wurde auf neue Kulturflaschen verteilt und mit zellspezifischem Medium auf 10 ml verdünnt.

Die MDCK-Zellen wurden aufgrund starker Adhäsionen vor der Trypsingabe für zehn Minuten mit 0,05 % EDTA in DPBS inkubiert.

2.2.1.2 Einfrieren der Zellen

Insbesondere MDCK-Zellen wurden bei einer geringen Passagenzahl eingefroren und nach wenigen Passagen aufgetaut, um mögliche Änderungen des Phänotyps oder Zelltyps zu vermeiden.

Vor dem Einfrieren der Zellen wurde eine DMSO-Gebrauchslösung, bestehend aus 1 ml steril filtriertem DMSO und 6,2 ml zellspezifischem Kulturmedium, hergestellt und auf 4 °C gekühlt.

Aus einer subkonfluenten Zellkulturflasche mit einer hohen Viabilität wurden vier Kryoröhrchen mit je 1,1 ml Volumen hergestellt und in einem mit Isopropanol-gefüllten Kryobehälter bei -80 °C eingefroren. Die Zellen wurden trypsinisiert und mit Kulturmedium in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurde bei 1200 Umdrehungen pro

Minute (rpm) und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Das Pellet wurde in Medium aufgenommen und mit der gekühlten DMSO-Gebrauchslösung verdünnt. Pro Kryoröhrchen wurden 0,5 ml des zellspezifischen Mediums und 0,6 ml der DMSO-Gebrauchslösung hinzugefügt. Die Suspension wurde danach schnell auf die Kryoröhrchen verteilt, um temperaturabhängige zytotoxische Effekte des Frostschutzmittels DMSO zu verhindern. Die Kryoröhrchen wurden zuvor mit der Zelllinie, der Passagenummer, dem Einfriermedium und dem Einfrierdatum beschriftet und dann im Kryobehälter eingefroren.

2.2.1.3 Auftauen der Zellen

Die Zellsuspension im Medium-DMSO-Gemisch, die in Kryoröhrchen bei -80 °C eingefroren wurde, wurde mit 5 ml angewärmtem, zellspezifischem Medium in ein Zentrifugenröhrchen aufgetaut und überführt. Bei 1200 rpm wurde bei 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde schnellstmöglich abgesaugt und das Pellet mit 5 ml zellspezifischem Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf eine Kulturflasche gegeben und mit zellspezifischem Medium auf 10 ml aufgefüllt.

Nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C wurde der Erfolg des Einfrierens und Auftauens anhand der Morphologie, der Adhärenz und Viabilität der aufgetauten Zellen evaluiert und das Medium gewechselt.

2.2.1.4 Aussaat der Zellen

Die Zellen wurden nach der Trypsinierung mit zellspezifischem Medium in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1200 rpm und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in dem gewünschten Verhältnis im zellspezifischen Medium resuspendiert.

Mit einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl pro Milliliter bestimmt. Anschließend wurde die Zellsuspension – falls nötig – mit Medium verdünnt und auf die Vertiefungen der jeweiligen Well-Platten gegeben. Diese wurden im Wärmeschrank bei 37 °C inkubiert.

2.2.2 Serumfreisetzung und Zellbehandlung

Um die Herkunft und Rolle des sE-cads weiter zu untersuchen, wurden Zellen mit TGF- β 1 (BPS Bioscience, San Diego, Kalifornien, USA) und dem rekombinanten humanen sE-cad (Advanced Biomatrix, Carlsbad, Kalifornien, USA) behandelt: Dafür wurden alle Zelllinien bis zu einer Zelldichte von etwa 70 % kultiviert, das verbrauchte Medium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml DPBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mit 10 ml zellspezifischem, serumfreiem Medium für 24 Stunden vor der Behandlung bei 37 °C inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurde in einem Intervall von drei Stunden dreimal das serumfreie Medium gewechselt, um Reste des an der Zelloberfläche gebundenen Serums zu eliminieren.

2.2.2.1 sE-cad-Behandlung

Die potenzielle Wirkung des sE-cads auf Nierenzellen wurde mit dem MTT-Assay, dem Annexin-V-Apoptose-Assay, dem Western-Blot, der Immunfluoreszenzfärbung und der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) analysiert. Dafür wurden die Zellen nach der Serumfreisetzung mit verschiedenen sE-cad-Konzentrationen (50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 500 ng/ml) behandelt und bei 37 °C für 72 Stunden inkubiert. Dazu wurde nach einer 24-stündigen Serumfreisetzung das Medium abgesaugt und die entsprechende Menge des sE-cads in frisches serumfreies Medium hinzugefügt. Die behandelten Zellen wurden im Wärmeschrank für die benötigte Inkubationszeit kultiviert.

2.2.2.2 TGF- β 1-Behandlung

Zum Nachweis einer E-Cadherin-Spaltung infolge einer Aktivierung profibrotischer Signalkaskaden wurden MDCK-Zellen mit TGF- β 1 behandelt. Nach 24-stündiger Serumfreisetzung wurden die MDCK-Zellen für 48 Stunden mit 5 ng/ml aktivem TGF- β 1 bei 37 °C behandelt. Zur Untersuchung der Rolle der Matrix-Metalloproteinasen in der E-Cadherin-Spaltung nach erfolgter Zellaktivierung durch TGF- β 1 wurden MDCK-Zellen zusätzlich zu 5 ng/ml TGF- β 1 mit 10 μ g/ml des Matrix-Metalloproteinase-Inhibitors GM6001 behandelt. Wie in 2.2.5.1 beschrieben, wurden die Zellüberstände gesammelt und E-Cadherin-Spaltfragmente mittels Western-Blots nachgewiesen.

Die TGF- β 1- und GM6001-Behandlung wurde analog zur sE-cad-Behandlung (s. 2.2.2.1) durchgeführt.

2.2.3 MTT-Zellviabilität-Assay

Für Rückschlüsse auf die Zellviabilität der behandelten Zellen wurde der MTT-Assay mithilfe des *Cell Proliferation Kit I* (Roche Diagnostics, Mannheim) durchgeführt. Dafür wurden 1500 bis 3500 Zellen auf eine 96-Well-Zellkulturplatte ausgesät, über Nacht in 100 µl Nährmedium kultiviert und am nächsten Tag serumfreigesetzt. Die Zellen wurden, wie oben beschrieben, mit unterschiedlichen sE-cad-Konzentrationen (50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 500 ng/ml) behandelt, zusätzlich wurden Positivkontrollen mit serumfreiem Medium und Negativkontrollen angelegt. Nach der Inkubationszeit von 24, 48 oder 72 Stunden wurden 10 µl des gelben, hydrophilen Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml hinzugegeben.

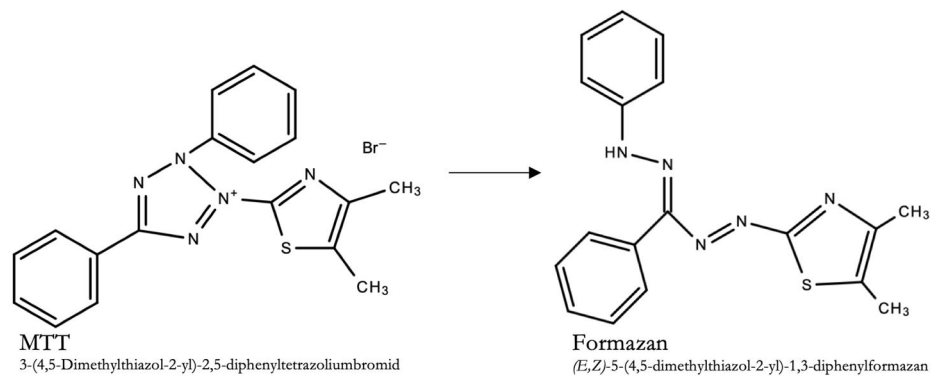


Abbildung 4: Reduktion des MTTs in Formazan, Abbildung modifiziert nach dem Datenblatt vom Cell Proliferation Kit I (Roche Diagnostics, Mannheim).

Das MTT wurde während einer Inkubation von vier Stunden bei 37 °C durch metabolisch aktive Zellen in violette, hydrophobe Formazankristalle reduziert (Abbildung 4) (Mosmann 1983). Die Menge des Formazans ist proportional zur Anzahl der lebenden, metabolisch aktiven Zellen (Mosmann 1983). Ausschlaggebend für die Reduktion ist weniger die Aktivität der mitochondrialen Succinat-Dehydrogenase, vielmehr das Vorhandensein der Reduktionsmittel NADH und NADPH und damit die Aktivität der Enzyme des Endoplasmatischen Retikulums (Berridge und Tan 1993).

Anschließend wurden die Formazankristalle durch das Hinzufügen von 100 µl der im Kit enthaltenen *Solubilization solution* und das Inkubieren über Nacht bei 37 °C gelöst. Am nächsten Morgen wurde die Absorption der gelösten Proben photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595$ nm gemessen.

2.2.4 Annexin-V-Apoptose-Assay

Um den Anteil apoptotischer und nekrotischer Nierenzellen nach sE-cad-Behandlung zu bestimmen, wurde der Annexin-V-Apoptose-Assay durchgeführt. Es wurde mit dem *Alexa Fluor 488 Annexin V/ Dead Cell Apoptosis Kit* (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt) gearbeitet.

Annexin V wird als Apoptosemarker verwendet: In vitalen Zellen befindet sich das Phospholipid Phosphatidylserin im inneren Monolayer der Zellmembran (Koopman et al. 1994; Verhoven et al. 1995). Während des kontrollierten Zelltodes wird das Phosphatidylserin durch die Scramblase zum äußeren Monolayer der Zellmembran getauscht (Verhoven et al. 1995). Annexin V besitzt eine hohe Affinität für Phosphatidylserin, wodurch apoptotische Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen detektiert werden können. Mit PI werden Nukleinsäuren dargestellt und dadurch nekrotische Zellen erfasst, da das PI einer intakten Zellmembran impermeabel ist (Unal-Cevik und Dalkara 2003).

Die Zellen wurden dafür auf 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät und bei Subkonfluenz für 24 Stunden serumfreigesetzt. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen sE-cad-Konzentrationen (50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 500 ng/ml) für 72 Stunden bei 37 °C behandelt. Parallel dazu wurden vier Kontrollreihen für doppelt-negative, einfach-positive Färbungen mit Annexin V, einfach-positive Färbungen mit PI und doppelt-positive Färbungen geführt. Mithilfe der Kontrollmessungen wurden die Schwellenwerte der einzelnen Signale für das *Alexa Fluor 488 Annexin V* und das PI festgelegt, um die Wahrscheinlichkeit falsch-positiver und falsch-negativer Ereignisse zu minimieren. Bei jeder Messung wurde mit drei Replikaten gearbeitet.

Anders als in 2.2.1.1 beschrieben, wurden das Medium und der Zellüberstand nicht abgesaugt, sondern in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Jedes Well wurde mit 1 ml DPBS gespült, welches ebenfalls in das jeweilige Zentrifugenröhrchen aufgenommen wurde. Die Zellen wurden mit 500 µl Trypsin-EDTA von der Kulturfläche gelöst, die Trypsinreaktion wurde durch die Zugabe von 1 ml zellspezifischem Medium gestoppt und alles nach mehrmaligem Spülen in das Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 1200 rpm und 4 °C für fünf Minuten. Das Pellet wurde mit 500 µl DPBS resuspendiert und unter denselben Bedingungen abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl einfach konzentriertem *Annexin Binding Buffer*, zuvor verdünnt in Ampuwa Sterilwasser, aufgenommen. Die Suspension wurde nach einer Zellzahlbestimmung auf 10⁶ Zellen/ml verdünnt.

In Rundboden-Polystyrolröhrchen wurden 100 µl der Zellsuspension überführt. Dieser wurden 5 µl *Alexa Fluor 488* Annexin V und 1 µl PI hinzugegeben. Die doppelt-negative Kontrolle wurde weder mit Annexin V noch mit PI, die einfach-positiven Kontrollen entsprechend nur mit PI oder Annexin V gefärbt. Die Suspension wurde im Dunkeln bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 400 µl *Annexin Binding Buffer* hinzugegeben und vorsichtig resuspendiert. Die Probe wurde bis zur durchflusszytometrischen Analyse auf Eis bewahrt.

Die Durchflusszytometrie erfolgte mit dem Durchflusszytometer FACSCanto II (BD Biosciences, Heidelberg) und der Software FACSDiva (BD Biosciences, Heidelberg) an der Wissenschaftlichen Serviceeinrichtung „Cell-Sorting“ der Klinik für Hämatologie und Onkologie der Universitätsmedizin Göttingen.

In der Durchflusszytometrie wurde die Zellsuspension durch eine Düse in einen Kanal aufgenommen. Eine Trägerflüssigkeit umhüllte die Zellsuspension in dem sich verengenden Kanal und fokussierte diese hydrodynamisch, sodass einzelne Zellen nacheinander auf den Laserstrahl trafen. Das Licht wurde dabei zum einen gestreut, zum anderen wurde ein Fluoreszenzsignal nach Anregung des konjugierten Fluoreszenzfarbstoffs mit der entsprechenden Wellenlänge emittiert. Die Streuung des Lichts erfolgte in allen Richtungen, sodass das Vorwärtsstreulicht (FSC) als Maß für die Zellgröße vom im rechten Winkel gestreuten Seitwärtsstreulicht (SSC) als Maß für die Zellstruktur und -granularität unterschieden wurde (Parks et al. 1986).

Das Fluoreszenzsignal wurde im Weiteren gefiltert, sodass der für das jeweilige Fluorochrom entsprechende Photomultiplier nur Licht spezifischer Wellenlänge detektierte. Der Photomultiplier wandelte das Fluoreszenzsignal in ein elektrisches Signal um. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden so ausgewählt, dass sich keine Überlappung der Emissionsspektren ergab.

Vor der Messung wurde die Zellsuspension gemischt, um Verklumpungen zu vermeiden. Es wurden pro Messung 10000 zufällige Ereignisse registriert.

2.2.5 Proteinbiochemische Analyse

2.2.5.1 Nachweis von E-Cadherin-Fragmenten und Fibronectin im Zellüberstand

Nach 48-stündiger TGF- β 1- oder 72-stündiger sE-cad-Behandlung wurde der Zellüberstand eingesammelt und das Sekretom mittels Western-Blots analysiert.

Nach der sE-cad-Behandlung wurde im Überstand das extrazelluläre Matrixprotein Fibronectin nachgewiesen.

Nach der TGF- β 1-Behandlung wurden im Überstand E-Cadherin-Fragmente detektiert. Mithilfe der indirekten Immunpräzipitation wurden die E-Cadherin-Fragmente angereichert und danach durch den Western-Blot dargestellt.

2.2.5.1.1 Einengung des Zellüberstandes

Nach dem Einsammeln des Überstandes wurde dieser mit den Vivaspin-Konzentratoren (Sartorius, Göttingen) auf 1 ml eingengt. Es wurden Ultrafiltrationseinheiten mit einem *cut-off* bei einer relativen Molekülmasse von 5000 Da verwendet. Deren Membran wurde zunächst mit DPBS benetzt und bei 4700 rpm und 4 °C für 30 Minuten zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen, mit dem Überstand wurde fortgefahren.

2.2.5.1.2 Proteinanreicherung mittels Chloroform-Methanol-Fällung

Die Fällung erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Wessel und Flügge (1984). Auf 100 μ l einer Proteinprobe wurden 400 μ l eiskaltes Methanol hinzugegeben und gemischt. Es wurden 100 μ l Chloroform hinzugefügt und gemischt. Nach der Zugabe von 300 μ l ddH₂O und erneutem Mischen wurde bei 14000 g und 4 °C für 90 Sekunden zentrifugiert. Das Proteinpräzipitat befand sich nach der Zentrifugation zwischen zwei Phasen. Die obere Phase wurde verworfen und es wurden erneut 400 μ l eiskaltes Methanol hinzugegeben. Nach dem Mischen folgte ein Zentrifugationsschritt bei 14000 g und 4 °C für zwei Minuten. Der Überstand wurde verworfen und der vorherige Schritt zweimal wiederholt. Anschließend wurde das Pellet unter der Sterilbank getrocknet. Sollte nun mit der indirekten Immunpräzipitation (s. 2.2.5.1.3) fortgefahren werden, so wurde die Probe in 1 ml DPBS aufgenommen. Ansonsten wurde das Pellet in Harnstoff-Lysepuffer aufgenommen und mit dem Western-Blot (s. 2.2.5.3) analysiert.

Die Sekretom-Proben wurden bei -20 °C eingefroren. Während der Fällung wurde auf Eis gearbeitet.

2.2.5.1.3 Indirekte Immunpräzipitation

Die indirekte Immunpräzipitation wurde zum Anreichern der E-Cadherin-Fragmente aus dem Zellüberstand nach 48-stündiger TGF- β 1-Behandlung durchgeführt.

Um unspezifische Bindungen an die Antikörper oder am Protein G zu vermeiden, wurde die Probe mit 50 μ l *Protein-G-Agarose-Beads* bei 4 °C für drei Stunden unter Rotation inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 12000 g und 4 °C für 30 Sekunden. Das Pellet wurde verworfen, mit dem Überstand wurde fortgefahren. Dieser wurde mit Anti-E-Cadherin Antikörper (s. Tabelle 6) bei 4 °C unter Rotation über Nacht inkubiert.

Am folgenden Tag wurden 50 μ l *Protein-G-Agarose-Beads* hinzugegeben und die Probe bei 4 °C für vier Stunden unter Rotation inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 12000 g und 4 °C für 30 Sekunden wurden die *Protein-G-Agarose-Beads* dreimal mit 0,1 %-igem Triton X-100, gelöst in DPBS, gewaschen. Dafür wurde das Pellet in 500 μ l 0,1 %-igem Triton X-100 resuspendiert, unter denselben Bedingungen zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Zur Elution wurden 40 μ l Elutionspuffer hinzugegeben und bei 4 °C unter Rotation für zehn Minuten inkubiert. Durch eine erneute Zentrifugation wurden die präzipitierten Proteine von den *Beads* gelöst. Die angereicherten Proteine wurden nun mit einem Vakuumkonzentrator getrocknet und in einfach konzentriertem Probenpuffer aufgenommen. Das weitere Vorgehen gleicht dem des Gesamtzelllysats in 2.2.5.3.3.

2.2.5.2 Zellaufschluss und Proteinextraktion

Die Zellen wurden nach 72-stündiger Behandlung zur weiteren proteomischen Analyse aufgeschlossen. Wie in 2.2.1.1 beschrieben, wurden die Zellen trypsinisiert und mit zellspezifischem Medium in einem Zentrifugenröhrchen aufgenommen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 1200 rpm und 4 °C für fünf Minuten, das Pellet wurde zweimal in DPBS resuspendiert und unter denselben Bedingungen abzentrifugiert. Dem Pellet wurde Lysepuffer hinzugegeben. Es wurde, abhängig vom Vorhaben, der RIPA-Puffer oder der Harnstoff-Lysepuffer verwendet. Die Zellen wurden zur Lyse 30 Minuten auf Eis gehalten und alle zehn Minuten durchmischt. Anschließend wurde das Lysat bei 14000 rpm und 4 °C für 30 Minuten zentrifugiert, um nicht lysierte Bestandteile zu trennen. Der Überstand wurde erneut bei 14000 rpm und 4 °C für 30 Minuten zentrifugiert. Der hieraus resultierende Überstand wurde aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

2.2.5.3 Western-Blot-Analyse

Mithilfe des Western-Blots wurden die durch die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Molekulargewicht aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert, um die Proteinexpression durch eine spezifische Antikörperbindung zu analysieren und behandelte Proben mit deren Kontrollproben zu vergleichen. Für die Western-Blot-Analyse wurde ein modifiziertes Protokoll nach Towbin et al. (1979) verwendet.

2.2.5.3.1 Herstellung eindimensionaler Gele (1D-Gele) für die SDS-PAGE

Zur Durchführung der SDS-PAGE wurden frische Minigele gegossen. Dabei wurde zunächst das Trenngel, welches je nach Molekulargewicht des zu darstellenden Proteins unterschiedliche Acrylamidkonzentrationen (8 %, 10 %, 12 %) aufwies, nach dessen Polymerisation das 4 %-ige Sammelgel aufgetragen.

Zur Herstellung des Trenngels wurden ddH₂O, 1,5 mol/l TRIS/HCl pH 8,8 und 30 % Acrylamid in den unten angegebenen Volumina gemischt (Tabelle 15) und zehn Minuten entgast. Danach wurden 10 % SDS, TEMED und 10 % APS hinzugegeben und der Polymerisationsprozess so gestartet. Nach dem Gießen des Trenngels wurde eine dünne Schicht Isopropanol auf dessen Oberfläche aufgetragen. Durch das Isopropanol wurde die Oberflächekante des Trenngels einheitlich geglättet und der Kontakt des polymerisierenden Trenngels zu Sauerstoffradikalen verhindert. Nach einer 45-minütigen Polymerisation wurde das Isopropanol oberhalb des polymerisierten Trenngels verworfen und mit ddH₂O gespült. Simultan dazu wurde das 4 %-ige Sammelgel hergestellt. Das Sammelgel wurde nach der Zugabe von ddH₂O, 1,5 mol/l TRIS/HCl pH 6,8 und 30 % Acrylamid für zehn Minuten entgast (Tabelle 16). Durch das Hinzufügen von 10 % SDS, TEMED und 10 % APS wurde der Polymerisationsprozess gestartet. Das zu polymerisierende Sammelgel wurde auf das Trenngel gegossen. Durch das Einführen eines Trennkamms in das Sammelgel wurden die 10 mm breiten Probenaschen zur Beladung erstellt.

Tabelle 15: Zusammensetzung der verschiedenen konzentrierten Trenngele (Angaben für acht Minigele)

	8 %	10 %	12 %
ddH ₂ O	18,6 ml	16,3 ml	14 ml
1,5 mol/l TRIS/HCl pH 8,8	10,4 ml	10,2 ml	10 ml
30 % Acrylamid	11 ml	13,5 ml	16 ml
Entgasen für zehn Minuten			
10 % (w/v) SDS	400 µl	400 µl	400 µl
TEMED	20 µl	20 µl	20 µl
10 % (w/v) APS	200 µl	200 µl	200 µl

Nach Polymerisation des Sammelgels wurde das Gel in einem feuchten Tuch und in Alufolie umwickelt im Kühlschrank bei 8 °C aufbewahrt und innerhalb der nächsten drei Tage verwendet.

Während der experimentellen Phase dieser Arbeit erfolgte eine Umstellung vom 1D-Gel-Herstellungsprozess auf den Erwerb von Fertiggelen (Mini-PROTEAN TGX Gels, Bio-Rad, München).

Tabelle 16: Zusammensetzung des 4 %-igen Sammelgels (Angaben für acht Minigele)

	4 %
ddH ₂ O	15 ml
1,5 mol/l TRIS/HCl pH 6,8	6,3 ml
30 % Acrylamid	3,9 ml
Entgasen für zehn Minuten	
10 % (w/v) SDS	250 µl
TEMED	25 µl
10 % (w/v) APS	125 µl

2.2.5.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Um eine Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Proteinproben herzustellen und dieselbe Beladung des Gels zu gewährleisten, wurde vor der SDS-PAGE und dem Western-Blot die Proteinkonzentration der Proben bestimmt. Die Proteinbestimmung nach Bradford arbeitet mit dem Farbstoff *Coomassie Brilliant Blue G-250*. Das Absorptionsmaximum dieses Farbstoffs ändert sich durch die Bindung von Proteinen von $\lambda = 465$ nm auf $\lambda = 595$ nm. Die Proteinkonzentration bestimmt über die Zahl der gebundenen Proteine an den Farbstoff und verhält sich linear zu einer zunehmenden Extinktion bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595$ nm.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer Probe wurde eine Eichkurve mit der optischen Dichte einer verschiedenen konzentrierten BSA-Stammlösung (1 mg/ml) als Referenzlösung angelegt. Der Bradford-Farbstoff wurde vor jeder photometrischen Analyse im Verhältnis 1:5 in ddH₂O verdünnt. Die Lösungen wurden mit einem Rührspatel gemischt und zehn Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. In Doppelbestimmung wurde eine Standardreihe mit folgenden Konzentrationen der Referenzlösung aufgestellt (Tabelle 17):

Tabelle 17: Pipettierschema für die Eichkurve zur Proteinbestimmung nach Bradford

BSA-Stammlösung (1 mg/ml) (μ l)	Farbstoff-ddH ₂ O-Gemisch (μ l)
0	1000
2	998
4	996
6	994
8	992
10	990

Nach Erstellung der Eichkurve wurde die unbekannte Proteinkonzentration der Probe bestimmt. Dafür wurde die verdünnte Proteinprobe auf 1 ml des Farbstoff-Wasser-Gemischs pipettiert. Zur Proteinbestimmung wurde nach der Photometrie der Verdünnungsfaktor berücksichtigt. Es wurde für jede Proteinbestimmung eine neue Eichkurve erstellt.

2.2.5.3.3 SDS-PAGE

Für die elektrophoretische Auftrennung der Proteine wurden 60 µg der jeweiligen Proteinprobe in die Probenaschen des Gels mit einer Hamilton-Spritze beladen. Dafür wurde die Probe mit ddH₂O und vierfach konzentriertem Probenpuffer auf 20 µl verdünnt und kurz anzentrifugiert. Anschließend wurde die Probe für zehn Minuten bei 95 °C auf einem Thermoblock denaturiert und erneut anzentrifugiert.

Die Gele wurden in der Elektrophoresekammer befestigt und diese mit einfach konzentriertem Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Der Kamm wurde aus dem Gel entfernt und die Probenaschen von Gelresten mit dem Elektrophoresepuffer gereinigt und anschließend beladen. Zur Beobachtung des Verlaufs der Elektrophorese wurden 7 µl eines Markers (Precision Plus Protein Standards, Bio-Rad, München) aufgetragen.

Die Elektrophorese wurde unter Gleichstrom mit einer Spannung von 120 V auf Eis gestartet. Alle 20 Minuten wurde die Spannung um 20 V erhöht, bis der Marker das Ende des Gels erreicht hat.

Das Gel wurde für das weitere Vorgehen aus den Glasplatten gelöst und das Sammelgel verworfen.

2.2.5.3.4 Western-Blot-Analyse: Tankblotting-Methode

Der Transfer der Proteine vom Trenngel auf die Nitrocellulose-Membran erfolgte über die Tankblotting-Methode.

Alle Materialien wurden 15 Minuten vor dem Transfer in einfach konzentriertem Transferpuffer eingeweicht und die Nitrocellulosemembran so equilibriert.

Innerhalb einer Transferkassette wurde zwischen zwei Schaumpolstern und vier Stück Whatman-Filterpapier die Nitrocellulosemembran auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Beachtet wurde hierbei, dass zwischen dem Gel und der Membran keine Luftblasen entstehen und die Membran für einen erfolgreichen Transfer der negativ geladenen Proteine zur Anode hin positioniert wurde. Die Transferkassette wurde in die Transferkammer positioniert, diese wurde mit einem zur Kathode gelegenen Eisblock gekühlt und mit einfach konzentriertem Transferpuffer aufgefüllt.

Der Proteintransfer auf die Nitrocellulose-Membran erfolgte unter Gleichstrom bei 40 V und 4 °C im Kühlraum über Nacht.

2.2.5.3.5 Kontrolle des Proteintransfers: Färbung der Nitrocellulose-Membran mit der Ponceau-S-Lösung

Die Nitrocellulose-Membran wurde nach erfolgtem Proteintransfer am nächsten Morgen für eine Minute mit einer 0,2 %-igen Ponceau-S-Lösung gefärbt. Mithilfe der Ponceau-Färbung wurden die Proteintransfereffizienz und die gleichmäßige Proteinbeladung beurteilt. Mit 5 %-iger Essigsäure wurde die Membran wieder entfärbt und zweimal mit einfach konzentriertem Waschpuffer gewaschen. Die Membran wurde dann für 15 Minuten unter dem Abzug getrocknet.

2.2.5.3.6 Inkubation mit Antikörpern

Freie Bindungsstellen der getrockneten Nitrocellulosemembran und somit unspezifische Antikörperbindungsstellen wurden mit 5 %-iger Milch, gelöst in einfach konzentriertem Waschpuffer, bei 37 °C für zwei Stunden geblockt. Dieser und alle weiteren Inkubations- oder Waschschriffe erfolgten unter leichtem Schütteln in einem Inkubationsschüttler. Nachdem die Milch abgeschüttet wurde, wurde der spezifische Primärantikörper (s. Tabelle 6), je nach Herstellerangabe, in 5 %-iger Milch oder 5 %-iger BSA-Lösung (gelöst in einfach konzentriertem Waschpuffer) verdünnt und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Die Membran wurde dreimal mit Waschpuffer für zehn Minuten gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde die Membran mit dem jeweiligen Sekundärantikörper (s. Tabelle 8) für zwei Stunden bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Der Sekundärantikörper war an einem Fluoreszenzfarbstoff *Alexa Fluor* konjugiert. Durch die Konjugation des Fluoreszenzfarbstoffs an den Sekundärantikörper wurde dieser sichtbar und das Signal amplifiziert.

Nach drei Waschschriffen wurde die Membran lichtgeschützt luftgetrocknet.

2.2.5.3.7 Fluoreszenzdetektion

Mittels eines Fluoreszenz-Laserscanners (Fuji FLA 5100, Fujifilm, Düsseldorf) wurde der Fluoreszenzfarbstoff *Alexa Fluor* durch den Fluoreszenzlaser mit einer Wellenlänge von $\lambda = 635$ nm angeregt und die emittierte Fluoreszenz durch den Detektor gemessen. Der Scanprozess wurde mit dem Programm Image Reader 5LA-5000 (Fujifilm, Düsseldorf) eingestellt. Die Intensität des Lasers wurde so ausgewählt, dass die Signalstärke mit Proteingehalt linear korrelierte und keine Signalsättigung vorlag. Diese Einstellungen wurden für jedes biologische oder experimentelle Replikat beibehalten.

Die Datei wurde als *Tagged Image File Format* exportiert und die Fluoreszenzstärke mit der ImageJ-Software (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) densitometrisch quantifiziert. Um eine relative Quantifizierung der Signalstärken zu ermöglichen, wurden stets eine Kontrollprobe zur behandelten Probe und β -Aktin oder Cofilin als Ladekontrolle verwendet.

2.2.6 *Real Time quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)*

2.2.6.1 RNA-Isolation

Die Ribonukleinsäure(RNA)-Isolation erfolgte mit dem *PureLink RNA Mini Kit* (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt). Die Zellen wurden nach 72-stündiger Behandlung, wie in 2.2.1.1 beschrieben, trypsinisiert und mit zellspezifischem Medium in einem Zentrifugenröhrchen aufgenommen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 1200 rpm und 4 °C für fünf Minuten, das Pellet wurde zweimal in DPBS resuspendiert, in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und unter denselben Bedingungen abzentrifugiert.

Alle weiteren Schritte wurden, sofern nicht anders angegeben, auf Eis und mit höchster Sorgfalt durchgeführt. Der Arbeitsplatz wurde zuvor mit *RNase Zap* gereinigt. Es wurde mit sterilen Filterspitzen gearbeitet.

Unter dem Abzug wurde das Pellet zur Lyse in 750 μ l Trizol aufgenommen und nach mehrfachem Resuspendieren für fünf Minuten inkubiert. Es wurden 250 μ l Chloroform hinzugefügt und die Reaktionsgefäße zum Mischen der Lösung invertiert. Es folgte eine Inkubationsphase von drei Minuten bei Raumtemperatur. Die Guanidium-Thiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion erfolgte durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 13000 g und 4 °C (Chomczynski und Sacchi 1987). Nach der Zentrifugation bildete sich ein Mehrphasensystem aus: Eine obere wässrige Phase, die die RNA beinhaltet, eine Interphase und eine Phenol-haltige organische Phase, die die denaturierten Proteine und die DNA enthielt.

Die obere Phase wurde in ein RNA-freies Reaktionsgefäß mit 200 μ l 100 %-igem Ethanol überführt und zur Präzipitation geschüttelt. Bis zu 700 μ l dieses Gemischs wurden in einem *Spin Cartridge* für 30 Sekunden bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert, damit die RNA an der Silica-Membran des *Spin Cartridge* gebunden wird. Die Säule des *Spin Cartridge* wurde auf ein neues *Collection Tube* befestigt und mit 700 μ l des Waschpuffers I des Kits unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und die Säule zweimal mit 500 μ l des Waschpuffer II, welches zuvor mit 100 %-igem Ethanol angesetzt wurde, durch erneute Zentrifugation gewaschen. Die Säule wurde erneut auf ein neues *Collection Tube*

befestigt und für eine Minute bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert, um Reste des Waschpuffers zu eliminieren. Anschließend wurde die Säule auf ein *Recovery Tube* gesetzt und für zwei Minuten bei Raumtemperatur mit offenem Deckel getrocknet. Die Probe wurde mit 30 µl RNase-freies Wasser von der Silica-Membran eluiert und danach bei Raumtemperatur mit offenem Deckel inkubiert. Nach einer Zentrifugation unter denselben Bedingungen befand sich die eluierte RNA im *Recovery Tube* und wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren.

2.2.6.2 Messung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentration und die Qualität der Proben, gemessen durch das Verhältnis der Absorption bei $\lambda = 260$ nm zu jener bei $\lambda = 280$ nm (A_{260}/A_{280}), wurden mit dem Mikrovolumen-Spektralphotometer NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt) gemessen.

Es wurden ausschließlich Proben mit einem Verhältnis von A_{260} zu A_{280} größer 2,0 verwendet. Als Leerwert wurde Nuklease-freies Wasser verwendet.

2.2.6.3 Reverse Transkription: die Synthese der komplementären Desoxyribonukleinsäure (cDNA)

Um etwaige DNA-Kontaminationen der isolierten RNA vor der reversen Transkription zu beseitigen, wurde diese mit der DNase I (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt) behandelt.

In 7 µl Nuklease-freiem Wasser wurden 2,5 µg bis 5 µg RNA aufgenommen. Es wurden 1 µl 10 x Reaktionspuffer und 1 µl der DNase I hinzugefügt und nach kurzem Mischen für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde 1 µl der *Stop Solution* (50 mmol/l EDTA) hinzugegeben, um eine Hydrolyse der RNA durch divalente Kationen zu vermeiden (Wiame et al. 2000). Im Thermocycler (Eppendorf, Hamburg) wurde die DNase I und die RNA für zehn Minuten bei 70 °C denaturiert und im Anschluss auf Eis abgekühlt.

Mit dem *First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt) wurde die zur mRNA komplementäre cDNA synthetisiert. Die reverse Transkription erfolgte nach dem folgenden Protokoll (Tabelle 18).

Tabelle 18: cDNA-Synthese

Reagenz	Volumen
Oligo-dT-Primer	1 μ l
Vorsichtiges Mischen und kurzes Anzentrifugieren Hybridisierung im Thermocycler für fünf Minuten bei 65 °C	
Reaktionspuffer (5 x)	4 μ l
RNase Inhibitor (20 U/ μ l)	1 μ l
dNTP-Mix (10 mmol/l)	2 μ l
M-MuLV Reverse Transkriptase (20 U/ μ l)	2 μ l
Vorsichtiges Mischen und kurzes Anzentrifugieren cDNA-Synthese im Thermocycler für 60 Minuten bei 45 °C Termination der Reaktion für fünf Minuten bei 70 °C Abkühlen der Probe bei 4 °C oder Einfrieren bei -80 °C	

Es wurden gleichzeitig Negativkontrollen angelegt, um mögliche DNA-Kontaminationen ausschließen zu können. Zum einen wurde eine Probe ohne Reverse Transkriptase, zum anderen ohne RNA-Matrize hergestellt.

2.2.6.4 qPCR

Durch die Polymerase-Kettenreaktion können DNA-Sequenzen *in vitro* amplifiziert werden. Je ein Vorwärts- und ein Rückwärtsprimer begrenzen das Amplikon, indem sie nach einer Hitzedenaturierung des Doppelstrangs an die komplementären Stränge binden (*Annealing*) und der Taq-Polymerase die Bindung ermöglichen (Elongation). Die Zielsequenz wird exponentiell zur Anzahl der Zyklen, bestehend aus Denaturierung, *Annealing* und Elongation, amplifiziert (Saiki et al. 1988).

Durch den Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green I* wird bei der qPCR, anders als bei der konventionellen PCR, die Amplifikation in Echtzeit gemessen. Dies geschieht durch die Emission des Fluoreszenzfarbstoffs nach Bindung an die doppelsträngige DNA. Die Fluoreszenzintensität wird nach jedem Zyklus gemessen. Während die Taq-Polymerase die Zielsequenz amplifiziert, bindet das *SYBR Green I* an jedes neue Amplifikat, wodurch die Fluoreszenzintensität proportional zur Zahl der Amplifikate steigt.

Vor der qPCR wurde die synthetisierte cDNA mit Nuklease-freiem Wasser auf 5 ng/ μ l verdünnt. Es wurden 96-Well-PCR-Mikrotiterplatten verwendet, worin zunächst der *Mastermix* (Tabelle 19) und danach 5 μ l der cDNA auf Eis pipettiert wurden.

Tabelle 19: Komponenten der qPCR

	Primer von Primerdesign	Primer von Microsynth
<i>SYBR Green Mastermix</i>	10 μ l	10 μ l
Vorwärtsprimer (300 nmol/l)	1 μ l	0,2 μ l (30 μ mol/l Arbeitslösung)
Rückwärtsprimer (300 nmol/l)		0,2 μ l (30 μ mol/l Arbeitslösung)
Nuklease-freies Wasser	4 μ l	4,6 μ l
cDNA (5 ng/ μ l)	5 μ l	5 μ l
Gesamtvolumen	20 μ l	20 μ l

Um eine relative Quantifizierung zu ermöglichen, wurden stets eine Kontrolle zur Behandlung und GAPDH als Referenzgen verwendet. Weiterhin wurden Negativkontrollen, zum einen ohne Taq-Polymerase, zum anderen ohne cDNA miteingeschlossen. Pro Gen wurden jeweils drei experimentelle und biologische Replikate durchgeführt.

Die Platte wurde mit der zugehörigen Klebefolie dicht verschlossen und in einer Plattenzentrifuge bei 2500 rpm für zehn Sekunden zentrifugiert. Die Analyse erfolgte im Real-Time PCR System StepOnePlus (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt) nach dem in der Tabelle 20 beschriebenen Programm.

Da *SYBR Green I* an jegliche doppelsträngige DNA (dsDNA), auch an unspezifische PCR-Produkte bindet, wurden standardmäßig Schmelzkurvenanalysen nach der qPCR erstellt. So konnten Hinweise auf Kontaminationen der cDNA und etwaige Primer-Dimer-Formationen gewonnen werden.

Tabelle 20: qPCR-Programm

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Aktivierung der DNA-Polymerase	95 °C	10 min	1 x
Denaturierung	95 °C	20 s	40 x
<i>Annealing</i> /Extension	60 °C	30 s	

2.2.6.5 Auswertung der qPCR

Nach der qPCR wurden die Ergebnisse mithilfe der StepOne Software v2.3 gesammelt und mit Microsoft Excel ausgewertet. Experimentelle Replikate mit einer Standardabweichung $s > 0,5$ wurden wiederholt.

Es wurde die $\Delta\Delta C_t$ -Methode angewandt. Bei jeder qPCR wurde ein Schwellenwert innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase des Amplifikationsgraphen festgelegt, wobei die Hintergrundfluoreszenz signifikant überschritten wurde. Der C_t -Wert beschreibt die benötigte Anzahl der Zyklen, um den Schwellenwert zu erreichen.

Der ΔC_t -Wert einer Probe wurde als Differenz der arithmetischen Mittelwerte der C_t -Werte des Zielgens vom Referenzgen festgelegt:

$$\Delta C_t = C_t(\text{Zielgen}) - C_t(\text{GAPDH}).$$

$\Delta\Delta C_t$ wurde als Differenz des ΔC_t -Werte der Behandlung und Kontrolle beschrieben:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Behandlung}) - \Delta C_t(\text{Kontrolle}).$$

Die relative Genexpression wurde bei einer Effizienz ~ 1 der Reaktion definiert durch

$$\text{relative Genexpression} = 2^{-\Delta\Delta C_t}.$$

2.2.7 Immunfluoreszenzfärbung und Fluoreszenzmikroskopie

2.2.7.1 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Es wurden 6000 bis 10000 TK173- oder HK-2-Zellen auf 8-Well-Kammerobjektträger ausgesät und über Nacht kultiviert. Es erfolgte eine Serumfreisetzung über 24 Stunden und eine Behandlung mit dem 500 ng/ml sE-cad über 72 Stunden oder mit 5 ng/ml TGF- β 1 und zusätzlich 10 μ g/ml GM6001 für 48 Stunden. Danach wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit DPBS gewaschen und fixiert. Zur Darstellung von Membranproteinen bzw. membrangebundenen Proteinen wurde mit eiskaltem Methanol für 20 Minuten bei -20 °C fixiert. Zur Darstellung von zytoplasmatischen Proteinen wurde mit 4 % Paraformaldehyd für zehn Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit DPBS wurden die Zellen für 30 Sekunden mit 0,1 % Triton X-100, in DPBS, permeabilisiert, erneut zweimal gewaschen und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 10 % *Goat Serum*, in DPBS, gegen eine unspezifische Antikörperbindung geblockt. Die Permeabilisierung erfolgte nicht bei Membranproteinen bzw. membrangebundenen Proteinen. Es folgte eine Inkubation mit den verdünnten Primärantikörpern (s. Tabelle 6) bei 4 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die fixierten Zellen dreimal für je zehn Minuten mit DPBS gewaschen, für zwei Stunden bei 37 °C mit den verdünnten Sekundärantikörpern (s. Tabelle 7) im Dunkeln inkubiert und erneut dreimal mit DPBS für zehn Minuten gewaschen. Anschließend erfolgte eine Kernkontrastierung mit 3 mmol/l DAPI für zehn Minuten bei 37 °C und eine Waschung mit DPBS für zehn Minuten.

Nach dem Absaugen des DPBS wurden die Kammern von den Objektträgern entfernt und die gefärbten Zellen mit Mowiol eingebettet. Das Deckglas wurde auf dem Objektträger angebracht und mit Eukitt fixiert. Die fertigen *Slides* wurden bis zur Mikroskopie bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

Das Vorgehen bei MDCK-Zellen unterschied sich in der Aussaat von HK-2- und TK173-Zellen. Eine Zellkulturflasche der MDCK-Zellen wurde einen Tag nach Erreichen der Konfluenz im Verhältnis von 1:10 subkultiviert. Am nächsten Tag wurden 5000 Zellen auf die 8-Well-Kammerobjektträger ausgesät. Das weitere Vorgehen glich dem der HK-2- und TK173-Zellen.

Neben den unten aufgeführten Positivkontrollen wurden ebenfalls Negativkontrollen angelegt, die die Fluoreszenz des Sekundärantikörpers ohne vorherige Gabe eines Primärantikörpers zeigten.

2.2.7.2 Direkte Immunfluoreszenzfärbung

Die Zellen wurden analog zu 2.2.7.1 behandelt. Nach dem Absaugen des Mediums und zweimaligem Waschen mit DPBS wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd für zehn Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurde zweimal mit DPBS gewaschen und die Zellen mit 0,1 % Triton X-100, in DPBS, für drei Minuten permeabilisiert. Die Zellen wurden nach zwei weiteren Waschgängen mit 1 % BSA, in DPBS, für 30 Minuten gegen eine unspezifische Proteinbindung geblockt. Darauf wurden die Zellen mit dem am Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Phallotoxin *Alexa Fluor 488 Phalloidin* zur Darstellung des F-Aktins bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert. Analog zu 2.2.7.1 erfolgten drei Waschschrte mit DPBS, eine Kernkontrastierung und Fixierung.

2.2.7.3 Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung

Mit der gekoppelten Fluoreszenzkamera des Fluoreszenzmikroskops IX71 (Olympus, Hamburg) wurde die Immunfluoreszenzfärbung schnellstmöglich aufgenommen und mit der Cell D Imaging Software (Olympus, Hamburg) analysiert. Dazu wurden die Fluoreszenzfarbstoffe (*Alexa Fluor 488*, *Alexa Fluor 555*, DAPI) mit der für den jeweiligen Farbstoff spezifischen Wellenlänge angeregt und die Emission der einzelnen Farbstoffe durch das Fluoreszenzmikroskop und die -kamera festgehalten. Mit dem Anregungsfilter des Fluoreszenzmikroskops wurden bis zu drei Farbkanäle voneinander getrennt. Die Bilder wurden in die Cell D Imaging Software importiert und den entsprechenden Farbkanälen zugeordnet: *Alexa Fluor 488* als grün, *Alexa Fluor 555* als rot und DAPI als blau. Die Farbkanäle wurden in Kombinationsbildern zusammengefasst.

Für jedes dargestellte Protein wurde dieselbe Belichtungszeit verwendet. Es wurden Bilder in 200-facher Vergrößerung zur Übersicht aufgenommen und in 400-facher Vergrößerung zur qualitativen und quantitativen Auswertung.

Die Quantifizierung erfolgte mit der ImageJ-Software (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Dazu wurden mindestens fünf Gesichtsfelder der Kontrollprobe und der behandelten Probe in 400-facher Vergrößerung fotografiert und ausgewertet. Die auf die Zellzahl normalisierten Fluoreszenzintensitäten der gefärbten Proteine wurden über die automatische Schwellenwertanalyse ermittelt. Es erfolgte keine Quantifizierung des Vimentins aufgrund einer Signalsättigung. Quantifiziert wurden das E-Cadherin und das aktive, unphosphorylierte β -Catenin (s. Tabelle 6).

2.2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit den Programmen Microsoft Excel und Graphpad Prism. Die Ergebnisse wurden stets als Mittelwert \pm Standardfehler des arithmetischen Mittelwerts (SEM) bei mindestens drei unabhängigen Replikaten je Experiment präsentiert.

Es wurden zweiseitige Hypothesentests analog zur Fragestellung formuliert. Die einzelnen Gruppen wurden durch t-Tests miteinander verglichen. Sollte keine Homoskedastizität vorliegen, wurde zusätzlich der Welch-Test durchgeführt. Bei mehreren simultanen Gruppenvergleichen wurde der p-Wert bei Homoskedastizität nach Tukey, bei Heteroskedastizität nach Dunnett-T3 adjustiert. Das statistische Signifikanzniveau wurde als $\alpha = 5\%$ definiert. Statistische Signifikanzen wurden in den Graphen vermerkt: $p < 0,05$ als (*), $p < 0,01$ als (**) und $p < 0,001$ als (***)).

3 Ergebnisse

3.1 Die TGF- β 1-Behandlung von MDCK-Zellen

Die folgende Versuchsreihe diente dem Gewinn von Erkenntnissen über den Ursprung des sE-cads im Urin diabetischer Patienten. Es stellte sich die Frage, ob das E-Cadherin-Fragment über die Blutzirkulation in den Urin gelang oder von geschädigten Tubulusepithelzellen abgespalten wurde.

Eine persistierende oder wiederholte Schädigung des Tubulointerstitiums führt durch die Aktivierung proinflammatorischer Signalkaskaden, wie dem TGF- β -/Smad-Signalweg (Abbildung 23), zur chronischen Inflammation und später zur Organfibrose (vgl. 1.2.2).

Zum Nachweis einer möglichen E-Cadherin-Spaltung infolge einer Aktivierung proinflammatorischer und -fibrotischer Signalkaskaden wurden MDCK-Zellen mit 5 ng/ml aktivem TGF- β 1 für 48 Stunden behandelt. Zur Untersuchung der Rolle der Matrix-Metalloproteinasen in der E-Cadherin-Spaltung nach erfolgter Zellaktivierung durch TGF- β 1 wurden MDCK-Zellen zusätzlich zu 5 ng/ml TGF- β 1 mit 10 μ g/ml des Matrix-Metalloproteinase-Inhibitors GM6001 behandelt. MDCK-Zellen wurden dem distalen Tubulusepithel des Hundes entnommen und exprimierten als einzige in dieser Dissertationsarbeit verwendete Zelllinie E-Cadherin (vgl. 1.5).

3.1.1 Lichtmikroskopische Veränderungen von MDCK-Zellen nach TGF- β 1- und GM6001-Behandlung

In der Phasenkontrastmikroskopie wurden die Effekte der Behandlung mit aktivem TGF- β 1 und dem Matrix-Metalloproteinase-Inhibitor GM6001 im Vergleich zu den Kontrollzellen nach 24 Stunden und 48 Stunden dokumentiert (Abbildung 5) und verglichen.

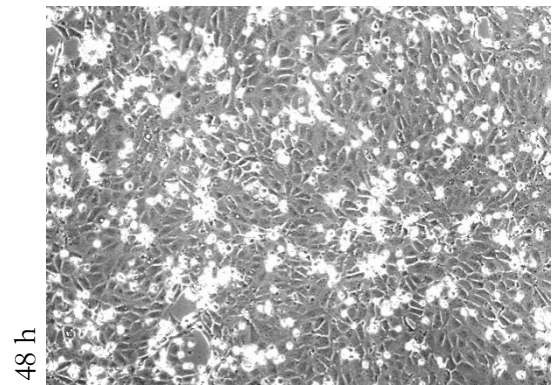
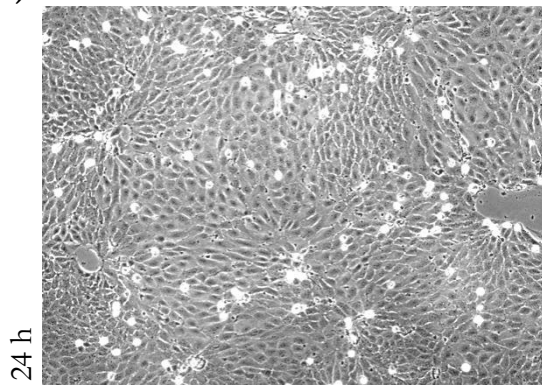
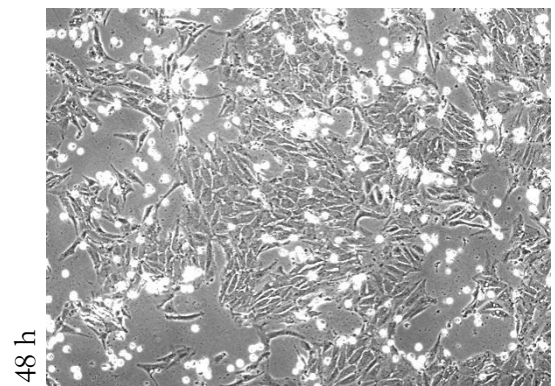
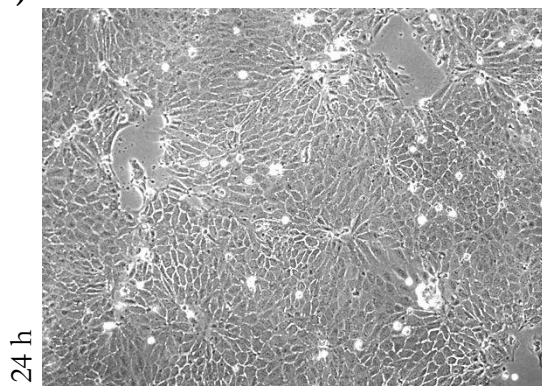
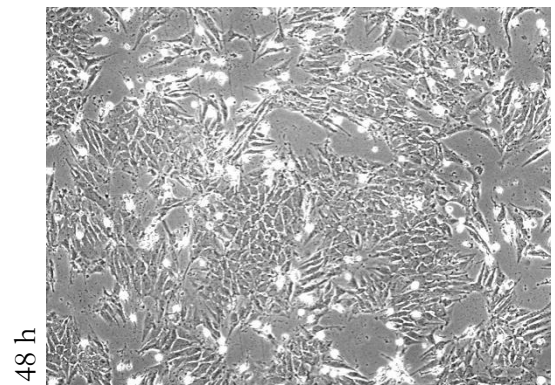
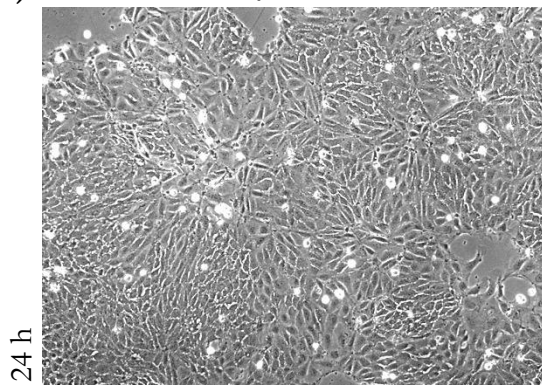
(A) MDCK: Kontrolle**(B) MDCK: TGF- β 1****(C) MDCK: TGF- β 1/GM6001**

Abbildung 5: Einfluss der TGF- β 1- und GM6001-Behandlung auf den MDCK-Zellphänotyp. Phasenkontrastaufnahmen in 200-facher Vergrößerung von unbehandelten MDCK-Zellen als Kontrolle (A), behandelten MDCK-Zellen mit 5 ng/ml aktivem TGF- β 1 (B) und mit 5 ng/ml aktivem TGF- β 1/10 μ g/ml GM6001 (C) nach einer Inkubationszeit von 24 h (linke Spalte) und 48 h (rechte Spalte).

Lichtmikroskopisch zeigte sich nach einer 24-stündigen Inkubation eine hohe Konfluenz unter allen Bedingungen. In der Kontrolle zeigte sich eine kuboide Zellmorphologie innerhalb des epithelialen Monolayers. Unter der TGF- β 1-Behandlung der MDCK-Zellen deutete sich eine Änderung der kuboiden Zellmorphologie in eine spindelförmige Zellmorphologie an. Unter der TGF- β 1-/GM6001-Behandlung waren diese Effekte schwächer ausgeprägt als unter alleiniger TGF- β 1-Behandlung und vergleichbar zur Kontrollgruppe.

Nach einer 48-stündigen Inkubation zeigten sich in allen drei Behandlungsgruppen vermehrt apoptotische Zellen im Überstand. Zu diesem Zeitpunkt waren die MDCK-Zellen bereits für 72 Stunden serumfreigesetzt. Die Zellkonfluenz nahm, verglichen zur jeweiligen Phasenkontrastaufnahme nach 24 Stunden, deutlich unter der TGF- β 1-Behandlung und der TGF- β 1-/GM6001-Behandlung ab. In der Kontrolle zeigte sich weiterhin ein hochkonfluenten Zellverband. Die TGF- β 1-behandelten MDCK-Zellen wiesen eine deutliche Abnahme der Zelladhäsionen, verglichen zur Kontrolle und der Phasenkontrastaufnahme nach 24 Stunden, auf. Hier nahm der Großteil der Zellen eine spindelförmige Morphologie an und bildete einzelne Zellausläufer aus. Diese Zellen lösten sich von den epithelialen Zellaggregaten. Die TGF- β 1-/GM6001-Behandlung resultierte in einem schwächeren Effekt als die alleinige TGF- β 1-Behandlung.

3.1.2 Doppelimmunfluoreszenzfärbung von E-Cadherin und Vimentin in MDCK-Zellen nach 48-stündiger TGF- β 1- und GM6001-Behandlung

In der indirekten Immunfluoreszenzfärbung (s. 2.2.7.1) wurden E-Cadherin als epithelialer Marker und Vimentin als Fibrosemarker in MDCK-Zellen nach 48-stündiger Behandlung mit TGF- β 1 und GM6001 dargestellt (Abbildung 6).

Die Immunfluoreszenzfärbung des Vimentins erlaubte Rückschlüsse auf das Zytoskelett und die Zellstruktur, die des E-Cadherins zeigte zudem Veränderungen der Zelladhäsionen innerhalb der Zellverbände an. In einer Schwellenwertanalyse der Immunfluoreszenzfärbung (Abbildung 7) wurde der zur Kontrolle relativierte Grauwert des E-Cadherin-Signals bestimmt.

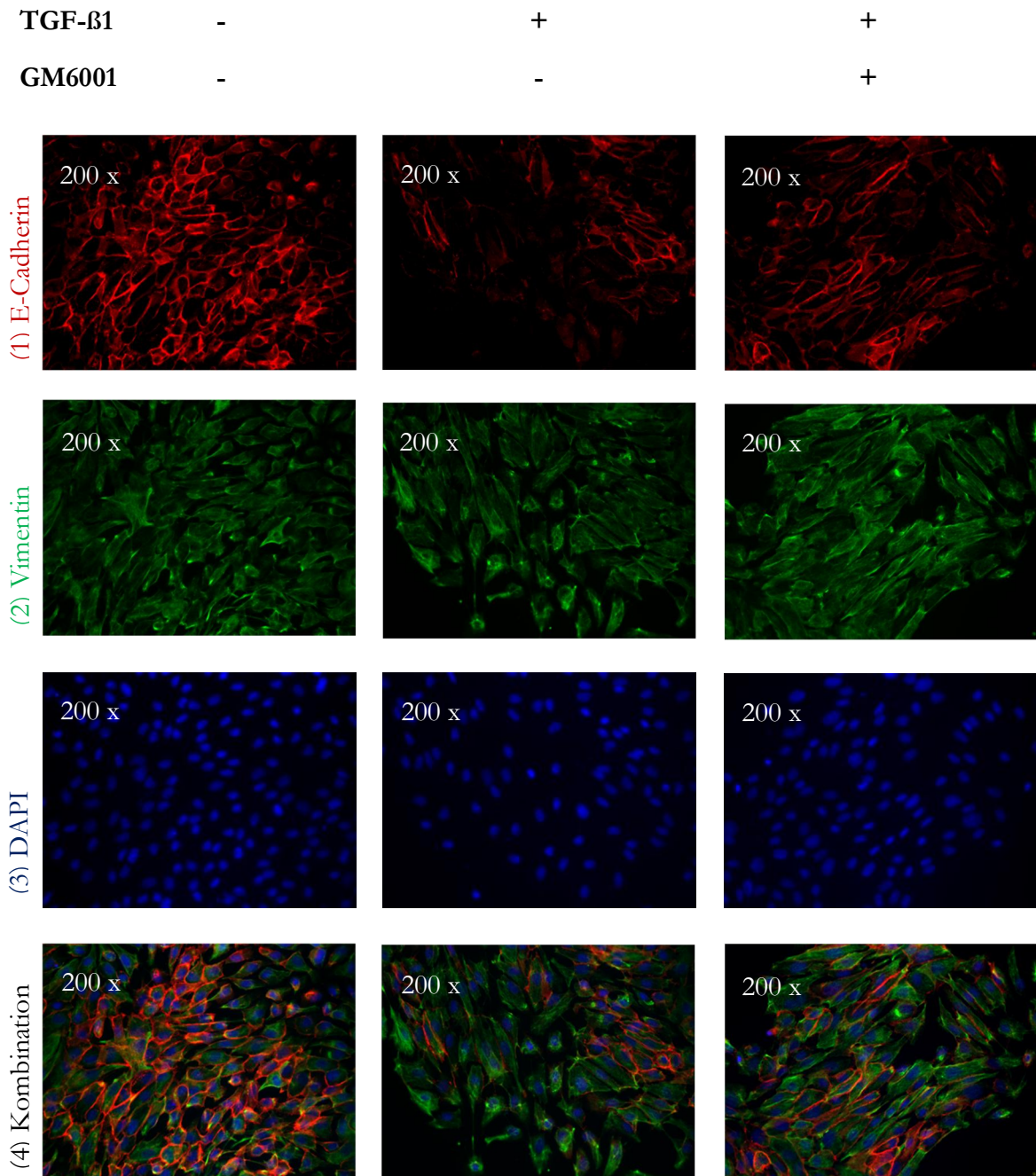


Abbildung 6: Doppelimmunfluoreszenzfärbung von E-Cadherin und Vimentin in MDCK-Zellen nach 48-stündiger TGF- β 1- und GM6001-Behandlung. Dargestellt ist eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung des E-Cadherins (1), des Vimentins (2), des Zellkerns mit DAPI (3) zusammengefasst als Kombination (4) in 200-facher Vergrößerung. Gefärbt wurden unbehandelte MDCK-Zellen als Kontrolle, mit 5 ng/ml aktivem TGF- β 1 behandelte und mit 5 ng/ml aktivem TGF- β 1/10 μ g/ml GM6001 behandelte MDCK-Zellen.

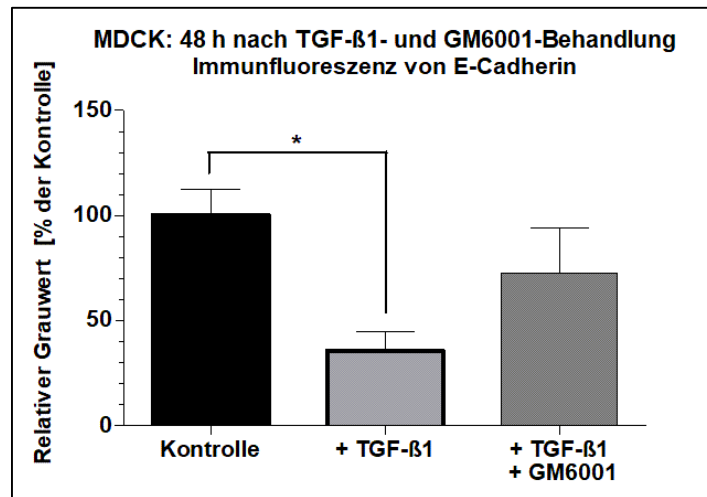


Abbildung 7: Quantifizierung der Immunfluoreszenz von E-Cadherin nach 48-stündiger Behandlung von MDCK-Zellen mit TGF-β1 und GM6001. In Balkendiagrammen wurde der in der Schwellenwertanalyse ermittelte Grauwert, relativiert zur Kontrolle, als Mittelwert \pm SEM dargestellt. (*) $< 0,05$.

In der Kontrolle (Abbildung 6) zeigte die E-Cadherin-Färbung deutliche Zelladhäsionen innerhalb des Zellverbandes und ein starkes Signal an der Plasmamembran. Die Vimentin-Färbung ergab ein positives Signal in der Kontrolle. Wenige MDCK-Zellen nahmen eine spindelförmige Gestalt an, der Großteil hingegen war kuboid im Zellverband angeordnet.

Unter der TGF-β1-Behandlung (Abbildung 6) nahm das E-Cadherin-Signal signifikant um $64,21 \% \pm 15,2 \%$ ($p = 0,0109$) im Vergleich zur Kontrolle ab (Abbildung 7). Das E-Cadherin-Signal war an der Plasmamembran adhätierender Zellen innerhalb kleiner Zellverbände lokalisiert. Diese Zellen zeigten eine regelmäßige Zellmorphologie in der Vimentin-Färbung, der Großteil der Zellen nahm hingegen eine spindelförmige Zellmorphologie mit Zellausläufern an. Diese Zellen zeigten hingegen kein E-Cadherin-Signal. In der E-Cadherin-Färbung waren hier zudem keine Zelladhäsionen nachweisbar.

Unter der TGF-β1-/GM6001-Behandlung (Abbildung 6) nahm das E-Cadherin-Signal um $27,44 \% \pm 24,88 \%$ im Vergleich zur Kontrolle ab (Abbildung 7). Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant. Der Effekt der TGF-β1-/GM6001-Behandlung war schwächer als bei alleiniger TGF-β1-Behandlung ausgeprägt. Die Zellen bildeten Zellverbände, es waren weniger spindelförmige Zellen und Zellausläufer in der Vimentin-Färbung erkennbar.

3.1.3 Nachweis von E-Cadherin-Fragmenten im Zellüberstand nach TGF- β 1-Behandlung von MDCK-Zellen

Um die Spaltung des E-Cadherins nach TGF- β 1-Behandlung der MDCK-Zellen nachzuweisen, wurde der Zellüberstand nach 48-stündiger TGF- β 1- oder TGF- β 1-/GM6001-Behandlung auf Spaltfragmente des E-Cadherins analysiert.

Der Zellüberstand wurde nach erfolgter TGF- β 1- und TGF- β 1-/GM6001-Behandlung gesammelt und eingeeignet (s. 2.2.5.1.1). Mithilfe der indirekten Immunpräzipitation (s. 2.2.5.1.3) wurden extrazelluläre E-Cadherin-Fragmente angereichert und anschließend mittels Western-Blots (Abbildung 8A, Abbildung A.1, Abbildung A.2) nachgewiesen. Die Western-Blot-Analysen wurden densitometrisch quantifiziert. Auf eine statistische Analyse wurde bei zwei unabhängigen Versuchen verzichtet. Zur Quantifizierung der relativen Intensität (Abbildung 8B) wurde die Intensität der Kontrollprobe als 100 % definiert.

Die Western-Blot-Analysen des Immunpräzipitats (Abbildung 8A, Abbildung A.1, Abbildung A.2) zeigten in beiden Versuchen positive Signale für ein extrazelluläres E-Cadherin-Fragment. Dieses E-Cadherin-Fragment ließ sich schwach im Überstand der serumfreigesetzten Kontrollzellen nachweisen. Unter der TGF- β 1-Behandlung stieg die relative Intensität des extrazellulär nachweisbaren E-Cadherin-Signals um 554,22 % und damit einhergehend die Proteinsekretion. Unter der TGF- β 1-/GM6001-Behandlung nahm die relative Signalintensität für das extrazelluläre E-Cadherin-Fragment um 187,35 % zu. Die Zunahme der relativen Signalintensität unter TGF- β 1-/GM6001-Behandlung war schwächer als unter alleiniger TGF- β 1-Behandlung.

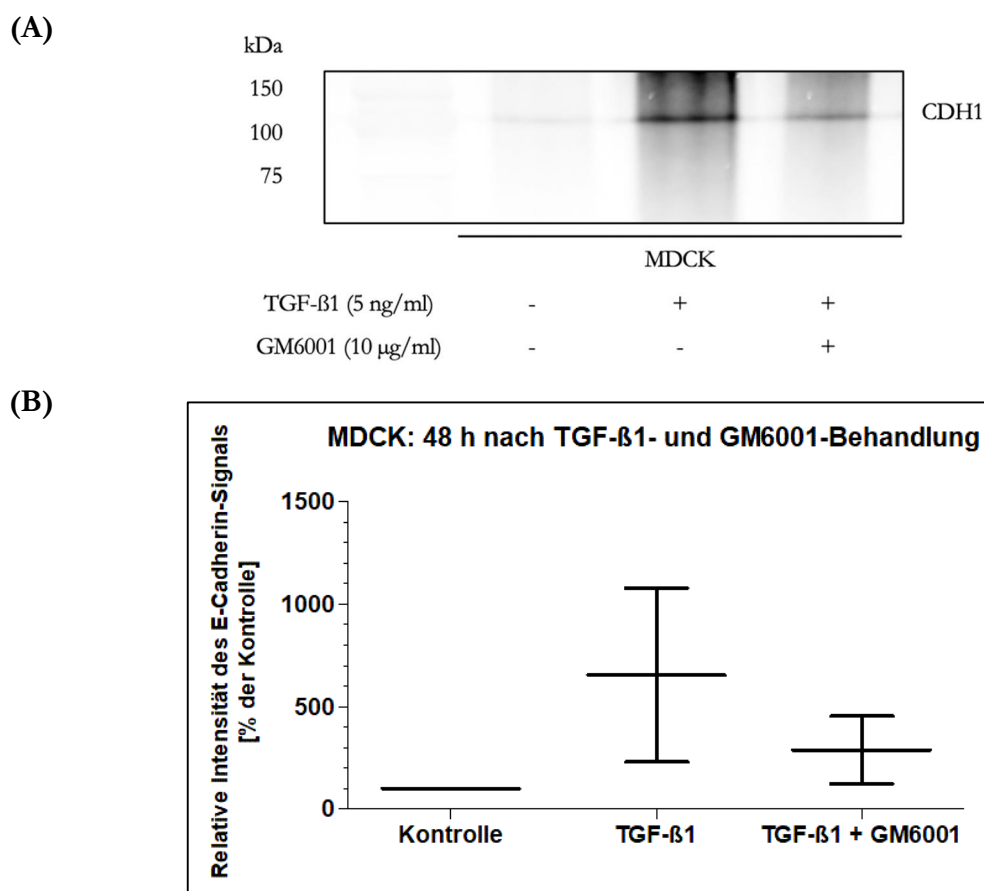


Abbildung 8: Western-Blot-Analyse der extrazellulären E-Cadherin-Fragmente nach 48-stündiger TGF-β1- und GM6001-Behandlung von MDCK-Zellen. Nach 48-stündiger Behandlung von MDCK-Zellen mit 5 ng/ml aktivem TGF-β1 oder 5 ng/ml TGF-β1/10 μg/ml GM6001 wurde der Zellüberstand gesammelt und nach indirekter Immunpräzipitation im Western-Blot (A) auf extrazelluläre E-Cadherin-Fragmente analysiert. Es wurden zwei unabhängige Versuche durchgeführt. Die Intensität des Fluoreszenzsignals wurde relativ zur Kontrolle densitometrisch quantifiziert. Mit einem Boxplot (B) wurden der arithmetische Mittelwert und die einzelnen Signalintensitäten dargestellt.

3.2 Die sE-cad-Behandlung renaler Zelllinien

Die folgenden Experimente sollten die Frage beantworten, ob das im Urin ausgeschiedene sE-cad einen Effekt auf ausgewählte Nierenzelllinien hat und ob dieser protektiv oder schädigend wirkt. Behandelt wurden, wie in 2.2.2.1 beschrieben, distale Tubulusepithelzellen der Zelllinie MDCK, proximale Tubulusepithelzellen der Zelllinie HK-2 und renale interstitielle Fibroblasten der Zelllinie TK173. Vor jeder sE-cad-Behandlung erfolgte eine 24-stündige Serumfreisetzung (s. 2.2.2). Parallel zu jeder behandelten Probe wurde eine unbehandelte, serumfreigesetzte Kontrollprobe geführt und zur relativen Quantifizierung genutzt.

3.2.1 Morphologische Veränderungen renaler Zelllinien nach sE-cad-Behandlung

Die morphologischen Veränderungen renaler Zelllinien nach der 72-stündigen Behandlung mit 500 ng/ml sE-cad wurden mittels direkter Immunfluoreszenzfärbung (s. 2.2.7.2) von F-Aktin mit *Alexa Fluor 488 Phalloidin* dokumentiert (Abbildung 9).

Die MDCK-Zellen (Abbildung 9A) erreichten sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter der sE-cad-Behandlung eine hohe Konfluenz. Sowohl in der Kontrolle als auch in der Behandlung waren deutliche Zelladhäsionen darstellbar. Die Zellmorphologie war unter der sE-cad-Behandlung nicht eindeutig verändert.

Die HK-2-Zellen (Abbildung 9B) erreichten in der hier abgebildeten Kontrollaufnahme eine höhere Konfluenz als unter der Behandlung mit 500 ng/ml sE-cad. Die Zelladhäsionen erschienen in der Kontrolle und in der Behandlung ähnlich stark ausgeprägt. In der 400-fachen Vergrößerung zeigten die behandelten Zellen keine eindeutigen morphologischen Veränderungen zur Kontrolle.

Die TK173-Zellen (Abbildung 9C) waren sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter der sE-cad-Behandlung subkonfluent und gruppierten sich. Deutlich sichtbar waren die morphologischen Veränderungen: Die Kontrolle zeigte tri- bis multipolare Zellen mit dünnen Zellausläufern und einem vergleichsweise dünnen Zytoplasma. Die behandelten Zellen wiesen hingegen eine Verbreiterung des Zytoplasmas auf und nahmen eine spindelförmige Morphologie mit wenigen Zellausläufern an.

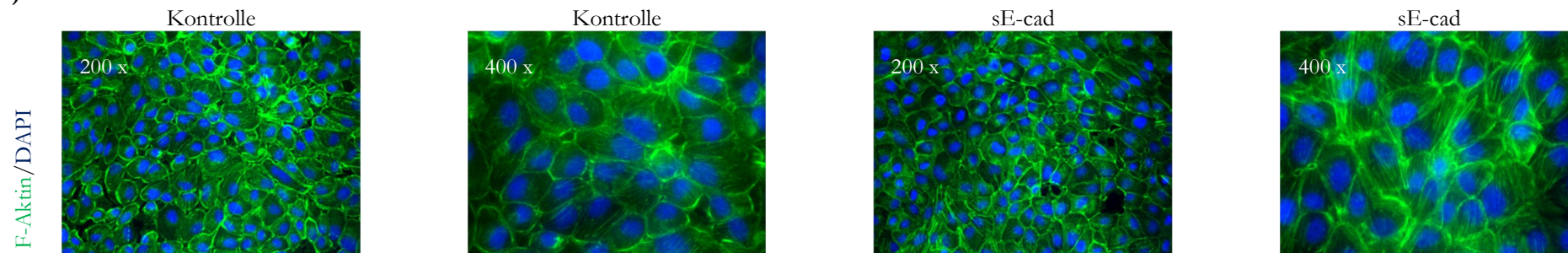
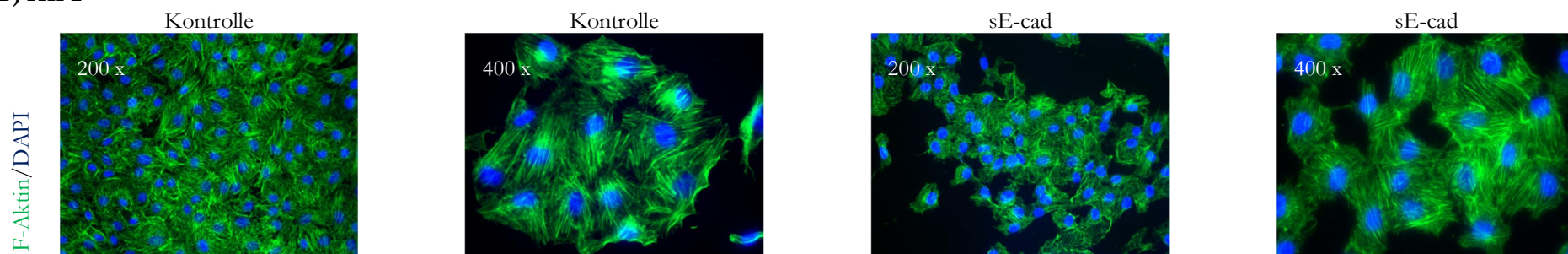
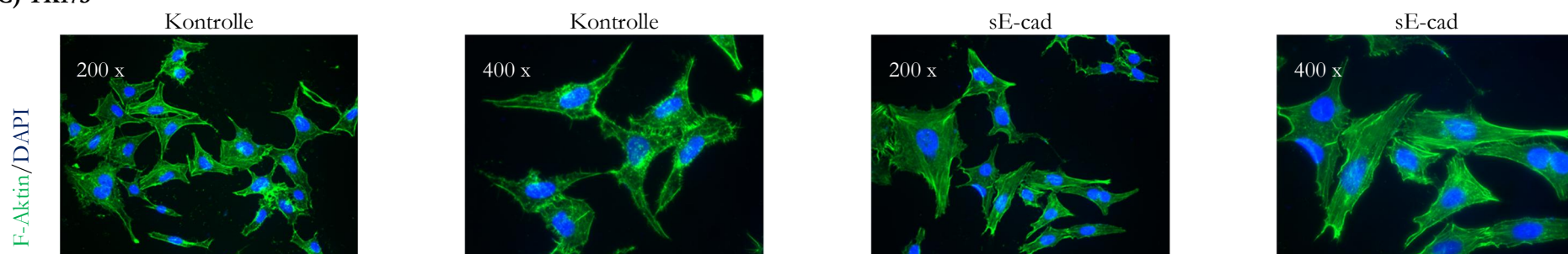
(A) MDCK**(B) HK-2****(C) TK173**

Abbildung 9: Immunfluoreszenzfärbung von F-Aktin in MDCK- (A), HK 2- (B) und TK173-Zellen (C) nach 72-stündiger Behandlung mit 500 ng/ml sE cad. Dargestellt ist eine direkte Immunfluoreszenzfärbung des F-Aktins mit *Alexa Fluor 488 Phalloidin* und des Zellkerns mit DAPI von unbehandelten Zellen (Kontrolle) und mit 500 ng/ml sE-cad-behandelten Zellen in 200- und 400-facher Vergrößerung.

3.2.2 Untersuchung der Zellviabilität renaler Zelllinien nach sE-cad-Behandlung

Erhöhte sE-cad-Konzentrationen sind bei zahlreichen malignen Erkrankungen beschrieben. In verschiedenen *In-vitro*-Modellen der Karzinogenese wurde eine Steigerung der Zellviabilität und der Proliferationsrate unter der sE-cad-Behandlung beschrieben (vgl. 1.3.3). Mit diesem Hintergrund stellt sich die Frage, wie sich die Zellviabilität renaler Zellen unter der sE-cad-Behandlung verändert. Infolgedessen wurde der MTT-Assay durchgeführt (s. 2.2.3). Mithilfe des MTT-Assays konnte auch ein möglicher proliferativer Effekt des sE-cads festgestellt werden. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen (50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 500 ng/ml) des sE-cads für 24 h, 48 h oder 72 h behandelt und die photometrisch gemessene Absorption des gelösten Formazans (s. 2.2.3) relativ zur Kontrollprobe quantifiziert (Abbildung 10).

Die MDCK-Zellen (Abbildung 10A) zeigten nach einer 24-stündigen sE-cad-Behandlung eine verminderte Zellviabilität. Signifikante Effekte waren bei einer Behandlung ab 100 ng/ml sE-cad nachweisbar. Die Viabilität nahm hierbei um $20,68 \% \pm 5,10 \%$ ($p = 0,0015$) ab. Bei der Gabe von 200 ng/ml sE-cad sank die Zellviabilität sogar um $40,51 \% \pm 4,82 \%$ ($p < 0,001$). Bei einer Gabe von 500 ng/ml nahm die Zellviabilität um $21,99 \% \pm 4,61 \%$ ($p < 0,001$) ab. Nach einer 48-stündigen sE-cad-Behandlung zeigten sich ähnliche Effekte. Nicht dargestellt sind hier die Ergebnisse der 72-stündigen sE-cad-Behandlung von MDCK-Zellen, da eine metabolische Aktivität nach einer insgesamt 96-stündigen Serumfreisetzung im MTT-Assay nicht zuverlässig messbar war.

HK-2-Zellen (Abbildung 10B) wiesen ebenfalls eine verminderte Zellviabilität nach einer 24-stündigen sE-cad-Behandlung mit einer Konzentration von mindestens 100 ng/ml sE-cad auf. Signifikante Effekte waren erst bei einer Behandlung mit 500 ng/ml sE-cad nachweisbar. Die Zellviabilität nahm dabei um $15,28 \% \pm 4,35 \%$ ($p = 0,0056$) ab. Ähnliche Effekte waren nach einer 48-stündigen und 72-stündigen sE-cad-Behandlung erkennbar. Nach einer 48-stündigen Behandlung mit 500 ng/ml sE-cad sank die Viabilität um $12,93 \% \pm 4,46 \%$ ($p = 0,0355$). Signifikante Unterschiede waren nach einer 72-stündigen sE-cad-Behandlung nicht nachweisbar.

TK173-Zellen (Abbildung 10C) zeigten eine gesteigerte Zellviabilität bzw. Zellproliferation nach einer 24-stündigen sE-cad-Behandlung. Die Viabilität stieg signifikant um $29,58 \% \pm 5,94 \%$ ($p < 0,001$) bei einer Gabe von 100 ng/ml sE-cad an, um $25,97 \% \pm 5,38 \%$ ($p < 0,001$) bei 200 ng/ml sE-cad und um $22,8 \% \pm 5,71 \%$ ($p = 0,0012$)

bei 500 ng/ml sE-cad. Nach einer 48-stündigen sE-cad-Behandlung waren ähnliche, jedoch nicht signifikante Effekte erkennbar. Nach einer 72-stündigen Behandlung waren keine eindeutigen Effekte oder signifikanten Unterschiede erkennbar.

In allen drei Zelllinien waren die stärksten Veränderungen der Zellviabilität nach einer 24-stündigen sE-cad-Inkubation erkennbar. Nach 72 Stunden präsentierten sich keine eindeutigen Effekte. Statistisch signifikante Veränderungen der Zellviabilität zeigten sich in MDCK- und TK173-Zellen bei einer sE-cad-Konzentration von mindestens 100 ng/ml, bei HK-2-Zellen erst bei 500 ng/ml sE-cad. Während die Zellviabilität der Tubulusepithelzellen, v. a. der MDCK-Zellen, unter der sE-cad-Behandlung abnahm, nahm die der renalen Fibroblasten zu.

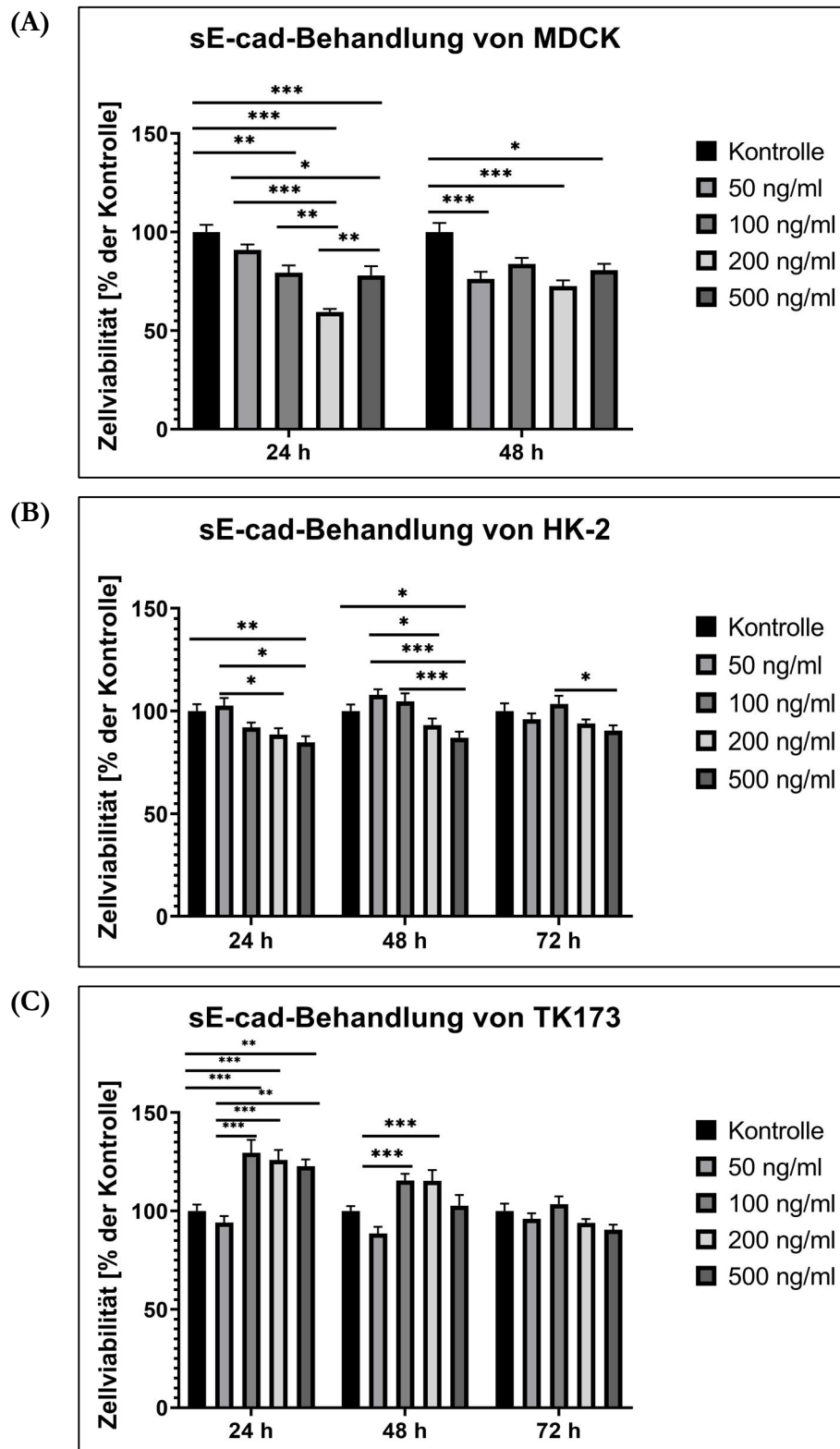


Abbildung 10: Zellviabilität von MDCK- (A), HK-2- (B) und TK173-Zellen (C) nach 24-, 48- und 72-stündiger sE-cad-Behandlung. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des sE-cads behandelt. Die Zellviabilität wurde relativ zur Kontrolle quantifiziert und in Balkendiagrammen als Mittelwert \pm SEM von mindestens drei unabhängigen Versuchen dargestellt. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$.

3.2.3 Quantifizierung der Apoptose nach sE-cad-Behandlung renaler Zelllinien

In *In-vitro*-Modellen der Karzinogenese ist neben der Steigerung der Zellviabilität unter der sE-cad-Behandlung auch ein antiapoptotischer Effekt des sE-cads beschrieben (vgl. 1.3.3). Es stellt sich die Frage, ob die sE-cad-Behandlung die Apoptose renaler Zellen beeinflusst. Um den Anteil apoptotischer Nierenzellen nach der sE-cad-Behandlung zu bestimmen, wurde der Annexin-V-Apoptose-Assay durchgeführt. Dafür wurden MDCK-, HK-2- und TK173-Zellen für 72 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen des sE-cads inkubiert. Wie in 2.2.4 beschrieben, wurden die Zellen für die anschließende Durchflusszytometrie vorbereitet und diese durchgeführt. Als vital galten alle doppelt-negative Zellen, einfach-positive Zellen für Annexin V (*Annexin+*) als frühapoptotisch, doppelt-positive Zellen (*A+P*) als spätapoptotisch und einfach-positive Zellen für PI (*PI+*) als nekrotisch (Abbildung 11).

In Abbildung 12 wurde der Anteil apoptotischer Zellen (frühapoptotisch und spätapoptotisch) dargestellt. Im Folgenden werden die wesentlichen Erkenntnisse des Apoptose-Assays aufgeführt:

Die serumfreigesetzte Kontrolle der MDCK-Zellen beinhaltet bereits einen hohen Anteil apoptotischer Zellen ($38,56 \% \pm 0,70 \%$). Unter der 72-stündigen sE-cad-Behandlung nahm der Anteil apoptotischer MDCK-Zellen signifikant zu (Abbildung 11A, Abbildung 12A). Nach einer Behandlung mit 50 ng/ml sE-cad stieg der Anteil apoptotischer Zellen um $6,24 \% \pm 0,78 \%$ ($p = 0,0204$). Weiterhin nahm dieser signifikant um $16,87 \% \pm 0,72 \%$ ($p = 0,0068$) bei einer Inkubation mit 100 ng/ml sE-cad und um $11,92 \% \pm 0,87 \%$ ($p = 0,001$) bei 500 ng/ml sE-cad zu.

In HK-2- und TK173-Zellen (Abbildung 11, Abbildung 12) war nach 72-stündiger sE-cad-Behandlung kein eindeutiger Effekt auf den Anteil apoptotischer Zellen nachweisbar.

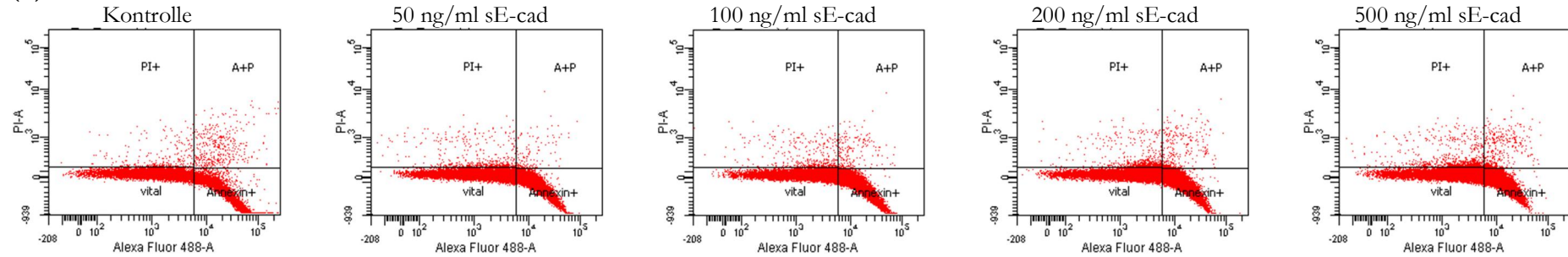
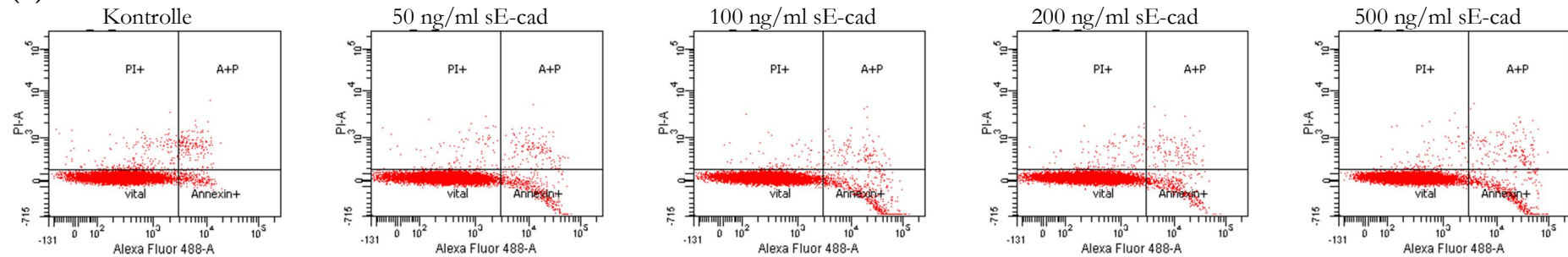
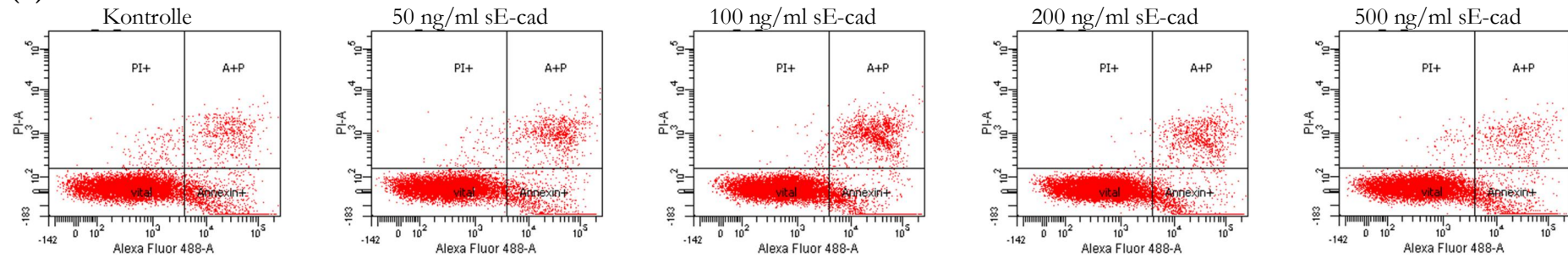
(A) MDCK**(B) HK-2****(C) TK173**

Abbildung 11: Annexin-V-Apoptose-Assay von MDCK- (A), HK-2- (B) und TK173-Zellen (C) nach 72-stündiger sE-cad-Behandlung. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen sE-cad-Konzentrationen behandelt und mit Annexin V und PI markiert. Die Ergebnisse wurden in Dot Plots dargestellt: Doppelt-negative Zellen galten als vital, für Annexin-V-positive Zellen als apoptotisch und einfach-positive Zellen für PI als nekrotisch. Schwellenwerte der Signale für *Alexa Fluor 488* Annexin V und PI wurden durch Kontrollmessungen festgelegt.

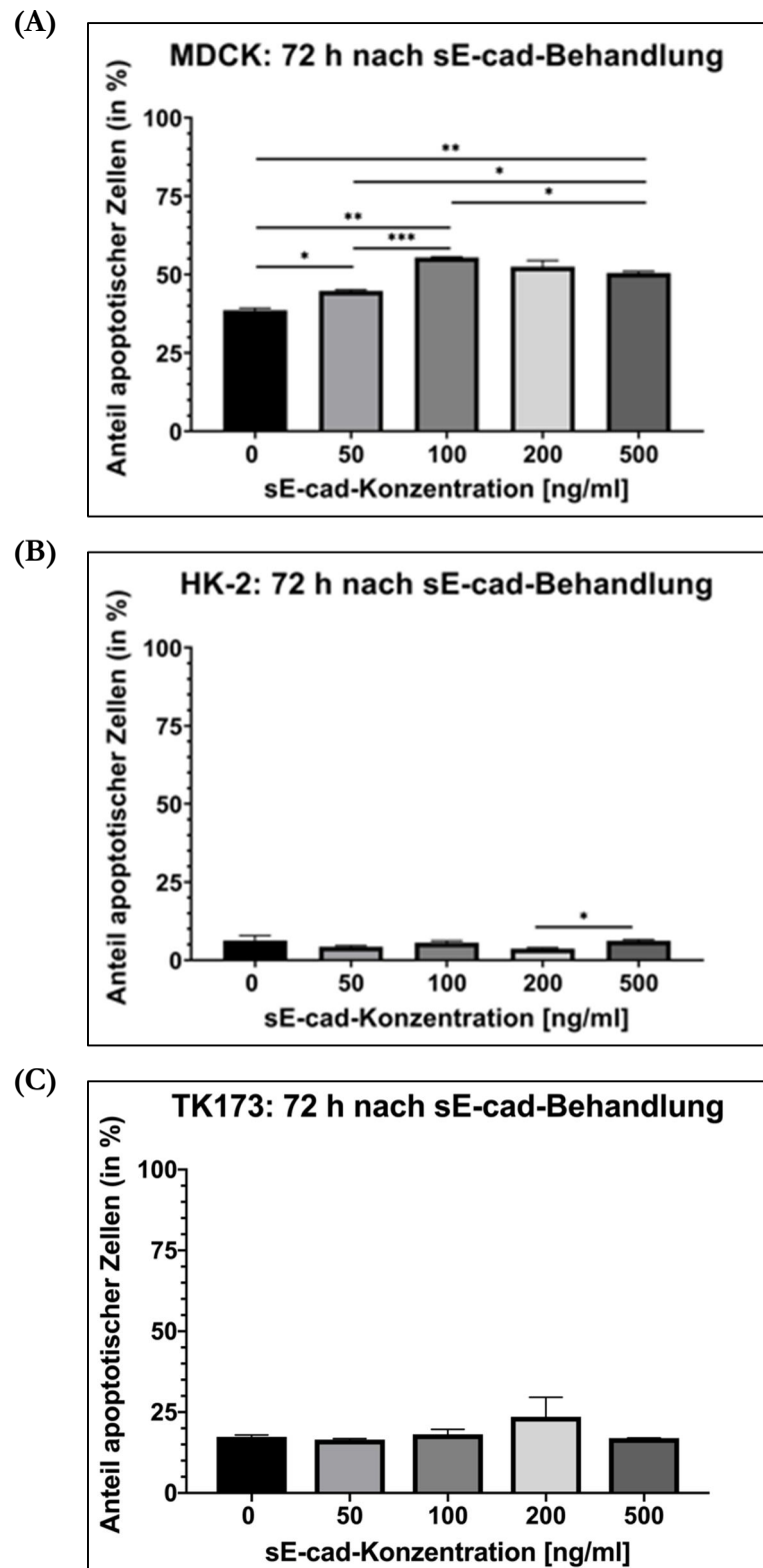


Abbildung 12: Anteil apoptotischer Zellen nach 72-stündiger sE cad-Behandlung der MDCK- (A), HK 2- (B) und TK173-Zellen (C). Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des sE-cads behandelt. Alle Annexin-positiven Zellen galten als apoptotisch und wurden relativ zur Gesamtzellzahl gemessen. Der Anteil apoptotischer Zellen (in %) ist in Balkendiagrammen als Mittelwert \pm SEM von drei unabhängigen Versuchen dargestellt. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$.

3.2.4 Expressionsregulation von E-Cadherin nach sE-cad-Behandlung von MDCK-Zellen

Wie in 1.3.3 beschrieben, kann das sE-cad als Pseudoligand am epithelialen Marker E-Cadherin binden. Um zu bestimmen, ob das sE-cad auch die E-Cadherin-Expression beeinflusst, wurde diese nach 72-stündiger Behandlung mit 500 ng/ml sE-cad im Western-Blot (Abbildung 13, Abbildung A.3) und in der indirekten Immunfluoreszenzfärbung analysiert (Abbildung 14). Die sE-cad-Konzentration wurde infolge des MTT-Assays und des Annexin-V-Apoptose-Assays festgelegt: Alle drei Zelllinien zeigten signifikante Veränderungen der Zellviabilität bei einer sE-cad-Konzentration von 500 ng/ml.

Für den Western-Blot wurden die parallel zur serumfreigesetzten Kontrolle behandelten Zellen aufgeschlossen (s. 2.2.5.2). Für eine gleiche Proteinbeladung wurde vor der SDS-PAGE eine Proteinbestimmung des Zellysats nach Bradford (s. 2.2.5.3.2) durchgeführt und β -Aktin als Ladekontrolle im Western-Blot dargestellt. Das dargestellte Protein wurde densitometrisch mit der ImageJ-Software quantifiziert und die Mittelwerte \pm SEM der quantifizierten Dichte in Balkendiagrammen abgebildet (Abbildung 13).

Im Western-Blot von E-Cadherin waren zwei spezifische Banden bei etwa 125 bis 130 kDa erkennbar. Das Signal beider Banden wurde densitometrisch als E-Cadherin quantifiziert. Es war eine tendenzielle Zunahme der relativen Intensität des E-Cadherin-Signals um $18,53\% \pm 8,91\%$ im Western-Blot nachweisbar (Abbildung 13). In der Immunfluoreszenzfärbung stellte sich keine eindeutige Veränderung der E-Cadherin-Expression unter der sE-cad-Behandlung dar (Abbildung 15). Die Ergebnisse zeigten keine statistische Signifikanz.

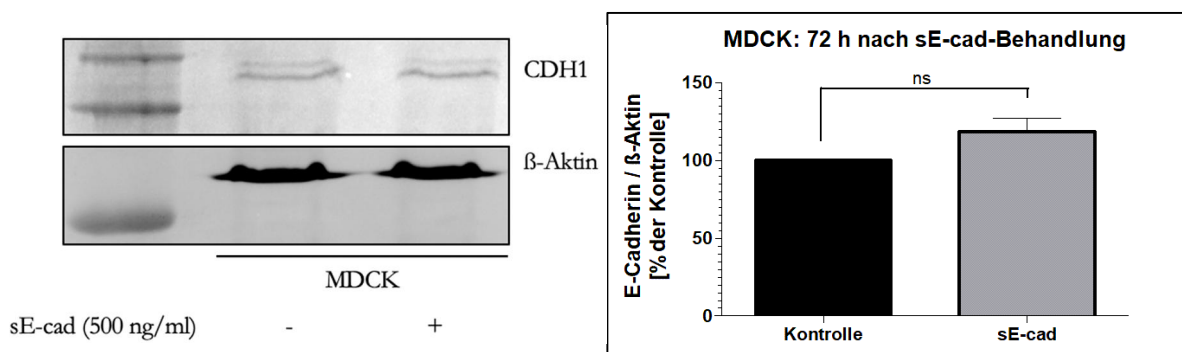


Abbildung 13: Western-Blot-Analyse von E-Cadherin nach 72-stündiger sE-cad-Behandlung. MDCK-Zellen wurden parallel zu einer serumfreigesetzten Kontrolle mit 500 ng/ml sE-cad behandelt. Durch den Western-Blot des Zellysats wurden das E-Cadherin und die Ladekontrolle β -Aktin dargestellt. Die relative Intensität der Proteinbanden wurde densitometrisch quantifiziert und in Balkendiagrammen als Mittelwert \pm SEM von mindestens drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

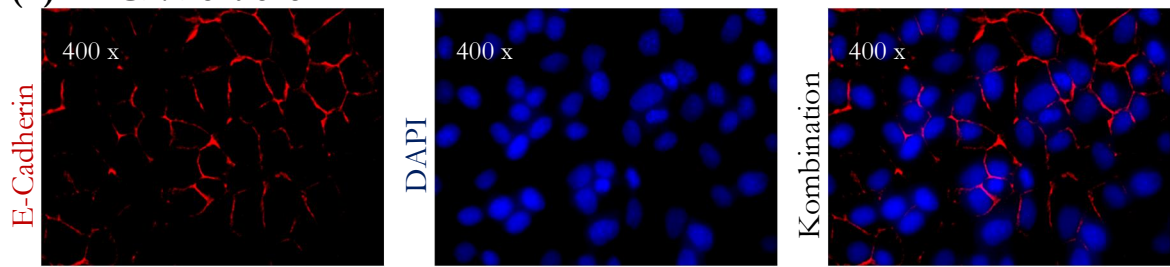
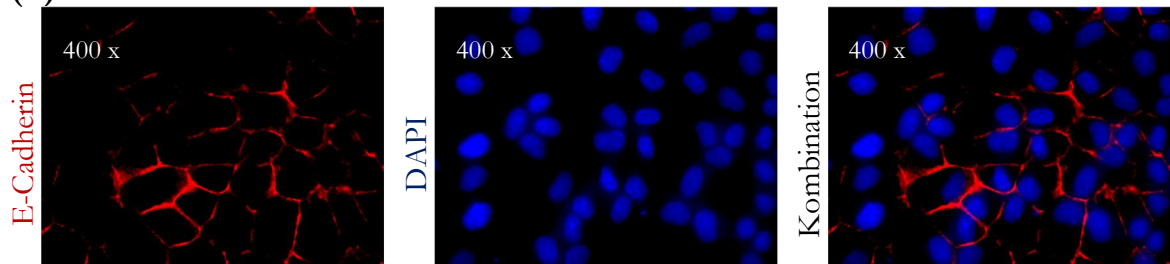
(A) MDCK: Kontrolle**(B) MDCK: sE-cad**

Abbildung 14: Immunfluoreszenzfärbung von E-Cadherin in MDCK-Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit 500 ng/ml sE-cad. Dargestellt ist eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung des E-Cadherins (rot) und des Zellkerns mit DAPI (blau) in Kombination von unbehandelten Zellen als Kontrolle (A) und mit 500 ng/ml sE-cad-behandelten Zellen (B) in 400-facher Vergrößerung.

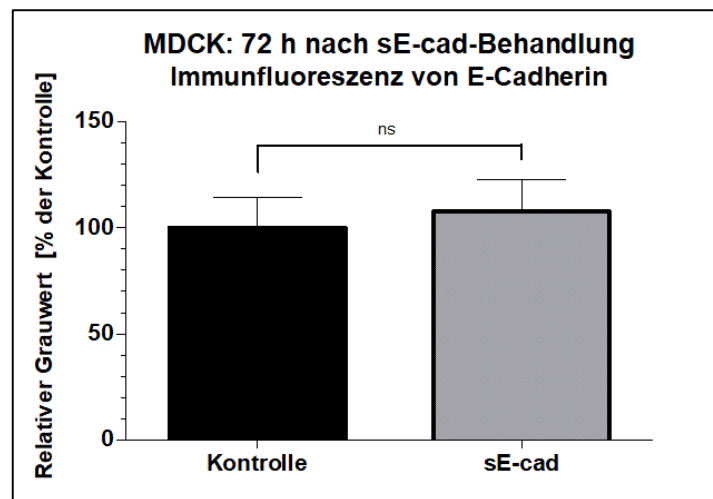


Abbildung 15: Quantifizierung der Immunfluoreszenz von E-Cadherin nach 72-stündiger Behandlung von MDCK-Zellen mit 500 ng/ml sE-cad. In Balkendiagrammen wurde der in der Schwellenwertanalyse ermittelte Grauwert, relativiert zur Kontrolle, als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

3.2.5 Expressionsregulation von β -Catenin nach sE-cad-Behandlung von MDCK-Zellen

Die β -Catenin-Expression wurde nach einer 72-stündigen Behandlung von MDCK-Zellen mit 500 ng/ml sE-cad im Western-Blot und in der indirekten Immunfluoreszenzfärbung analysiert. Wie in 1.3.1 beschrieben, stabilisiert das β -Catenin als Teil des Cadherin-Catenin-Komplexes die Zelladhäsion. Das β -Catenin ist ebenfalls zentraler Bestandteil des Wnt-Signalwegs, der in der renalen Fibrogenese aktiv ist. Das E-Cadherin sequestriert das β -Catenin an der Zellmembran und verhindert eine zytoplasmatische Akkumulation des β -Catenins. Bei E-Cadherin-Verlust akkumuliert das β -Catenin im Zytoplasma und wird bei Abwesenheit eines aktivierenden Wnt-Signals proteasomal abgebaut. Bei Aktivierung des Wnt-Signalwegs ist das β -Catenin nach nukleärer Translokation an der Transkription zahlreicher Zielgene, wie *SNAIL1* und *SNAIL2*, beteiligt.

Verwendet wurden MDCK-Zellen, da sie, wie in 1.5 beschrieben, E-Cadherin exprimieren und einen Cadherin-Catenin-Komplex ausbilden.

Im Western-Blot des Zellysats von MDCK-Zellen (Abbildung 16, Abbildung A.4) wurde das aktive, unphosphorylierte β -Catenin dargestellt. Die Intensität des aktiven, unphosphorylierten β -Catenins nahm im Western-Blot der MDCK-Zellen um $16,85\% \pm 5,38\%$ (Abbildung 16) ab. In der indirekten Immunfluoreszenzfärbung des aktiven, unphosphorylierten β -Catenins zeigte sich sowohl in der Kontrolle als auch in der Behandlung von MDCK-Zellen ein Signal an der Plasmamembran (Abbildung 17). In einer Schwellenwertanalyse der Immunfluoreszenz (Abbildung 18) wurde der zur Kontrolle relative Grauwert des β -Catenin-Signals quantifiziert. Das β -Catenin-Signal nahm hierbei um $26,40\% \pm 24,46\%$ nach 72-stündiger Behandlung von MDCK-Zellen ab. Die Ergebnisse zeigten über diese tendenziellen Beobachtungen hinaus keine statistische Signifikanz.

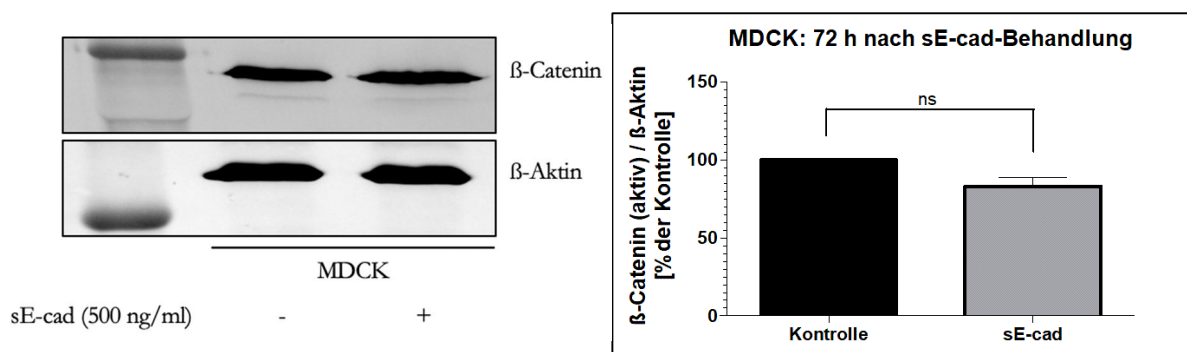


Abbildung 16: Western-Blot-Analyse von β -Catenin nach 72-stündiger sE-cad-Behandlung. MDCK-Zellen wurden parallel zu einer serumfreigesetzten Kontrolle mit 500 ng/ml sE-cad behandelt. Durch den Western-Blot des Zellysats wurden das aktive, unphosphorylierte β -Catenin und die Ladekontrolle β -Aktin dargestellt. Die relative Intensität der Proteinbanden wurde densitometrisch quantifiziert und in Balkendiagrammen als Mittelwert \pm SEM von mindestens drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

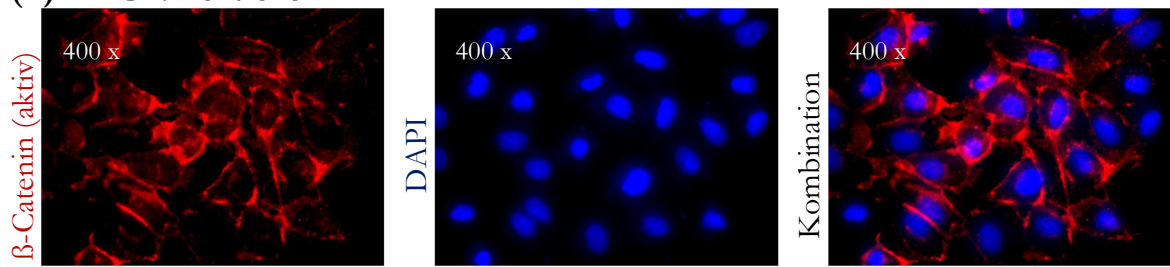
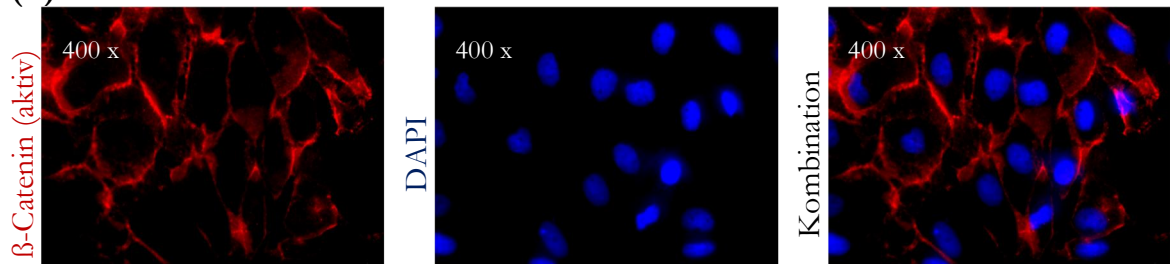
(A) MDCK: Kontrolle**(B) MDCK: sE-cad**

Abbildung 17: Immunfluoreszenzfärbung von β -Catenin in MDCK-Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit 500 ng/ml sE-cad. Dargestellt ist eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung des unphosphorylierten β -Catenins (rot) und des Zellkerns mit DAPI (blau) in Kombination von unbehandelten Zellen als Kontrolle (A) und mit 500 ng/ml sE-cad-behandelten Zellen (B) in 400-facher Vergrößerung.

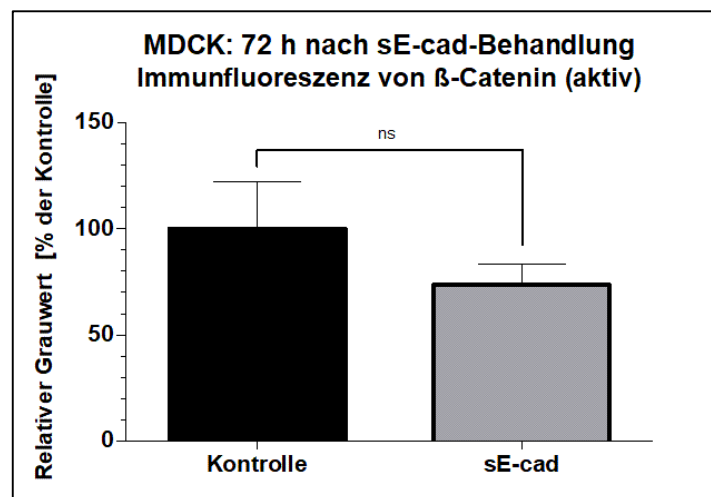


Abbildung 18: Quantifizierung der Immunfluoreszenz von β -Catenin nach 72-stündiger Behandlung von MDCK-Zellen mit 500 ng/ml sE-cad. In Balkendiagrammen wurde der in der Schwellenwertanalyse ermittelte Grauwert, relativ zur Kontrolle, als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

3.2.6 Expressionsregulation von Fibrosemarkern nach sE-cad-Behandlung renaler Zelllinien

Um eine etwaige Aktivierung profibrotischer Signalkaskaden unter der sE-cad-Behandlung nachzuweisen, wurde die Expression der Fibrosemarker Vimentin, *ACTA2* und *fibroblast specific protein 1 (FSP1) / S100A4* und der Transkriptionsfaktoren *SNAI1* und *SNAI2* nach 72-stündiger Behandlung mit 500 ng/ml sE-cad analysiert. Zudem wurde die Fibronektin-Expression im Zellysat und Fibronektin-Sekretion im Zellüberstand nach der sE-cad-Behandlung untersucht.

3.2.6.1 Expressionsregulation von Vimentin nach sE-cad-Behandlung renaler Zelllinien

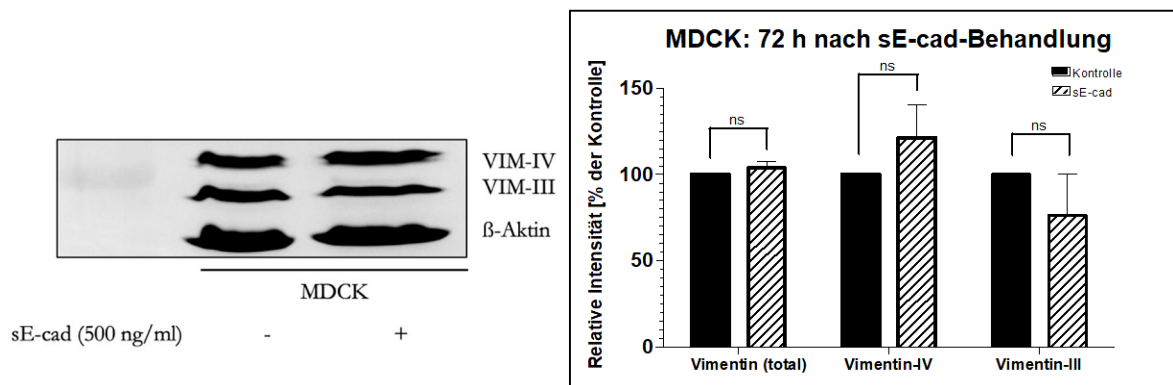
Die Analyse der Expressionsregulation des Vimentins (VIM) erfolgte mittels Western-Blots des Zellysats. Anlehnend an vorherige Arbeiten unserer Arbeitsgruppe (vgl. 4.5.1) konnte die Expression von den Isoformen VIM-IV bei 54 kDa und VIM-III bei 50 kDa (Abbildung 19, Abbildung A.5 - Abbildung A.7) festgestellt werden. Es wurden die Proteinbanden der Isoformen VIM-IV, VIM-III und das Signal beider Banden als totales Vimentin densitometrisch quantifiziert.

Bei keiner Zelllinie ergaben sich eindeutige Veränderungen des totalen Vimentins: MDCK-Zellen (Abbildung 19A) zeigten nach einer 72-stündigen sE-cad-Behandlung eine tendenzielle Zunahme der relativen Intensität von VIM-IV um $21,17 \% \pm 19,32 \%$ und eine Abnahme von VIM-III um $23,56 \% \pm 23,87 \%$. Es ergaben sich hier keine statistisch signifikanten Unterschiede.

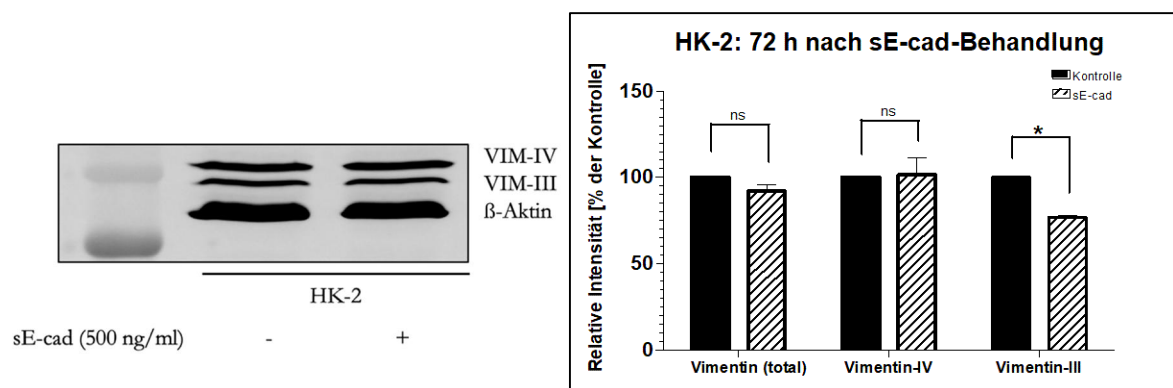
In HK-2-Zellen (Abbildung 19B) war kein Unterschied der relativen Intensität von VIM-IV erkennbar. Es wurde eine signifikante Abnahme von VIM-III um $22,99 \% \pm 0,96 \%$ ($p = 0,0017$) nachgewiesen.

TK173-Zellen (Abbildung 19C) zeigten eine signifikante Abnahme der relativen Intensität von VIM-IV um $61,12 \% \pm 10,33 \%$ ($p = 0,0274$). Die Isoform VIM-III nahm um $131,00 \% \pm 97,18 \%$ zu. Dieses Ergebnis war statistisch nicht signifikant.

(A)



(B)



(C)

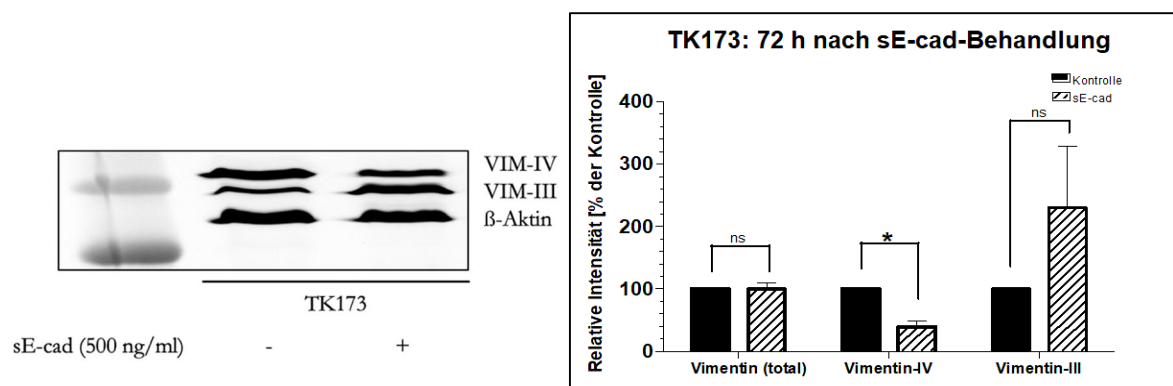


Abbildung 19: Western-Blot-Analyse von Vimentin nach 72-stündiger sE-cad-Behandlung. MDCK- (A), HK-2- (B) und TK173-Zellen (C) wurden parallel zu einer serumfreigesetzten Kontrolle mit 500 ng/ml sE-cad behandelt. Durch den Western-Blot des Zellysats wurden die Vimentin-Isoformen VIM-IV und VIM-III und die Ladekontrolle β -Aktin dargestellt. Die relative Intensität der Proteinbanden wurde densitometrisch quantifiziert und in Balkendiagrammen als Mittelwert \pm SEM von mindestens drei unabhängigen Versuchen dargestellt. (*) $p < 0,05$.

3.2.6.2 Expression von *ACTA2* und *S100A4* nach sE-cad-Behandlung renaler Zelllinien

Die relative Genexpression der Fibrosemarker *ACTA2* und *S100A4* wurde nach 72-stündiger sE-cad-Behandlung in der qPCR (s. 2.2.6) untersucht (Abbildung 20). Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode (s. 2.2.6.5) gemessen und als Mittelwert \pm SEM in Balkendiagrammen angegeben.

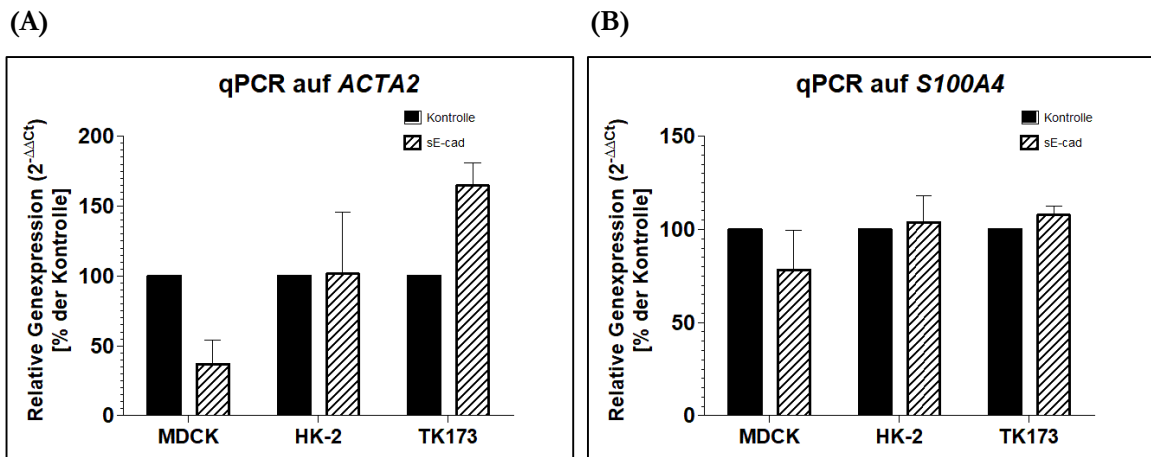


Abbildung 20: Relative Genexpression von *ACTA2* (A) und *S100A4* (B) in der qPCR mit *SYBR Green* nach sE-cad-Behandlung. MDCK-, HK-2- und TK173-Zellen wurden parallel zu einer serumfreigesetzten Kontrolle für 72 Stunden mit 500 ng/ml sE-cad behandelt. Die Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode quantifiziert und die Mittelwerte \pm SEM in Balkendiagrammen dargestellt. GAPDH wurde als Referenzgen verwendet. Die Ergebnisse zeigten in der statistischen Auswertung keine statistische Signifikanz.

Nach der sE-cad-Behandlung von MDCK-Zellen nahm die relative Genexpression von *ACTA2* um 63,11 % \pm 17,01 % ab. Es waren keine Unterschiede in der relativen Genexpression von *S100A4* erkennbar (-21,62 % \pm 21,26 %). Die sE-cad-Behandlung der HK-2-Zellen führte zu keinen eindeutigen Veränderungen der relativen Genexpression von *ACTA2* (1,35 % \pm 44,53 %) und *S100A4* (3,83 % \pm 14,45 %). In TK173-Zellen nahm die relative Genexpression von *ACTA2* um 64,57 % \pm 16,26 % zu. Die relative Genexpression von *S100A4* zeigte keine Änderungen nach der sE-cad-Behandlung (7,75 % \pm 4,89 %). Diese tendenziellen Beobachtungen wiesen keine statistische Signifikanz auf.

3.2.6.3 Regulation der Expression und Sekretion von Fibronectin nach sE-cad- Behandlung renaler Zelllinien

Die fibrogene Phase der renalen Fibrose ist gekennzeichnet durch eine Dysbalance der Synthese extrazellulärer Matrix und des Abbaus dieser. Diese führt zur progressiven Akkumulation extrazellulärer Matrix. Um quantitative Veränderungen extrazellulärer Matrixproteine nach der sE-cad-Behandlung nachzuweisen, wurde das Zellysat und der Zellüberstand auf Fibronectin untersucht (Abbildung 21, Abbildung A.8 - Abbildung A.12).

MDCK-, HK-2- und TK173-Zellen wurden für 72 Stunden mit 500 ng/ml sE-cad behandelt und das Zellysat, wie in 2.2.5.2 beschrieben, analysiert. Zur Analyse des Zellüberstandes wurde dieser eingengt (s. 2.2.5.1.1) und gefällt (s. 2.2.5.1.2). Es wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt (s. 2.2.5.3.2) und das Fibronectin im qualitativen Western-Blot nachgewiesen. Es erfolgte keine statistische Analyse der Western-Blots des Zellüberstandes.

Im Zellysat von MDCK-Zellen (Abbildung 21A) zeigte sich mit einer Mittelwertdifferenz von $9,76 \% \pm 20,36 \%$ zwischen serumfreigesetzten Kontrollzellen und sE-cad-behandelten Zellen keine eindeutige Änderung der Fibronectin-Expression. Im qualitativen Western-Blot des Zellüberstands war eine deutliche Abnahme des Fibronectin-Monomers erkennbar. Die Western-Blots des Lysats und Überstands von HK-2-Zellen und TK173-Zellen wiesen keine eindeutigen qualitativen bzw. quantitativen Veränderungen der Fibronectin-Expression und Fibronectin-Sekretion auf (Abbildung 21B, C).

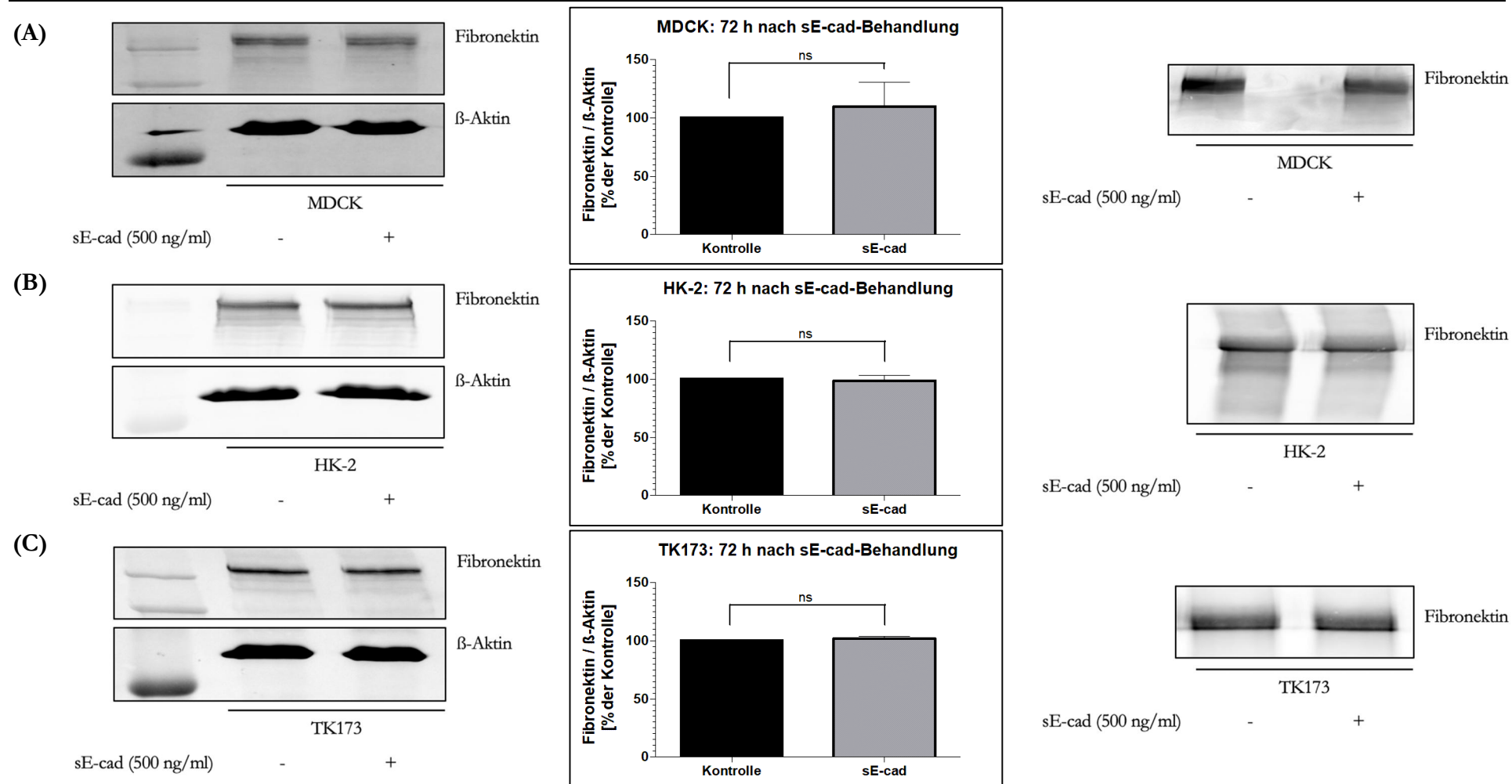


Abbildung 21: Western-Blot-Analyse von Fibronectin im Zellysat und Zellüberstand nach 72-stündiger sE-cad-Behandlung. MDCK- (A), HK-2- (B) und TK173-Zellen (C) wurden parallel zu einer serumfreigesetzten Kontrolle mit 500 ng/ml sE-cad behandelt. In den Western-Blots des Zellysats (links) wurde das Fibronectin und die Ladekontrolle β -Aktin dargestellt. Die relative Signalintensität (mittig) wurde nach einer densitometrischen Quantifizierung in Balkendiagrammen als Mittelwert \pm SEM von mindestens drei unabhängigen Versuchen abgebildet. In den Western-Blots des Zellüberstands (rechts) wurde die Fibronectin-Sekretion qualitativ dargestellt. Es erfolgte hier keine Quantifizierung.

3.2.6.4 Expressionsregulation von *SNAI1* und *SNAI2* nach sE-cad-Behandlung renaler Zelllinien

Die relative Genexpression der in der renalen Fibrogenese wichtigen Transkriptionsfaktoren *SNAI1* und *SNAI2* wurde nach einer 72-stündigen Inkubation mit 500 ng/ml sE-cad in der qPCR mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode (s. 2.2.6.5) gemessen und als Mittelwert \pm SEM in Balkendiagrammen angegeben (Abbildung 22).

Nach der sE-cad-Behandlung von MDCK-Zellen nahm die relative Genexpression von *SNAI1* signifikant um $43,64\% \pm 8,41\%$ ($p = 0,0352$) ab. Bei *SNAI2* ergaben sich bei einer Abnahme der relativen Genexpression um $15,38\% \pm 18,22\%$ keine eindeutigen Effekte der Behandlung.

Bei HK-2-Zellen waren nach der sE-cad-Behandlung keine eindeutigen Veränderungen der relativen Genexpression von *SNAI1* ($-9,59\% \pm 20,70\%$) und *SNAI2* ($19,69\% \pm 44,86\%$) erkennbar.

TK173-Zellen zeigten nach der sE-cad-Behandlung eine deutliche Zunahme der relativen Genexpression von *SNAI1* um $55,24\% \pm 15,95\%$. Die relative Genexpression von *SNAI2* nahm nach der Behandlung um $192,80\% \pm 88,05\%$ zu. Diese Ergebnisse waren statistisch nicht signifikant.

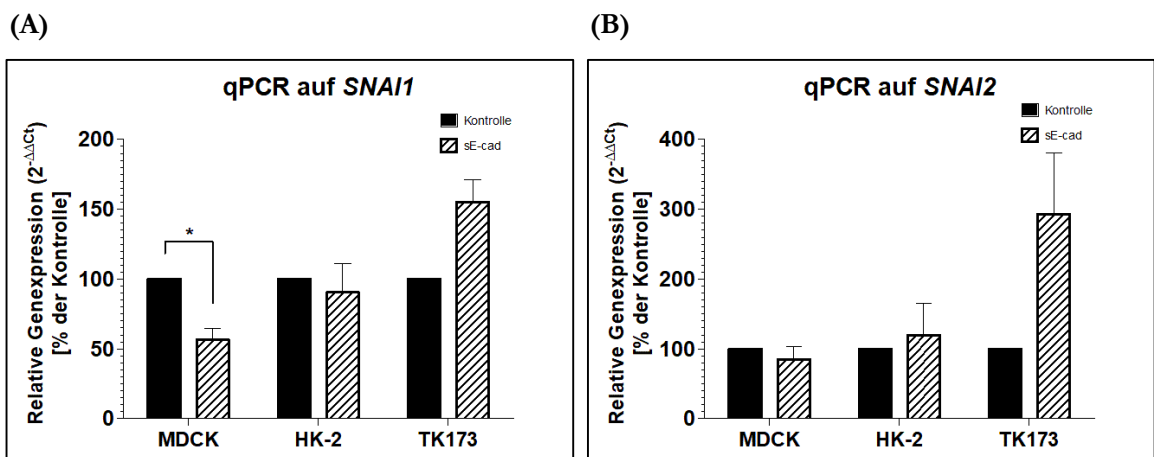


Abbildung 22: Relative Genexpression von *SNAI1* (A) und *SNAI2* (B) in der qPCR mit *SYBR Green* nach sE-cad-Behandlung. MDCK-, HK-2- und TK173-Zellen wurden parallel zu einer serumfreigesetzten Kontrolle für 72 Stunden mit 500 ng/ml sE-cad behandelt. Die Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode quantifiziert und die Mittelwerte \pm SEM in Balkendiagrammen dargestellt. GAPDH wurde als Referenzgen verwendet. (*) $p < 0,05$. Statistisch nicht signifikante Ergebnisse wurden auf dieser Abbildung nicht zusätzlich gekennzeichnet.

4 Diskussion

4.1 TGF- β 1-induzierte Spaltung des E-Cadherins in MDCK-Zellen

Das im Urin detektierte sE-cad hat laut Koziolk et al. (2020) einen hohen prognostischen Wert für Patienten mit einem hohen Risiko einer diabetischen Nephropathie. Die Herkunft des im Urin detektierten sE-cads ist bisher nicht näher beschrieben. Vorstellbar sind folgende Szenarien: Zum einen könnte das sE-cad ein Bestandteil des peripheren Bluts sein und glomerulär filtriert werden. Bei zunehmender Schädigung der glomerulären Basalmembran nähme die sE-cad-Konzentration im Urin zu. Zum anderen könnte das sE-cad nach einer Spaltung des membranständigen E-Cadherins im distalen Tubulus im Urin nachgewiesen werden.

Die Voraussetzung für das letztgenannte Szenario ist dabei die bestehende E-Cadherin-Expression. So zeigten Gofuku et al. (1998), dass Magenkarzinome mit partiellem E-Cadherin-Verlust mit einer höheren sE-cad-Konzentration im peripheren Blut korrelierten als Magenkarzinome mit einem homogenen und somit totalen E-Cadherin-Verlust. Unter dieser Voraussetzung wird eine podozytäre oder mesangiale Herkunft des sE-cads als unwahrscheinlich betrachtet, obwohl glomeruläre Schädigungen bereits früh im Modell der diabetischen Nephropathie auftreten. Im Podozyten ist eine überwiegende P-Cadherin-Expression, in Mesangiumzellen eine N-Cadherin-Expression beschrieben (Li et al. 2008; Nameta et al. 2009; Ying und Wu 2017). Auch das proximale Tubulusepithel zeigt eine N-Cadherin-Expression und keine E-Cadherin-Expression (Nouwen et al. 1993). Das distale Tubulusepithel hingegen exprimiert E-Cadherin (Nouwen et al. 1993).

Das E-Cadherin könnte von der Membran geschädigter distaler Tubulusepithelzellen gespalten werden. Eine persistierende oder wiederholte Schädigung des Tubulointerstitiums führt durch die Aktivierung proinflammatorischer Signalkaskaden, wie dem TGF- β -/Smad-Signalweg, zur chronischen Inflammation und später zur Organfibrose (Kuncio et al. 1991). Im Zusammenhang mit dem chronischen Entzündungsprozess einer CKD sind eine Abnahme der E-Cadherin-Expression und eine Entdifferenzierung tubulärer Epithelzellen beschrieben worden (Liu 2004; Kalluri und Weinberg 2009). Zum Nachweis einer E-Cadherin-Spaltung infolge einer Aktivierung proinflammatorischer und -fibrotischer Signalkaskaden wurden MDCK-Zellen, die dem distalen Tubulusepithel entstammen, mit TGF- β 1 behandelt. Für die Spaltung des E-Cadherins ist eine

Proteasenaktivität notwendig (vgl. 1.3.2). MDCK-Zellen wurden simultan mit aktivem TGF- β 1 und dem Matrix-Metalloproteinase-Inhibitor GM6001, auch Iloprost oder Galardin genannt, inkubiert, um eine Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen *downstream* des TGF- β 1-/Smad-Signalwegs zu beurteilen.

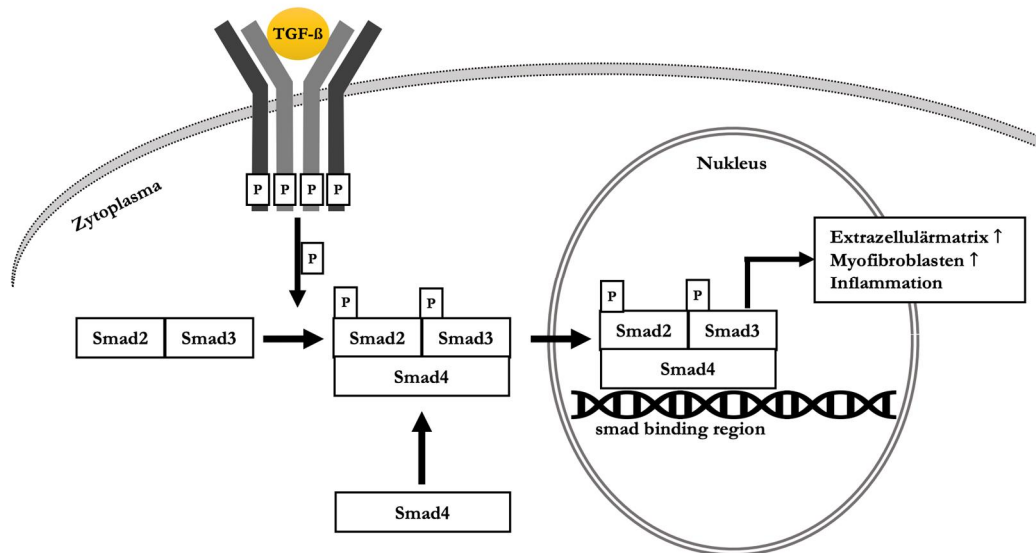


Abbildung 23: TGF- β -/Smad-Signalweg, basierend auf Tampe (2011) und Smith et al. (2012). TGF- β wird durch eine limitierte Proteolyse aktiviert und bindet an seinen membranständigen Rezeptor, einer Serin-Threonin-Kinase (Böttlinger und Bitzer 2002). Nach der Rezeptoraktivierung und dessen Autophosphorylierung kommt es zur Phosphorylierung der R-Smads Smad2 und Smad3 (Liu 2006; Grande und López-Novoa 2009). Nach einer Komplexierung mit dem Co-Smad Smad4 transloziert der Smad-Komplex in den Nucleus und bindet an TGF- β -Zielgene, wodurch das TGF- β seine proinflammatorischen und -fibrotischen Eigenschaften ausübt (Liu 2006).

TGF- β wirkt über den TGF- β -/Smad-Signalweg, welcher in der renalen Fibrogenese überaktiviert ist und in Abbildung 23 dargestellt ist (Liu 2006). Die Konvergenz verschiedener Signalwege und fibrotischer Stimuli, wie die Hyperglykämie oder das Angiotensin II, auf den TGF- β -/Smad-Signalweg, verdeutlichen dessen zentrale Rolle in der renalen Fibrogenese (Liu 2006). Die Expression von TGF- β 1 ist in der renalen Fibrose hochreguliert und dessen profibrotische Rolle *in vivo* etabliert (Strutz et al. 2001; Dihazi et al. 2013). Der TGF- β -/Smad-Signalweg induziert die Synthese der Extrazellulärmatrix (Sharma und Ziyadeh 1994). TGF- β kann Fibroblasten aktivieren und die Transformation von Fibroblasten in Myofibroblasten induzieren (Desmoulière et al. 2005). Des Weiteren ist aktives TGF- β mit einer Inhibition des Matrixabbaus assoziiert und wirkt chemoattraktiv auf Fibroblasten (Sharma und Ziyadeh 1994).

4.1.1 Annahme eines fibrotischen Phänotyps nach TGF- β 1-Behandlung von MDCK-Zellen

Die 48-stündige TGF- β 1-Behandlung von MDCK-Zellen führte zu einer signifikanten Abnahme der E-Cadherin-Expression in der Immunfluoreszenzfärbung. Ein Teil der ursprünglich kuboiden Zellen nahm eine spindelförmige Zellmorphologie an. Diese Zellen wiesen kein E-Cadherin-Signal und keine Zelladhäsionen in der Immunfluoreszenzfärbung auf. Diese Ergebnisse suggerieren die Annahme eines fibrotischen Phänotyps von MDCK-Zellen nach der Inkubation mit TGF- β 1. Zheng et al. (2009) veröffentlichten ähnliche Ergebnisse unter Verwendung der Zelllinie NRK52e, die dem Tubulusepithel entstammt und E-Cadherin exprimiert. Unter der zusätzlichen Behandlung mit GM6001 ergab sich ein schwächerer Effekt als unter alleiniger TGF- β 1-Behandlung – die TGF- β 1-Wirkung nahm demnach durch den MMP-Inhibitor GM6001 ab. Dieses Ergebnis bestätigt die Beobachtung von Zheng et al (2009), dass MMPs *in vitro downstream* vom aktivierten TGF- β 1-/Smad-Signalweg agieren. An NRK52e-Zellen konnten Zheng et al. (2009) einen nahezu vollständigen Wirkungsverlust von aktivem TGF- β 1 durch GM6001 demonstrieren. Laut den Herstellerangaben hemmt GM6001 die Matrix-Metalloproteinasen MMP-1, -2, -3, -8 und -9. Unter den genannten MMPs ist eine proteolytische Spaltung des E-Cadherins durch MMP-2, -3 und -9 beschrieben (Grabowska und Day 2012). Es ist davon auszugehen, dass TGF- β 1 andere Proteasefamilien induziert, die ebenfalls das E-Cadherin spalten, allerdings nicht von GM6001 inhibiert werden (vgl. 1.3.2). Zheng et al. (2009) vermuten, dass im inflammatorischen Kontext verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren verschiedene Proteasen aktivieren können.

4.1.2 Nachweis eines E-Cadherin-Fragments im Zellüberstand von MDCK-Zellen nach TGF- β 1-Behandlung

Nach der TGF- β 1- und TGF- β 1-/GM6001-Behandlung von MDCK-Zellen wurde der Zellüberstand auf extrazelluläre Spaltfragmente des E-Cadherins untersucht, um eine Spaltung des E-Cadherins im distalen Tubulus nachzuweisen. Unter allen Inkubationsbedingungen war ein E-Cadherin-Fragment bei etwa 75 bis 100 kDa nachweisbar. Die höchste Signalintensität ergab sich unter alleiniger TGF- β 1-Behandlung. Dieser Effekt war deutlich abgeschwächt unter der TGF- β 1-/GM6001-Behandlung, aber stärker als unter Kontrollbedingungen. Auffällig war, dass das E-Cadherin-Fragment, wenn auch mit der geringsten Signalintensität, ebenfalls unter Kontrollbedingungen nachweisbar war. Koziolok et al. (2020) konnten ebenfalls eine niedrige sE-cad-Konzentration im Urin gesunder Patienten nachweisen. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass das sE-cad im

Rahmen des physiologischen Proteinumsatzes und -abbaus von E-Cadherin auch bei Gesunden in Körperflüssigkeiten aufzufinden ist (Banks et al. 1995).

Zheng et al. (2009) veröffentlichten ähnliche Ergebnisse unter Verwendung der rekombinanten MMP-3, die *downstream* von TGF- β 1 agiert, und der Zelllinie NRK52e: Das sE-cad wurde im Zellüberstand der NRK52e-Zellen nach der MMP-3-Behandlung nachgewiesen, wohingegen nach der MMP-3-/GM6001-Behandlung kein sE-cad nachweisbar war (Zheng et al. 2009). In weiteren Versuchen wurde sE-cad im Zellüberstand von NRK52e-Zellen nach einer TGF- β 1- und einer MMP-9-Behandlung detektiert (Zheng et al. 2009). Das sE-cad wurde hier, wenn auch mit einer geringen Signalintensität, auch unter Kontrollbedingungen dargestellt (Zheng et al. 2009).

In MDCK-Zellen ist die – stets vor der Zellbehandlung – durchgeführte Serumfreisetzung als ein proapoptotischer Stimulus beschrieben: Eine Vakuolisierung wurde bereits nach einer 24-stündigen Serumfreisetzung nachgewiesen, die Apoptose nach 48 Stunden (Zhang et al. 2000; Inge et al. 2011). Die Serumfreisetzung und die Apoptose sind bekannte Stimuli einer E-Cadherin-Spaltung und erklären den Nachweis des sE-cads unter Kontrollbedingungen (Steinhusen et al. 2001; Najy et al. 2008). In dieser Arbeit führen somit verschiedene Stimuli, die vermutlich unabhängig vom TGF- β 1-/Smad-Signalweg wirken, zur Spaltung des E-Cadherins. Verschiedene Stimuli können dann auf unterschiedliche Proteasen konvergieren mit der E-Cadherin-Spaltung als gemeinsame Endstrecke.

Insgesamt zeigen die durchgeführten Experimente, dass TGF- β 1 die Spaltung des E-Cadherins in MDCK-Zellen potenziert. MDCK-Zellen nehmen unter der TGF- β 1-Behandlung einen fibrotischen Phänotyp an. Das E-Cadherin kann zum Auflösen bestehender Zelladhäsionskontakte proteolytisch gespalten werden, wodurch das entstandene sE-cad im Zellüberstand nachgewiesen werden kann. Die verminderte Spaltung des E-Cadherins durch den MMP-Inhibitor GM6001 bestätigt die Annahme von Zheng et al. (2009), dass MMPs durch profibrotische Zytokine, wie hier TGF- β 1, induziert werden und das E-Cadherin spalten. Signalkaskaden können so zum einen die Spaltung des E-Cadherins an der Zellmembran, zum anderen eine Herunterregulation des *CDH1*-Gens bewirken (Zuo et al. 2011).

Anhand dieser Beobachtungen erscheint es plausibel, dass erhöhte Urin-sE-cad-Konzentrationen aufgrund einer vermehrten E-Cadherin-Spaltung im distalen Tubulusepithel erscheinen.

4.2 Effekte des sE-cads auf die Viabilität und Apoptose renaler Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden renale Zellen mit unterschiedlichen sE-cad-Konzentrationen (50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 500 ng/ml) über 24, 48 und 72 Stunden behandelt. Verwendet wurden distale Tubulusepithelzellen der Zelllinie MDCK, proximale Tubulusepithelzellen der Zelllinie HK-2 und renale interstitielle Fibroblasten der Zelllinie TK173. Diese Zelllinien unterscheiden sich in ihrer E-Cadherin-Expression: HK-2-Zellen exprimieren kein E-Cadherin (Nouwen et al. 1993). MDCK-Zellen exprimieren hingegen E-Cadherin (Gaush et al. 1966; Nouwen et al. 1993). Es ist keine Expression des E-Cadherins in den renalen Fibroblasten der Zelllinie TK173 beschrieben (Müller et al. 1995).

Im MTT-Assay wurde die Zellviabilität, im Annexin-V-Apoptose-Assay der Anteil apoptotischer Nierenzellen unter der sE-cad-Behandlung bestimmt.

Die sE-cad-Behandlung führte in Tubulusepithelzellen (MDCK- und HK-2-Zellen) zu einer Abnahme der Zellviabilität. Ursächlich dafür kann eine verminderte Zellproliferation oder eine sE-cad-induzierte Apoptose in Tubulusepithelzellen sein. In HK-2-Zellen zeigten sich keine eindeutigen Veränderungen des Anteils apoptotischer Zellen unter der sE-cad-Behandlung. In MDCK-Zellen nahm der Anteil apoptotischer Zellen unter der sE-cad-Behandlung signifikant zu. Trotz der erwiesenen Signifikanz des proapoptischen Effekts ist dieser bei einer Mittelwertdifferenz von $16,87\% \pm 0,72\%$ bei 100 ng/ml sE-cad als gering einzustufen. Die verminderte Zellviabilität der Tubulusepithelzellen ist daher wahrscheinlich bedingt durch eine Proliferationshemmung und bei MDCK-Zellen zusätzlich durch eine geringe Apoptoseinduktion. Auffällig ist zudem, dass signifikante Veränderungen der Zellviabilität in MDCK- und TK173-Zellen bei einer sE-cad-Konzentration von mindestens 100 ng/ml, bei HK-2-Zellen erst bei 500 ng/ml sE-cad nachweisbar waren.

Die sE-cad-Behandlung führte in den renalen Fibroblasten der Zelllinie TK173 zu einer Zunahme der Zellviabilität. Es ergab sich keine Veränderung des Anteils der apoptotischen Zellen unter der sE-cad-Behandlung.

Die Zellviabilität renaler Fibroblasten und Tubulusepithelzellen scheint somit *in vitro*, gegensätzlich unter der sE-cad-Behandlung beeinflusst zu werden.

Die sE-cad-induzierten Effekte auf die Zellviabilität und Apoptose sind in der Literatur kontrovers beschrieben: In den Mammakarzinomzelllinien MCF-7, SKRB3 und MDA-MB-231 ist eine sE-cad-induzierte Zellproliferation und eine Inhibition der

Apoptose beschrieben (Najy et al. 2008; Brouxhon et al. 2014). Najy et al. (2008) verwendeten dafür 1,5 µg/ml eines Fc-gekoppelten E-Cadherin-Chimärs. Brouxhon et al. (2014) setzten 10 µg/ml und 20 µg/ml des Fc-gekoppelten E-Cadherin-Chimärs ein. Diese Ergebnisse wurden auf die Bindung des sE-cads an die Rezeptortyrosinkinasen der ErbB-Familie HER2 und HER3 zurückgeführt (Najy et al. 2008; Brouxhon et al. 2014). In humanen Umbilikalvenenendothelzellen führte die sE-cad-Inkubation *in vitro* zu keiner signifikanten Veränderung der Zellviabilität (Tang et al. 2018). Tang et al. (2018) verwendeten dafür sE-cad im konditionierten Medium und ein Fc-gekoppeltes E-Cadherin-Chimär. Inge et al. (2011) beobachteten antiapoptotische Effekte des sE-cads auf MDCK-Zellen nach einer initialen Apoptoseinduktion durch eine Serumfreisetzung. Beobachtet wurde dieser Effekt bei einer eingesetzten sE-cad-Konzentration von 10 µg/ml (Inge et al. 2011). Wesentliche Unterschiede dieser Arbeit sind die verwendeten Zelllinien, das verwendete sE-cad und die sE-cad-Konzentration. Die hier eingesetzten Konzentrationen sind um ein Vielfaches geringer als in der beschriebenen Literatur (Najy et al. 2008; Inge et al. 2011; Brouxhon et al. 2014; Tang et al. 2018). Sie richten sich nach den von Koziolk et al. (2020) bestimmten Urin-sE-cad-Konzentrationen bei Vorliegen einer diabetischen Nephropathie. Kuncio et al. (1991) vermuteten, dass die Konzentration verschiedener profibrotischer Proteine ihr Wirkprofil bestimmt. Die hier aufgeführten Ergebnisse stellen folglich eine Ergänzung zu den beschriebenen sE-cad-Effekten dar. Koziolk et al. (2020) detektierten bereits niedrige sE-cad-Konzentration im Urin gesunder Patienten. Diese waren nicht mit dem Risiko einer diabetischen Nierenerkrankung assoziiert (Koziolk et al. 2020). Diese Beobachtungen suggerieren, dass sE-cad konzentrationspezifische Effekte ausübt.

Im *In-vitro*-Modell der renalen Fibrose ist die gesteigerte Proliferation matrix-synthetisierender Zellen ein wichtiges Merkmal (Eddy 1996). So ist die Proliferationsrate interstitieller Fibroblasten einer humanen fibrotischen Niere im Vergleich zu gesunden interstitiellen Fibroblasten erhöht (Rodemann et al. 1991). Dieser proliferative Effekt ist in TK173-Zellen unter der sE-cad-Behandlung nachweisbar.

4.3 Effekte des sE-cads auf die E-Cadherin-Expression in MDCK-Zellen

Die E-Cadherin-Expression wurde in MDCK-Zellen untersucht, da diese anders als HK-2- und TK173-Zellen E-Cadherin exprimieren und weitere Untersuchungen am Cadherin-Catenin-Komplex erlauben (Gauthier et al. 1966; Nouwen et al. 1993).

Unter der 72-stündigen sE-cad-Behandlung von MDCK-Zellen waren im Western-Blot eine tendenzielle, nicht signifikante Zunahme der E-Cadherin-Expression nachweisbar. Hierbei waren zwei spezifische Banden bei etwa 130 kDa erkennbar. E-Cadherin ist ein Glykoprotein (Bex et al. 1995). Durch diese posttranslationale Proteinmodifikation kann die relative Molekülmasse zunehmen (Bass et al. 2017). Im Western-Blot wären somit sowohl das glykosylierte als auch das nicht modifizierte Protein erkennbar. Vorstellbar wäre auch die Darstellung des Proproteins des E-Cadherins mit einer relativen Molekülmasse von 135 kDa (Shore und Nelson 1991). Aufgrund der Spezifität des Signals wurden beide Banden als E-Cadherin quantifiziert. In der Immunfluoreszenzfärbung war keine eindeutige Veränderung der E-Cadherin-Expression erkennbar.

Die Arbeitsgruppe um David, Rajasekaran und Inge beobachtete keine Änderungen der Zelladhäsion nach der Behandlung von MDCK-Zellen mit 10 µg/ml sE-cad (Inge et al. 2011; David und Rajasekaran 2012). Inge et al. (2011) beschrieben eine Abnahme der Zelladhäsionen bei einer Behandlung mit 50 bis 100 µg sE-cad. Ryniers et al. (2002) beschreiben hingegen eine Reexpression des E-Cadherins bei längerer Inkubation mit sE-cad.

E-Cadherin gilt traditionell als Tumorsuppressor (Bex et al. 1995). Der Verlust des E-Cadherins geht in den frühen Stadien der Tumorgenese mit einer gesteigerten Invasivität und Metastasierung einher (Chaffer et al. 2007). Im Tiermodell führte eine Hochregulation des E-Cadherins in hochinvasiven Tumorzellen des Nieren- und Brustdrüsenepithels zu einer verminderten Invasivität (Vleminckx et al. 1991). Andererseits wird das E-Cadherin in lokal fortgeschrittenen und metastasierten Karzinomen, wie dem Prostatakarzinom oder dem Ovarialkarzinom, hochreguliert und ist konträr zur gängigen Vorstellung mit einer gesteigerten Invasivität assoziiert (Putzke et al. 2011; Trillsch et al. 2016). E-Cadherin nimmt daher eine duale Rolle in der Tumorgenese ein (Chaffer et al. 2007). Des Weiteren ist die Überexpression des E-Cadherins mit einem Zellzyklusarrest und einer erhöhten Apoptoserate in murinen Zellen assoziiert (Stockinger et al. 2001). Zurückzuführen ist dies auf die zytoplasmatische E-Cadherin-Domäne, welche β -Catenin bindet und dessen transkriptionelle Aktivität negativ reguliert (Stockinger et al. 2001). Die Apoptose ist laut Stockinger et al. (2001) die Folge des persistierenden Zellzyklusarrests. MDCK-Zellen

zeigten unter der sE-cad-Behandlung eine tendenzielle Zunahme der E-Cadherin-Expression und eine signifikante Zunahme der Apoptose. Diese Effekte ähneln somit den Beobachtungen von Stockinger et al. (2001). Da die Zunahme der E-Cadherin-Expression keine Signifikanz aufweist, können auch E-Cadherin-unabhängige Mechanismen dieser Beobachtung zugrunde liegen und erfordern weitere wissenschaftliche Untersuchungen.

4.4 Effekte des sE-cads auf die β -Catenin-Expression in MDCK-Zellen

Das β -Catenin ist ein bedeutendes Protein im kanonischen Wnt-Signalweg (Kikuchi et al. 2006). Es stabilisiert als Teil des Cadherin-Catenin-Komplexes die Zelladhäsion und ist bei nukleärer Translokation als Koaktivator der Transkriptionsfaktoren der TCF-/LEF-Familie an der Transkription zahlreicher Zielgene beteiligt (Nagafuchi und Takeichi 1989; Ozawa et al. 1989; Kikuchi et al. 2006). Dazu zählen u. a. die Gene der Transkriptionsfaktoren *SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST1* und *ZEB1* (Surendran et al. 2005; Hu et al. 2016). Surendran et al. (2005) nehmen an, dass der Wnt-Signalweg synergistische Effekte zum TGF- β -/Smad-Signalweg hat. Der kanonische Wnt-Signalweg ist an der renalen Fibrogenese beteiligt und eine Inhibition dessen ist mit einer verminderten Akkumulation der extrazellulären Matrix assoziiert (He et al. 2009).

β -Catenin reguliert im Komplex mit TCF-4 die Promotoren verschiedener MMPs (Brabletz et al. 1999; Crawford et al. 1999; Takahashi et al. 2002). Auf diese Weise kann eine Aktivierung des Signalwegs um β -Catenin eine Spaltung des E-Cadherins bewirken. Zudem besitzt der *CDH1*-Promotor eine TCF-/ β -Catenin-Bindungsstelle und kann bei Aktivität des Wnt-Signalwegs herunterreguliert werden (Jamora et al. 2003). Das E-Cadherin sequestriert β -Catenin an der Plasmamembran und kann bei Überexpression den Wnt-Signalweg antagonisieren (Orsulic et al. 1999; Lamouille et al. 2014).

Unter der 72-stündigen sE-cad-Behandlung der MDCK-Zellen nahm die β -Catenin-Expression im Western-Blot tendenziell, nicht signifikant ab. In der Immunfluoreszenzfärbung konnte das β -Catenin sowohl in der Kontrolle als auch in der Behandlung an der Plasmamembran lokalisiert werden. Eine nukleäre Translokation konnte nicht beobachtet werden. Die β -Catenin-Expression nahm in der Immunfluoreszenzfärbung nach der sE-cad-Behandlung nicht signifikant ab. Der verwendete Antikörper detektierte laut Herstellerangaben ausschließlich das unphosphorylierte β -Catenin. Das vom Antikörper detektierte β -Catenin ist somit an Zelladhäsionskontakten gebunden oder im kanonischen Wnt-Signalweg aktiv.

Ausgehend von diesen Daten lässt sich folgern, dass die sE-cad-Behandlung weder zur Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs noch zur zytoplasmatischen Akkumulation von β -Catenin führt. In Zusammenschau mit der E-Cadherin-Expression von MDCK-Zellen nach erfolgter sE-cad-Behandlung leitet sich ab, dass die sE-cad-Behandlung bei tendenzieller Zunahme der E-Cadherin-Expression mit einer tendenziellen Abnahme des β -Catenins einhergeht. Das β -Catenin ist hauptsächlich an der Plasmamembran lokalisiert. Maher et al. (2009) beobachteten, dass das an der Plasmamembran sequestrierte β -Catenin membranassoziiert degradiert wird. Sie folgerten daraus, dass das E-Cadherin die Konzentration des β -Catenins vermindert und auf diese Weise den Wnt-Signalweg antagonisiert (Maher et al. 2009). Die sE-cad-Behandlung hat bei verminderter β -Catenin-Expression einen protektiven Effekt auf MDCK-Zellen.

4.5 Effekte des sE-cads auf die Expression von Fibrosemarkern in renalen Zelllinien

4.5.1 Effekte des sE-cads auf die Vimentin-Expression in renalen Zelllinien

Die Expression des Intermediärfilaments Vimentin findet als Fibrosemarker Verwendung (Dihazi et al. 2011). Vimentin wird insbesondere in mesenchymalen Zellen exprimiert (Eckes et al. 2000). Es ist ein hoch konserviertes Protein und moduliert die Zellstabilität, die Zellmotilität und die Migration (Eckes et al. 2000; Buchmaier et al. 2013). Als Intermediärfilament bildet es ein passives Stützgerüst und definiert die Zugfestigkeit der Zelle mit (Buchmaier et al. 2013). Buchmaier et al. (2013) haben vier verschiedene Isoformen des Vimentins beschrieben, welche unabhängig voneinander reguliert werden und unterschiedliche zelluläre Eigenschaften modulieren. Verschiedene zelluläre Stressbedingungen, wie der osmotische Stress oder die Hyperglykämie, induzieren die Expression unterschiedlicher Vimentin-Isoformen *in vitro* (Buchmaier et al. 2013). Die Isoformen unterscheiden sich in ihren Aminosäuresequenzen und relativen Molekülmassen: VIM-IV mit 54 kDa, VIM-III mit 50 kDa, VIM-II mit 48 kDa und VIM-I mit 46 kDa (Buchmaier et al. 2013).

In den hier durchgeführten Experimenten exprimierten alle drei Zelllinien die Isoformen VIM-IV bei 54 kDa und VIM-III bei 50 kDa. Unter der sE-cad-Behandlung dieser Zelllinien wurde die Expression der Vimentin-Isoformen unterschiedlich reguliert: Während in MDCK-Zellen die Expression von VIM-IV tendenziell zunahm, nahm die des VIM-III tendenziell ab. In HK-2-Zellen war VIM-III signifikant unterexprimiert. Die TK173-Zellen zeigten konträre Veränderungen des Vimentins zu den MDCK-Zellen: VIM-IV war

signifikant unterexprimiert, VIM-III tendenziell überexprimiert. In keiner Zelllinie konnte jedoch eine sE-cad-induzierte Über- oder Unterexpression des wichtigen Fibrosemarkers Vimentin nachgewiesen werden.

4.5.2 Effekte des sE-cads auf die *ACTA2*- und *S100A4*-Expression in renalen Zelllinien

Nach der 72-stündigen sE-cad-Behandlung der renalen Zelllinien wurde die relative Genexpression der Fibrose- und Myofibroblastenmarker *S100A4* und *ACTA2* mittels qPCR analysiert. Das von *S100A4* kodierte Protein S100 kalziumbindendes Protein A4 (S100A4) wird auch als Fibroblasten-spezifisches Protein 1 (FSP-1) bezeichnet. Das FSP-1 wurde von Strutz et al. im Jahr 1995 erstmalig als Myofibroblastenmarker, welcher spezifisch in Zellen mesenchymalen Ursprungs nachgewiesen werden konnte, beschrieben. Bei einer tubulointerstitiellen Schädigung mit einhergehender Inflammation beobachteten Strutz et al. (1995) eine *De-novo*-Expression von *FSP1* auch in Tubulusepithelzellen. In keiner Zelllinie zeigten sich Effekte der sE-cad-Behandlung auf die relative Genexpression von *S100A4*. Das Protein α -SMA wird vom *ACTA2*-Gen kodiert. Die relative Genexpression von *ACTA2* nahm unter der sE-cad-Behandlung tendenziell in den serumfreigesetzten und somit gestressten MDCK-Zellen (vgl. 4.1.2) ab und im Gegensatz dazu in TK173-Zellen zu. In HK-2-Zellen war kein Effekt nachweisbar. Diese Ergebnisse waren statistisch nicht signifikant.

Es fällt im Weiteren auf, dass die sE-cad-Behandlung zu tendenziellen Änderungen der relativen Genexpression von *ACTA2*, allerdings nicht von *S100A4* führte. Die Spezifität von α -SMA und FSP-1 ist in der Literatur umstritten: Im Modell der unilateralen ureteralen Obstruktion (UUO) stellte sich keine Koexpression von FSP-1 mit α -SMA oder der 5'-Ektonukleotidase, einem Marker für interstitielle renale Fibroblasten, dar (Grande und López-Novoa 2009). Verschiedene Autoren vermuten, dass FSP-1-positive Zellen keine Myofibroblasten, sondern Leukozyten oder Makrophagen darstellen (Inoue et al. 2005; Picard et al. 2008; Grande und López-Novoa 2009). Diese These beruht auf einer beschriebenen Koexpression von FSP-1 und Makrophagen-Markern (Inoue et al. 2005). In anderen Fibrose-Modellen zeigten Kollagen-produzierende FSP-1-positiven-Zellen keine α -SMA-Expression (Okada et al. 2000). Strutz und Zeisberg (2006) kritisierten α -SMA als einen unspezifischen Myofibroblasten-Marker, da dessen Expression ebenfalls in anderen Zellen mesenchymalen Ursprungs, wie Perizyten oder glatten Muskelzellen der Gefäßwand, beschrieben ist (Okada et al. 2000; Strutz und Zeisberg 2006).

Es wird angenommen, dass FSP-1 und α -SMA heterogene Myofibroblasten-Populationen markieren und die alleinige Betrachtung von FSP-1 oder α -SMA die Zahl der Myofibroblasten unterschätzt (Strutz und Zeisberg 2006; Fragiadaki und Mason 2011). Demnach beeinflusst die sE-cad-Behandlung die α -SMA-positive Myofibroblastenpopulation.

4.5.3 Effekte des sE-cads auf die Expression und Sekretion von extrazellulären Matrixproteinen in renalen Zelllinien

Die renale Fibrose resultiert aus der Dysbalance zwischen der Synthese und dem Abbau der extrazellulären Matrix (Liu 2006). Die extrazelluläre Matrix wird hauptsächlich von aktivierten Fibroblasten und Myofibroblasten synthetisiert (Grande und López-Novoa 2009). Die Zellpopulation der aktivierten Fibroblasten und Myofibroblasten hat einen heterogenen Ursprung (vgl. 1.2.3). Die einzelnen Zellpopulationen unterscheiden sich in der Quantität ihrer extrazellulären Matrixsynthese: Interstitielle Fibroblasten tragen zum größten Teil zur Fibrosierung bei (Picard et al. 2008). Umstritten ist hingegen, ob und wie sehr die vom Tubulusepithel abstammenden Myofibroblasten zur Fibrosierung beitragen (Humphreys et al. 2010; Fragiadaki und Mason 2011). Die exzessive Akkumulation der extrazellulären Matrix im Tubulointerstitium verdrängt im Verlauf das renale Parenchym und vermindert die renale exkretorische Funktion (Zeisberg und Neilson 2010). Die extrazelluläre Matrix einer fibrotischen Niere unterscheidet sich auch qualitativ von der einer gesunden Niere (Strutz und Müller 1999): Zum einen sind die extrazellulären Matrixproteine untereinander quervernetzt, wodurch der proteolytische Abbau erschwert wird (Liu 2006), zum anderen unterscheidet sich die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix einer fibrotischen Niere. Sie besteht aus Kollagen Typ I, Typ III, Typ IV, Typ VI, Fibronectin und Proteoglykanen (Kuncio et al. 1991; Eddy 1996; Grande und López-Novoa 2009; Zeisberg und Neilson 2010). Fibronectin wird als erstes Matrixprotein im Rahmen der renalen Fibrose sezerniert (Eddy 1996). Eddy vergleicht das Fibronectin mit einem Gerüst, welches nach der Sekretion die extrazelluläre Matrix durchzieht und die Anlagerung und Konfiguration weiterer Matrixkomponenten vereinfacht (1996). Des Weiteren sind chemoattraktive Eigenschaften des Fibronectins auf Fibroblasten beschrieben (Gharaee-Kermani et al. 1996).

Nach der 72-stündigen sE-cad-Behandlung waren keine Veränderungen der Fibronectin-Expression der renalen Zelllinien im Western-Blot nachweisbar. Weiterhin waren unter der sE-cad-Behandlung keine eindeutigen Veränderungen der Fibronectin-Sekretion von HK-2- und TK173-Zellen im qualitativen Western-Blot des Zellüberstands erkennbar. Im

Western-Blot des Zellüberstands von MDCK-Zellen nahm die Fibronectin-Sekretion deutlich ab. Es ist in MDCK-Zellen davon auszugehen, dass die sE-cad-Behandlung die Fibronectin-Sekretion bei unveränderter Fibronectin-Expression tendenziell vermindert.

In keiner Zelllinie ergaben sich Hinweise auf eine sE-cad-induzierte Stimulation der Fibronectin-Synthese, einem Kennzeichen der renalen Fibrose (Kuncio et al. 1991).

4.5.4 Effekte des sE-cads auf die Expression von *SNAI1* und *SNAI2* in renalen Zelllinien

Die Zinkfingerproteine *SNAI1* und *SNAI2* gehören zu der Snail Superfamilie (Barrallo-Gimeno und Nieto 2005). Sie nehmen als Transkriptionsfaktoren durch die Induktion der EMT eine zentrale Rolle in der Embryogenese, der Fibrogenese und der Tumordinvasion ein (Barrallo-Gimeno und Nieto 2005; Boutet et al. 2006). *SNAI1* und *SNAI2* verhalten sich funktionell ähnlich (Bolós et al. 2003). In der gesunden menschlichen Niere ist keine Expression von *SNAI1* und *SNAI2* zu beobachten (Boutet et al. 2006). Diese Beobachtung wird mit dem Gen-Silencing von *SNAI1* in der adulten Niere assoziiert (Boutet et al. 2006). In der renalen Fibrose sind die Transkriptionsfaktoren *SNAI1* und *SNAI2* demgegenüber hochreguliert (Boutet et al. 2006). Die Überexpression von *SNAI1* und *SNAI2* induziert die renale Fibrose (Grande und López-Novoa 2009). *SNAI1* und *SNAI2* binden als Repressoren an die E-Box des *CDH1*-Promotors und regulieren so dessen Gentranskription herunter (Batlle et al. 2000; Hajra et al. 2002).

SNAI1 und *SNAI2* agieren *downstream* von TGF- β 1 (Weinberg 2008; Zheng et al. 2009). Die Assoziation zum Wnt-Signalweg und β -Catenin verdeutlicht sich dadurch, dass sich innerhalb des *SNAI2*-Promotors eine Bindestelle für β -Catenin/LEF befindet (Vallin et al. 2001).

Unter der sE-cad-Behandlung nahm die relative Genexpression von *SNAI1* in MDCK-Zellen signifikant ab. Die relative Genexpression von *SNAI2* wurde hingegen nicht signifikant durch die sE-cad-Behandlung beeinflusst. Unter der sE-cad-Behandlung von TK173-Zellen nahm die relative Genexpression von *SNAI1* und *SNAI2* zu. HK-2-Zellen wiesen keine eindeutigen Veränderungen in der Expression der untersuchten Gene auf. Die sE-cad-Behandlung führte zu konträren Veränderungen von MDCK- und TK173-Zellen. Diese Beobachtungen decken sich mit den anderen Ergebnissen dieser Dissertationsarbeit. Sie liefern weitere Hinweise für einen protektiven Effekt des sE-cads auf serumfreigesetzte MDCK-Zellen und einer Aktivierung interstitieller Fibroblasten (TK173-Zellen) durch sE-cad.

4.6 Protektive und schädigende Effekte des sE-cads auf renale Zellen

In Zusammenschau aller Ergebnisse übt das sE-cad eine komplexe Wirkung auf renale Zelllinien aus. In MDCK-Zellen nahm unter der sE-cad-Behandlung die Zellviabilität signifikant ab und ging mit einem Anstieg apoptotischer Zellen im Annexin-V-Apoptose-Assay einher. Der protektive Effekt des sE-cads präsentierte sich in der tendenziellen Zunahme der E-Cadherin-Expression und simultanen Abnahme der β -Catenin-Expression. Zudem nahm die Expression der Fibrosemarker *ACTA2* und *SNAI1* unter der sE-cad-Behandlung tendenziell ab. Weiterhin führte das sE-cad zur Abnahme der Fibronectin-Sekretion.

In HK-2-Zellen nahm die Zellviabilität unter der sE-cad-Behandlung signifikant bei einer Konzentration von 500 ng/ml sE-cad ab. Im Weiteren stellten sich keine eindeutigen Veränderungen der Apoptoserate und der Expression der Fibrosemarker dar. Vorstellbar wäre das Fehlen eines Rezeptors auf HK-2-Zellen, der sE-cad-spezifische Effekte transduziert. Weitere experimentelle Arbeiten sollten deshalb den sE-cad-Rezeptor charakterisieren und dessen Expression in Nierenzellen analysieren. Eine weitere Erklärung ist der Ursprung der HK-2-Zellen aus dem proximalen Tubulusepithel. Dieser zeichnet sich durch eine hohe Reabsorptionskapazität aus und könnte erst bei hohen sE-cad-Konzentrationen mögliche Expressionsänderungen der Fibrosemarker aufweisen (Ziyadeh und Goldfarb 1991).

Die sE-cad-Behandlung der TK173-Zellen bewirkte eine tendenzielle Induktion eines fibrotischen Phänotyps. Im Zellviabilitätsassay konnte eine signifikante sE-cad-induzierte Zellproliferation nachgewiesen werden. Im Weiteren nahm die Expression der Fibrosemarker *ACTA2*, *SNAI1*, *SNAI2* tendenziell zu. Die sE-cad-Behandlung induzierte hingegen keine Fibronectin-Synthese. Im UO-Modell der Fibrose ist eine progressive Differenzierung von interstitiellen Fibroblasten in Myofibroblasten beschrieben, wodurch eine große Heterogenität im Phänotyp der Fibroblasten entsteht (Desmoulière et al. 2005; Picard et al. 2008). Dies lässt vermuten, dass sE-cad synergistisch zu anderen Zytokinen an der Induktion des fibrotischen Phänotyps interstitieller Fibroblasten (hier TK173-Zellen) beteiligt ist. Hinweisend darauf sind auch die morphologischen Veränderungen der TK173-Zellen unter der sE-cad-Behandlung. Die sE-cad-behandelten Zellen nahmen einen fibrotischen Phänotyp mit spindelförmiger Zellmorphologie, wenigen Zellausläufern und einer Verbreiterung des Zytoplasmas an. Die darauffolgende Synthese und Sekretion von

extrazellulären Matrixproteinen könnte in diesem Fall von anderen Zytokinen reguliert werden (Desmoulière et al. 2005).

Weiterhin fällt auf, dass MDCK-Zellen und TK173-Zellen konträr auf die sE-cad-Behandlung reagieren. Craig und Brady-Kalnay (2011) nehmen an, dass sE-cad an unterschiedliche Membranrezeptoren binden kann und so in verschiedenen Zellen unterschiedliche Signalkaskaden aktivieren kann. Diese Annahme setzt voraus, dass sowohl MDCK-Zellen als auch TK173-Zellen einen sE-cad-Rezeptor exprimieren. Howard et al. (2011) beobachteten, dass epitheliale und mesenchymale Zellen unterschiedlich auf die Aktivierung des Wnt-Signalwegs reagierten. Epithelzellen schienen aufgrund ihrer Zellstruktur und starken Zelladhäsionen, resistenter gegenüber Wnt-Signalen zu sein als mesenchymale Zellen (Howard et al. 2011). Analog dazu ist es vorstellbar, dass die sE-cad Behandlung unterschiedliche Signalwege in epithelialen (MDCK, HK-2-Zellen) und mesenchymalen Zellen (TK173) aktiviert und unterschiedliche Reaktionen auslöst.

4.7 Limitationen dieser Arbeit und Ausblick

Die in dieser Dissertationsarbeit durchgeführten *In-vitro*-Experimente belegen eine tendenzielle Wirksamkeit des rekombinanten humanen sE-cads auf renale Zelllinien. Die Wirkung des sE-cads ist in der veröffentlichten Literatur kontrovers beschrieben (Najy et al. 2008; Inge et al. 2011; Brouxhon et al. 2014; Tang et al. 2018). Bedingt ist dies u. a. durch den Einsatz verschiedener Testsubstanzen. Die in der Literatur verwendeten Testsubstanzen sind v. a. rekombinante humane Proteine oder Fc-gekoppelte E-Cadherin-Chimäre (Najy et al. 2008; Inge et al. 2011; Brouxhon et al. 2014; Tang et al. 2018). Najy et al. (2008) vermuten, dass unterschiedliche E-Cadherin-Fragmente unterschiedliche biologische Funktionen haben können. Rekombinante Proteine weisen zwar die benötigte Aminosäuresequenz, wie in dieser Arbeit, auf, eine biologische Aktivität kann allerdings fehlen (Baneyx 1999). Ursächlich dafür ist der einfache Zellaufbau eines Prokaryonten, wodurch eine adäquate Proteinfaltung oder posttranslationale Modifikationen, die die Aktivität des Proteins maßgeblich bestimmen, fehlen (Baneyx und Mujacic 2004; Brooks 2004). Das hier verwendete rekombinante, humane sE-cad wurde in *E. coli* synthetisiert und gefaltet, um das Protein aus den Einschlusskörperchen zu rekonstituieren. Das Protein wurde anschließend chromatographisch aufgereinigt. Das Erreichen einer höhergradigen Proteinstruktur ist nicht beschrieben. Um eine physiologische Proteinaktivität in weiteren *In-vitro*-Experimenten zu gewährleisten, könnte das sE-cad aus dem Patientenurin isoliert und chromatographisch aufgereinigt werden.

Ein weiterer Kritikpunkt dieser Arbeit besteht in der Serumfreisetzung der MDCK-Zellen. Diese ist ein wesentlicher Stressor und proapoptotischer Stimulus der MDCK-Zellen (Zhang et al. 2000). So haben MDCK-Zellen nach einer 96-stündigen Serumfreisetzung bereits unter Kontrollbedingungen eine hohe Apoptoserate mit $38,56 \% \pm 0,70 \%$. Aufgrund dieser Gegebenheit kann das sE-cad protektiv auf MDCK-Zellen wirken. Die Apoptose ist in der Literatur nicht als typischer Stimulus profibrotischer Signalwege, wie TGF- β , beschrieben. Um im weiteren Verlauf eine durch das sE-cad-induzierte Inhibition fibrotischer Signalwege in MDCK-Zellen bzw. distale Tubulusepithelzellen zu beurteilen, ist ein etablierter und gut steuerbarer profibrotischer Faktor *in vitro* notwendig. Vorstellbar wäre in diesem Rahmen eine sE-cad-Behandlung nach erfolgter Zellaktivierung durch TGF- β 1. Weiterhin sollte berücksichtigt werden, dass die hohe Apoptoserate durch die Serumfreisetzung mögliche Effekte des sE-cads maskieren kann. Hier sollten weitere *In-vitro*-Experimente mit anderen Zelllinien, die ebenfalls E-Cadherin exprimieren, durchgeführt werden.

Darüber hinaus erscheint die Translation der in dieser Dissertation erfassten Erkenntnisse in einem *In-vivo*-Modell als sinnvoll. Es stellt sich dabei die zentrale Frage, ob eine exogene Gabe des sE-cads die Progression der diabetischen Nephropathie beeinflusst. Zudem könnte dadurch die Rolle des distalen Tubulusepithels im Rahmen der diabetischen Nephropathie stärker akzentuiert werden, da die Literatur sich neben glomerulären Veränderungen hauptsächlich mit der Bedeutung des proximalen Tubulusepithels in der tubulointerstitiellen Fibrose befasst. Die *In-vitro*-Arbeit erlaubt einen weiteren Bezug des sE-cads in das komplexe Zusammenspiel verschiedener Zytokine und verschiedener Zellpopulationen und ermöglicht weitere Erkenntnisse in der Entstehung und Progression der diabetischen Nierenerkrankung, deren Prävalenz zukünftig weiter ansteigen wird (Vos et al. 2015).

5 Zusammenfassung

Weltweit leiden etwa 470 bis 500 Millionen Menschen an einer chronischen Nierenerkrankung. Diese ist gekennzeichnet durch eine Progression bis zur terminalen Niereninsuffizienz mit eventueller Nierenersatztherapie. Darüber hinaus ist sie ein wesentlicher Risikofaktor für kardiovaskuläre Folgeerkrankungen und ist mit einer erhöhten Mortalität assoziiert. Die chronische Nierenerkrankung ist ein polyätiologisches Krankheitsbild. Eine wesentliche Ursache stellt dabei die diabetische Nephropathie, eine mikrovaskuläre Komplikation des Diabetes mellitus, dar. Trotz einer unterschiedlichen Ätiologie und Pathogenese präsentiert sich die chronische Nierenerkrankung histologisch durch eine zunehmende tubulointerstitielle Fibrose. Diese resultiert aus einer Dysbalance zwischen der Synthese und dem Abbau der extrazellulären Matrix und wird durch einen inflammatorischen Stimulus initiiert.

Um eine Progression zur terminalen Niereninsuffizienz zu vermeiden und das hohe kardiovaskuläre Risiko zu vermindern, bedarf es einer frühzeitigen Intervention. Da die zum Screening einer diabetischen Nephropathie verwendete Mikroalbuminurie bereits mit einer Veränderung der glomerulären Basalmembran einhergeht, bedarf es neuer Biomarker, die eine frühe Intervention rechtfertigen. Erhöhte Urin-Konzentrationen des extrazellulären E-Cadherin-Fragments sE-cad (*soluble E-cadherin*) diskriminieren dabei Patienten mit einem hohen Risiko einer diabetischen Nephropathie und zeigen einen hohen prognostischen Wert. Das sE-cad entsteht durch eine unspezifische proteolytische Spaltung und erhöhte Konzentrationen sind u. a. bei Tumor-, Haut- und Infektionserkrankungen beschrieben. Bei malignen Erkrankungen sind erhöhte Konzentrationen des sE-cads mit einer schlechten Prognose assoziiert.

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurde die Herkunft des Urin-sE-cads untersucht. Zum Nachweis einer E-Cadherin-Spaltung infolge einer Aktivierung proinflammatorischer und -fibrotischer Signalkaskaden wurden MDCK-Zellen mit TGF- β 1 behandelt. Dabei konnte eine TGF- β 1-induzierte Spaltung des E-Cadherins von der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen suggerieren eine Herkunft des sE-cads von geschädigten distalen Tubulusepithelzellen. In einem weiteren Schritt wurde die Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen nach erfolgter Zellaktivierung durch TGF- β 1 nachgewiesen. Die TGF- β 1-induzierte Spaltung des E-Cadherins erfolgt wahrscheinlich durch verschiedene Proteasen.

Im Weiteren wurden mögliche Effekte einer exogenen sE-cad-Behandlung auf renale Zellen untersucht. Verwendet wurden humane proximale Tubulusepithelzellen der Zelllinie HK-2, humane interstitielle Fibroblasten der Zelllinie TK173 und distale Tubulusepithelzellen der Hunde-Zelllinie MDCK. MDCK-Zellen exprimieren als einziger verwendeter Zelltyp E-Cadherin. Die Effekte der sE-cad-Behandlung wurden in den MTT-Zellviabilitäts- und Annexin-V-Apoptose-Assays gemessen. Zudem wurden der Signalweg um β -Catenin wie auch die Expression auf Fibrosemarker analysiert. Experimentell unterscheidet sich diese Arbeit von bisher veröffentlichten Arbeiten durch die niedrige sE-cad-Konzentration bei maximal 500 ng/ml und den verwendeten Zelllinien. Bisher sind keine Effekte des sE-cads auf renale Fibroblasten beschrieben.

Die sE-cad-Behandlung bewirkte in TK173-Zellen eine Zunahme der Zellviabilität und -proliferation, wohingegen die Zellviabilität in Tubulusepithelzellen (HK-2, MDCK) abnahm. Die MDCK-Zellen wiesen als einzige Zelllinie eine Zunahme der Apoptoserate unter der sE-cad-Behandlung auf.

Unter der sE-cad-Behandlung zeigten MDCK-Zellen eine tendenzielle Abnahme der β -Catenin-Expression bei einer simultanen Zunahme der E-Cadherin-Expression auf. Die sE-cad-Behandlung hat bei einer verminderten β -Catenin-Expression einen protektiven Effekt auf MDCK-Zellen.

Untersucht wurde zudem die Expression von Vimentin, Fibronectin, *S100A4*, *ACTA2*, *SNAI1* und *SNAI2* als Fibrosemarker. Die proximalen Tubulusepithelzellen HK-2 zeigten keine eindeutigen Veränderungen unter der sE-cad-Behandlung. MDCK- und TK173-Zellen reagierten gegensätzlich auf die sE-cad-Stimulation: Während serumfreigesetzte und somit gestresste MDCK-Zellen mit der tendenziellen Abnahme der Fibrosemarker (Fibronectin, *ACTA2*, *SNAI1*) reagierten, nahm die Expression einzelner Fibrosemarker in TK173-Zellen tendenziell zu (*ACTA2*, *SNAI1*, *SNAI2*). In TK173-Zellen induziert das sE-cad dementsprechend einen fibrotischen Phänotyp.

6 Anhang

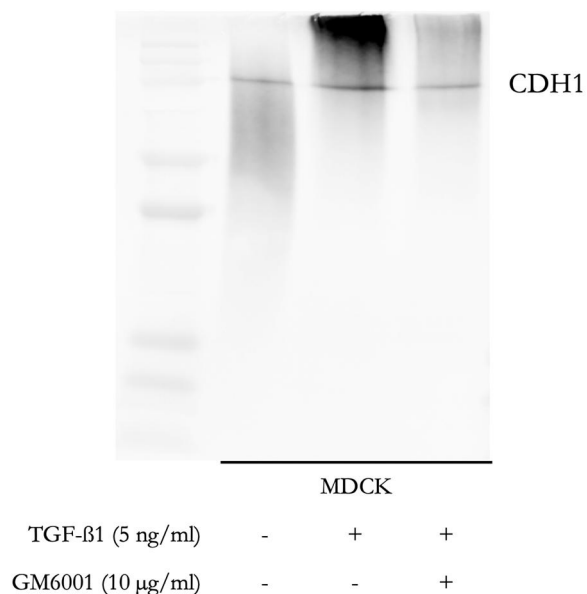


Abbildung A.1: Western-Blot-Analyse extrazellulärer E-Cadherin-Fragmente nach 48-stündiger TGF-β1- und GM6001-Behandlung von MDCK-Zellen. Nach 48-stündiger Behandlung von MDCK-Zellen mit 5 ng/ml aktivem TGF-β1 oder 5 ng/ml TGF-β1/10 μg/ml GM6001 wurde der Zellüberstand gesammelt und nach indirekter Immunpräzipitation im Western-Blot auf extrazelluläre E-Cadherin-Fragmente analysiert.

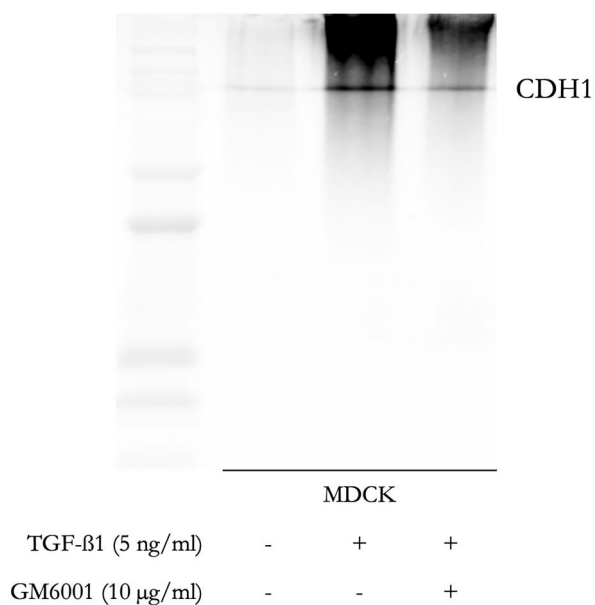


Abbildung A.2: Western-Blot-Analyse extrazellulärer E-Cadherin-Fragmente nach 48-stündiger TGF-β1- und GM6001-Behandlung von MDCK-Zellen. Nach 48-stündiger Behandlung von MDCK-Zellen mit 5 ng/ml aktivem TGF-β1 oder 5 ng/ml TGF-β1/10 μg/ml GM6001 wurde der Zellüberstand gesammelt und nach indirekter Immunpräzipitation im Western-Blot auf extrazelluläre E-Cadherin-Fragmente analysiert.

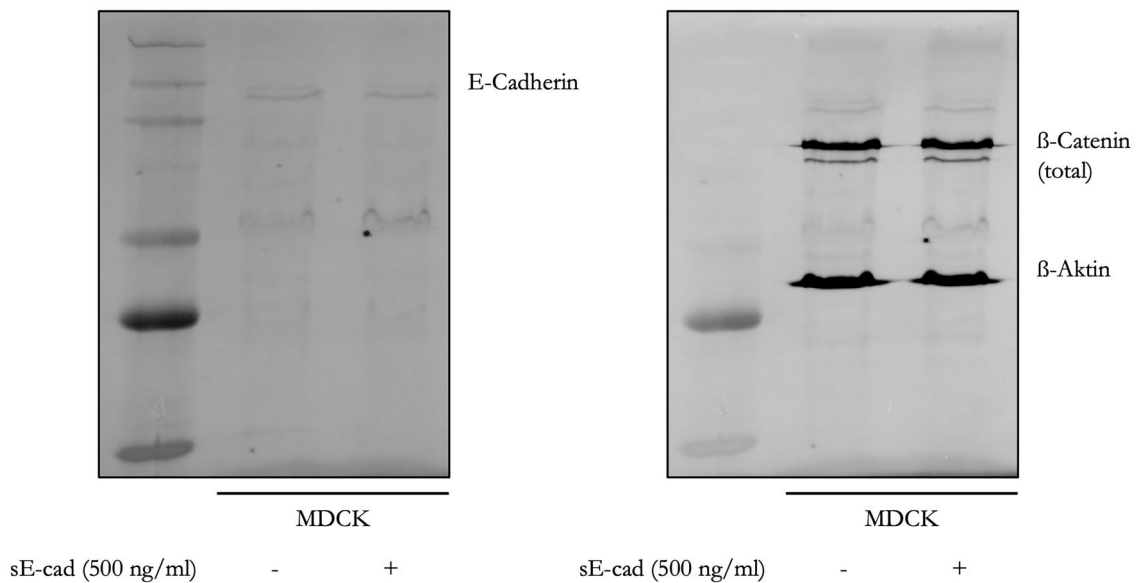


Abbildung A.3: Western-Blot-Analyse von E-Cadherin nach 72-stündiger sE-cad-Behandlung. MDCK-Zellen wurden parallel zu einer serumfreigesetzten Kontrolle mit 500 ng/ml sE-cad behandelt. Durch den Western-Blot des Zellysats wurden das E-Cadherin (links), das totale β -Catenin (rechts) und die Ladekontrolle β -Aktin (rechts) dargestellt.

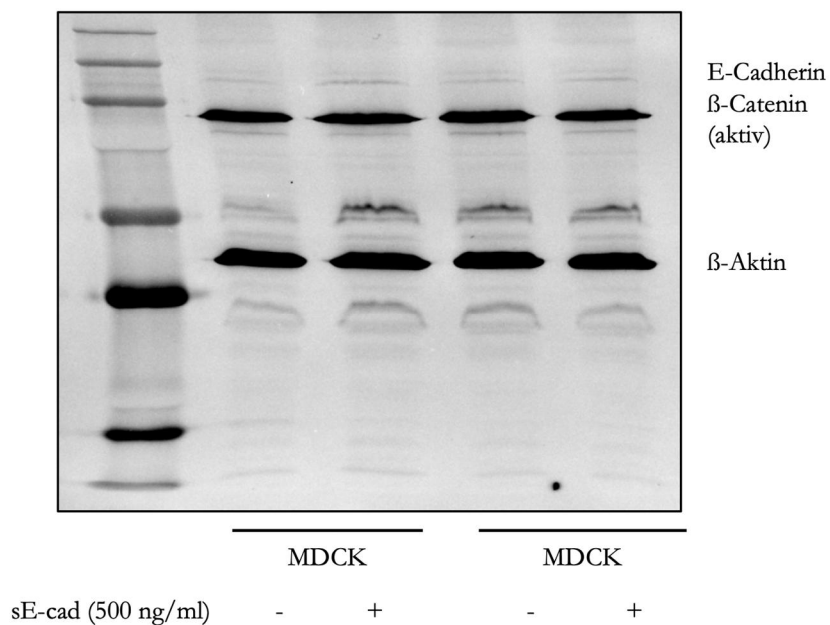


Abbildung A.4: Western-Blot-Analyse von E-Cadherin und aktivem, unphosphoryliertem β -Catenin nach 72-stündiger sE-cad-Behandlung. MDCK-Zellen wurden parallel zu einer serumfreigesetzten Kontrolle mit 500 ng/ml sE-cad behandelt. Durch den Western-Blot des Zellysats wurden das E-Cadherin, das aktive β -Catenin und die Ladekontrolle β -Aktin dargestellt.

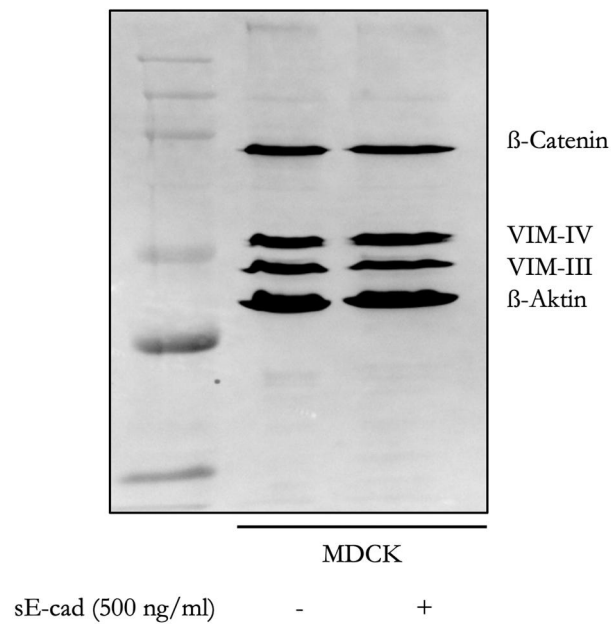


Abbildung A.5: Western-Blot-Analyse von Vimentin und aktivem, unphosphoryliertem β -Catenin nach 72-stündiger sE-cad-Behandlung. MDCK-Zellen wurden parallel zu einer serumfreigesetzten Kontrolle mit 500 ng/ml sE-cad behandelt. Durch den Western-Blot des Zellysats wurden die Vimentin-Isoformen VIM-IV und VIM-III, das aktive β -Catenin und die Ladekontrolle β -Aktin dargestellt.

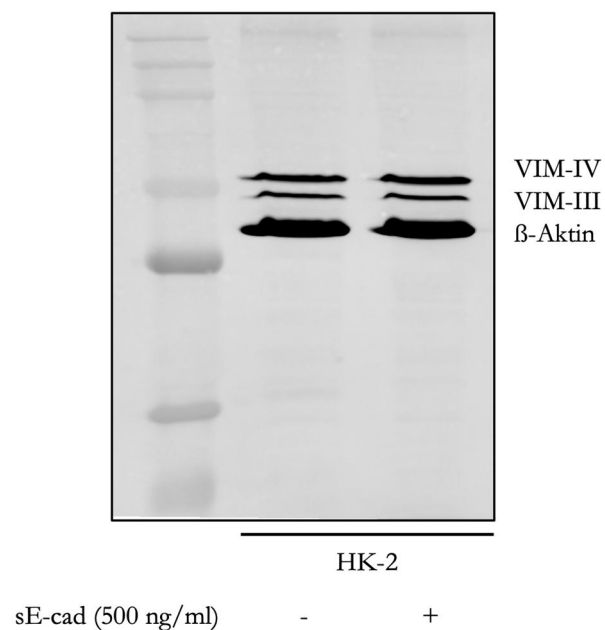


Abbildung A.6: Western-Blot-Analyse von Vimentin nach 72-stündiger sE-cad-Behandlung. HK-2-Zellen wurden parallel zu einer serumfreigesetzten Kontrolle mit 500 ng/ml sE-cad behandelt. Durch den Western-Blot des Zellysats wurden die Vimentin-Isoformen VIM-IV und VIM-III und die Ladekontrolle β -Aktin dargestellt.

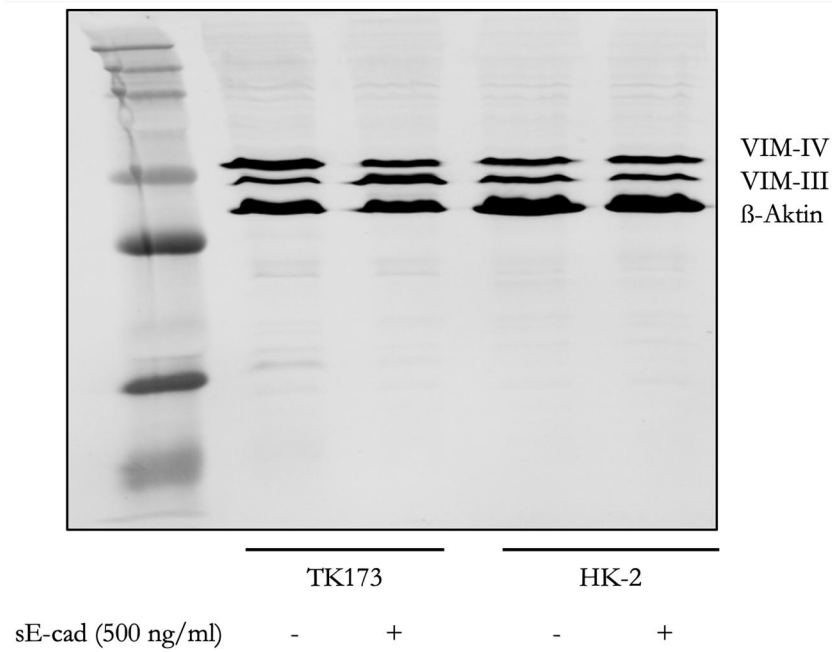


Abbildung A.7: Western-Blot-Analyse von Vimentin nach 72-stündiger sE-cad-Behandlung. TK173- und HK-2-Zellen wurden parallel zu einer serumfreigesetzten Kontrolle mit 500 ng/ml sE-cad behandelt. Durch den Western-Blot des Zelllysats wurden die Vimentin-Isoformen VIM-IV und VIM-III und die Ladekontrolle β -Aktin dargestellt.

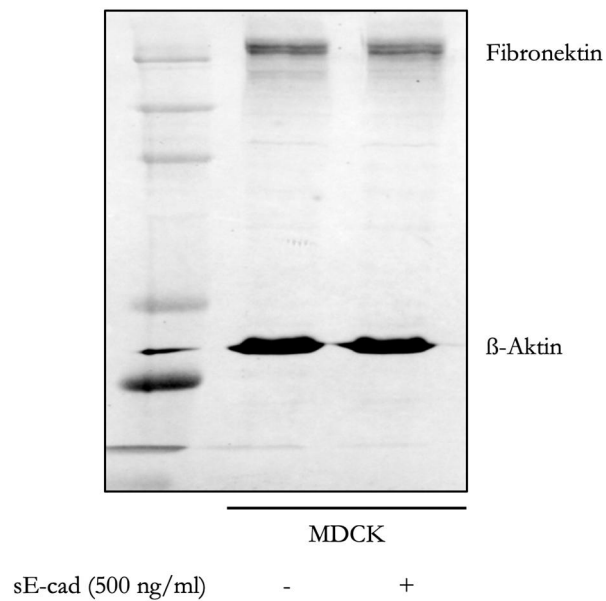


Abbildung A.8: Western-Blot-Analyse von Fibronectin nach 72-stündiger sE-cad-Behandlung. MDCK-Zellen wurden parallel zu einer serumfreigesetzten Kontrolle mit 500 ng/ml sE-cad behandelt. Durch den Western-Blot des Zelllysats wurden das Fibronectin und die Ladekontrolle β -Aktin dargestellt.

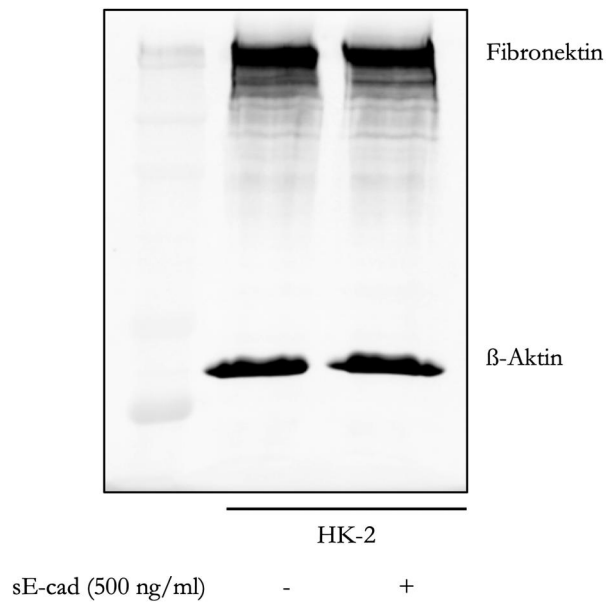


Abbildung A.9: Western-Blot-Analyse von Fibronectin nach 72-stündiger sE-cad-Behandlung. HK-2-Zellen wurden parallel zu einer serumfreigesetzten Kontrolle mit 500 ng/ml sE-cad behandelt. Durch den Western-Blot des Zellysats wurden das Fibronectin und die Ladekontrolle β -Aktin dargestellt.

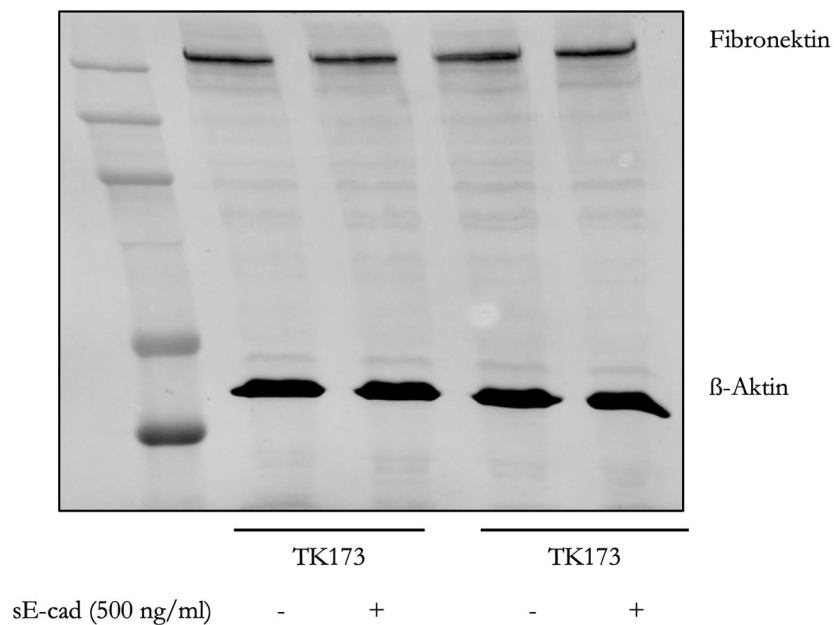


Abbildung A.10: Western-Blot-Analyse von Fibronectin nach 72-stündiger sE-cad-Behandlung. TK173-Zellen wurden parallel zu einer serumfreigesetzten Kontrolle mit 500 ng/ml sE-cad behandelt. Durch den Western-Blot des Zellysats wurden das Fibronectin und die Ladekontrolle β -Aktin dargestellt.

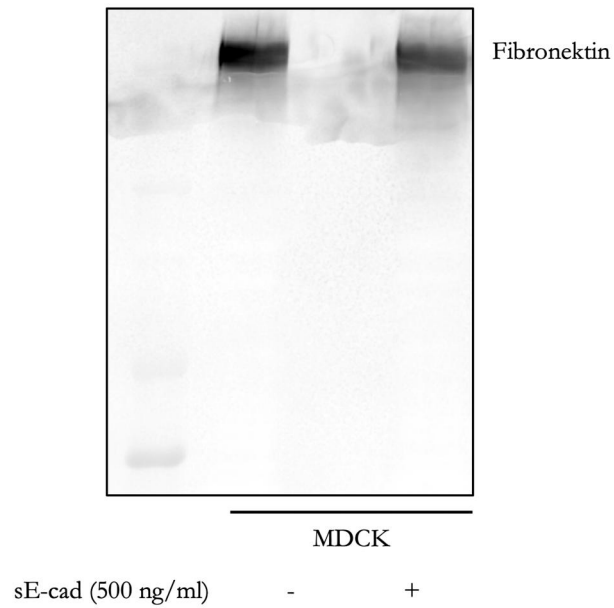


Abbildung A.11: Western-Blot-Analyse von Fibronektin nach 72-stündiger sE-cad-Behandlung. MDCK-Zellen wurden parallel zu einer serumfreigesetzten Kontrolle mit 500 ng/ml sE-cad behandelt. Der Zellüberstand wurde gefällt und im Western-Blot das Fibronektin dargestellt. Da es sich hier um den Zellüberstand handelt, wurde auf eine Ladekontrolle verzichtet.

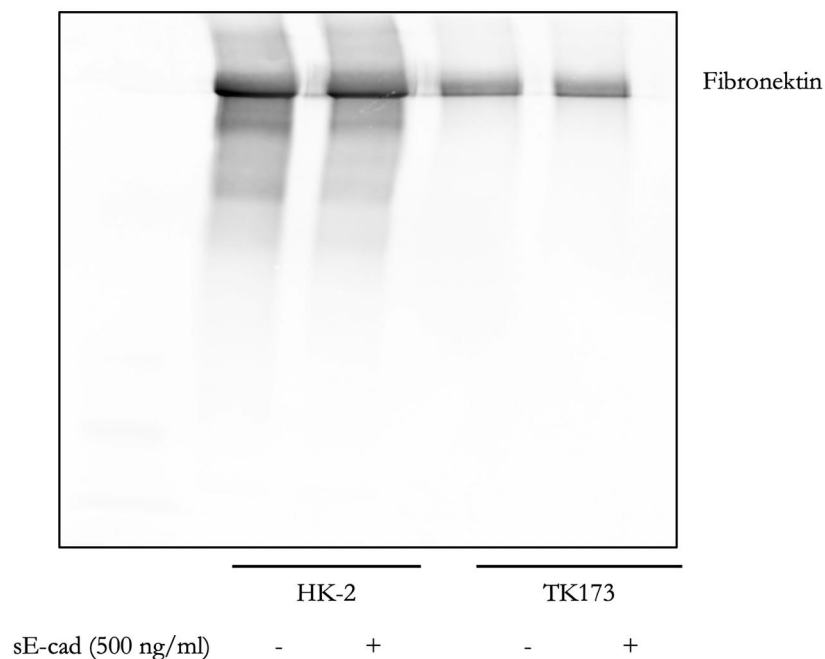


Abbildung A.12: Western-Blot-Analyse von Fibronektin nach 72-stündiger sE-cad-Behandlung. HK-2- und TK173-Zellen wurden parallel zu einer serumfreigesetzten Kontrolle mit 500 ng/ml sE-cad behandelt. Der Zellüberstand wurde gefällt und im Western-Blot das Fibronektin dargestellt. Da es sich hier um den Zellüberstand handelt, wurde auf eine Ladekontrolle verzichtet.

7 Literaturverzeichnis

Adler AI, Stevens RJ, Manley SE, Bilous RW, Cull CA, Holman RR, Group U (2003): Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64). *Kidney Int* 63, 225–232

Alicic RZ, Rooney MT, Tuttle KR (2017): Diabetic kidney disease: challenges, progress, and possibilities. *Clin J Am Soc Nephrol* 12, 2032–2045

Alpers CE, Seifert RA, Hudkins KL, Johnson RJ, Bowen-Pope DF (1993): PDGF-receptor localizes to mesangial, parietal epithelial, and interstitial cells in human and primate kidneys. *Kidney Int* 43, 286–294

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

Anderson S, Meyer TW, Brenner BM (1985): The role of hemodynamic factors in the initiation and progression of renal disease. *J Urol* 133, 363–368

Baneyx F (1999): Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 10, 411–421

Baneyx F, Mujacic M (2004): Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* 22, 1399–1408

Banks RE, Porter WH, Whelan P, Smith PH, Selby PJ (1995): Soluble forms of the adhesion molecule E-cadherin in urine. *J Clin Pathol* 48, 179–180

Barrallo-Gimeno A, Nieto MA (2005): The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* 132, 3151–3161

Bass JJ, Wilkinson DJ, Rankin D, Phillips BE, Szewczyk NJ, Smith K, Atherton PJ (2017): An overview of technical considerations for western blotting applications to physiological research. *Scand J Med Sci Sports* 27, 4–25

Batlle E, Sancho E, Francí C, Domínguez D, Monfar M, Baulida J, García de Herreros A (2000): The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2, 84–89

Berridge MV, Tan AS (1993): Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* 303, 474–482

Berx G, Staes K, van Hengel J, Molemans F, Bussemakers MJG, van Bokhoven A, van Roy F (1995): Cloning and characterization of the human invasion suppressor gene E-cadherin (CDH1). *Genomics* 26, 281–289

- Bolós V, Peinado H, Pérez-Moreno MA, Fraga MF, Esteller M, Cano A (2003): The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci* **116**, 499–511
- Böttlinger EP, Bitzer M (2002): TGF- β signaling in renal disease. *J Am Soc Nephrol* **13**, 2600–2610
- Boutet A, de Frutos CA, Maxwell PH, Mayol MJ, Romero J, Nieto MA (2006): Snail activation disrupts tissue homeostasis and induces fibrosis in the adult kidney. *EMBO J* **25**, 5603–5613
- Brabletz T, Jung A, Dag S, Hlubek F, Kirchner T (1999): β -catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am J Pathol* **155**, 1033–1038
- Brooks SA (2004): Appropriate glycosylation of recombinant proteins for human use: implications of choice of expression system. *Mol Biotechnol* **28**, 241–255
- Brouxhon SM, Kyrkanides S, Teng X, Athar M, Ghazizadeh S, Simon M, O'Banion MK, Ma L (2014): Soluble E-cadherin: a critical oncogene modulating receptor tyrosine kinases, MAPK and PI3K/Akt/mTOR signaling. *Oncogene* **33**, 225–235
- Brownlee M (1995): Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu Rev Med* **46**, 223–234
- 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
- Cavallaro U, Christofori G (2004): Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer* **4**, 118–132
- Cavallaro U, Dejana E (2011): Adhesion molecule signalling: not always a sticky business. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 189–197
- Chaffer CL, Thompson EW, Williams ED (2007): Mesenchymal to epithelial transition in development and disease. *Cells Tissues Organs* **185**, 7–19
- Chomczynski P, Sacchi N (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156–159
- Craig SEL, Brady-Kalnay SM (2011): Cancer cells cut homophilic cell adhesion molecules and run. *Cancer Res* **71**, 303–309
- Crawford HC, Fingleton BM, Rudolph-Owen LA, Goss KJH, Rubinfeld B, Polakis P, Matrisian LM (1999): The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene* **18**, 2883–2891
- Curthoys NP, Moe OW (2014): Proximal tubule function and response to acidosis. *Clin J Am Soc Nephrol* **2**, 1627–1638
- Damsky CH, Richa J, Solter D, Knudsen K, Buck CA (1983): Identification and purification of a cell surface glycoprotein mediating intercellular adhesion in embryonic and adult tissue. *Cell* **34**, 455–466

- Dantzer WH, Layton AT, Layton HE, Pannabecker TL (2014): Urine-concentrating mechanism in the inner medulla: function of the thin limbs of the loops of Henle. *Clin J Am Soc Nephrol* **2**, 1781–1789
- David JM, Rajasekaran AK (2012): Dishonorable discharge: the oncogenic roles of cleaved E-cadherin fragments. *Cancer Res* **72**, 2917–2923
- Desmoulière A, Chaponnier C, Gabbiani G (2005): Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen* **13**, 7–12
- Dihazi H, Müller GA, Lindner S, Meyer M, Asif AR, Oellerich M, Strutz F (2007): Characterization of diabetic nephropathy by urinary proteomic analysis: identification of a processed ubiquitin form as a differentially excreted protein in diabetic nephropathy patients. *Clin Chem* **53**, 1636–1645
- Dihazi H, Dihazi GH, Mueller C, Lahrchi L, Asif AR, Bibi A, Eltoweissy M, Vasko R, Mueller GA (2011): Proteomics characterization of cell model with renal fibrosis phenotype: osmotic stress as fibrosis triggering factor. *J Proteomics* **74**, 304–318
- 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
- Eardley KS, Cockwell P (2005): Macrophages and progressive tubulointerstitial disease. *Kidney Int* **68**, 437–455
- Eckes B, Colucci-Guyon E, Smola H, Nodder S, Babinet C, Krieg T, Martin P (2000): Impaired wound healing in embryonic and adult mice lacking vimentin. *J Cell Sci* **113**, 2455–2462
- Eddy AA (1996): Molecular insights into renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* **7**, 2495–2508
- 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
- Fioretto P, Mauer M (2007): Histopathology of diabetic nephropathy. *Semin Nephrol* **27**, 195–207
- Fragiadaki M, Mason RM (2011): Epithelial-mesenchymal transition in renal fibrosis - evidence for and against. *Int J Exp Pathol* **92**, 143–150
- Frei U, Schober-Halstenberg HJ: Nierenersatztherapie in Deutschland: Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2006/2007. QuaSi-Niere, Berlin 2008
- Gaush CR, Hard WL, Smith TF (1966): Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK). *Proc Soc Exp Biol Med* **122**, 931–935
- Gharaee-Kermani M, Wiggins R, Wolber F, Goyal M, Phan SH (1996): Fibronectin is the major fibroblast chemoattractant in rabbit anti-glomerular basement membrane disease. *Am J Pathol* **148**, 961–967
- Glasscock RJ, Warnock DG, Delanaye P (2017): The global burden of chronic kidney disease: estimates, variability and pitfalls. *Nat Rev Nephrol* **13**, 104–114
- Gofuku J, Shiozaki H, Doki Y, Inoue M, Hirao M, Fukuchi N, Monden M (1998): Characterization of soluble E-cadherin as a disease marker in gastric cancer patients. *Br J Cancer* **78**, 1095–1101

- Grabowska MM, Day ML (2012): Soluble E-cadherin: more than a symptom of disease. *Front Biosci* 17, 1948–1964
- Grande MT, López-Novoa JM (2009): Fibroblast activation and myofibroblast generation in obstructive nephropathy. *Nat Rev Nephrol* 5, 319–328
- Griffiths TRL, Brotherick I, Bishop RI, White MD, McKenna DM, Horne CH, Shenton BK, Neal DE, Mellon JK (1996): Cell adhesion molecules in bladder cancer: soluble serum E-cadherin correlates with predictors of recurrence. *Br J Cancer* 74, 579–584
- Hajra KM, Chen DYS, Fearon ER (2002): The Slug zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer Res* 62, 1613–1618
- He W, Dai C, Li Y, Zeng G, Monga SP, Liu Y (2009): Wnt/ β -catenin signaling promotes renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 20, 765–776
- Hinchliffe SA, Sargent PH, Howard CV, Chan YF, van Velzen D (1991): Human intrauterine renal growth expressed in absolute number of glomeruli assessed by the disector method and Cavalieri principle. *Lab Invest* 64, 777–784
- Hoening MP, Zeidel ML (2014): Homeostasis, the milieu intérieur, and the wisdom of the nephron. *Clin J Am Soc Nephrol* 2, 1272–1281
- Howard S, Deroo T, Fujita Y, Itasaki N (2011): A positive role of cadherin in Wnt/ β -catenin signalling during epithelial-mesenchymal transition. *PLOS ONE* 6, e23899
- Hu C, Sun L, Xiao L, Han Y, Fu X, Xiong X, Xu X, Liu Y, Yang S, Liu F, Kanwar YS (2015): Insights into the mechanisms involved in the expression and regulation of extracellular matrix proteins in diabetic nephropathy. *Curr Med Chem* 22, 2858–2870
- Hu QP, Kuang JY, Yang QK, Bian XW, Yu SC (2016): Beyond a tumor suppressor: soluble E-cadherin promotes the progression of cancer. *Int J Cancer* 138, 2804–2812
- Humphreys BD, Lin SL, Kobayashi A, Hudson TE, Nowlin BT, Bonventre JV, Valerius MT, McMahon AP, Duffield JS (2010): Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Am J Pathol* 176, 85–97
- Inge LJ, Barwe SP, D'Ambrosio J, Gopal J, Lu K, Ryazantsev S, Rajasekaran SA, Rajasekaran AK (2011): Soluble E-cadherin promotes cell survival by activating epidermal growth factor receptor. *Exp Cell Res* 317, 838–848
- Inoue T, Plieth D, Venkov CD, Xu C, Neilson EG (2005): Antibodies against macrophages that overlap in specificity with fibroblasts. *Kidney Int* 67, 2488–2493
- International Diabetes Federation: IDF Diabetes Atlas 2017. 8. Auflage; International Diabetes Federation, Brüssel 2017
- Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG (2002): Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* 110, 341–350
- Jamora C, DasGupta R, Kocieniewski P, Fuchs E (2003): Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial bud development. *Nature* 422, 317–322

- Kalluri R, Weinberg RA (2009): The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* **119**, 1420–1428
- Kanwar YS, Sun L, Xie P, Liu F, Chen S (2011): A glimpse of various pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy. *Annu Rev Pathol* **6**, 395–423
- Katayama M, Hirai S, Kamihagi K, Nakagawa K, Yasumoto M, Kato I (1994): Soluble E-cadherin fragments increased in circulation of cancer patients. *Br J Cancer* **69**, 580–585
- KDIGO CKD Work Group (2013): KDIGO 2012 Clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl* **3**, 1–150
- Kemler R, Hierholzer A, Kanzler B, Kuppig S, Hansen K, Taketo M, de Vries W, Knowles B, Solter D (2004): Stabilization of β -catenin in the mouse zygote leads to premature epithelial-mesenchymal transition in the epiblast. *Development* **131**, 5817–5824
- Kikuchi A, Kishida S, Yamamoto H (2006): Regulation of Wnt signaling by protein-protein interaction and post-translational modifications. *Exp Mol Med* **38**, 1–10
- Koesters R, Kaissling B, Le Hir M, Picard N, Theilig F, Gebhardt R, Glick AB, Hähnel B, Hosser H, Gröne HJ, Kriz W (2010): Tubular overexpression of transforming growth factor- β 1 induces autophagy and fibrosis but not mesenchymal transition of renal epithelial cells. *Am J Pathol* **177**, 632–643
- Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH (1994): Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* **84**, 1415–1420
- Koziolok M, Mueller GA, Dihazi GH, Jung K, Altubar C, Wallbach M, Markovic I, Raddatz D, Karoköse H, Lenz C, et al. (2020): Urine E-cadherin: a marker for early detection of kidney injury in diabetic patients. *J Clin Med* **9**, 639
- Kriz W, Kaissling B, Le Hir M (2011): Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in kidney fibrosis: fact or fantasy? *J Clin Invest* **121**, 468–474
- Kuncio GS, Neilson EG, Haverty T (1991): Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *Kidney Int* **39**, 550–556
- Lamouille S, Xu J, Derynck R (2014): Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 178–196
- LeBleu VS, Taduri G, O’Connell J, Teng Y, Cooke VG, Woda C, Sugimoto H, Kalluri R (2013): Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nat Med* **19**, 1047–1053
- Li JH, Wang W, Huang XR, Oldfield M, Schmidt AM, Cooper ME, Lan HY (2004): Advanced glycation end products induce tubular epithelial-myofibroblast transition through the RAGE-ERK1/2 MAP kinase signaling pathway. *Am J Pathol* **164**, 1389–1397
- Li Y, Kang YS, Dai C, Kiss LP, Wen X, Liu Y (2008): Epithelial-to-mesenchymal transition is a potential pathway leading to podocyte dysfunction and proteinuria. *Am J Pathol* **172**, 299–308
- Lin YC, Chang YH, Yang SY, Wu KD, Chu TS (2018): Update of pathophysiology and management of diabetic kidney disease. *J Formos Med Assoc* **117**, 662–675

- Liu Y (2004): Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol* **15**, 1–12
- Liu Y (2006): Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int* **69**, 213–217
- Liyanage T, Ninomiya T, Jha V, Neal B, Patrice HM, Okpechi I, Zhao M, Lv J, Garg AX, Knight J, et al. (2015): Worldwide access to treatment for end-stage kidney disease: a systematic review. *Lancet* **385**, 1975–1982
- Lovisa S, LeBleu VS, Tampe B, Sugimoto H, Vadrnagara K, Carstens JL, Wu CC, Hagos 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
- Maher MT, Flozak AS, Stocker AM, Chenn A, Gottardi CJ (2009): Activity of the β -catenin phosphodestruction complex at cell-cell contacts is enhanced by cadherin-based adhesion. *J Cell Biol* **186**, 219–228
- Maretzky T, Reiss K, Ludwig A, Buchholz J, Scholz F, Proksch E, de Strooper B, Hartmann D, Saftig P (2005): ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and β -catenin translocation. *Proc Natl Acad Sci* **102**, 9182–9187
- Masterson J, O’Dea S (2007): Posttranslational truncation of E-cadherin and significance for tumour progression. *Cells Tissues Organs* **185**, 175–179
- Matsuyoshi N, Tanaka T, Toda K, Okamoto H, Furukawa F, Imamura S (1995): Soluble E-cadherin: a novel cutaneous disease marker. *Br J Dermatol* **132**, 745–749
- Mezzano S, Aros C, Droguett A, Burgos ME, Ardiles L, Flores C, Schneider H, Ruiz-Ortega M, Egido J (2004): NF- κ B activation and overexpression of regulated genes in human diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* **19**, 2505–2512
- Mills KT, Xu Y, Zhang W, Bundy JD, Chen CS, Kelly TN, Chen J, He J (2015): A systematic analysis of world-wide population-based data on the global burden of chronic kidney disease in 2010. *Kidney Int* **88**, 950–957
- Mosmann T (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**, 55–63
- Mount DB (2014): Thick ascending limb of the loop of Henle. *Clin J Am Soc Nephrol* **2**, 1974–1986
- Müller GA, Frank J, Rodemann HP, Engler-Blum G (1995): Human renal fibroblast cell lines (tFKIF and tNKF) are new tools to investigate pathophysiologic mechanisms of renal interstitial fibrosis. *Exp Nephrol* **3**, 127–133
- Nagafuchi A, Takeichi M (1989): Transmembrane control of cadherin-mediated cell adhesion: a 94 kDa protein functionally associated with a specific region of the cytoplasmic domain of E-cadherin. *Cell Regul* **1**, 37–44
- Najj AJ, Day KC, Day ML (2008): The ectodomain shedding of E-cadherin by ADAM15 supports ErbB receptor activation. *J Biol Chem* **283**, 18393–18401

- Nameta M, Yaoita E, Kato N, Zhao L, Zhang Y, Fujinaka H, Xu B, Yoshida Y, Yamamoto T (2009): Mesangial cells connected by the N-cadherin-catenin system in the rat kidney. *Nephron Exp Nephrol* **112**, 92–98
- Nath KA (1998): The tubulointerstitium in progressive renal disease. *Kidney Int* **54**, 992–994
- National Kidney Foundation (2007): KDOQI Clinical practice guidelines and clinical practice recommendations for diabetes and chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis* **49** (Suppl 2), 12–154
- Nawrocki-Raby B, Gilles C, Polette M, Bruyneel E, Laronze JY, Bonnet N, Foidart JM, Mareel M, Birembaut P (2003): Upregulation of MMPs by soluble E-cadherin in human lung tumor cells. *Int J Cancer* **105**, 790–795
- Neilson EG, McCafferty E, Feldman A, Clayman MD, Zakheim B, Korngold R (1984): Spontaneous interstitial nephritis in kdkd mice. I. An experimental model of autoimmune renal disease. *J Immunol* **133**, 2560–2565
- Noe V, Fingleton B, Jacobs K, Crawford HC, Vermeulen S, Steelant W, Bruyneel E, Matrisian LM, Mareel M (2001): Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J Cell Sci* **114**, 111–118
- Nouwen EJ, Dauwe S, van der Biest I, de Broe ME (1993): Stage- and segment-specific expression of cell-adhesion molecules N-CAM, A-CAM, and L-CAM in the kidney. *Kidney Int* **44**, 147–158
- Okada H, Ban S, Nagao S, Takahashi H, Suzuki H, Neilson EG (2000): Progressive renal fibrosis in murine polycystic kidney disease: an immunohistochemical observation. *Kidney Int* **58**, 587–597
- Orsulic S, Huber O, Aberle H, Arnold S, Kemler R (1999): E-cadherin binding prevents β -catenin nuclear localization and β -catenin/LEF-1-mediated transactivation. *J Cell Sci* **112**, 1237–1245
- Ozawa M, Baribault H, Kemler R (1989): The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J* **8**, 1711–1717
- Parks DR, Lanier LL, Herzenberg LA: Flow cytometry and fluorescence activated cell sorting. In: Herzenberg LA, Weir DM, Blackwell CC, Herzenberg LA (Hrsg.): *Immunochemistry (The Handbook of Experimental Immunology)*. 1. Auflage; Blackwell Scientific Publications, Edinburgh 1986, 1–21
- Pearce D, Soundararajan R, Trimpert C, Kashlan OB, Deen PMT, Kohan DE (2015): Collecting duct principal cell transport processes and their regulation. *Clin J Am Soc Nephrol* **10**, 135–146
- Persson F, Lindhardt M, Rossing P, Parving HH (2016): Prevention of microalbuminuria using early intervention with renin-angiotensin system inhibitors in patients with type 2 diabetes: a systematic review. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* **17**, 1–10
- Picard N, Baum O, Vogetseder A, Kaissling B, Le Hir M (2008): Origin of renal myofibroblasts in the model of unilateral ureter obstruction in the rat. *Histochem Cell Biol* **130**, 141–155
- Pittard AJ, Banks RE, Galley HF, Webster NR (1996): Soluble E-cadherin concentrations in patients with systemic inflammatory response syndrome and multiorgan dysfunction syndrome. *Br J Anaesth* **76**, 629–631

- Pollak MR, Quaggin SE, Hoenig MP, Dworkin LD (2014): The glomerulus: the sphere of influence. *Clin J Am Soc Nephrol* 9, 1461–1469
- Potthoff F, Münscher C, Berendes A, Weber W: Jahresbericht 2017 zur Qualität in der Dialyse. Medical Netcare, Münster 2018
- Protheroe AS, Banks RE, Mzimba M, Porter WH, Southgate J, Singh PN, Bosomworth M, Harnden P, Smith PH, Whelan P, Selby PJ (1999): Urinary concentrations of the soluble adhesion molecule E-cadherin and total protein in patients with bladder cancer. *Br J Cancer* 80, 273–278
- Putzke AP, Ventura AP, Bailey AM, Akture C, Opoku-Ansah J, Çeliktaş M, Hwang MS, Darling DS, Coleman IM, Nelson PS, et al. (2011): Metastatic progression of prostate cancer and E-cadherin. *Am J Pathol* 179, 400–410
- Qi W, Chen X, Poronnik P, Pollock CA (2006): The renal cortical fibroblast in renal tubulo-interstitial fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 38, 1–5
- Remuzzi G, Benigni A, Remuzzi A (2006): Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. *J Clin Invest* 116, 288–296
- Reutens AT (2013): Epidemiology of diabetic kidney disease. *Med Clin North Am* 97, 1–18
- Rodemann HP, Müller GA, Knecht A, Norman JT, Fine LG (1991): Fibroblasts of rabbit kidney in culture. I. Characterization and identification of cell-specific markers. *Am J Physiol* 261, 283–291
- Roy A, Al-bataineh MM, Pastor-Soler NM (2015): Collecting duct intercalated cell function and regulation. *Clin J Am Soc Nephrol* 10, 305–324
- 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
- Ryniers F, Stove C, Goethals M, Brackenier L, Noë V, Bracke M, Vandekerckhove J, Mareel M, Bruyneel E (2002): Plasmin produces an E-cadherin fragment that stimulates cancer cell invasion. *Biol Chem* 383, 159–165
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487–491
- Schainuck LI, Striker GE, Cutler RE, Benditt EP (1970): Structural-functional correlations in renal disease. *Hum Pathol* 1, 631–641
- Schena FP, Gesualdo L (2005): Pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 16 (Suppl 1), 30–33
- Scott RP, Quaggin SE (2015): The cell biology of renal filtration. *J Cell Biol* 209, 199–210
- Sharma K, Ziyadeh FN (1994): The emerging role of transforming growth factor- β in kidney diseases. *Am J Physiol* 266, 829–842
- 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

- Smith AL, Robin TP, Ford HL (2012): Molecular pathways: targeting the TGF- β pathway for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 18, 4514–4521
- Stein JH, Fadem SZ (1978): The renal circulation. *JAMA* 239, 1308–1312
- Steinhusen U, Weiske J, Badock V, Tauber R, Bommert K, Huber O (2001): Cleavage and shedding of E-cadherin after induction of apoptosis. *J Biol Chem* 276, 4972–4980
- Stockinger A, Eger A, Wolf J, Beug H, Foisner R (2001): E-cadherin regulates cell growth by modulating proliferation-dependent β -catenin transcriptional activity. *J Cell Biol* 154, 1185–1196
- Strutz F, Müller GA (1999): Interstitial pathomechanisms underlying progressive tubulointerstitial damage. *Kidney Blood Press Res* 22, 71–80
- Strutz F, Zeisberg M (2006): Renal fibroblasts and myofibroblasts in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 17, 2992–2998
- Strutz F, Okada H, Lo C, Danoff T, Carone RL, Tomaszewski JE, Neilson EG (1995): Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J Cell Biol* 130, 393–405
- Strutz F, Zeisberg M, Hemmerlein B, Sattler B, Hummel K, Becker V, Mueller GA (2000): Basic fibroblast growth factor expression is increased in human renal fibrogenesis and may mediate autocrine fibroblast proliferation. *Kidney Int* 57, 1521–1538
- Strutz F, Zeisberg M, Renziehausen A, Raschke B, Becker V, van Kooten C, Müller GA (2001): TGF- β 1 induces proliferation in human renal fibroblasts via induction of basic fibroblast growth factor (FGF-2). *Kidney Int* 59, 579–592
- Subramanya AR, Ellison DH (2014): Distal convoluted tubule. *Clin J Am Soc Nephrol* 2, 2147–2163
- Surendran K, Schiavi S, Hruska KA (2005): Wnt-dependent β -catenin signaling is activated after unilateral ureteral obstruction, and recombinant secreted Frizzled-related protein 4 alters the progression of renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 16, 2373–2384
- Takahashi M, Tsunoda T, Seiki M, Nakamura Y, Furukawa Y (2002): Identification of membrane-type matrix metalloproteinase-1 as a target of the β -catenin/Tcf4 complex in human colorectal cancers. *Oncogene* 21, 5861–5867
- Takeichi M (1991): Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 251, 1451–1455
- Tampe B (2011): Die Rolle der Bone Morphogenetic Proteins (BMP)-5 und -7 in der humanen Normalniere und der hypertensiven Nephropathie. Med. Diss. Göttingen 2011
- Tang MKS, Yue PYK, Ip PP, Huang RL, Lai HC, Cheung ANY, Tse KY, Ngan HYS, Wong AST (2018): Soluble E-cadherin promotes tumor angiogenesis and localizes to exosome surface. *Nat Commun* 2, 2270
- Titze S, Schmid M, Köttgen A, Busch M, Floege J, Wanner C, Kronenberg F, Eckardt KU, Titze S, Prokosch HU, et al. (2015): Disease burden and risk profile in referred patients with moderate chronic kidney disease: composition of the German Chronic Kidney Disease (GCKD) cohort. *Nephrol Dial Transplant* 30, 441–451

- 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
- Trillsch F, Kuerti S, Eulenburg C, Burandt E, Woelber L, Prieske K, Eylmann K, Oliveira-Ferrer L, Milde-Langosch K, Mahner S (2016): E-cadherin fragments as potential mediators for peritoneal metastasis in advanced epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer* **114**, 213–220
- Unal-Cevik I, Dalkara T (2003): Intravenously administered propidium iodide labels necrotic cells in the intact mouse brain after injury. *Cell Death Differ* **10**, 928–929
- Vallin J, Thuret R, Giacomello E, Faraldo MM, Thiery JP, Broders F (2001): Cloning and characterization of three *Xenopus* Slug promoters reveal direct regulation by Lef/ β -catenin signaling. *J Biol Chem* **276**, 30350–30358
- van den Bossche J, Malissen B, Mantovani A, de Baetselier P, van Ginderachter JA (2012): Regulation and function of the E-cadherin/catenin complex in cells of the monocyte-macrophage lineage and DCs. *Blood* **119**, 1623–1633
- van Roy F (2014): Beyond E-cadherin: roles of other cadherin superfamily members in cancer. *Nat Rev Cancer* **14**, 121–134
- Verhoven B, Schlegel RA, Williamson P (1995): Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J Exp Med* **182**, 1597–1601
- Vleminckx K, Vakaet L, Mareel M, Fiers W, van Roy F (1991): Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* **66**, 107–119
- Vos T, Barber RM, Bell B, Bertozzi-Villa A, Biryukov S, Bolliger I, Charlson F, Davis A, Degenhardt L, Dicker D, et al. (2015): Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* **386**, 743–800
- Weinberg RA (2008): Twisted epithelial-mesenchymal transition blocks senescence. *Nat Cell Biol* **10**, 1021–1023
- Wessel D, Flügge UI (1984): A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* **138**, 141–143
- Wheelock MJ, Buck CA, Bechtol KB, Damsky CH (1987): Soluble 80-kd fragment of Cell-CAM 120/80 disrupts cell-cell adhesion. *J Cell Biochem* **34**, 187–202
- Wiame I, Remy S, Swennen R, Sági L (2000): Irreversible heat inactivation of DNase I without RNA degradation. *BioTechniques* **29**, 252–256
- Wolf G (2004): New insights into the pathophysiology of diabetic nephropathy: from haemodynamics to molecular pathology. *Eur J Clin Invest* **34**, 785–796
- Ying Q, Wu G (2017): Molecular mechanisms involved in podocyte EMT and concomitant diabetic kidney diseases: an update. *Ren Fail* **39**, 474–483
- Zeisberg EM, Potenta SE, Sugimoto H, Zeisberg M, Kalluri R (2008): Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol* **19**, 2282–2287

- Zeisberg M, Neilson EG (2010): Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 21, 1819–1834
- Zhang XJ, Yan J, Cuttle L, Endre Z, Gobé G (2000): Escape from apoptosis after prolonged serum deprivation is associated with the regulation of the mitochondrial death pathway by Bcl-x(l). *Biochem Biophys Res Commun* 277, 487–493
- Zheng G, Lyons JG, Tan TK, Wang Y, Hsu TT, Min D, Succar L, Rangan GK, Hu M, Henderson BR, et al. (2009): Disruption of E-cadherin by matrix metalloproteinase directly mediates epithelial-mesenchymal transition downstream of transforming growth factor- β 1 in renal tubular epithelial cells. *Am J Pathol* 175, 580–591
- Ziyadeh FN, Goldfarb S (1991): The renal tubulointerstitium in diabetes mellitus. *Kidney Int* 39, 464–475
- Zuo JH, Zhu W, Li MY, Li XH, Yi H, Zeng GQ, Wan XX, He QY, Li JH, Qu JQ, et al. (2011): Activation of EGFR promotes squamous carcinoma SCC10A cell migration and invasion via inducing EMT-like phenotype change and MMP-9-mediated degradation of E-cadherin. *J Cell Biochem* 112, 2508–2517

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. rer. nat. H. Dihazi für das Ermöglichen und Betreuen meiner Promotion. Herr Prof. Dr. H. Dihazi begleitete meine Promotion vom ersten Tag an sehr intensiv und nahm sich stets Zeit für ausführliche Diskussionen und Planungen weiterer Experimente. Betonen möchte ich auch die intensive Betreuung während der Verschriftlichung meiner Arbeit. Danken möchte ich nicht nur für den wissenschaftlichen Diskurs, sondern die Möglichkeit, sich ebenfalls über kulturelle, gesellschaftliche und soziale Themen austauschen zu können.

Zudem möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. F. Bremmer für die gute Ko-Betreuung meiner Promotion und die ausführlichen Gespräche mit zahlreichen Vorschlägen bedanken. Ich danke dem Klinikdirektor der Klinik für Nephrologie und Rheumatologie Herrn Prof. Dr. med. M. Zeisberg für die Möglichkeit, in seiner Klinik promovieren zu können. Herrn PD Dr. med. M. Wallbach danke ich für die Beratung vor der Aufnahme der experimentellen Doktorarbeit und die Empfehlung einer Doktorarbeit bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. H. Dihazi.

Weiterhin möchte ich mich bei den medizinisch-technischen Assistenten unserer Arbeitsgruppe Frau C. Decker, Herrn J. Mahrt und Frau S. Hoffmeister bedanken. Hervorheben möchte ich die gute Zusammenarbeit mit Frau C. Decker, die mich in die Methodik einarbeitete und stets meine erste Ansprechpartnerin während der experimentellen Phase war. Ich danke im Weiteren den anderen Doktoranden und Doktorandinnen meiner Arbeitsgruppe: Frau S. Aufmkolk, Frau H. Beißwenger, Frau K. Dietz und Herrn H. Wülfrath.

Ich danke der Studienstiftung des deutschen Volkes für die Förderung während meines Studiums. Besonders danken möchte ich hierbei Frau M. Maly, Frau Dr. phil. D. Trebesius und meinem Vertrauensdozenten Herrn Prof. Dr. T. Hohage.