

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

Proteomische Analyse der Nephrotoxizität im Falle der Cyclosporin A und Tacrolimus Therapie

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Hauke Sebastian Wülfrath

aus
Bremen

Göttingen 2022

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

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

Prüfungskommission

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

Ko-Referent: Prof. Dr. rer. nat. H. Urlaub

Datum der mündlichen Prüfung: 03.05.2023

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Proteomische Analyse der Nephrotoxizität im Falle der Cyclosporin A und Tacrolimus Therapie" 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:

Dihazi GH, Eltoweissy M, Jahn O, Tampe B, Zeisberg M, **Wülfrath HS**, Müller GA, Dihazi H (2020): The Secretome Analysis of Activated Human Renal Fibroblasts Revealed Beneficial Effect of the Modulation of the Secreted Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerase A in Kidney Fibrosis. *Cells* **9**, 1724

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung	1
1.1 Anfänge und Problematik der Organtransplantation	1
1.2 Calcineurininhibitoren – Cyclosporin A und Tacrolimus.....	2
1.3 CNI-Nephrotoxizität	4
1.4 Nierenfibrose	5
1.5 Faltung von Proteinen und die ER-Stress Proteine GRP78, ERp57 und CALR	6
1.6 ER-Stress und der UPR-Signalweg.....	7
1.7 Fragestellung und Zielsetzung.....	9
2 Material und Methoden	10
2.1 Material.....	10
2.1.1 Antikörper	10
2.1.2 Chemikalien.....	10
2.1.3 Geräte	11
2.1.4 Nukleinsäuren	12
2.1.5 Proteine und Enzyme	14
2.1.6 Software	14
2.1.7 Verbrauchsmaterialien	14
2.1.8 Zelllinien	15
2.2 Methoden.....	16
2.2.1 Zellkultur	16
2.2.2 Behandlung mit Calcineurininhibitoren.....	16
2.2.3 Einfluss der CNI-Behandlung auf das Zellüberleben und Proliferation: MTT Viabilitätstest	17
2.2.4 Das Ernten der Zellen und Proteinextraktion.....	18
2.2.5 Proteinbestimmung (Bradford).....	18
2.2.6 Herstellung von Polyacrylamidgelen	19
2.2.7 Die Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE).....	19
2.2.8 Western Blot.....	20
2.2.9 Antikörpervermittelte Darstellung von Proteinen	21
2.2.10 In-Gel-Verdau.....	21
2.2.11 Massenspektrometrie und Identifikation der Proteine.....	22
2.2.12 Transfektion	23
2.2.13 Durchflusszytometrie (<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> : FACS)	24
3 Ergebnisse.....	26
3.1 Einfluss von CNI auf die Zellviabilität.....	26
3.1.1 Zellviabilität von HK-2 unter CNI Behandlung	26
3.1.2 Zellviabilität von TK-173 unter CNI Behandlung.....	28
3.2 Proteomische Analyse.....	30

3.2.1	Einfluss der CsA-Behandlung auf das Proteom der Nierenzellen	34
3.2.2	Einfluss der TAC-Behandlung auf das Proteom der Nierenzellen	43
3.3	Western-Blot Analyse der Rolle der ER-Stress Proteine in der CNI-Therapie.....	52
3.3.1	Einfluss der CNI-Behandlung auf die Expression von GRP78	52
3.3.2	Einfluss der CNI-Behandlung auf die Expression von ERp57	53
3.3.3	Einfluss der CNI-Behandlung auf die Expression von CALR.....	55
3.4	Einfluss der Regulierung der ERp57 und CALR Expression auf die Zellreaktion auf CNI Behandlung.....	57
3.4.1	Der Effekt der ERp57 Expressionsregulation auf die Zellantwort auf die CNI TAC und CsA	57
3.4.2	Der Effekt der CALR Expressionsregulation auf die Zellantwort auf die CNI TAC und CsA	62
4	Diskussion.....	67
4.1	Auswahl der Versuchsmaterialien.....	67
4.2	Toxische Wirkung von CNI auf HK-2 und TK-173.....	67
4.3	Auswirkungen der CNI-Behandlung auf das Proteom von HK-2.....	69
4.4	Regulierung von ER-Stress Proteinen unter CNI-Therapie.....	71
4.5	Rolle der ER-Stressproteine ERp57 und CALR in der CNI-Nephrotoxizität.....	73
5	Zusammenfassung.....	76
6	Anhang	77
7	Literaturverzeichnis	117

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chemische Struktur von Cyclosporin A.....	2
Abbildung 2: Chemische Struktur von Tacrolimus	3
Abbildung 3: Wirkmechanismen der Calcineurininhibitoren.....	4
Abbildung 4: Der UPR-Signalweg.....	8
Abbildung 5: Das Plasmid pcDNA3.1 (Invitrogen), welches für die Transfektion des ERp57-Gens verwendet wurde.....	13
Abbildung 6: Das Plasmid pCMV2-Flag, welches für die Transfektion des CALR-Gens verwendet wurde.....	13
Abbildung 7: Zusammenstellung des Western Blot Sandwiches.....	20
Abbildung 8: Viabilität von HK-2 Zellen nach 48 h CsA-Behandlung.....	26
Abbildung 9: Viabilität von HK-2 Zellen nach 48 h TAC-Behandlung.....	27
Abbildung 10: Viabilität von TK-173 Zellen nach 48 h CsA-Behandlung.....	28
Abbildung 11: Viabilität von TK-173 Zellen nach 48 h TAC-Behandlung.....	29
Abbildung 12: Polyacrylamidgel vor dem Ausstanzen.....	30
Abbildung 13: Verteilung identifizierter Proteine.....	31
Abbildung 14: STRING-Netzwerk der Proteine, die exklusiv in der mit CsA behandelten Probe identifiziert wurden.....	31
Abbildung 15: STRING-Netzwerk der Proteine, die exklusiv in der mit TAC behandelten Probe identifiziert wurden.....	32
Abbildung 16: STRING-Netzwerk der Proteine, die in der mit CsA und der mit TAC behandelten Probe identifiziert wurde, nicht jedoch in der unbehandelten Kontrolle.....	33
Abbildung 17: STRING-Netzwerk der Proteine, die exklusiv in der unbehandelten Kontrolle identifiziert wurden.....	34
Abbildung 18: Volcano Plot der Proteine in der mit CsA behandelten Probe im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle.....	34
Abbildung 19: Regulierte Signalwege nach CsA Behandlung 1/3.....	36
Abbildung 20: Regulierte Signalwege nach CsA Behandlung 2/3.....	37
Abbildung 21: Regulierte Signalwege nach CsA Behandlung 3/3.....	38
Abbildung 22: IPA Toxizitätsanalyse der proteomischen Daten von HK-2 nach CsA Behandlung.....	39
Abbildung 23: CsA reguliert zelluläre Immunantwort, zelluläre Fortbewegung, hämatologische Entwicklung und Funktion.....	40
Abbildung 24: CsA reguliert Zelltod und -überleben, Zellmorphologie, renale Nekrose/Zelltod.....	41
Abbildung 25: CsA reguliert Zellzyklus, Zelltod und -überleben, embryonale Entwicklung... ..	42
Abbildung 26: Volcano Plot der Proteine in der mit TAC behandelten Probe im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle.....	43
Abbildung 27: Regulierte Signalwege nach TAC-Behandlung Teil 1/4.....	44
Abbildung 28: Regulierte Signalwege nach TAC-Behandlung Teil 2/4.....	45
Abbildung 29: Regulierte Signalwege nach TAC-Behandlung Teil 3/4.....	46
Abbildung 30: Regulierte Signalwege nach TAC-Behandlung Teil 4/4.....	47
Abbildung 31: IPA Toxizitätsanalyse der proteomischen Daten von HK-2 nach TAC-Behandlung.....	48
Abbildung 32: TAC reguliert Zellgefährdung, Gastrointestinale Erkrankungen, Lebererkrankungen.....	49

Abbildung 33: TAC reguliert Zelltod und -überleben, Zellsignalisierung, Zell-zu-Zell Signalisierung und Interaktion.	50
Abbildung 34: TAC reguliert Zelltod und -überleben, zelluläre Funktion und Instandhaltung, DNA-Replikation, -Rekombination und -Reparatur.....	50
Abbildung 35: TAC reguliert Krebs, Zelltod und -überleben, Infektionskrankheiten.....	51
Abbildung 36: Western-Blot von HK-2 mit GRP78 Antikörper.	52
Abbildung 37: Western-Blot von TK-173 mit GRP78 Antikörper.....	53
Abbildung 38: Western-Blot von HK-2 mit ERp57 Antikörper.....	53
Abbildung 39: Western-Blot von TK-173 mit ERP57 Antikörper.	54
Abbildung 40: Western-Blot von HK-2 mit CALR Antikörper.	55
Abbildung 41: Western-Blot von TK-173 mit CALR Antikörper.	55
Abbildung 42: Western-Blot Kontrolle der Transfektionen von HK-2 mit ERp57.	57
Abbildung 43: Durchflusszytometrie von ERp57-transfizierten HK-2, behandelt mit TAC....	59
Abbildung 44: Durchflusszytometrie von ERp57-transfizierten HK-2, mit CsA behandelt....	61
Abbildung 45: Western-Blot Kontrolle der Transfektionen von HK-2 mit CALR.	62
Abbildung 46: Durchflusszytometrie von CALR-transfizierten HK-2, mit TAC behandelt....	64
Abbildung 47: Durchflusszytometrie von CALR-transfizierten HK-2, mit CsA behandelt.....	66

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Antikörper.....	10
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien	10
Tabelle 3: Verwendete Geräte	11
Tabelle 4: Verwendete Proteine und Enzyme.....	14
Tabelle 5: Verwendete Software.....	14
Tabelle 6: Verwendete Verbrauchsmaterialien	14
Tabelle 7: Verdünnungen der Stammlösungen (50 mM) im Zellkulturmedium	17
Tabelle 8: Pipettierschema zur Erstellung einer BSA-Eichkurve	19
Tabelle 9: Pipettierschema zur Herstellung von Trenn- und Sammelgelen.....	19
Tabelle 10: Nukleinsäuren für die Transfektion	23
Tabelle 11: Pipettierschema Durchflusszytometrie.....	24
Tabelle 12: Zahlenwerte des MTT-Tests HK-2 mit CsA	27
Tabelle 13: Zahlenwerte MTT HK-2 TAC	28
Tabelle 14: Zahlenwerte MTT TK-173 CsA.....	29
Tabelle 15: Zahlenwerte MTT TK-173 TAC.....	30
Tabelle 16: Zahlenwerte der früh apoptotischen HK-2 nach Behandlung mit TAC.....	59
Tabelle 17: Zahlenwerte der früh apoptotischen HK-2 nach Behandlung mit CsA.....	61
Tabelle 18: Zahlenwerte der früh apoptotischen HK-2 nach Behandlung mit TAC.....	64
Tabelle 19: Zahlenwerte der früh apoptotischen HK-2 nach Behandlung mit CsA.....	66

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATF	<i>Activating Transcription Factor</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
C-	Carboxy-
CALR	Calreticulin
CsA	Cyclosporin A
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERp	Endoplasmatisches Retikulum Protein
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
fdr	<i>False Detection Rate</i>
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSGS	Fokal-segmentale Glomerulosklerose
IAA	Iodacetamid
IL-2	Interleukin-2
IL-13	Interleukin-13
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PERK	Protein Kinase R (PKR)- <i>Like Endoplasmic Reticulum Kinase</i>
PI	Propidiumiodid
PKR	Protein Kinase R
TAC	Tacrolimus
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
siRNA	<i>Small Interfering Ribonucleic Acid</i>
STRING	<i>Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>

1 Einleitung

1.1 Anfänge und Problematik der Organtransplantation

Die erste erfolgreiche Transplantation eines menschlichen Organs, einer Niere, gelang 1954 Dr. Joseph Murray und Dr. John Merrill in Boston. Spender und Empfänger waren die eineiigen Zwillinge Ronald und Richard Herrick (Merrill et al. 1956). Für eine erfolgreiche Transplantation zwischen genetisch unterschiedlichen Individuen brauchte es jedoch, um eine Abstoßung seitens des Empfängers zu verhindern, eine effektive Immunsuppression. Die subletale Ganzkörperbestrahlung der Transplantationspatienten erwies sich dafür rückblickend als konzeptioneller Beweis (Linden 2009). Sie selbst stellte kein geeignetes Mittel dar. In einer von Murray und Merrill durchgeführten Studie starben neun von zehn bestrahlten Patienten innerhalb weniger Tage, jedoch nicht auf Grund einer Abstoßungsreaktion, sondern an den Folgen der Bestrahlung (Murray et al. 1960).

Zeitgleich erfolgte die Entdeckung gleich mehrerer Pharmaka als potenzielle Immunsuppressiva. So vermeldeten Calne und Zukoski, dass eine Abstoßungsreaktion bei Nierentransplantationen in Hunden mit 6-Mercaptopurin verhindert werden konnte (Calne 1960; Zukoski et al. 1960). Außerdem zeigten Cyclophosphamid und Methotrexat in Kombination mit Prednison eine Verlängerung der abstoßungsfreien Überlebenszeit nach Nierentransplantation (Goodwin et al. 1963). Auch Prednison als Monotherapie konnte eine Abstoßung hinauszögern (Zukoski et al. 1963). Hohe Dosen von 200 mg/d Prednison in Kombination mit der dauerhaften Gabe von Azathioprin konnten gar eine Umkehrung der Abstoßungsreaktion zeigen (Marchioro et al. 1964). Azathioprin gilt als *prodrug* und wird im Körper zu 6-Mercaptopurin umgewandelt (Elion 1993). Diese Funde führten dazu, dass in den Vereinigten Staaten von Amerika und Europa mehrere Transplantationszentren eingerichtet wurden und die Organtransplantation Einzug hielt in die klinische Medizin (Starzl 2001; Linden 2009).

Den wichtigsten Schritt in der immunsuppressiven Pharmakotherapie bei Transplantationspatienten stellen die Einführung der Calcineurininhibitoren (CNI) Cyclosporin A (CsA) in 1983, und später Tacrolimus (TAC), Anfang der 1990er Jahre, (s.a. 1.2 Calcineurininhibitoren) dar (Linden 2009). Unter Behandlung mit CNI wurde eine 1-Jahresüberlebensrate der Spenderniere von 89,5% in Nierentransplantationspatienten beobachtet, gegenüber einer 1-Jahresüberlebensrate von 50% in Patienten, die Azathioprin als Immunsuppressivum erhielten (Rosenthal et al. 1983).

Heute ist die Organtransplantation und daraus resultierend die pharmakologische Immunsuppression gängige klinische Praxis. So wurden seit 1963 in Deutschland 135.312 Organe transplantiert. In den Jahren 2012 bis 2017 waren es zwischen 2.765 und 3.706 pro

Jahr (DSO Jahresbericht). Bei allen Patienten mit einem transplantierten Organ – z. B. der Niere - ist lebenslang eine immunsuppressive Therapie indiziert (Kasiske et al. 2009). In 2017 enthielt diese immunsuppressive Therapie in den U.S.A. - nach Nierentransplantation - in 90,5 % der Fälle einen Calcineurininhibitor (Hart et al. 2019).

1.2 Calcineurininhibitoren – Cyclosporin A und Tacrolimus

Calcineurin ist eine Serin-/Threoninphosphatase eukaryotischer Zellen, welche erstmals Ende der 1970er Jahre beschrieben wurde (Wang und Desai 1976; Watterson und Vanaman 1976; Klee und Krinks 1978). Calcineurin, ein Heterodimer, setzt sich aus einer katalytischen (Calcineurin A) und einer regulatorischen (Calcineurin B) Domäne zusammen (Klee et al. 2006). Als Serin/Threoninphosphatase ist Calcineurin in diverse Signalwege innerhalb der Zelle involviert, darunter die Aktivierung des *Nuclear Factor of Activated T-Cells* (NFAT) (Flanagan et al. 1991) und sukzessive die Bildung von Interleukin 2 (IL-2) in der zellulären Immunantwort (Shaw et al. 1988). IL-2 führt bei T-Zellen, die einen IL-2-Rezeptor exprimieren, zur Proliferation (Schreier et al. 1980). Auf Grund dieser Eigenschaft wird IL-2 auch als T-Zell-Wachstumsfaktor (*t-cell growth factor*) bezeichnet. Calcineurin ist in seiner Funktion abhängig von Ca^{2+} und Calmodulin (Klee et al. 1979). Mit Cyclosporin A (CsA) und Tacrolimus (TAC) existieren zwei wirksame Inhibitoren von Calcineurin. Entdeckt wurde CsA und seine immunsuppressiven Eigenschaften in einem Labor um F. Borel des Pharmakonzerns Sandoz (heute Teil von Novartis) (Borel 1976). CsA, welches aus dem Pilz *Tolypocladium inflatum Gams* gewonnen wird, ist ein neutrales, lipophiles, zyklisches Peptid, bestehend aus elf Aminosäuren (AS) (Kahan 1989). Abbildung 1 zeigt seine chemische Struktur.

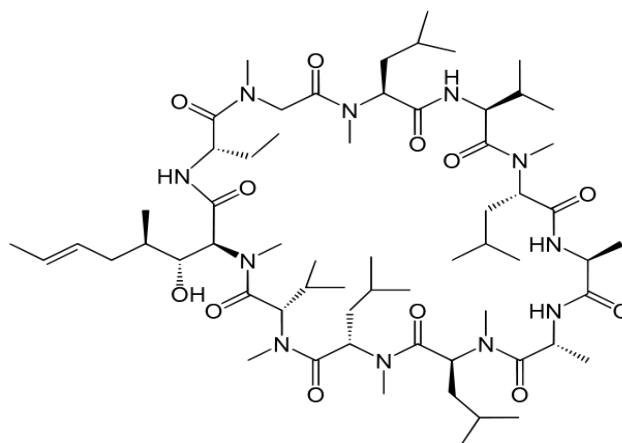


Abbildung 1: Chemische Struktur von Cyclosporin A

Seine immunsuppressive Wirkung entfaltet CsA indem es reversibel die von T-Zellen vermittelte Immunantwort inhibiert (Borel 1976). Vorrangig ist hier die namensgebende Inhibition von Calcineurin (s.o.). CsA bindet Immunophiline wie Cyclophilin [auch bekannt

als Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase (PPI)] (Handschumacher et al. 1984) und zusammen verhindern sie die Phosphataseaktivität von Calcineurin (Liu et al. 1991). Das inhibierte Calcineurin ist nicht länger in der Lage NFAT zu dephosphorylieren, was zur Folge hat, dass NFAT nicht in den Nukleus transloziert (Flanagan et al. 1991). CsA inhibiert die Bildung von IL-2 somit schon auf der Transkriptionsebene (Krönke et al. 1984; Herold et al. 1986).

Bei TAC, auch bekannt als FK506, handelt es sich um ein Makrolid, welches aus *Streptomyces Tsukubaensis* isoliert werden kann (Kino et al. 1987). Abbildung 2 zeigt seine chemische Struktur.

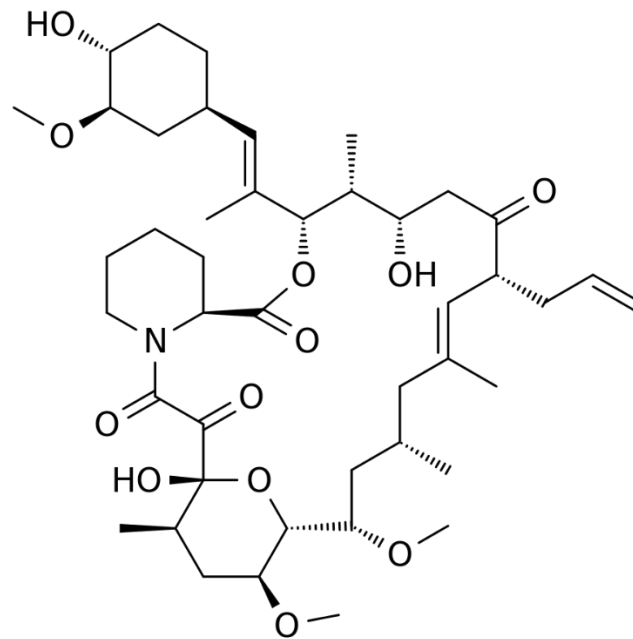


Abbildung 2: Chemische Struktur von Tacrolimus

Wie CsA entfaltet TAC seine immunsuppressive Wirkung durch die Inhibition von Calcineurin. Es bindet dazu allerdings FK506 bindende Proteine (FKBP), welche, wie Cyclophilin, Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase-Aktivität besitzt (Harding et al. 1989). TAC, FKBP12, Calmodulin, Ca^{2+} und Calcineurin formen einen Komplex, in welchem die Phosphataseaktivität des Calcineurin aufgehoben ist (Thomson et al. 1995). Abbildung 3 gibt eine Übersicht über die Wirkmechanismen von TAC und CsA.

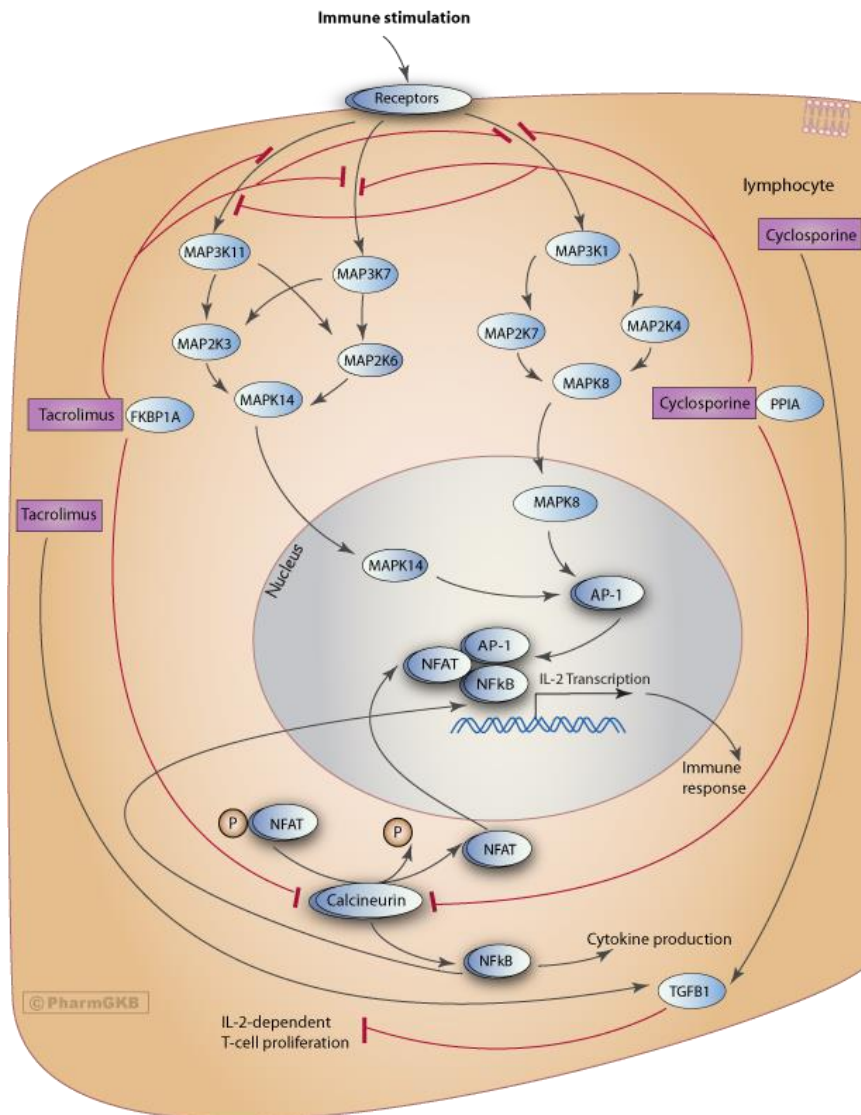


Abbildung 3: Wirkmechanismen der Calcineurininhibitoren (Barbarino et al. 2013) Lizenz: CC-BY-SA 4.0

Wie Abbildung 3 zeigt, wirken CsA und TAC nicht nur über die Inhibition von Calcineurin. Ebenso greifen sie in verschiedene *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK)-Wege ein, was zur immunsuppressiven Wirkung beiträgt (Matsuda et al. 2000; Jeffrey et al. 2007). Eine weitere Wirkung der CNI ist die Aktivierung von *Transforming Growth Factor beta* (TGF- β) (Shin 1998; Bennett et al. 2016), welcher eine entscheidende Rolle in der Entstehung der Nierenfibrose spielt (s. 1.4). Die gesteigerte Expression von TGF- β findet sowohl in renalen Tubulus Zellen, als auch in tubulointerstitiellen Fibroblasten statt (Wolf et al. 1995). Die Nierenfibrose ist entscheidender Teil der wichtigsten unerwünschten Arzneimittelwirkung (UAW) von CsA und TAC – der Calcineurininhibitor-Nephrotoxizität (s. 1.3).

1.3 CNI-Nephrotoxizität

Nephrotoxizität wird als unerwünschte Arzneimittelwirkung (UAW) sowohl bei der Cyclosporin A- (Calne et al. 1978), als auch bei der Tacrolimus-Therapie beobachtet (Neuhaus et

al. 1994; Laskow et al. 1996). Die nephrotoxische Wirkung der beiden Medikamente ähnelt sich so sehr, dass von einem Wirkstoffgruppeneffekt ausgegangen wird (Williams und Haragsim 2006) und im Folgenden nur noch von CNI-Nephrotoxizität gesprochen wird.

Die CNI-Nephrotoxizität beruht auf einer hämodynamisch bedingten, potentiell reversiblen „akuten CNI-Nephrotoxizität“ (Klintmalm et al. 1981) und einer progredienten, irreversiblen „chronischen CNI-Nephrotoxizität“ (Myers et al. 1984; Myers und Newton 1991).

Die „akute CNI-Nephrotoxizität“ ist bedingt durch einen verminderten Blutfluss in der Niere (Murray et al. 1985). Dies kommt durch eine Vasokonstriktion sowohl des Vas afferens, als auch des Vas efferens der Glomeruli zustande, welche zu einer Reduktion der glomerulären Filtrationsrate (GFR) führt (Barros et al. 1987; English et al. 1987). Zu den Mediatoren der Vasokonstriktion gehören die vermehrte Sekretion von Endothelin (Lanese und Conger 1993) sowie die verminderte Bildung vasodilatatorischer Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO) und Prostaglandinen (De Nicola et al. 1993; Lanese und Conger 1993; Sudhir et al. 1994).

Die „chronische CNI-Nephrotoxizität“ zeigt eine Punktprävalenz von 67,3% nach 5 Jahren und 100% nach 10 Jahren post transplantationem (Nankivell et al. 2004). Sie wurde erstmals von (Myers et al. 1984) als solche beschrieben. Sie zeigten interstitielle Fibrose, tubuläre Atrophie und das Auftreten von fokal segmentaler Sklerose (FSGS) bei Herztransplantationspatienten, die mit CsA immunsupprimiert waren. Die interstitielle Fibrose lässt sich bei nahezu allen CNI-behandelten Patienten zeigen und korreliert mit der Dauer der Behandlung sowie der Höhe der Dosis (Klintmalm et al. 1984). Häufig zeigt die interstitielle Fibrose in der Biopsie zunächst ein charakteristisch streifiges Muster, jedoch kommt auch eine diffuse Fibrosierung vor. Glomeruli, die sich in fibrosierten Bereichen befinden, zeigen Zeichen der Sklerosierung und können kollabieren (Kopp und Klotman 1990). Wie die „akute CNI-Nephrotoxizität“ ist auch die „chronische CNI-Nephrotoxizität“ mitbedingt durch eine Verringerung des renalen Blutflusses. In der Tunica media der Vv. afferentes bilden sich hyaline Ablagerungen, die mit der Zeit groß genug werden können, um das Lumen des Vas afferens einzuengen (Nankivell et al. 2004; Sis et al. 2006).

1.4 Nierenfibrose

Wie in 1.3 beschrieben, führt die langjährige Einnahme von CNIs fast unvermeidlich zur Fibrose der Niere. Charakteristisch für die Nierenfibrose sind die „interstitielle Fibrose“ mit Ablagerung von Bestandteilen der extrazellulären Matrix (EZM) im Tubulointerstitium (Bohle et al. 1979) und die „Glomerulosklerose“ mit EZM-Ablagerungen in den Glomeruli (Mauer et al. 1992). Zur Bildung dieser Ablagerungen tragen sowohl epitheliale Tubulus Zellen (Tang et al. 1999; Wang et al. 1999), als auch mesenchymale Fibroblasten bei (Roberts et al. 1997). Ebenso kommt es bei der Nierenfibrose zur Epithelial-mesenchymalen

Transition (EMT), bei der Tubulus Zellen die Eigenschaften von Fibroblasten annehmen (Strutz et al. 1995). Die renale Fibrose geht mit einem Funktionsverlust der Niere einher (Mackensen-Haen et al. 1981; Taft et al. 1994). Die Pathomechanismen, die zur Fibrose eines Organsystems führen, sind vielfältig und Gegenstand der aktuellen Forschung (Lovisa et al. 2020; Sheng und Zhuang 2020; Carney 2021). Eine zentrale Rolle in der Entstehung der Nierenfibrose spielt *Transforming Growth Factor beta* (TGF- β) (Border und Noble 1994). Außerdem ist die intakte Funktionsfähigkeit des endoplasmatischen Retikulums (ER), respektive deren Verlust bedeutend (Dihazi et al. 2011). Die Funktionen des ER und ihre Störung im Zusammenhang mit der CNI-Behandlung werden in dieser Arbeit untersucht und jeweils in einem gesonderten Punkt behandelt (s. 1.5 und 1.6). Die Behandlung renaler Fibroblasten mit profibrotischen Agenzien, wie TGF- β , führt zu einer vermehrten Expression von 78 kDa Glukose-reguliertes Protein (GRP78), endoplasmatische Retikulum Protein 57 (ERp57) und Calretikulin (Dihazi et al. 2013). In Nierenbiopsien von Patienten, die mit CNI immunsupprimiert waren, konnte ein Anstieg von ERp57 gegenüber Patienten, die ein anderes Immunsuppressivum (Mycophenolat Mofetil) erhielten, gezeigt werden (Flechner et al. 2004). Mit CsA oder TAC behandelte HEK-293 Zellen (humane embryonale Nierenzellen) zeigen in proteomischen Untersuchungen mittels *Stable Isotope Labeling by/with Amino Acids in Cell Culture (SILAC)* eine vermehrte Expression von ER-Stress Proteinen (Lamoureux et al. 2011).

Die Arbeiten von Dihazi et al. in Zusammenschau mit den Beobachtungen von Flechner und Lamoureux weisen auf eine mögliche Rolle des ER-Stresses in der CNI-Nephrotoxizität hin.

1.5 Faltung von Proteinen und die ER-Stress Proteine GRP78, ERp57 und CALR

Das Zellorganell endoplasmatisches Retikulum (ER) dient als Ort für die Synthese sowie Faltung von sekretorischen und Transmembranproteinen, als Ca^{2+} -Speicher und nimmt sowohl am Lipid-, als auch am Kohlenhydratstoffwechsel teil (Siekevitz und Palade 1960; Palade 1975; Clapham 2007; Fagone und Jackowski 2009).

Die korrekte Faltung der Primärstruktur neugebildeter Proteine geschieht nicht immer spontan. Dafür stehen im Lumen des ER eine Reihe von Enzymen zur Verfügung. Sie gehören zur Klasse der molekularen Chaperons, Foldasen oder Lektinchaperons. Molekulare Chaperons wie das Binding Immunoglobulin Protein (BiP), ebenso bekannt als GRP78 unterstützen die Proteinfaltung indem sie noch ungefaltete Stellen binden und so von der Umgebung abschirmen (Munro und Pelham 1986). Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerasen (PPI) (Fischer et al. 1984) und Proteindisulfidisomerasen (PDI) (Givol et al. 1964) wie die Proteindisulfidisomerase A3 (PDIA3), auch bekannt als ERp57 katalysieren einzelne Faltungsschritte, sie zählen zu den Foldasen. Zu den Lektinen zählt das Calretikulin (CALR).

ERp57 und CALR können im ER einen Komplex bilden (Oliver et al. 1999) und katalysieren die Bildung von Disulfidbrücken in noch ungefalteten Glykoproteinen (Oliver et al. 1997).

Da die Proteine GRP78, ERp57 und CALR in dieser Arbeit eingehender untersucht werden, soll an dieser Stelle ein Überblick über sie gegeben werden.

GRP78 ist ein Protein, das im Lumen des ER vorkommt und gehört zur Familie der *heat shock protein* 70 kDa (HSP70) molekularen Chaperons. Es bindet an hydrophobe Bereiche in noch ungefalteten Proteinen, wodurch es unspezifische intra- oder intermolekulare Bindungen sowie Aggregation verhindert (Gething et al. 1986; Munro und Pelham 1986). Durch Zyklen von Bindung und Freigabe der von GRP78 gebundenen Proteine, wird schrittweise die korrekte Faltung ermöglicht (Gething 1999). Die vermehrte Expression von GRP78 gilt als Marker für ER-Stress (Rutkowski und Kaufman 2004; Lee 2005).

ERp57 ist, wie oben beschrieben, involviert in die korrekte Faltung von neugebildeten Proteinen im ER. Es gehört zu den PDI und katalysiert die Aus- bzw. Umbildung von Disulfidbrücken (Zapun et al. 1998; Antoniou et al. 2002), es ist dabei spezifisch für neugebildete Glykoproteine (Oliver et al. 1999). Die Disulfidisomerasefunktion des ERp57 wird durch CALR verstärkt, indem es Substrat und katalytisches Zentrum von ERp57 räumlich zusammenführt (Zapun et al. 1998).

CALR kommt innerhalb der Zelle sowohl im sarkoplasmatischen (Ostwald und MacLennan 1974), als auch im endoplasmatischen Retikulum vor (Opas et al. 1991), wo es Ca^{2+} in großen Mengen bindet (Milner et al. 1991). Die kalziumbindende Funktion und die als Chaperon (s.o.) werden von verschiedenen Domänen innerhalb des CALR vermittelt (Michalak et al. 1992).

1.6 ER-Stress und der UPR-Signalweg

Sind eine oder mehrere der Funktionen des ER gestört, kann es zur Akkumulation von fehl- bzw. ungefalteten Proteinen im Lumen des ER kommen – dieser Zustand wird als ER-Stress bezeichnet (Kozutsumi et al. 1988; Cnop et al. 2012). Grund dafür können Ischämie (Paschen und Doutheil 1999), die Depletion intrazellulären Kalziums (Wileman et al. 1991), oxidativer Stress und die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (van der Vlies et al. 2003), Glukosedeprivation (de la Cadena et al. 2014) sowie die gesteigerte Produktion sekretorischer Proteine z. B. bei einer Virusinfektion (Jordan et al. 2002) sein. Die Akkumulation fehl- bzw. ungefalteter Proteine im Lumen des ER ist zelltoxisch und spielt eine entscheidende Rolle in der Entstehung von diversen neurodegenerativen Krankheiten, wie Alzheimer Demenz und Parkinson Syndromen (Taylor et al. 2002; Selkoe 2003) oder dem metabolischen Syndrom (Özcan et al. 2004).

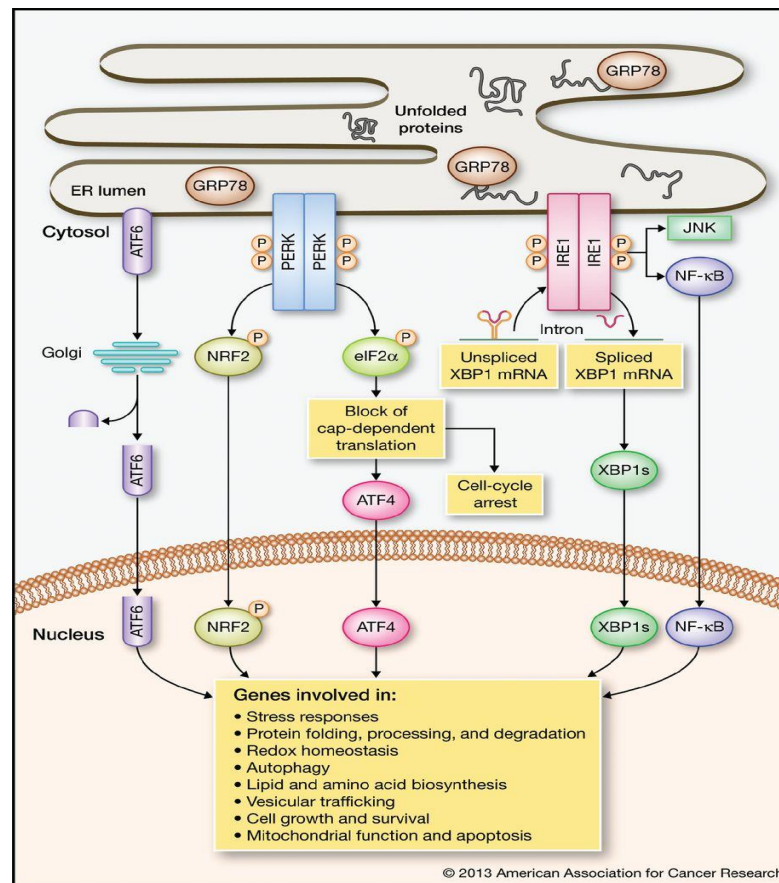


Abbildung 4: Der UPR-Signalweg. Publiziert in *Molecular Cancer Therapeutics* (Vincenz et al. 2013). Die Darstellung erfolgt mit freundlicher Genehmigung der American Association for Cancer Research (Rechteinhaber). Eine schriftliche Genehmigung des Rechteinhabers liegt vor.

Die zelluläre Antwort auf ER-Stress ist der Unfolded Protein Response (UPR)-Signalweg. Zunächst muss erkannt werden, ob in Inneren des ER mehr Proteine neugebildet werden, als korrekt gefaltet werden können. Eine wichtige Rolle spielt dabei das GRP78, welches neuentstandene und ungefaltete Proteine bindet (s. 1.4). Zusätzlich bindet es auch die Proteine *Activating Transcription Factor 6 alpha* (ATF6) (Shen et al. 2002), Protein Kinase R (PKR)-Like Endoplasmic Reticulum Kinase (PERK) und *Inositol Requiring Kinase 1* (IRE1) (Bertolotti et al. 2000). Steigt die Anzahl ungefalteter Proteine im ER, werden diese vermehrt von GRP78 gebunden und bislang gebundene ATF6, PERK und IRE1 werden frei. Das Transmembranprotein ATF6 wird unter ER-Stressbedingungen gespalten und seine N-terminale Domäne (p50ATF6) transloziert in den Zellkern (Haze et al. 1999). Dadurch wird die Expression von ER-Stress Proteinen wie GRP78, GRP94 und Calretikulin verstärkt (Yoshida et al. 1998). PERK und IRE1 werden durch das Freiwerden ihrer GRP78-Bindestelle aktiviert (Bertolotti et al. 2000). Sie aktivieren Signalwege, die wie im Falle des ATF6 die Expression von ER-Stress Proteinen verstärken (Harding et al. 2000a; Harding et al. 2000b; Lin et al. 2007). Gleichzeitig wird die Gesamtmenge an neugebildeten Proteinen gesenkt (Harding et al. 2000a). Eine Aktivierung des UPR-Signalweges führt außerdem zu einer Verlangsamung respektive dem Arrest des Zellzyklus (Brewer und Diehl 2000). Führen

diese Mechanismen nicht zu einer Reduktion der fehl- bzw. ungefalteten Proteine und der ER-Stress bleibt bestehen kommt es zur Apoptose (Marciniak et al. 2004).

1.7 Fragestellung und Zielsetzung

Die nephrotoxische Wirkung der CNI ist trotz ihres breiten Einsatzes und der jahrzehntelangen Erfahrung mit den Medikamenten nur in Teilen verstanden. So existiert bis heute keine kausale Therapiemöglichkeit der „chronischen CNI-Nephrotoxizität“ entgegenzuwirken. Zunächst soll deshalb in dieser Arbeit gezeigt werden, ob CNI eine toxische Wirkung auf die verwendeten Zellen (HK-2 und TK-173 s.u.) haben. Bei entsprechender Behandlung soll eine Proteomische Analyse durchgeführt werden, um neue Erkenntnisse über die Mechanismen, die zur CNI-Nephrotoxizität führen, zu erlangen und potenzielle Ziele für eine Therapie zu identifizieren. Anschließend stellt sich die Frage, ob ER-Stress eine Rolle in der CNI-Nephrotoxizität spielt. Dazu werden verschiedene in den ER-Stress involvierte Proteine mittels Western Blot untersucht. Nach gentechnisch vermittelter Über- bzw. Unterexpression wird eruiert, ob diese möglicherweise eine schädliche oder protektive Wirkung zeigen. Da der in dieser Arbeit gewählte klassische Ansatz der Proteomik globale Zustände (unbehandelt gegenüber behandelt) untersucht, lässt sich an dieser Stelle keine Hypothese aufstellen. Für den Rest der Arbeit lassen sich folgende Hypothesen aufstellen:

CNI besitzen eine direkte toxische Wirkung auf Nierenzellen, die in den renalen Zelllinien HK-2 und TK-173 Zellen abgebildet werden kann.

ER-Stress und der UPR-Signalweg spielen eine Rolle in der CNI-Nephrotoxizität, was sich im Zellmodell in HK-2 und TK-173 darstellen lässt.

Eine Veränderung der Expression der ER-Stress-Proteine ERP57 und CALR bewirkt eine Veränderung der toxischen Wirkung der CNI, sodass diese Proteine potenzielle Ziele einer Therapie zur Linderung der CNI-Nephrotoxizität sein können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antikörper

Tabelle 1: Verwendete Antikörper

Antikörper	Hersteller
Anti - beta - Aktin (Maus)	Sigma – Aldrich, Steinheim
Anti - CALR (Ziege)	Abcam, Hamburg
Anti - CALR (Kaninchen)	Cell signaling, Danvers, MA USA
Anti - ERP57 (Maus)	Enzo, Farmingdale, NY USA
Anti - GRP78 (Kaninchen)	Sigma – Aldrich, Steinheim
Alexa Fluor 488 anti - Annexin V (Maus)	Life technologies Corp., Eugene, OR USA
Alexa Fluor 647 anti - goat (Esel)	Life technologies Corp., Eugene, OR USA
Alexa Fluor 647 anti - mouse (Ziege)	Life technologies Corp., Eugene, OR USA
Alexa Fluor 647 anti - rabbit (Ziege)	Life technologies Corp., Eugene, OR USA

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
1,4 – Dithiothreitol	Roth, Karlsruhe
Acetonitril	Roth, Karlsruhe
Acrylamid, Bisacrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxiddisulfat (APS)	Sigma – Aldrich, Steinheim
Bradford – Reagens (Protein Assay Dye Reagent Concentrate)	Bio – Rad, München
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Butanol	Merck, Darmstadt
Cholamidopropyltrimethylammoniumpropansulfonat (CHAPS)	Merck, Darmstadt
Cyclosporin A	Tocris, Bristol, UK
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma – Aldrich, Steinheim
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Geneticin G-418 – Sulphate	Gibco, Paisley UK
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Merck, Darmstadt
HCl	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Sigma – Aldrich, Steinheim

Lipofectamin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Mercaptoethanol (98%)	Sigma – Aldrich, Steinheim
Methanol (99%)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Ponceau S	Serva, Heidelberg
Precision Plus Protein Kaleidoscope	Bio – Rad, München
SDS	Roth, Karlsruhe
Tacrolimus	Abcam, Hamburg
TEMED	Sigma – Aldrich, Steinheim
Tris Pufferan ®	Roth, Karlsruhe
Triton X 100	Sigma – Aldrich, Steinheim
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Urea	Sigma – Aldrich, Steinheim

2.1.3 Geräte

Tabelle 3: Verwendete Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Abzug Zellkultur	BSB4A	Gelaire, Sydney Australia
Durchflusszytometer	FACS Canto II	BD Biosciences, Franklin Lakes, NY, USA
Elektrische Pipette	Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Elektrophorese-Behälter	Mini-Protean 3 Cell	Bio-Rad, München
Fluoreszenzscanner	ELA 5100	Fujifilm, Shigetaka Komori, Japan
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Inkubator	Napco 5400	Thermo Scientific, Braunschweig
Kühlschrank	GlassLine	Liebherr, Bulle
Kühlschrank	Premium	Liebherr, Bulle
Kühlschrank	Premium Nofrost	Liebherr, Bulle
Kühlschrank	MDF-U5312	SANYO, Moriguchi, Japan
Lichtmikroskop	Axiovert 200	Zeiss, Oberkochen
Mikropipette 1000, 100, 10 µl	Reference	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	PB – 11	Sartorius, Göttingen
Photometer	Lambda 25	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Massenspektrometer	Q Exactive	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
Schüttelofen	IKA Combimag Reo	Janke & Kunkel GmbH, Staufen
Schüttelofen	Lab-Therm	B. Braun, Melsungen
Spannungsquelle	2301 Macrodrive 1	LKB, Bromma, Schweden

Vakuumpumpe	095 AN. 18	Schütt, Göttingen
Vakuumzentrifuge	Univapo 150 H	Uniequip, Planegg
Vortexer	Reax 2000	Heidolph, Schwabach
Waage	1773	Sartorius, Göttingen
Waage	Universal	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	GFL 1083	Gebr. Rettberg GmbH, Göttingen
Zählkammer	Neubauer Improved	Assistent, Sondheim v. d. Rhön
Zentrifuge	1-15PK	Sigma, Osterode
Zentrifuge	3-18K	Sigma, Osterode
Zentrifuge	5425R	Eppendorf, Hamburg

2.1.4 Nukleinsäuren

Die Herunterregulierung von ERp57 erfolgte mittels siRNA der Firma Eurofins MWG Operon Inc., welche in der Arbeitsgruppe zuvor mehrfach verwendet wurden. Ihre Sequenzen lauten wie folgt:

sense-Strang 5' ACC UCG UCC UUC ACA UCU CAC UAA CAU CAA GAG UGU UAG UGA GAU GUG AAG GACUU 3'

antisense-Strang 3' CAA AAA GUC CUU CAC AUC UCA CUA ACA CUC UUG AUG UUA GUG AGA UGU GAA GGACG 5'

Die Herunterregulierung von CALR erfolgte mittels siRNA „CALR_437“ und „CALR_1190“ der Firma Eurofins MWG Operon Inc., welche in der Arbeitsgruppe zuvor mehrfach verwendet wurden. Ihre Sequenzen lauten wie folgt:

sense-Strang 5' GAC AGA CAU GCA CGG AGA CUC AGA AUA 3'

antisense-Strang 5' UAU UCU GAG UCU CCG UGC AUG UCU GUC 3'

sense-Strang 5' GGA AGA AGA CAA GAA ACG CAA AGA GGA 3'

antisense-Strang 5' UCC UCU UUG CGU UUC UUG UCU UCU UCC 3'

Zur Hochregulierung der Expression von ERp57 wurde das Plasmid cDNA3.1-ERp57 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Neil Bulleid von der Universität in Glasgow) genutzt. Dieses enthält alle benötigten Informationen zur Expression von ERp57. Zusätzlich enthält es ein Gen für die Resistenz gegenüber dem Antibiotikum G418, was als Selektionsmittel für erfolgreich transfizierte Zellen diente. Außerdem enthält das Plasmid die Information über eine Resistenz gegenüber Ampicillin, was die Selektion von Bakterienstämmen in der Plasmidvermehrung und -reinigung ermöglicht. Abbildung 5 zeigt das Plasmid mit seinen Eigenschaften.

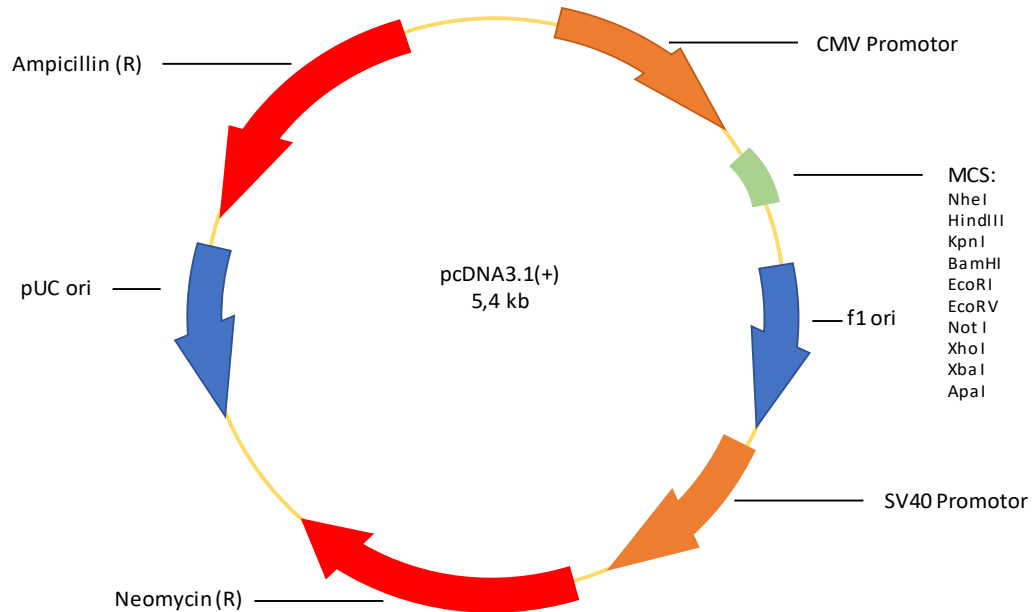


Abbildung 5: Das Plasmid pcDNA3.1 (Invitrogen), welches für die Transfektion des ERp57-Gens verwendet wurde. CMV: Cytomegalievirus; MCS: *Multiple Cloning Site* (Polylinker); ori: *Origin of Replication* (Replikationsursprung); SV40: Simian-Virus 40; (R): Resistenz.

Zur Hochregulierung von CALR wurde ein Plasmid mit allen benötigten Informationen zur Expression von CALR eingesetzt. Zur Selektion transfizierter Zellen enthielt das Plasmid ein Gen für die Resistenz gegenüber Hygromycin. Abbildung 6 zeigt das Plasmid mit seinen Eigenschaften.

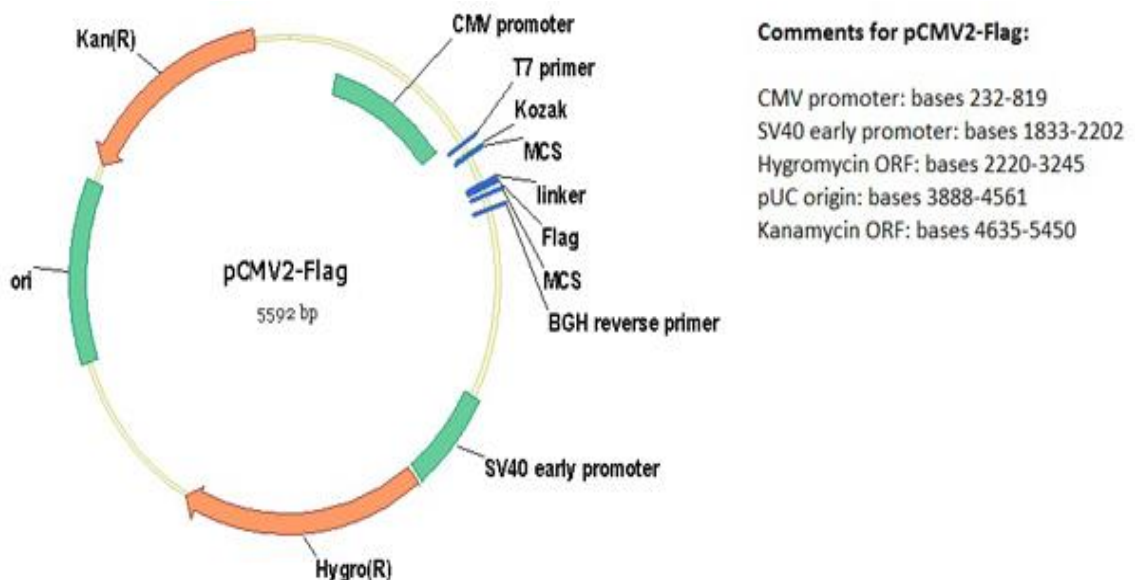


Abbildung 6: Das Plasmid pCMV2-Flag, welches für die Transfektion des CALR-Gens verwendet wurde. Die Darstellung erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Firma Sino Biological, die die Rechte an dem Bild innehat. CMV: Cytomegalievirus; MCS: *multiple cloning site* (Polylinker); BGH: *Bovine Growth Hormone* (bovines Wachstumshormon); SV40: Simian-Virus 40; Hygro: Hygromycin; ori: *Origin of Replication* (Replikationsursprung); Kan: Kanamycin; (R): Resistenz.

2.1.5 Proteine und Enzyme

Tabelle 4: Verwendete Proteine und Enzyme

Protein/Enzym	Hersteller
Bovines Serumalbumin (BSA)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin/ Ethylendiamintetraacetat (EDTA) (0,5%)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin (<i>Sequencing Grade Modified Trypsin, Porcine</i>)	Promega, Madison, WI, USA

2.1.6 Software

Tabelle 5: Verwendete Software

Software	Anwendung	Hersteller
Excel 2016	Einfache Kalkulationen	Microsoft Corp., Redmond, WA, USA
BD FACS Diva, Version 6.1.3	Durchflusszytometer Software	BD Biosciences, Franklin Lakes, NY, USA
ImageJ Version 1.40g	Quantifizierung Westernblot	Wayne Rasband, National Institute of Health, USA
Image Reader FLA 5000 Version 3.0	Fluoreszenzscanner Software	Fujifilm, Shigetaka Komori, Japan
Scaffold™ 4 Version 4.10.0	Software zur Normalisierung von Proteomdaten	Proteome Software, Portland, OR, USA
Word 2016	Textverarbeitung	Microsoft Corp., Redmond, WA, USA
GraphPad Prism 8	Statistische Analyse und Erstellung von Graphen	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA
FlowJo 10	Auswertung von FACS	BD Biosciences, Franklin Lakes, NY, USA
Ingenuity Pathway Analysis	Signalweg- und Toxizitätsanalyse	Qiagen, Venlo, Niederlande

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 6: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
96-Well tissue culture plate	Falcon, Rochester, NY USA
Combitips 0,5 ml, 5 ml	Eppendorf, Hamburg
Disposable Scalpel	Feather, Köln
Filterpapier	Bio – Rad, München
Glasflasche (verschiedene Volumina)	Schott Duran, Elmsford, NY USA
Handschuhe	B. Braun, Melsungen
Küvette (Polystyrol)	Sarstedt, Nümbrecht

Labortücher	Kimberley Clark, Reigate, UK
Meliseptol	B. Braun, Melsungen
Multitex Tücher	ZVG-Zellstoff-Vertriebs-GmbH & Co. KG, Troisdorf
Nitrocellulose Blotting Membran	GE Healthcare, Chicago, IL USA
PCR soft tubes 0,2 ml	Biozym, Wien, AU
Pasteurpipette	BRAND, Wertheim
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 500 µl, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Röhren 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Rührspatel	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipette 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
TC-Flasche T75, Bel. Ka. (Zellkulturflasche)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.8 Zelllinien

Für die Versuche dieser Arbeit wurden die Zelllinien HK-2 und TK-173 verwendet.

Bei der HK-2 Zelllinie handelt es sich um immortalisierte Epithelzellen aus dem proximalen Tubulus einer gesunden, erwachsenen humanen Niere (Ryan et al. 1994).

TK-173 Zellen sind Fibroblasten aus einer gesunden, erwachsenen humanen Niere (Müller und Rodemann 1991).

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Beide Zelllinien, TK-173 und HK-2, wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen kultiviert. Ein Filter in der Kappe der Zellkulturflaschen sorgte für aerobe Wachstumsbedingungen. Gelagert wurden die Zellen im Inkubator (Napco 5400, Thermo Scientific, Braunschweig) bei 37 °C, 5% CO₂ in der Luft und 95% Luftfeuchtigkeit.

Auf die Zellen wurde *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe), 1% Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml) (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) und 1% L-Glutamin (0,2 M) gegeben. Im Abstand von höchstens 2 Tagen wurden die Zellen lichtmikroskopisch auf Morphologie, Größe und eventuelle Verunreinigungen sowie auf den Stand der Konfluenz kontrolliert.

Bei Erreichen oder Annähern von 100% Konfluenz wurden die Zellen geteilt. Um die Zellen zu teilen, wurde zunächst das Medium abgesaugt und anschließend mit 5 ml *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (DPBS) die Zellen gespült. Nach Absaugen des DPBS erfolgte die Zugabe von 1,5 ml Trypsin 0,05% (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe), welches für 2 min auf den Zellen belassen wurde. Anschließend wurde das Trypsin vorsichtig abgesaugt und die Zellen durch wiederholtes, kurzes Klopfen der Zellkulturflaschen von deren Boden abgelöst. Die gelösten Zellen wurden in 6 ml DMEM aufgenommen und auf neue Zellkulturflaschen verteilt. In der neuen Zellkulturflasche wurde das Medium auf mindestens 7 ml aufgefüllt und die Zellen durch Schwenken gut verteilt. Alle Arbeiten an der Zellkultur erfolgten stets unter sterilen Bedingungen an der Laminar-Air-Flow-Bank (BSB4A, Gelaire, Sydney Australia).

2.2.2 Behandlung mit Calcineurininhibitoren

CsA (Tocris, Bristol, UK) und TAC (Abcam, Hamburg) wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und Stammlösungen von 50 mM hergestellt. Diese Stammlösungen wurden bei -20° C gelagert. In DMEM wurden die Stammlösungen auf die Behandlungskonzentrationen (Tabelle 7) verdünnt.

Zur Behandlung wurden 7 ml des CNI-haltigen DMEM zu den Zellen gegeben und verteilt. Über die Dauer der Behandlung wurden die Zellen bei 37 °C, 5% CO₂ in der Luft und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach 24 h und vor Beenden der Behandlung erfolgten lichtmikroskopische Kontrollen.

Tabelle 7: Verdünnungen der Stammlösungen (50 mM) im Zellkulturmedium

Cyclosporin A	Tacrolimus
0,5 μM	0,5 μM
1 μM	1 μM *
5 μM	5 μM
10 μM * †	10 μM
15 μM	20 μM
20 μM *	30 μM
25 μM	40 μM
30 μM	50 μM
-	60 μM * †
-	80 μM

Die mit einem * gekennzeichneten Konzentrationen wurden zur Zellbehandlung vor Western-Blot Analysen verwendet; die mit einem † gekennzeichneten Konzentrationen wurden zur Zellbehandlung vor der proteomischen Analyse verwendet.

2.2.3 Einfluss der CNI-Behandlung auf das Zellüberleben und Proliferation: MTT Viabilitätstest

Verwendet wurde das „*Cell Proliferation Kit I (MTT)*“ (Hoffmann-La Roche, Basel). TK-173 sowie HK-2 wurden zur Behandlung zu 5000, respektive 2500 Zellen pro Well auf *96-well-plates* ausgesät und über Nacht in 100 μL Zellmedium inkubiert. Anschließend, wurden die Zellen mit steigenden Konzentrationen von CsA und TAC, wie in Tabelle 7 dargestellt, behandelt. Nach 48 h wurde die Behandlung gestoppt, indem das Medium von den Zellen entfernt wurde. Den Zellen wurden 100 μL (CNI-freies) Zellmedium hinzugefügt sowie jedem Well 10 μL des „*MTT labeling reagent*“. Nach 4 Stunden wurde durch Zugabe von 100 μL „*Solubilisation Buffer*“ die Reaktion gestoppt.

Die Bestimmung der Viabilität wurde durch Messung der Absorption bei 595 nm mit dem PHOmo Elisa Reader (Autobio Diagnostics Co, Volksrepublik China) durchgeführt.

Die Mittelwerte der einzelnen Messungen, jeweils 6 pro Konzentration, wurden durch den Mittelwert einer unbehandelten Kontrolle dividiert, um eine relative Aussage über die Viabilität der Zellen unter CNI-Behandlung zu treffen. Die Messwerte der einzelnen Konzentrationen wurden mittels t-Test auf signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrolle hin überprüft. Eine Anpassung des Signifikanzniveaus erfolgte mittels Bonferroni-Korrektur.

Die Ergebnisse – Mittelwerte und Standardabweichung - wurden mittels GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) als Histogramme dargestellt.

2.2.4 Das Ernten der Zellen und Proteinextraktion

Für die proteomischen Analysen wurden nach Behandlung mit CNI die Zellen geerntet und ein Zelllysate gewonnen.

Zunächst wurden die Zellen unter dem Lichtmikroskop beobachtet, um einen Eindruck des Behandlungseffektes zu gewinnen und eventuelle Kontaminationen auszuschließen. Daraufhin wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und die Zellen mit einem Zellschaber vorsichtig vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Anschließend wurde die Zellkulturflasche mit 5 ml DPBS gespült. DPBS und darin befindliche Zellen wurden dann in einem 50 ml Test-Röhrchen gesammelt. Die Röhrchen mit den gesammelten Zellen wurden bei 4 °C für 5 min mit 1200 rpm zentrifugiert (3-18 K, Sigma, Osterode). Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 5 ml DPBS resuspendiert und in ein 15 ml Test-Röhrchen überführt und erneut, wie im vorangegangenen Schritt, zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und dem Pellet je nach Größe 30 – 100 µL eines Lysepuffers [Urea, Cholamido-propyldimethylammoniopropansulfonat (CHAPS) 2%, Dithiothreitol (DTT), Phenylmethylsulfonylfluorid] hinzugegeben. Das Lysieren der Zellen erfolgte dann auf Eis für 30 min unter regelmäßigem Vortexen (Reax 2000, Heidolph, Schwabach) um die Ausbeute der Proteinextraktion zu steigern. Der gesamte Inhalt der 15 ml Röhrchen wurde in ein 0,5 ml Eppendorf-Tube überführt und diese bei 4 °C für 30 min bei 14000 rpm zentrifugiert (1-15 PK, Sigma, Osterode). Das Pellet wurde verworfen und der Überstand mit den gelösten Proteinen wurde in einem neuen 0,5 ml Eppendorf-Tube wie im vorangegangenen Schritt zentrifugiert. Dieser beim letzten Zentrifugationsschritt gewonnene Proteinextrakt wurde entweder direkt für weitere Versuche eingesetzt oder bei -20 °C bis zur Verwertung gelagert.

2.2.5 Proteinbestimmung (Bradford)

Die Proteinbestimmung wurde entsprechend der Bradford Methode durchgeführt (Bradford 1976). Für eine Bradford-Lösung [1:5 *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Bio-Rad, München) zu doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O)] wurde mit bovinem Serumalbumin (BSA) eine Eichkurve erstellt. Dafür wurde das in Tabelle 8 gezeigte Pipettierschema verwendet und die Extinktion bei 595 nm Wellenlänge photometrisch bestimmt (Lambda 25, Perkin Elmer, Waltham, MA USA). Die Funktion der Eichkurve wurde ermittelt und als $f(x) = mx + b$ dargestellt.

Die zu bestimmenden Proben wurden so weit verdünnt, dass ihre Extinktion im Bereich derer der Eichkurve lag. Anhand der Extinktionswerte wurde mittels der Funktion die Proteinkonzentration errechnet.

Tabelle 8: Pipettierschema zur Erstellung einer BSA-Eichkurve

Bradford-Lösung [μ l]	BSA-Lösung [μ l]
1000	0
998	2
996	4
994	6
992	8
990	10

2.2.6 Herstellung von Polyacrylamidgelen

Die Herstellung der Gele für die Elektrophorese erfolgte modifiziert nach (Laemmli 1970). Jedes Gel bestand aus einem Sammelgel (4% Acrylamidanteil) und einem Trenngel (12% Acrylamidanteil). Tabelle 9 zeigt das Pipettierschema zur Herstellung beider Gele.

Zunächst wurde das Trenngel in eine Glaskammer gegossen und bis zur Polymerisation mit Butanol übergossen. Anschließend wurde das Butanol entfernt und Sammelgel eingegossen. In das Sammelgel wurde ein Kamm eingebracht und so Kammern im Gel erzeugt.

Tabelle 9: Pipettierschema zur Herstellung von Trenn- und Sammelgelen

	Trenngel 12% Acrylamid, pH 8,8	Sammelgel 4% Acrylamid, pH 6,8
ddH ₂ O	14 ml	15 ml
Tris-HCl pH 8,8	10 ml	-
Tris-HCl pH 6,8	-	6,3 ml
Acrylamid	16 ml	3,9 ml
SDS 10%	400 μ l	250 μ l
TEMED	30 μ l	25 μ l
APS 10%	200 μ l	125 μ l

2.2.7 Die Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)

Proben von 60 – 100 μ g Gesamtproteinmenge wurden mit 5 μ l Probenpuffer [Trisaminomethan – Salzsäure (HCl) Puffer 125 mM, pH 6,8, SDS 4% (w/v), Glycerol 20% (v/v), Bromphenolblau 2% (v/v), Beta Mercaptoethanol 2% (v/v)] versetzt und mit ddH₂O bis zu einem Volumen von 20 μ l aufgefüllt. Anschließend wurden zu

Denaturierungszwecken die Proben für 10 min auf 95 °C erhitzt (Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg).

Nach kurzer Abkühlzeit wurden die Proben sowie ein Proteinstandard (*Precision Plus Protein Kaleidoscope*, Bio-Rad, München), in die Taschen des Sammelgels pipettiert (s. 2.2.6). Die Gele befanden sich in Elektrophorese-Kammern (Bio-Rad, München), die mit Elektrophorese-Puffer [200 ml fünffach konzentrierter Elektrophorese-Puffer (Tris 15 g, L-Glycin 72 g, SDS 5 g in 2 l ddH₂O), 800 ml ddH₂O] gefüllt waren. Zur Trennung der Proteine fand in einem ersten Schritt, die Gelelektrophorese für 10 min unter einer Spannung von 180 V und in einen zweiten Schritt für 50 min unter einer Spannung von 200 V (2301 Macrodrive 1, LKB, Bromma, Schweden) statt.

2.2.8 Western Blot

Die Polyacrylamidgele mit den Proben aus 2.2.7 wurden wie auf Abbildung 7 abgebildet zusammengestellt und in eine Blotting-Vorrichtung (Bio-Rad, München) geklemmt. In der Kammer aus 2.2.7 wurden die Blotting-Vorrichtung und ein Eisblock platziert. Die Kammer wurde vollständig mit Transferpuffer [200 ml fünffach konzentrierter Transferpuffer (Tris 30,3 g, L-Glycin 144 g, SDS 5 g in 2 l ddH₂O), 200 ml Methanol 99% (v/v), 600 ml ddH₂O] gefüllt. Über die Nacht wurde eine Spannung von 40 V angelegt (2301 Macrodrive 1, LKB, Bromma, Schweden).

Der Erfolg des Blots wurde kontrolliert, indem die Nitrocellulosemembran für 1 min in Ponceau S Lösung (Serva, Heidelberg) getaucht und anschließend in fünfprozentiger Essigsäure gewaschen wurde.

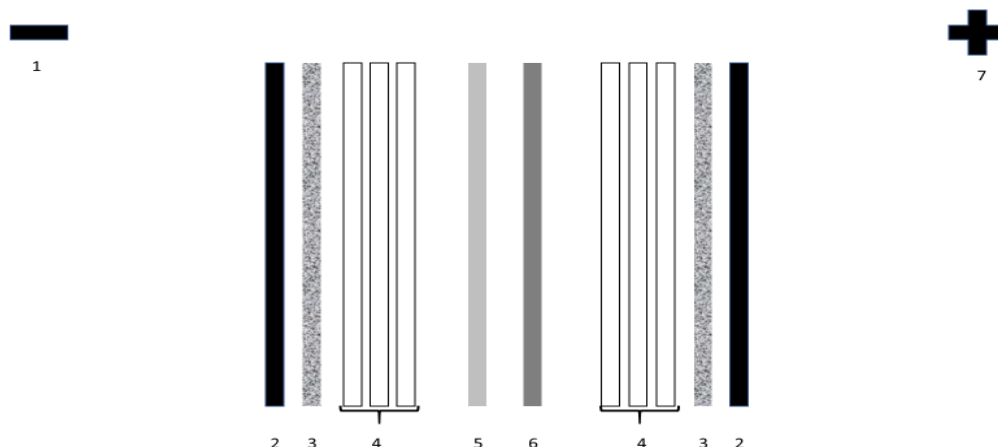


Abbildung 7: Zusammenstellung des Western Blot Sandwiches. Die Lücken zwischen den einzelnen Komponenten dienen der leichtern Nachvollziehbarkeit. 1) Kathode 2) Klemmvorrichtung 3) Schwamm 4) Filterpapier 5) Gel 6) Membran 7) Anode.

2.2.9 Antikörpervermittelte Darstellung von Proteinen

Die mit Proteinen beladenen Nitrocellulosemembranen aus 2.2.8 wurden für 10 min in Waschpuffer [200 ml fünffach konzentrierter Waschpuffer (Tris 12,11 g, NaCl 58,16 g, Tween 10 ml in 2 l ddH₂O, pH 7,5), 800 ml ddH₂O] bei 37 °C sanft geschüttelt (Lab-Therm, B. Braun, Melsungen). Zur Vermeidung von Hintergrundfärbung wurden die freie Bindungsstellen der Nitrocellulosemembran für 2 h mit einem Blockierpuffer [5g Magermilchpulver (Roth, Karlsruhe) in 100 ml Waschpuffer] gesättigt.

Über die Nacht wurden die Membranen mit Primärantikörpern bei 4 °C inkubiert. Die Primärantikörper wurden zuvor in Blockierpuffer verdünnt. Anschließend wurden die Membranen drei Mal für 10 min mit Waschpuffer gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit einem fluoreszierenden Sekundärantikörper für 2 h bei 37 °C im Schüttler. Erneut wurde drei Mal für 10 min gewaschen. Die Membranen wurden getrocknet und in entsprechenden Wellenlängenbereich gescannt (ELA 5100, Fujifilm, Shigetaka Komori, Japan).

Die Intensität der gescannten Banden wurde mittels ImageJ quantifiziert. Die Quantifizierung erfolgte nach einem Protokoll von Miller (lukemiller.org» Blog Archive» Analyzing gels and western blots with ImageJ). Die Intensitäten der Banden von ERp57, GRP 78 und Calretikulin wurden durch die Intensität der beta-Aktin Bande derselben Spur dividiert. Die erhaltenen Quotienten wurden jeweils durch denjenigen der Kontrolle dividiert, um die Intensität relativ zu jener der Kontrolle zu errechnen.

In GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) wurden die relativen Intensitäten aller Western-Blots als Histogramm dargestellt. Auf signifikante Unterschiede der behandelten Proben gegenüber der Kontrolle wurde mittels t-Test untersucht.

2.2.10 In-Gel-Verdau

Zur Vorbereitung für den Verdau wurden Proben von je 120 µg Proteinmenge wie in 2.2.7 mittels Elektrophorese aufgetrennt. An dieser Stelle wurden fertige Gele (*Mini Protean TGX Precast Gel*, Bio-Rad, München) benutzt. Mit Fixierlösung [Methanol 1000 ml, H₂O 760 ml, Essigsäure 240 ml] wurden die Proteine im Gel fixiert und anschließend mit Coomassie-Blau-Lösung [H₂O 60 ml, Methanol 20 ml, Roti-Blue 5x Konzentrat (Roth, Karlsruhe) 20 ml] sichtbar gemacht.

Mit einer Stanze wurden die Proteinbanden in je 23 „Gelstreifen“ aufgetrennt. Jeder der Gelstreifen wurde in ein eigenes 0,5 ml Reaktionsgefäß („Reaktionsgefäß 1“) gegeben. Die Gele wurden vor dem Ausstanzen fotografiert.

Jedem der Gelstreifen wurde zum Waschen 150 µl ddH₂O hinzugegeben und wieder entfernt. Mit 150 µl Acetonitril (ACN) wurde für 15 min dehydratisiert. Danach wurden die Gelstreifen mit 10 mM Dithiotreitol (DTT) [DTT 1,54 mg/ml in 100 mM NH₄HCO₃] bedeckt und für 50 min bei 56 °C inkubiert (GFL 1083, Gebr. Rettberg GmbH, Göttingen). Das DTT wurde entfernt und erneut mit 150 µl ACN für 15 min inkubiert. Anschließend

wurden 100 µl Iodacetamid (IAA) 55 mM (IAA 10,2 mg/ml in 100 mM NH₄HCO₃) hinzugegeben und für 20 min bei Dunkelheit inkubiert. Darauf folgte die Inkubation mit 150 µl von 100 mM NH₄HCO₃ für 15 min. Zwei Mal wurde für 15 min mit 150 µl ACN inkubiert und nach dem zweiten Mal die Gelstückchen gründlich getrocknet.

Der Verdau erfolgte mittels Trypsins in Verdaupuffer [50 mM NH₄HCO₃, 5 mM CaCl₂, 12,5 ng/µl Trypsin (Promega, Madison, WI, USA)], mit dem jedes der Gelstückchen bedeckt wurde. Nachdem die Gelstückchen den Verdaupuffer aufgenommen hatten, wurden sie mit demselben Puffer ohne Trypsin [50 mM NH₄HCO₃, 5 mM CaCl₂] erneut bedeckt. Die Gelstückchen wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Am Folgetag wurden 15 µl H₂O hinzugegeben und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Darauf folgte ein Inkubationsschritt mit 80 µl ACN für 15 min bei 37 °C. Die gesamte Flüssigkeit wurde in einem neuen Reaktionsgefäß („Reaktionsgefäß 2“) gesammelt. Dem Gelstückchen wurden 65 µl fünfprozentiger Ameisensäure hinzugegeben und für 15 min bei 37 °C inkubiert. 65 µl ACN wurden hinzugefügt und erneut für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die gesamte Flüssigkeit wurde abgenommen und „Reaktionsgefäß 2“ hinzugefügt. In der Vakuumzentrifuge (Univapo 150 H, Uniequip, Planegg) wurden die Proben getrocknet und bei -80 °C gelagert.

2.2.11 Massenspektrometrie und Identifikation der Proteine

Die in 2.2.10 gewonnenen Peptidfragmente wurden mit dem Q Exactive™ (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) Hybrid-Quadrupol-Orbitrap Massenspektrometer analysiert. Anschließend wurden die Tandem-Massenspektren (MS/MS) in Mascot (Matrix Science, London, UK, Version 2.4.1) eingegeben, um die Peptidsequenz zu ermitteln und die Proteine zu identifizieren. Als Datenbank wurde Swiss-Prot (11/2018) gewählt. Die Einstellungen wurden folgendermaßen vorgenommen: Spezies Mensch, Trypsin als Verdauenzym, Fragmentationstoleranz 0,02 Da, Mutter-Iontoleranz 10 ppm, Carbamidomethyl von Cystein als *fixed modification* und die Oxidation von Methionin als *variable modification*.

Die weitere Beurteilung der Daten erfolgte in Scaffold™ 4 (Proteome Software, Portland, OR, USA, Version 4.10.0). Scaffold normalisiert MS/MS Daten zwischen verschiedenen Proben, sodass diese miteinander verglichen werden können. Dazu wird von jeder Probe die Gesamtzahl der detektierten Spektren ermittelt und aus diesen ein Mittelwert errechnet. Die Anzahl aller Spektren einer Masse wird anschließend mit dem Mittelwert multipliziert.

Um hoch- bzw. herunterregulierte Proteine zu identifizieren wurden durch Scaffold von den normalisierten Quantitäten für jedes Protein ein *Fold Change* ermittelt. Dieser wurde für die weitere Analyse zum Logarithmus zur Basis 2 konvertiert, sodass ein negativer *Fold Change* eine Herunterregulierung und ein Positiver eine Hochregulierung. Proteine mit einem *Fold Change* ≥ 1 galten als hochreguliert, Proteine mit einem *Fold Change* ≤ 1 als herunterreguliert.

Diejenigen Proteine, die nur in einer der Proben (Kontrolle, CsA oder TAC) identifiziert werden konnten wurden mittels *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins* V 11.0 (STRING)(Szkarczyk et al. 2019) auf Interaktionen überprüft.

Von den hoch- bzw. herunterregulierten Proteinen wurden mit *Ingenuity Pathway Analysis*® (Qiagen, Venlo, Niederlande) eine funktionelle Analyse, eine Signalwegsanalyse sowie eine Toxizitätsanalyse angefertigt.

2.2.12 Transfektion

Zur Hoch- bzw. Herunterregulierung von ERp57 und CALR wurden HK-2 Zellen mit Plasmid-DNA bzw. siRNA transfiziert. Die Sequenzen der Plasmid-DNA wurden so gewählt, dass sie das für das jeweilige Proteine kodierende Gen enthalten und von den Zellen exprimiert werden können. Die siRNA wurde so konzipiert, dass sie spezifisch die mRNA der jeweiligen Proteine im Zytosol bindet. Die vier verwendeten Nukleinsäuren sind in 2.1.4 aufgeführt und beschrieben.

Zur Transfektion wurde die Lipofektion nach Felgner verwendet (Felgner et al. 1987). Dazu wurde das DMEM von den zu transfizierenden Zellen abgesaugt und durch 7,5 ml Opti-MEM (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) ersetzt. Nach einer Stunde wurde 1 ml von zuvor angesetzter Lösung mit Nukleinsäuren in Liposomen hinzugefügt. Um die Nukleinsäuren in Liposomen einzubringen, wurden zwei Ansätze mit 500 µl Lipofectamin (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) erstellt. Der erste „Ansatz A“ mit 471,8 µl Opti-MEM und 28,2 µl Lipofectamin. Der zweite „Ansatz B“ mit der aus Tabelle 10 zu entnehmender Menge an Nukleinsäure, der mit Opti-MEM auf 500 µl aufgefüllt wurde. Ansätze A und B wurden für 5 min inkubiert, dann zusammengeführt und nach weiteren 30 min zu den Zellen gegeben.

Tabelle 10: Nukleinsäuren für die Transfektion

Nukleinsäure	Eingesetzte Menge pro Flasche [ng]
Plasmid-DNA ERp57	2000
siRNA ERp57	50
Plasmid-DNA CALR	2000
siRNA CALR 437	52
siRNA CALR 1190	52

Nach der Transfektion wurden die Zellen wie in 2.2.4, 2.2.5, 2.2.7 und 2.2.8 beschrieben verarbeitet und schließlich mittels Western-Blot das Ergebnis der Transfektion überprüft.

Die mit Plasmid-DNA transfizierten Zellen wurden außerdem in einem speziellen Zellmedium, welches mit Geneticin (G418) versetzt war kultiviert. Da die Plasmid-DNA ein Resistenz-Gen gegenüber G418 enthielt, sollte so ein Selektionsdruck auf nicht transfizierte Zellen erzeugt werden.

2.2.13 Durchflusszytometrie (*Fluorescence Activated Cell Sorting: FACS*)

Für die Durchflusszytometrie wurde das „Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V Alexa Fluor™ & Propidium Iodide (PI)“ (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) verwendet.

In 6-well Platten wurden pro Well ca. 20.000 Zellen (HK-2 oder TK-173) in 1,5 ml Zellmedium (DMEM, 10% FCS, 1 % L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin) ausgesät. Nach Anwachsen der Zellen wurde mit CNI, wie in Tabelle 7 gezeigt, behandelt. Die Behandlung erfolgte über 48 h.

Nach abgeschlossener Behandlung wurde das Zellmedium in einem 15 ml Reaktionsgefäß gesammelt. Die Zellen wurden mit 1 ml DPBS gespült, welches ebenfalls im entsprechenden 15 ml Reaktionsgefäß gesammelt wurde. Anschließend wurde 0,5 ml Trypsin 0,05% (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) zu den Zellen gegeben und für 2 min belassen. Nach Ablauf der 2 min wurde 1 ml Zellmedium hinzugegeben und die Trypsinreaktion gestoppt. Vorsichtig wurden die Zellen durch Auf- und Abpipettieren vom Boden der Wells gelöst und im 15 ml Reaktionsgefäß aus dem ersten Schritt gesammelt.

Zweimal wurde bei 1200 rpm, 4 °C für 5 min zentrifugiert (3-18 K, Sigma, Osterode). Nach dem ersten Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und mit 5 ml DBPS die Zellen resuspendiert, nach dem zweiten Zentrifugieren erneut der Überstand verworfen.

Das Pellet wurde in 100 µl *Annexin-Binding-Buffer* (ABB) resuspendiert und in *Round-Bottom-Tubes* überführt. Den Reaktionsgefäßen wurden 5 µl anti-Annexin-V-Antikörper und 1 µl Propidiumiodid (PI) wie in Tabelle 11 abgebildet hinzugefügt. Nach 20 min wurden 200 µl ABB hinzugegeben und die Proben im Durchflusszytometer (FACS Canto II, BD Biosciences, Franklin Lakes, NY, USA) gemessen.

Tabelle 11: Pipettierschema Durchflusszytometrie

	„negativ“	„FITC“	„PI“	Proben
5 µl Annexin V AK	-	+	-	+
1 µl PI	-	-	+	+

- : Die Substanz wurde nicht hinzugefügt; + : die Substanz wurde hinzugefügt.

Je nach Anfärbbarkeit der transfizierten und mit CNI behandelten Zellen mit dem Annexin V-Antikörper oder dem PI wurden die Zellen in vier Gruppen eingeteilt. Zellen, die weder den Annexin V-Antikörper noch PI gebunden hatten, galten als vital. Zellen, die Annexin V-

Antikörper, nicht aber PI gebunden hatten, galten als frühapoptotisch. Die gleichzeitige Bindung von Annexin V-Antikörper und PI galt als spätapoptotisch. Die alleinige Bindung von PI galt als nekrotisch. Die vier Kategorien wurden mit FlowJo 10 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NY, USA) in Quadranten abgebildet, mit 10000 gemessenen Zellen als Punkte. Um die Grenzen für die Quadranten zu wählen, wurden die mit nur einem der beiden Farbstoffe behandelten Proben („FITC“, „PI“) verwendet. Zur vereinfachten Vergleichbarkeit wurde der Anteil jedes Quadranten an der Gesamtmenge als farbiger Balken in GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von CNI auf die Zellviabilität

Zur Untersuchung des Effektes der CNI auf die Zellviabilität und um geeignete Medikamentenkonzentrationen für weitere Versuche zu ermitteln, wurde ein MTT-Viabilitätstest eingesetzt. Die Tests wurde an beiden humanen Nierenzelllinien HK-2 und TK-173 Zellen durchgeführt.

3.1.1 Zellviabilität von HK-2 unter CNI Behandlung

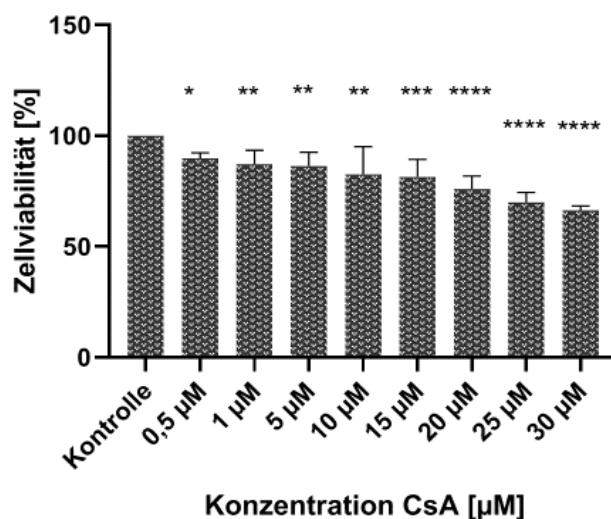


Abbildung 8: Viabilität von HK-2 Zellen nach 48 h CsA-Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte von 6 Versuchen als Balken mit der Standardabweichung als Whisker. Die Ordinate zeigt die Zellviabilität in Relation zu der der Kontrolle. Auf der Abszisse sind die unterschiedlichen Konzentrationen von CsA in aufsteigender Reihenfolge abgebildet. Mittels t-Test wurde auf signifikante Unterschiede gegenüber einer unbehandelten Kontrolle getestet. Signifikante Unterschiede einer behandelten Probe gegenüber der Kontrolle sind wie folgt gekennzeichnet: ns: $p > 0,05$; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$; ****: $p \leq 0,0001$.

Bei der Behandlung von HK-2 Zellen mit CsA zeigte sich, dass bei jeder der eingesetzten Konzentrationen von CsA die Zellviabilität in Relation zur unbehandelten Kontrolle verringert ist. Mit steigender CsA-Konzentration nimmt die Zellviabilität stetig ab, wie Abbildung 8 veranschaulicht. Die einzelnen Zahlenwerte sind der verbesserten Übersicht halber Tabelle 12 zu entnehmen.

Tabelle 12: Zahlenwerte des MTT-Tests HK-2 mit CsA

Konzentration von CsA [μM]	Zellviabilität relativ zur Kontrolle (Mittelwert) [%]	Standardabweichung	Signifikanz (p-Wert)
0,5	89,79	2,482	0,0248
1	87,24	6,17	0,0038
5	86,29	6,3	0,0039
10	82,55	12,55	0,0021
15	81,47	7,89	0,0003
20	75,89	5,86	< 0,0001
25	69,89	4,5	< 0,0001
30	66,32	1,98	< 0,0001

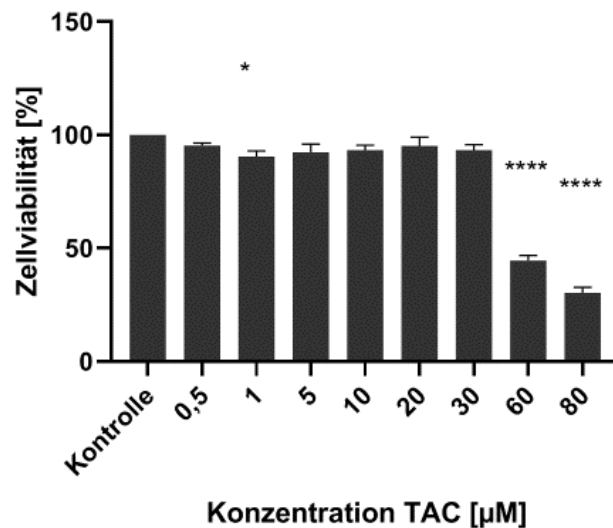


Abbildung 9: Viabilität von HK-2 Zellen nach 48 h TAC-Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte von 6 Versuchen als Balken mit der Standardabweichung als Whisker. Die Ordinate zeigt die Zellviabilität in Relation zu der der Kontrolle. Auf der Abszisse sind die unterschiedlichen Konzentrationen von TAC in aufsteigender Reihenfolge abgebildet. Mittels t-Test wurde auf signifikante Unterschiede gegenüber einer unbehandelten Kontrolle getestet. Signifikante Unterschiede einer behandelten Probe gegenüber der Kontrolle sind wie folgt gekennzeichnet: ns: $p > 0,05$; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$; ****: $p \leq 0,0001$.

Bei der Behandlung von HK-2 Zellen mit TAC zeigte sich erst ab einer Konzentration von 60 μM eine signifikante Abnahme der Zellviabilität, wie in Abbildung 9 dargestellt. Die einzelnen Zahlenwerte sind der verbesserten Übersicht halber Tabelle 13 zu entnehmen.

Tabelle 13: Zahlenwerte MTT HK-2 TAC

Konzentration von TAC [μM]	Zellviabilität relativ zur Kontrolle (Mittelwert) [%]	Standardabweichung	Signifikanz (p-Wert)
0,5	95,30	1,13	0,5547
1	90,44	2,44	0,0246
5	92,36	3,54	0,0978
10	93,32	2,18	0,1782
20	95,18	3,92	0,5296
30	93,33	2,3	0,216
60	44,6	2,56	< 0,0001
80	30,36	2,29	< 0,0001

3.1.2 Zellviabilität von TK-173 unter CNI Behandlung

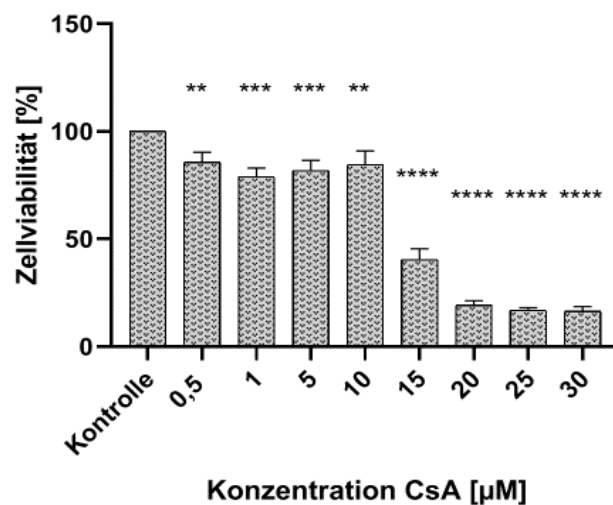


Abbildung 10: Viabilität von TK-173 Zellen nach 48 h CsA-Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte von 6 Versuchen als Balken mit der Standardabweichung als Whisker. Die Ordinate zeigt die Zellviabilität in Relation zu der der Kontrolle. Auf der Abszisse sind die unterschiedlichen Konzentrationen von CsA in aufsteigender Reihenfolge abgebildet. Mittels t-Test wurde auf signifikante Unterschiede gegenüber einer unbehandelten Kontrolle getestet. Signifikante Unterschiede einer behandelten Probe gegenüber der Kontrolle sind wie folgt gekennzeichnet: ns: $p > 0,05$; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$; ****: $p \leq 0,0001$.

Bei der Behandlung von TK-173 mit CsA zeigten die eingesetzten Konzentrationen von 0,5 μM - 10 μM eine geringe Abnahme der Zellviabilität. Die Konzentration 15 μM bewirkte eine Abnahme der Zellviabilität um mehr als die Hälfte. Konzentrationen von 20 μM - 30 μM führten zu einer starken Abnahme der Zellviabilität. Abbildung 10 gibt eine Übersicht. Die einzelnen Zahlenwerte sind der verbesserten Übersicht halber Tabelle 14 zu entnehmen.

Tabelle 14: Zahlenwerte MTT TK-173 CsA

Konzentration von CsA [μM]	Zellviabilität relativ zur Kontrolle (Mittelwert) [%]	Standardabweichung	Signifikanz (p-Wert)
0,5	85,70	4,590	0,0052
1	78,93	3,96	0,0001
5	81,87	4,69	0,0005
10	84,54	6,37	0,0078
15	40,41	5,07	< 0,0001
20	19,13	2,15	< 0,0001
25	16,79	1,26	< 0,0001
30	16,42	2,1	< 0,0001

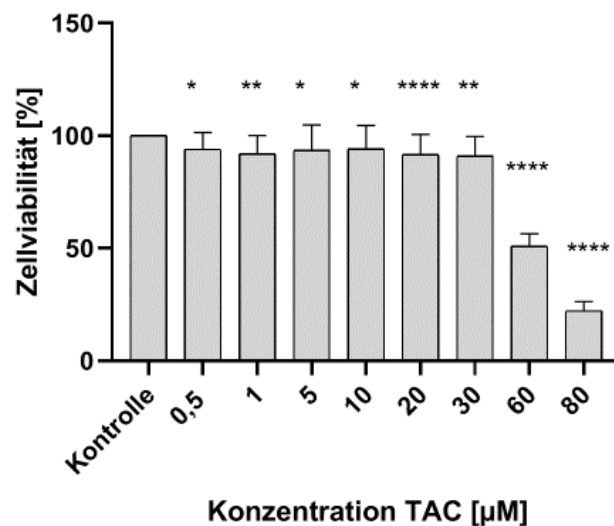


Abbildung 11: Viabilität von TK-173 Zellen nach 48 h TAC-Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte von 6 Versuchen als Balken mit der Standardabweichung als Whisker. Die Ordinate zeigt die Zellviabilität in Relation zu der der Kontrolle. Auf der Abszisse sind die unterschiedlichen Konzentrationen von TAC in aufsteigender Reihenfolge abgebildet. Mittels t-Test wurde auf signifikante Unterschiede gegenüber einer unbehandelten Kontrolle getestet. Signifikante Unterschiede einer behandelten Probe gegenüber der Kontrolle sind wie folgt gekennzeichnet: ns: $p > 0,05$; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$; ****: $p \leq 0,0001$.

Bereits die geringsten eingesetzten Konzentrationen von TAC bewirkten eine geringe, aber signifikante Abnahme der Zellviabilität von TK-173. Die Konzentrationen 0,5 μM – 30 μM zeigten eine geringe Abnahme der Zellviabilität. Die Konzentrationen 60 μM und 80 μM zeigten eine Abnahme von ca. 50% bzw. 75%. Abbildung 11 gibt eine Übersicht. Die einzelnen Zahlenwerte sind der verbesserten Übersicht halber Tabelle 15 zu entnehmen.

Tabelle 15: Zahlenwerte MTT TK-173 TAC

Konzentration von TAC [μM]	Zellviabilität relativ zur Kontrolle (Mittelwert) [%]	Standardabweichung	Signifikanz (p-Wert)
0,5	93,94	7,466	0,0385
1	91,96	8,1	0,0076
5	93,58	11,26	0,0325
10	94,19	10,37	0,0429
20	91,72	8,89	< 0,0001
30	91,05	8,58	0,0015
60	50,89	5,56	< 0,0001
80	22,25	4,02	< 0,0001

3.2 Proteomische Analyse

Drei verschiedene Proben von HK-2 Zellen wurden proteomisch analysiert. Eine unbehandelte Kontrolle, eine mit 10 μM CsA behandelte Probe und eine mit 60 μM TAC behandelte Probe. Abbildung 12 zeigt beispielhaft ein Polyacrylamidgel, welches anschließend zur proteomischen Analyse weiterverwendet wurde.

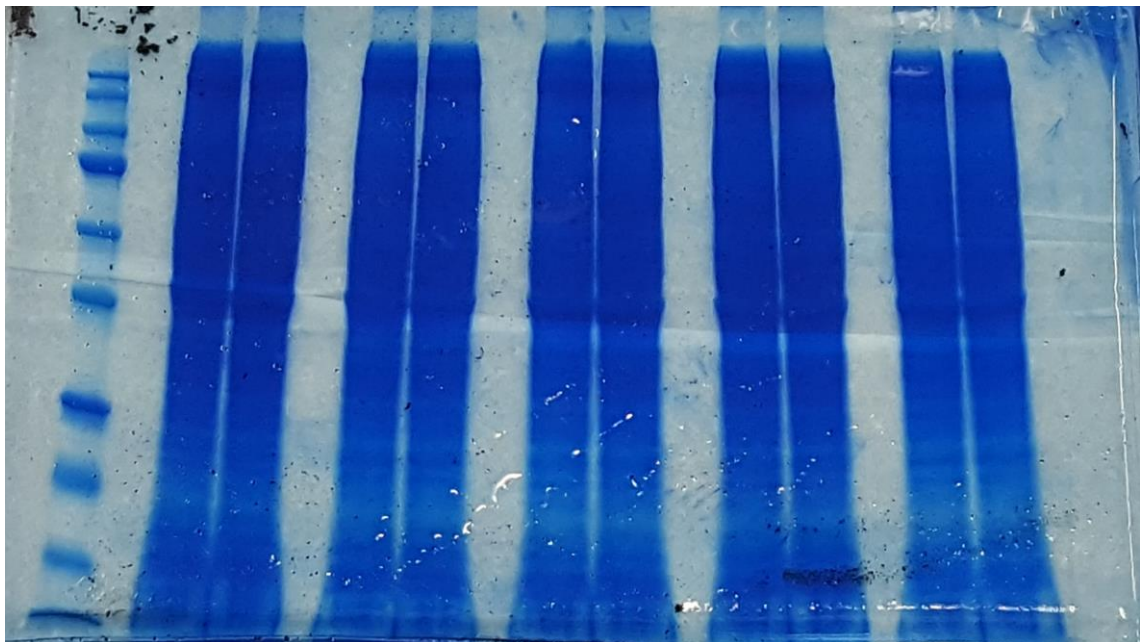


Abbildung 12: Polyacrylamidgel vor dem Ausstanzen. Von links nach rechts wurde das Gel wie folgt beladen (alle Proben in doppelter Ausführung und mit einer Tasche als Abstandhalter dazwischen): Marker, unbehandelte Kontrolle, TAC 1 μM , TAC 60 μM , CsA 10 μM , CsA 20 μM . Alle Banden wurden ausgestanzt und trypsinverdaut. Letztlich wurden Kontrolle, TAC 60 μM und CsA 10 μM proteomisch analysiert.

Insgesamt wurden 4502 Proteine identifiziert, davon 4186 in allen 3 Proben, 26 ausschließlich in der Kontrolle, 21 ausschließlich in der mit CsA Behandelten und 34 ausschließlich in der mit TAC behandelten Probe. Die Verteilung zeigt Abbildung 13.

Einer Anpassung des Signifikanzniveaus für multiples testen (Bonferroni $p < 0,00001$; Benjamini-Hochberg $p < 0,00001$) hielt keines der Proteine stand, weshalb auf eine solche Anpassung verzichtet wurde. Als signifikant wurden Proteine mit einem $p < 0,05$ angesehen. Um die Ergebnisse zusätzlich zu validieren, wurden nur Proteine als reguliert angesehen, die zusätzlich einen *Fold Change* von ≤ -1 bzw. ≥ 1 aufweisen.

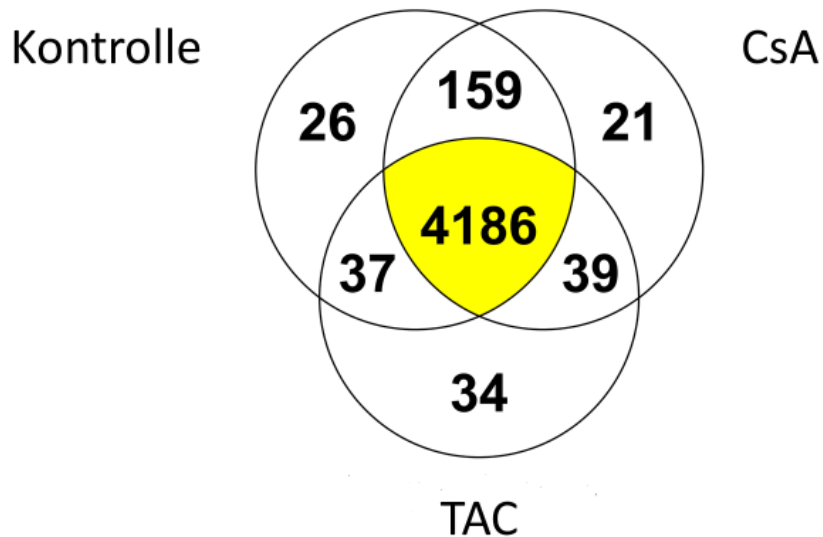


Abbildung 13: Verteilung identifizierter Proteine. Das Venn-Diagramm illustriert die Proteine, die nur in einer der Proben, in zwei der Proben oder in allen drei Proben identifiziert wurden.

Die Proteine, die ausschließlich in behandelten Proben identifiziert werden konnten, wurden getrennt auf Interaktionen und biologische Prozesse, in die sie involviert sind, überprüft. Mittels STRING wurden die folgenden Netzwerke erstellt und betroffene Funktionen identifiziert.

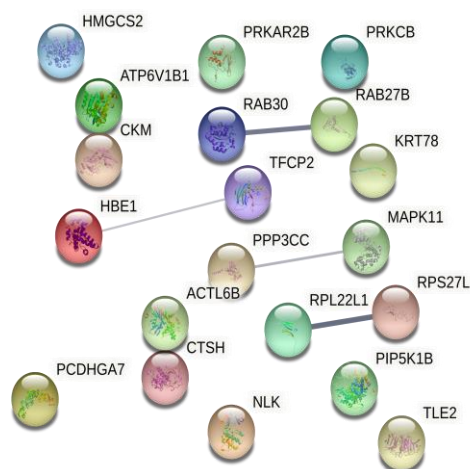


Abbildung 14: STRING-Netzwerk der Proteine, die exklusiv in der mit CsA behandelten Probe identifiziert wurden. Abgebildet sind die einzelnen Proteine als Kugeln. Die Linien zwischen den Kugeln

zeigen eine Interaktion dieser Proteine miteinander an. Je dicker die Linie, desto mehr Evidenz findet STRING für die gegebene Interaktion. Lizenz: CC-BY 4.0

STRING erstellt aus den Proteinen, die exklusiv in der mit CsA behandelten Probe indentifiziert wurden 20 sogenannte Knoten. Zwischen den Knoten können vier Interaktionen festgestellt werden. Bei der gegebenen Menge an Knoten sagt STRING zwei Interaktionen vorher. In diesem Netzwerk sind nicht signifikant mehr Interaktionen zu finden als erwartet (p -Wert 0,24). Zudem gibt STRING an, welchen Zellfunktionen und Signalwegen die Proteine zugeordnet werden können. Mit der niedrigsten *False Discovery Rate* (fdr) werden MAP Kinase Aktivität (fdr 0,0069) bei den Zellfunktionen und der VEGF Signalweg (fdr 0,004) angegeben. Die Knoten und ihre Interaktionen sind in Abbildung 14 dargestellt.

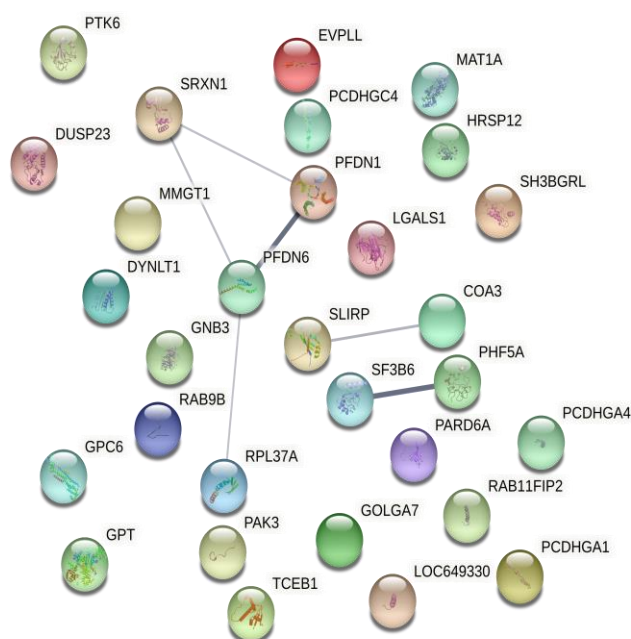


Abbildung 15: STRING-Netzwerk der Proteine, die exklusiv in der mit TAC behandelten Probe identifiziert wurden. Abgebildet sind die einzelnen Proteine als Kugeln. Die Linien zwischen den Kugeln zeigen eine Interaktion dieser Proteine miteinander an. Je dicker die Linie, desto mehr Evidenz findet STRING für die gegebene Interaktion. Lizenz: CC-BY 4.0

Aus den Proteinen, die exklusiv in der mit TAC behandelten Probe identifiziert werden konnten, erstellt STRING ein Netzwerk mit 30 Knoten. Zwischen den Knoten können sechs Interaktionen ermittelt werden. Bei dieser Menge an Knoten erwartet STRING fünf Interaktionen, sodass nicht signifikant mehr Interaktionen im Netzwerk zu finden sind (p -Wert 0,343). Es können für dieses Netzwerk keine Zellfunktionen angegeben werden, die besonders vertreten sind. Der Prefoldin Komplex als zelluläre Komponente zeigt sich angereichert (fdr 0,0134). Die Knoten und ihre Interaktionen sind in Abbildung 15 dargestellt.

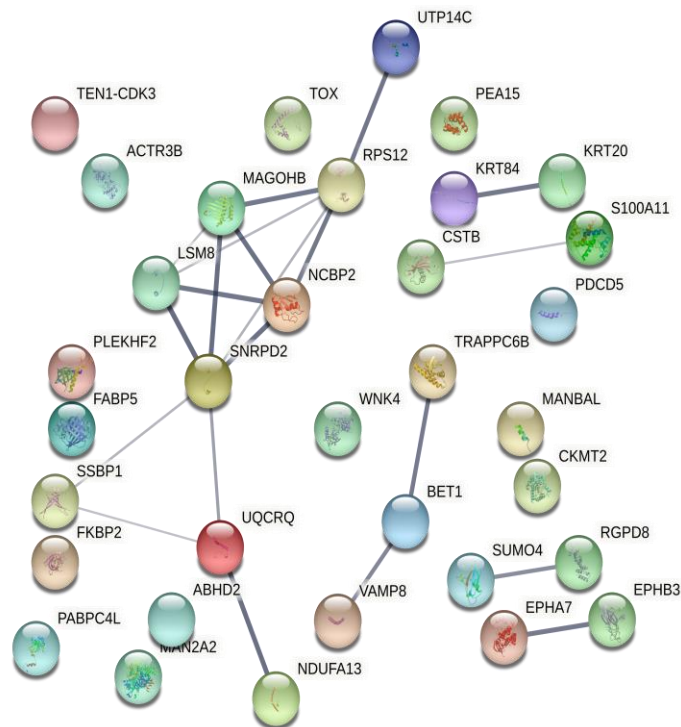


Abbildung 16: STRING-Netzwerk der Proteine, die in der mit CsA und der mit TAC behandelten Probe identifiziert wurde, nicht jedoch in der unbehandelten Kontrolle. Abgebildet sind die einzelnen Proteine als Kugeln. Die Linien zwischen den Kugeln zeigen eine Interaktion dieser Proteine miteinander an. Je dicker die Linie, desto mehr Evidenz findet STRING für die gegebene Interaktion. Lizenz: CC-BY 4.0

Von den Proteinen, die sowohl in der mit CsA behandelten Probe als auch in der mit TAC Behandelten identifiziert wurden erstellt STRING ein Netzwerk mit 34 Knoten. Darin befinden sich 21 Interaktionen. STRING erwartet für diese Menge Knoten sieben Interaktionen. Es befinden sich signifikant mehr Interaktionen in diesem Netzwerk als erwartet (p -Wert $2,6E-05$). Die am meisten angereicherten Zellfunktionen betreffen die Ephrinrezeptoren (fdr 0,0263), die bei der Wachstumsrichtung von Axonen (fdr 0,0151) eine Rolle spielen. Angereicherte Signalwege sind SNARE-Interaktionen (fdr 0,0117), mRNA Überwachungs Signalweg (fdr 0,005), RNA Transport (fdr 0,00025) und das Spliceosome (fdr 0,0012). Die Knoten und ihre Interaktionen sind in Abbildung 16 dargestellt.

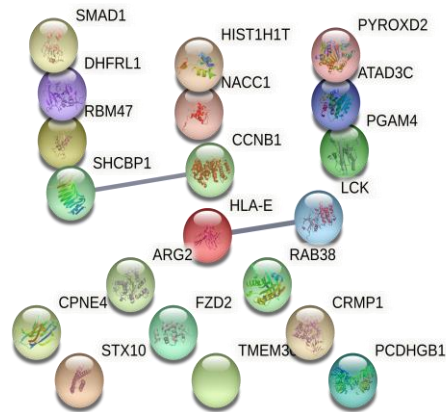


Abbildung 17: STRING-Netzwerk der Proteine, die exklusiv in der unbehandelten Kontrolle identifiziert wurden. Abgebildet sind die einzelnen Proteine als Kugeln. Die Linien zwischen den Kugeln zeigen eine Interaktion dieser Proteine miteinander an. Je dicker die Linie, desto mehr Evidenz findet STRING für die gegebene Interaktion. Lizenz: CC-BY 4.0

Von den Proteinen, die ausschließlich in der unbehandelten Kontrolle identifiziert wurden, erstellt STRING ein Netzwerk mit 20 Knoten. Zwischen den Knoten werden zwei Interaktionen ausgemacht, während zwei Interaktionen erwartet wurden (p -Wert 0,456). Es bestehen nicht signifikant mehr Interaktionen in diesem Netzwerk als erwartet. Unter den im Netzwerk angereicherten molekularen Funktionen befindet sich die T-Zellrezeptorbindung (fdr 0,007) und die Bindung der SH2-Domäne (fdr 0,0453). Die Knoten und ihre Interaktionen sind in Abbildung 17 dargestellt.

3.2.1 Einfluss der CsA-Behandlung auf das Proteom der Nierenzellen

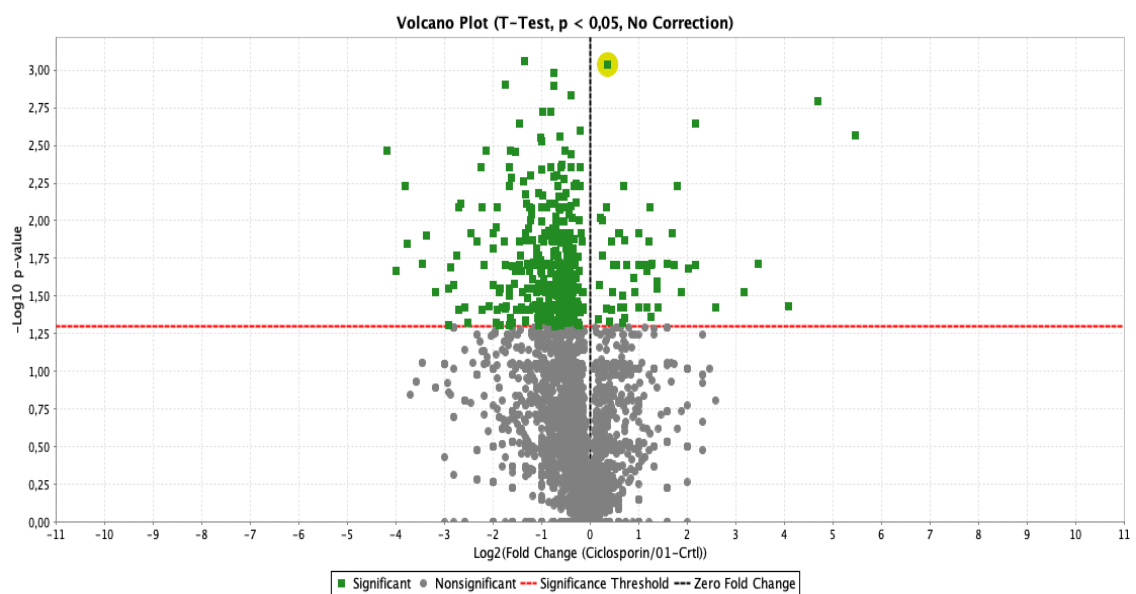


Abbildung 18: Volcano Plot der Proteine in der mit CsA behandelten Probe im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle. Die Abszisse gibt den Logarithmus zur Basis 2 des *Fold Change* an. Die Ordinate

gibt den negativen dekadischen Logarithmus des p-Wertes an. Die rote Linie trennt die signifikant veränderten von den nicht-signifikant veränderten Proteinen. Jeder Kasten bzw. Punkt steht für ein Protein.

Nach der Normalisierung der Proteine in Scaffold gibt Abbildung 18 einen ersten Überblick über die Verteilung von hoch- bzw. herunterregulierten Proteinen. Von den in Scaffold normalisierten Proteinen wurde anschließend mit IPA eine Karte erstellt, um festzustellen, welche zellulären Kompartimente betroffen und welche Signalwege innerhalb der Zelle aktiviert bzw. inhibiert wurden. Kartiert wurden 223 regulierte Proteine. Davon zeigten sich 158 Proteine als herunterreguliert ($Fold\ Change \leq -1$) und 65 Proteine als hochreguliert ($Fold\ Change \geq 1$). Insgesamt waren 54 Signalwege reguliert, die in Abbildung 19 bis Abbildung 21 aufgeführt werden. Abbildung 22 zeigt eine Toxizitätsanalyse, in der die regulierten Signalwege mit denen bekannter Pathologien verglichen werden. Zusätzlich waren 13 Netzwerke molekularer Signalwege reguliert. Diejenigen, die die Immunantwort oder den Zelltod betreffen sind in Abbildung 23 bis Abbildung 25 gezeigt. Die einzelnen Proteine, ihr $Fold\ Change$ und ihr p-Wert sind in Tabelle A1 im Anhang aufgeführt, die regulierten Signalwege in Tabelle A3.

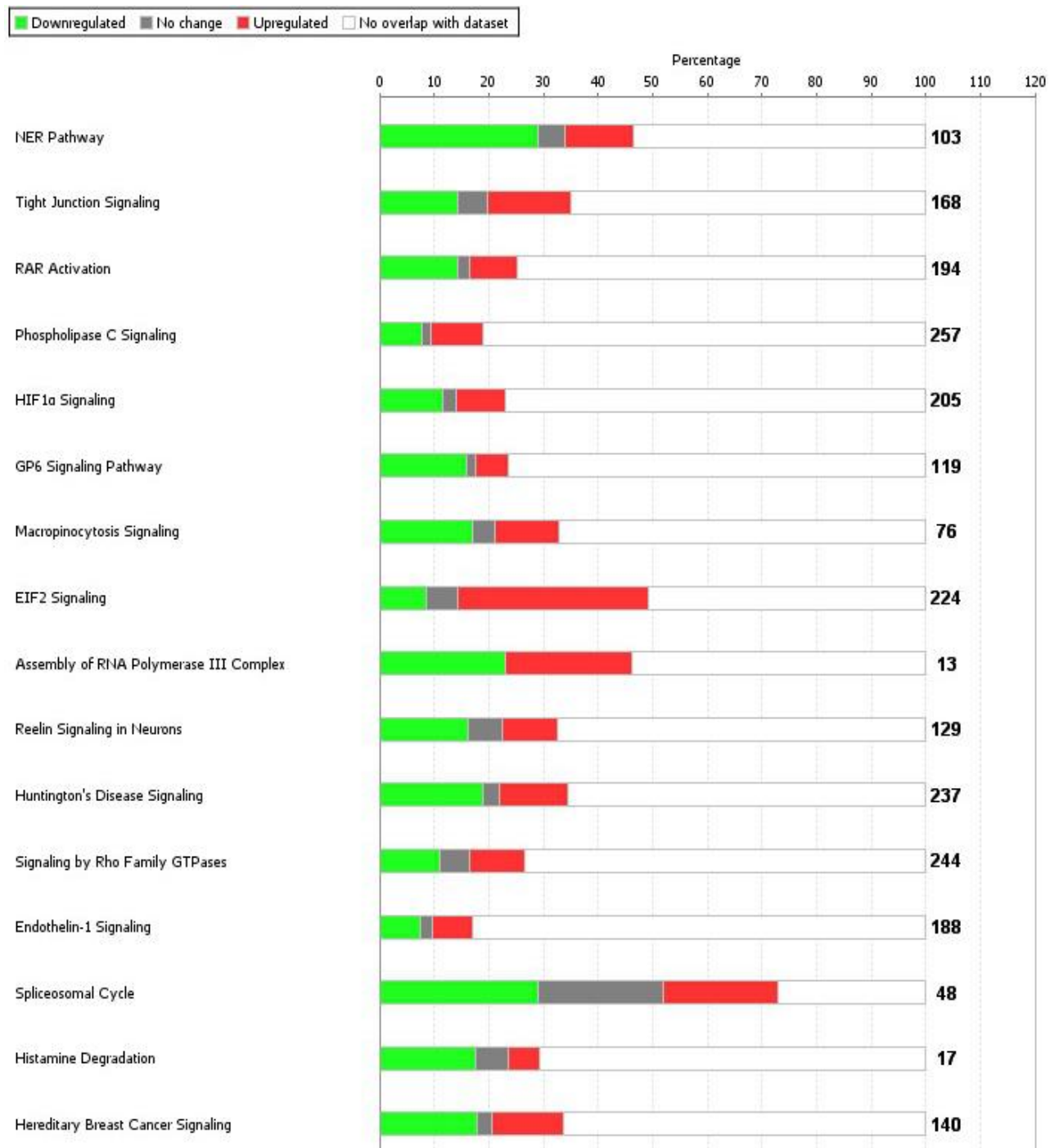
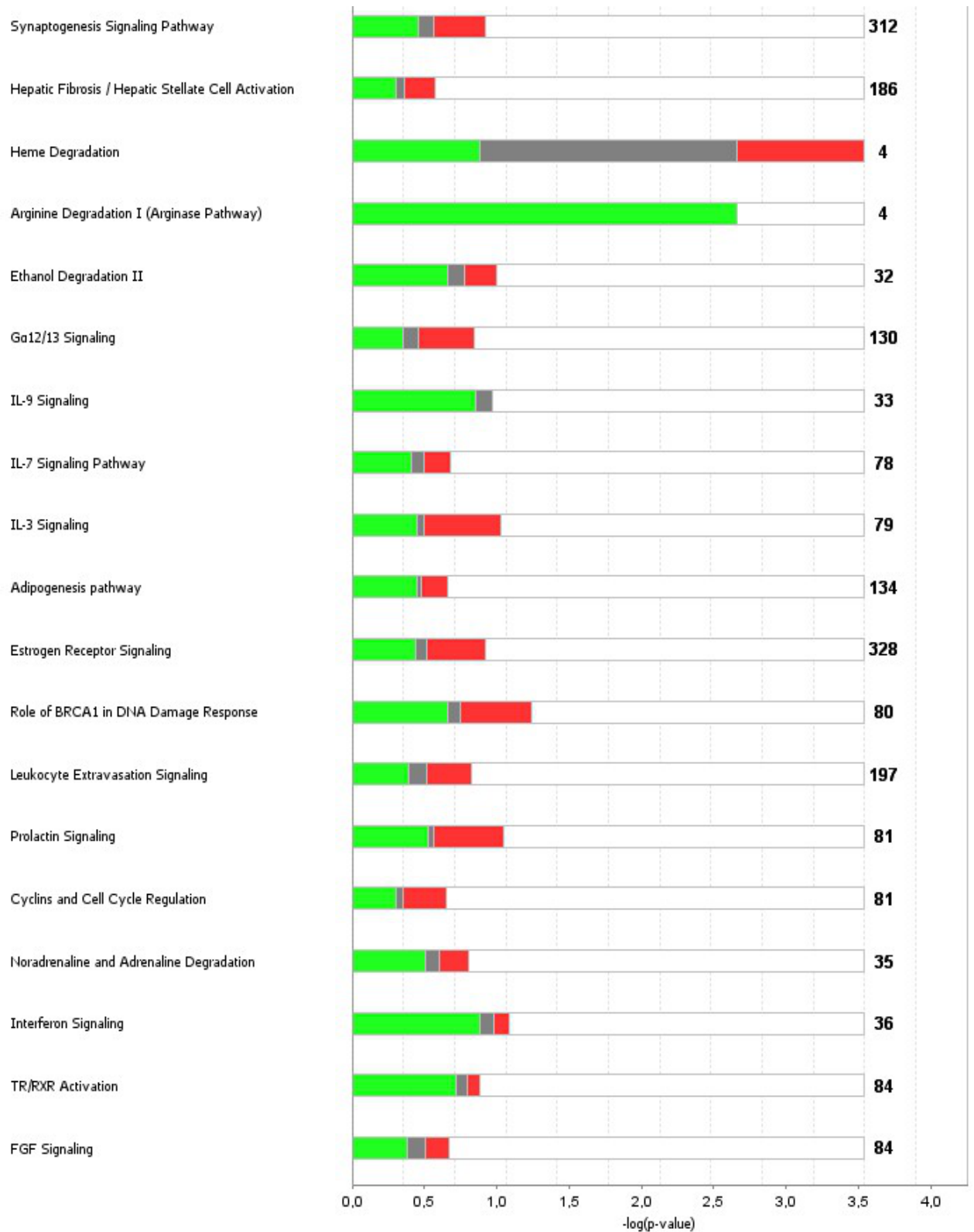


Abbildung 19: Regulierte Signalwege nach CsA Behandlung 1/3. Die Balken zeigen den Anteil der regulierten Proteine an der Gesamtzahl (rechts neben den Balken) der in den Signalweg involvierten Proteine an. Grün zeigt eine Herunterregulierung, Rot eine Hochregulierung, in grau markiert sind nicht regulierte Proteine.

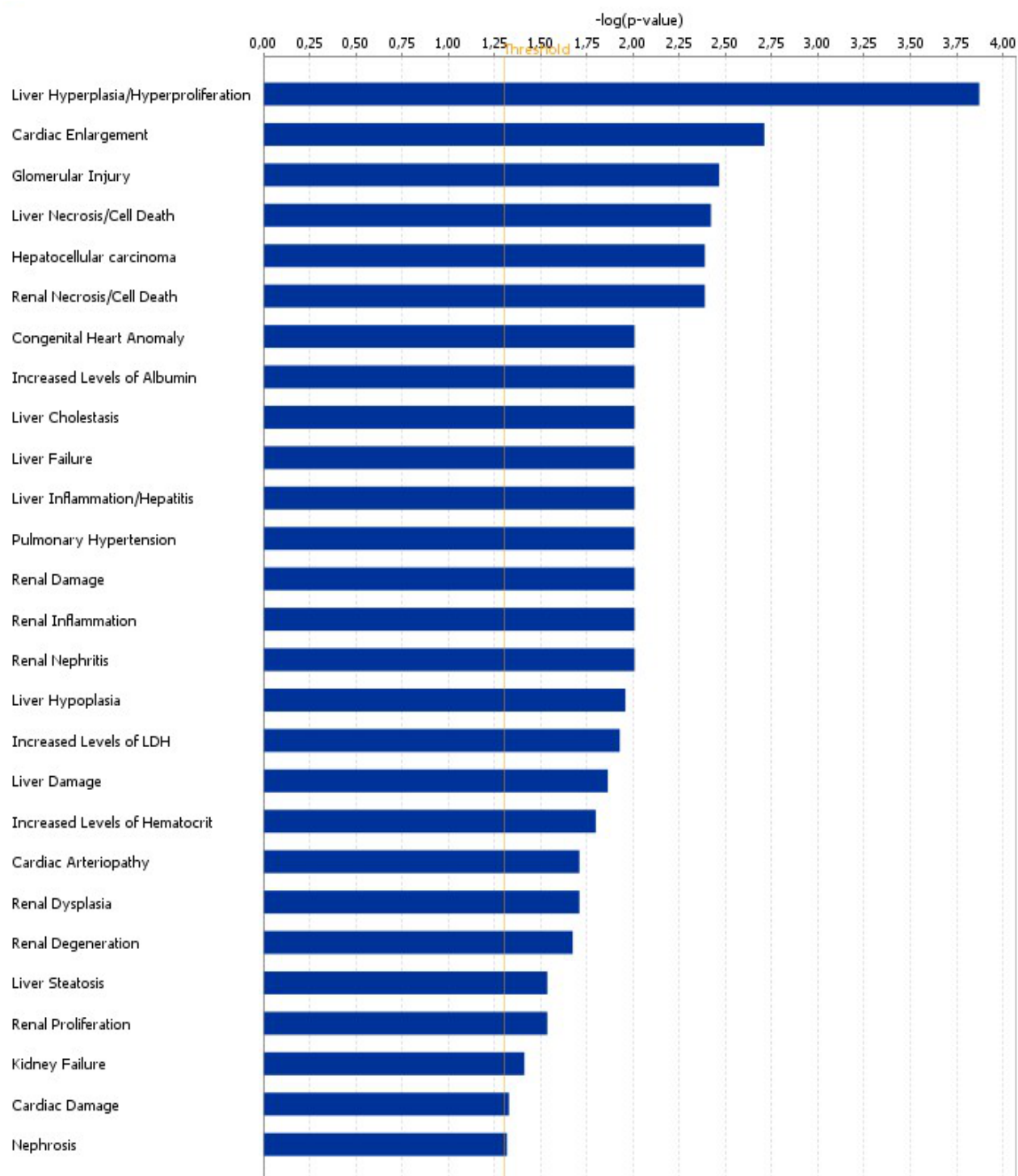


Abbildung 20: Regulierte Signalwege nach CsA Behandlung 2/3. Die Balken zeigen den Anteil der regulierten Proteine an der Gesamtzahl (rechts neben den Balken) der in den Signalweg involvierten Proteine an. Grün zeigt eine Herunterregulierung, Rot eine Hochregulierung, in grau markiert sind nicht regulierte Proteine.



© 2000-2020 QIAGEN. All rights reserved.

Abbildung 21: Regulierte Signalwege nach CsA Behandlung 3/3. Die Balken zeigen den Anteil der regulierten Proteine an der Gesamtzahl (rechts neben den Balken) der in den Signalweg involvierten Proteine an. Grün zeigt eine Herunterregulierung, Rot eine Hochregulierung, in grau markiert sind nicht regulierte Proteine.



© 2000-2020 QIAGEN. All rights reserved.

Abbildung 22: IPA Toxizitätsanalyse der proteomischen Daten von HK-2 nach CsA Behandlung.

IPA findet für 27 bekannte Krankheiten bzw. Krankheitsaspekte signifikante Überschneidungen mit den für CsA erhobenen proteomischen Daten. Direkt die Niere betreffen 10 der 27.

Die Analyse bezüglich Nephrotoxizität erzielt die signifikantesten Regulierungen in den IPA-Signalwegen Glomeruläre Verletzungen, renale Nekrose/Zelltod, renaler Schaden, renale Inflammation und Nephritis.

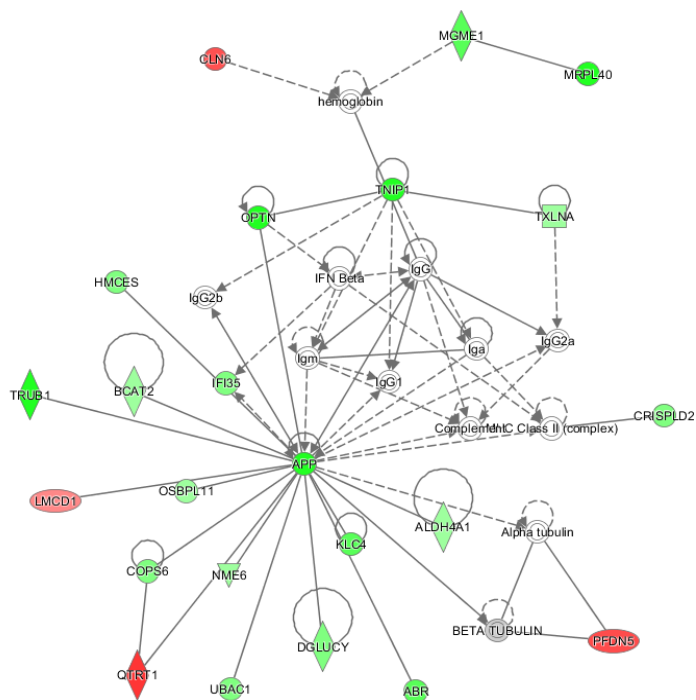


Abbildung 23: CsA reguliert zelluläre Immunantwort, zelluläre Fortbewegung, hämatologische Entwicklung und Funktion. Grün zeigt eine Herunterregulierung, Rot eine Hochregulierung. Die Intensität der Farben indiziert das Ausmaß der Regulierung. Ein durchgezogener Pfeil zeigt eine direkte Interaktion, ein gestrichelter eine indirekte Interaktion.

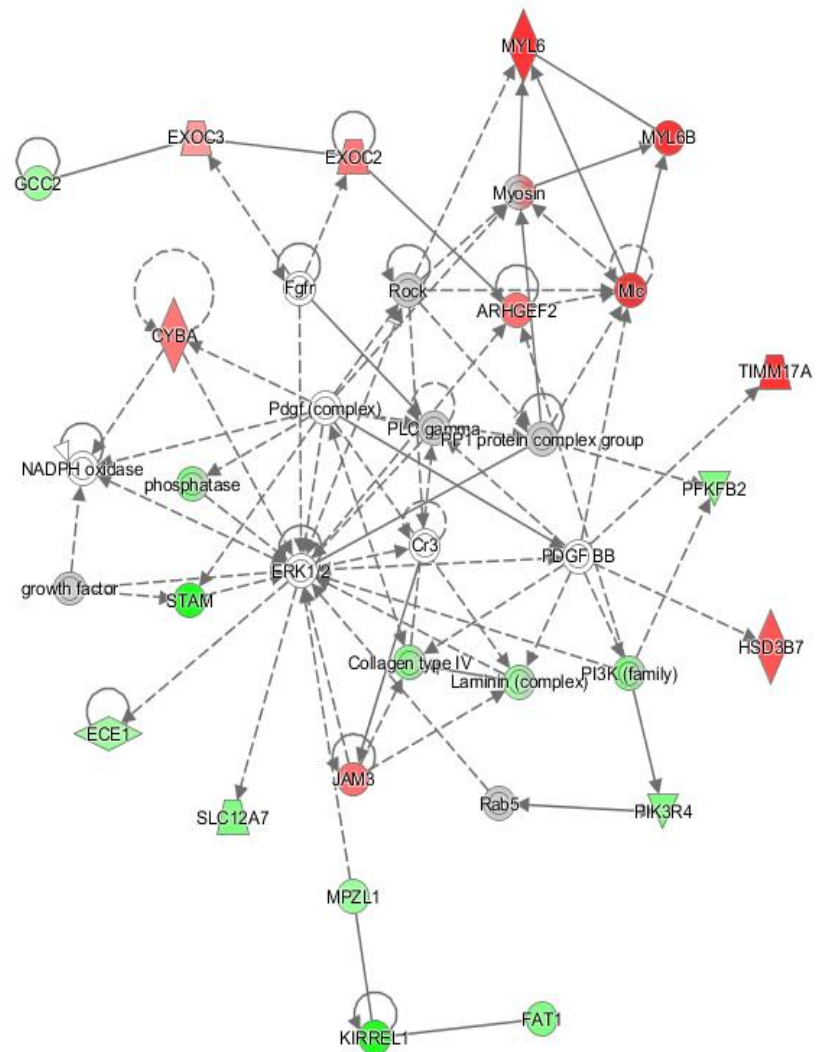


Abbildung 24: CsA reguliert Zelltod und -überleben, Zellmorphologie, renale Nekrose/Zelltod. Grün zeigt eine Herunterregulierung, Rot eine Hochregulierung. Die Intensität der Farben indiziert das Ausmaß der Regulierung. Ein durchgezogener Pfeil zeigt eine direkte Interaktion, ein Gestrichelter eine indirekte Interaktion.

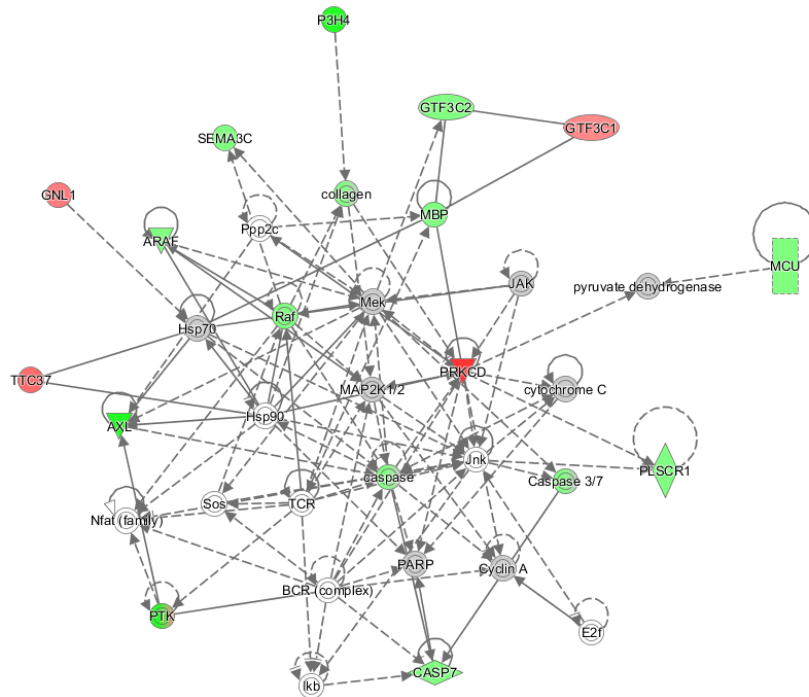


Abbildung 25: CsA reguliert Zellzyklus, Zelltod und -überleben, embryonale Entwicklung. Grün zeigt eine Herunterregulierung, Rot eine Hochregulierung. Die Intensität der Farben indiziert das Ausmaß der Regulierung. Ein durchgezogener Pfeil zeigt eine direkte Interaktion, ein Gestrichelter eine indirekte Interaktion.

3.2.2 Einfluss der TAC-Behandlung auf das Proteom der Nierenzellen

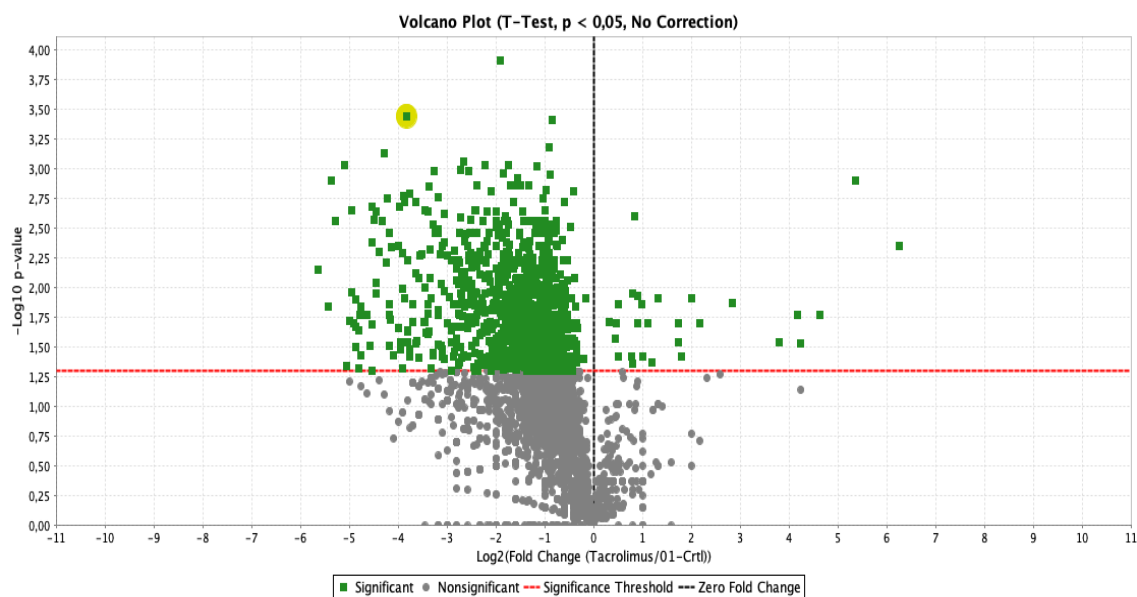


Abbildung 26: Volcano Plot der Proteine in der mit TAC behandelten Probe im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle. Die Abszisse gibt den Logarithmus zur Basis 2 des *Fold Change* an. Die Ordinate gibt den negativen dekadischen Logarithmus des p-Wertes an. Die rote Linie trennt die signifikant veränderten von den nicht-signifikant veränderten Proteinen. Jeder Kasten bzw. Punkt steht für ein Protein.

Nach der Normalisierung der Proteine in Scaffold gibt Abbildung 26 einen ersten Überblick über die Verteilung von hoch- bzw. herunterregulierten Proteinen. Von den in Scaffold normalisierten Proteinen wurde anschließend mit IPA eine Karte erstellt, um festzustellen, welche zellulären Kompartimente betroffen und welche Signalwege innerhalb der Zelle aktiviert bzw. inhibiert wurden. Kartiert wurden 706 regulierte Proteine. Davon zeigten sich 576 Proteine als herunterreguliert ($\text{Fold Change} \leq -1$) und 130 Proteine als hochreguliert ($\text{Fold Change} \geq 1$). Insgesamt waren 486 Signalwege reguliert, die in Abbildung 27 bis Abbildung 30 aufgeführt werden. Abbildung 31 zeigt eine Toxizitätsanalyse, in der die regulierten Signalwege mit denen bekannter Pathologien verglichen werden. Zusätzlich waren 25 Netzwerke molekularer Signalwege reguliert. Diejenigen, die die Immunantwort oder den Zelltod betreffen sind in Abbildung 32 bis Abbildung 35 gezeigt.

Die einzelnen Proteine, ihr *Fold Change* und ihr p-Wert sind in Tabelle A2 im Anhang aufgeführt, die regulierten Signalwege in Tabelle A4.



Abbildung 27: Regulierte Signalwege nach TAC-Behandlung Teil 1/4. Die Balken zeigen den Anteil der regulierten Proteine an der Gesamtzahl (rechts neben den Balken) der in den Signalweg involvierten Proteine an. Grün zeigt eine Herunterregulierung, Rot eine Hochregulierung, in grau markiert sind nicht regulierte Proteine.

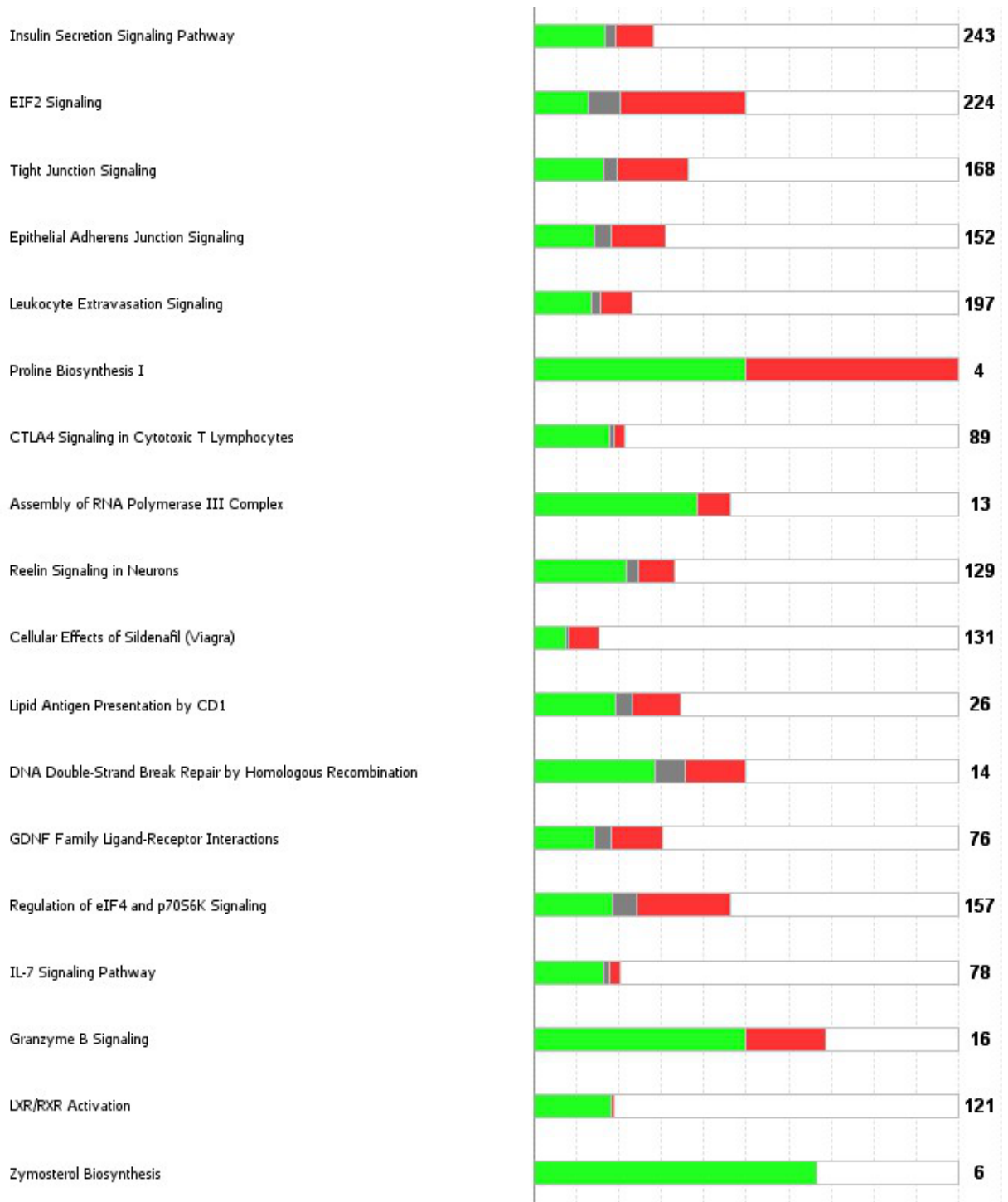


Abbildung 28: Regulierte Signalwege nach TAC-Behandlung Teil 2/4. Die Balken zeigen den Anteil der regulierten Proteine an der Gesamtzahl (rechts neben den Balken) der in den Signalweg involvierten Proteine an. Grün zeigt eine Herunterregulierung, Rot eine Hochregulierung, in grau markiert sind nicht regulierte Proteine.

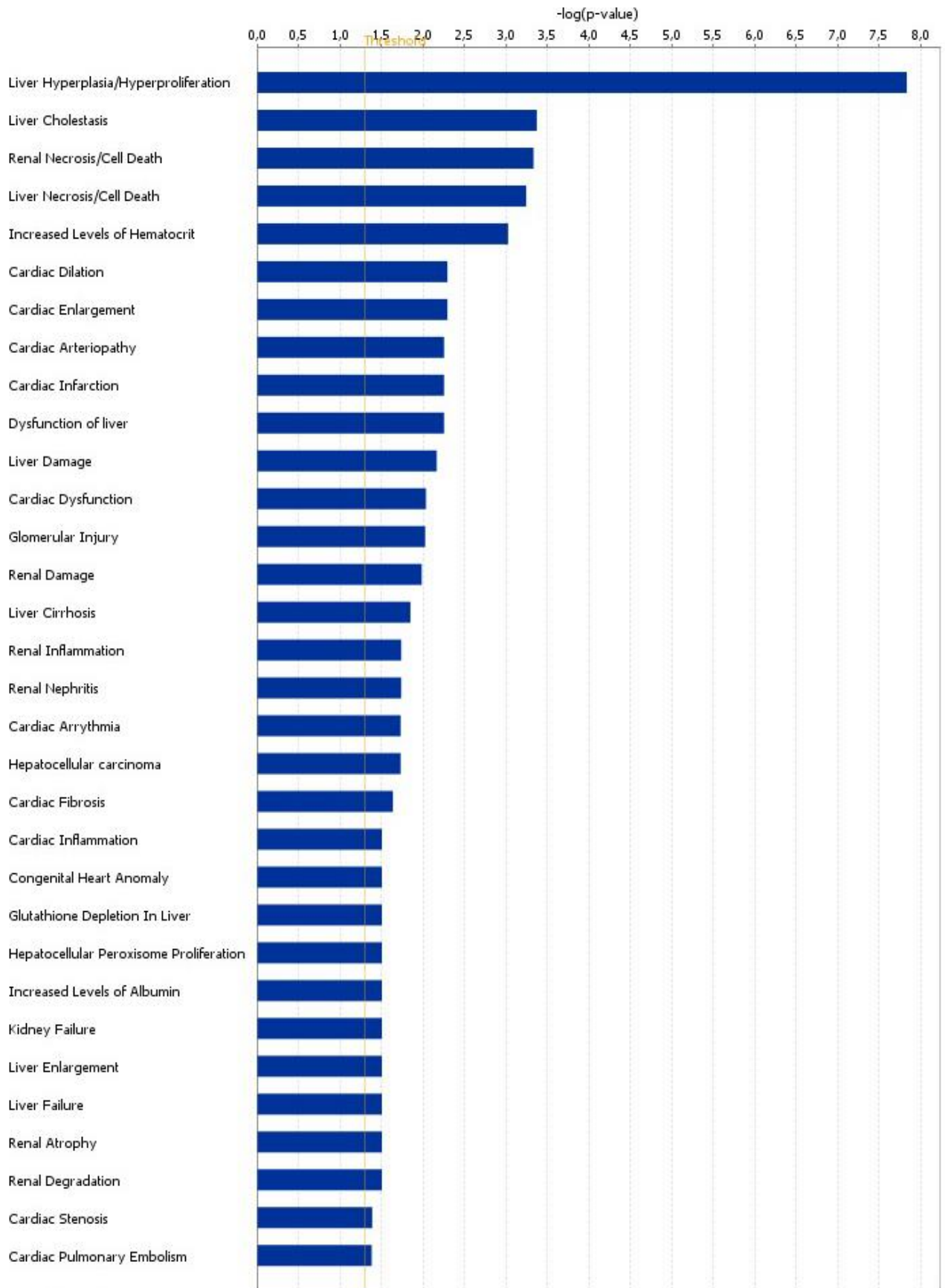


Abbildung 29: Regulierte Signalwege nach TAC-Behandlung Teil 3/4. Die Balken zeigen den Anteil der regulierten Proteine an der Gesamtzahl (rechts neben den Balken) der in den Signalweg involvierten Proteine an. Grün zeigt eine Herunterregulierung, Rot eine Hochregulierung, in grau markiert sind nicht regulierte Proteine.



© 2000-2020 QIAGEN. All rights reserved.

Abbildung 30: Regulierte Signalwege nach TAC-Behandlung Teil 4/4. Die Balken zeigen den Anteil der regulierten Proteine an der Gesamtzahl (rechts neben den Balken) der in den Signalweg involvierten Proteine an. Grün zeigt eine Herunterregulierung, Rot eine Hochregulierung, in grau markiert sind nicht regulierte Proteine.



© 2000-2020 QIAGEN. All rights reserved.

Abbildung 31: IPA Toxizitätsanalyse der proteomischen Daten von HK-2 nach TAC-Behandlung.

IPA findet für 32 bekannte Krankheiten bzw. Krankheitsaspekte signifikante Überschneidungen mit den für CsA erhobenen proteomischen Daten. Direkt die Niere betreffen 8 der 32.

Die Analyse bezüglich Nephrotoxizität erzielt die signifikantesten Regulierungen in den IPA-Signalwegen renale Nekrose/Zelltod, glomeruläre Verletzung, renaler Schaden, renale Inflammation und Nephritis.

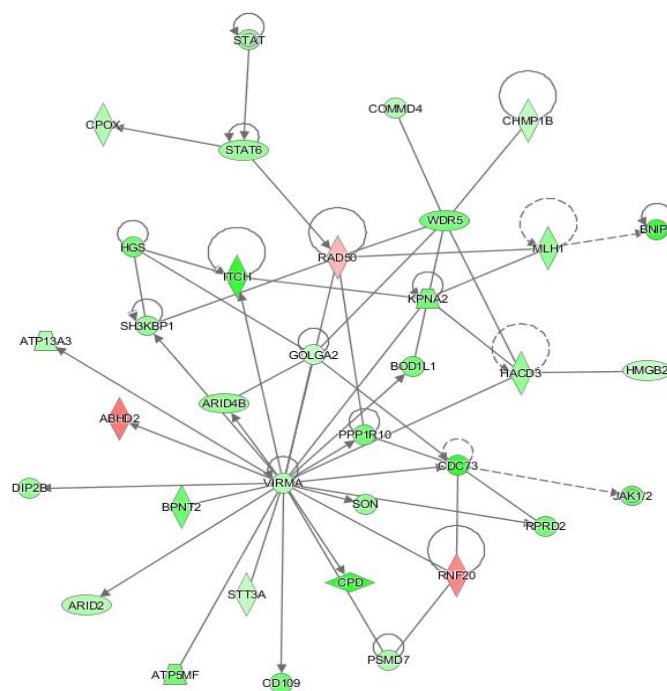


Abbildung 32: TAC reguliert Zellgefährdung, Gastrointestinale Erkrankungen, Lebererkrankungen.

Grün zeigt eine Herunterregulierung, Rot eine Hochregulierung. Die Intensität der Farben indiziert das Ausmaß der Regulierung. Ein durchgezogener Pfeil zeigt eine direkte Interaktion, ein gestrichelter eine indirekte Interaktion.

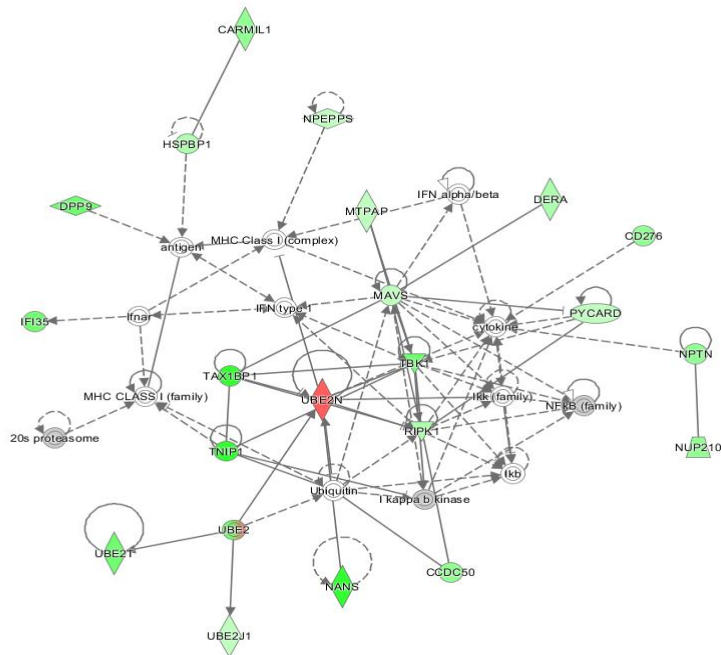


Abbildung 33: TAC reguliert Zelltod und -überleben, Zellsignalisierung, Zell-zu-Zell Signalisierung und Interaktion. Grün zeigt eine Herunterregulierung, Rot eine Hochregulierung. Die Intensität der Farben indiziert das Ausmaß der Regulierung. Ein durchgezogener Pfeil zeigt eine direkte Interaktion, ein gestrichelter eine indirekte Interaktion.

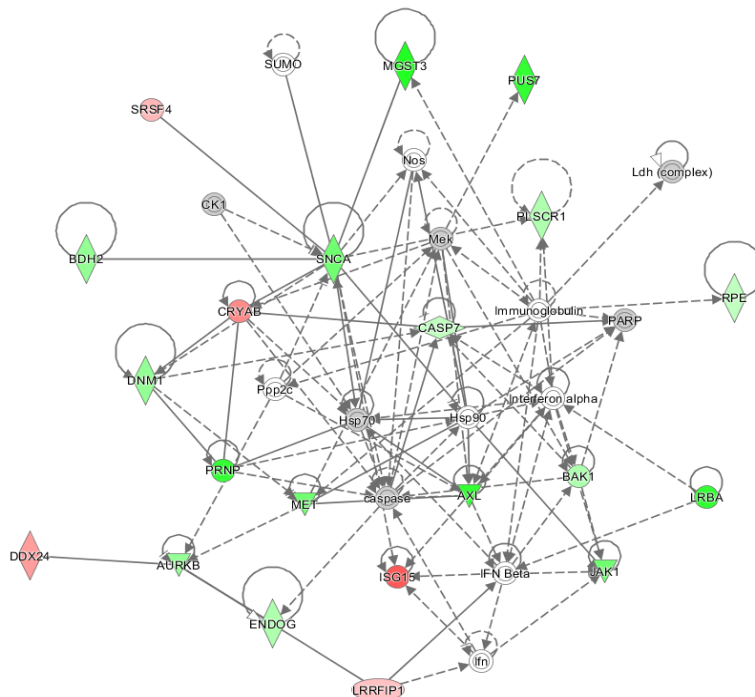


Abbildung 34: TAC reguliert Zelltod und -überleben, zelluläre Funktion und Instandhaltung, DNA-Replikation, -Rekombination und -Reparatur. Grün zeigt eine Herunterregulierung, Rot eine Hochregulierung. Die Intensität der Farben indiziert das Ausmaß der Regulierung. Ein durchgezogener Pfeil zeigt eine direkte Interaktion, ein gestrichelter eine indirekte Interaktion.

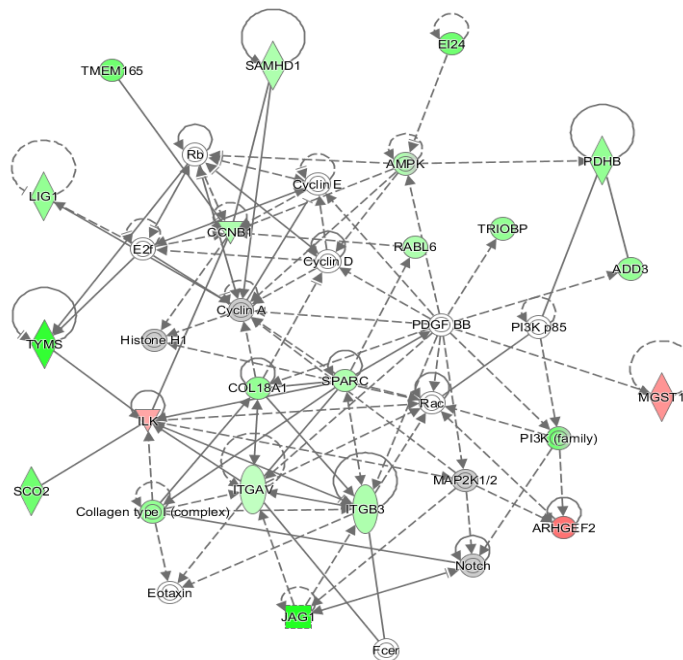


Abbildung 35: TAC reguliert Krebs, Zelltod und -überleben, Infektionskrankheiten. Grün zeigt eine Herunterregulierung, Rot eine Hochregulierung. Die Intensität der Farben indiziert das Ausmaß der Regulierung. Ein durchgezogener Pfeil zeigt eine direkte Interaktion, ein Gestrichelter eine indirekte Interaktion.

3.3 Western-Blot Analyse der Rolle der ER-Stress Proteine in der CNI-Therapie

Um die Auswirkung der CNI-Behandlung von HK-2 und TK-173 auf Proteine, die an ER-Stressreaktionen beteiligt sind zu untersuchen, wurden Western-Blots durchgeführt. Die Proteine GRP78, ERP57 und Calretikulin wurden mittels spezifischer Antikörper sichtbar gemacht und die Intensität der gemessenen Signale verglichen.

3.3.1 Einfluss der CNI-Behandlung auf die Expression von GRP78

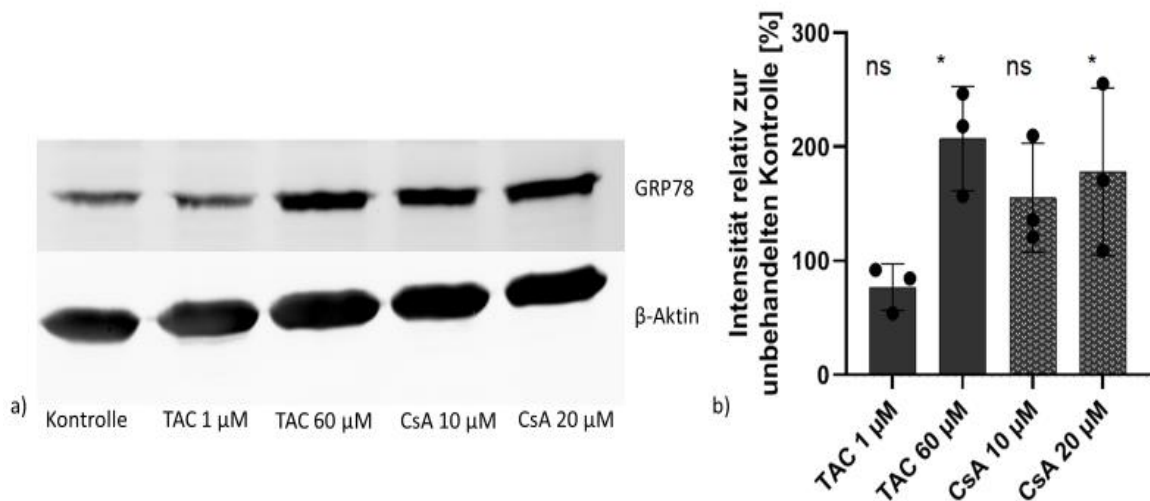


Abbildung 36: Western-Blot von HK-2 mit GRP78 Antikörper. a) Dargestellt ist exemplarisch eines von 3 Replikaten. b) Abgebildet sind die Werte von 3 Versuchen als Punkte und den Mittelwerten als Balken sowie mit der Standardabweichung als Whisker. Die Ordinate zeigt die Intensität in Relation zu der der Kontrolle. Auf der Abszisse sind die unterschiedlichen Konzentrationen von CNI mit denen behandelt wurde abgebildet. Auf die Abbildung der Kontrolle wurde verzichtet, weil diese in der gewählten Darstellung immer genau 100 betragen würde. Mittels t-Test wurde auf signifikante Unterschiede gegenüber einer unbehandelten Kontrolle getestet. Signifikante Unterschiede einer behandelten Probe gegenüber der Kontrolle sind wie folgt gekennzeichnet: ns: $p > 0,05$; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$; ****: $p \leq 0,0001$.

Bei der Behandlung von HK-2 mit TAC zeigt sich bei einer Konzentration von 60 μM eine signifikante ($p = 0,0154$) Zunahme der GRP78-Expression (Bandenintensität auf 207%) gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Abbildung 36). Die Behandlung mit 1 μM TAC zeigte keine signifikante ($p = 0,4849$) Veränderung der GRP78-Expression.

Beide verwendeten Konzentrationen von CsA führten zu einer Zunahme der Intensität der GRP78 Bande. Diese betrug 156% des Kontrollwertes bei 10 μM ($p = 0,0775$) und 178% bei 20 μM ($p = 0,039$). Damit ist nur der Wert bei 20 μM signifikant erhöht, jedoch zeigt sich auch bei 10 μM ein deutlicher Trend in Richtung einer Steigerung der GRP78-Expression im Western-Blot.

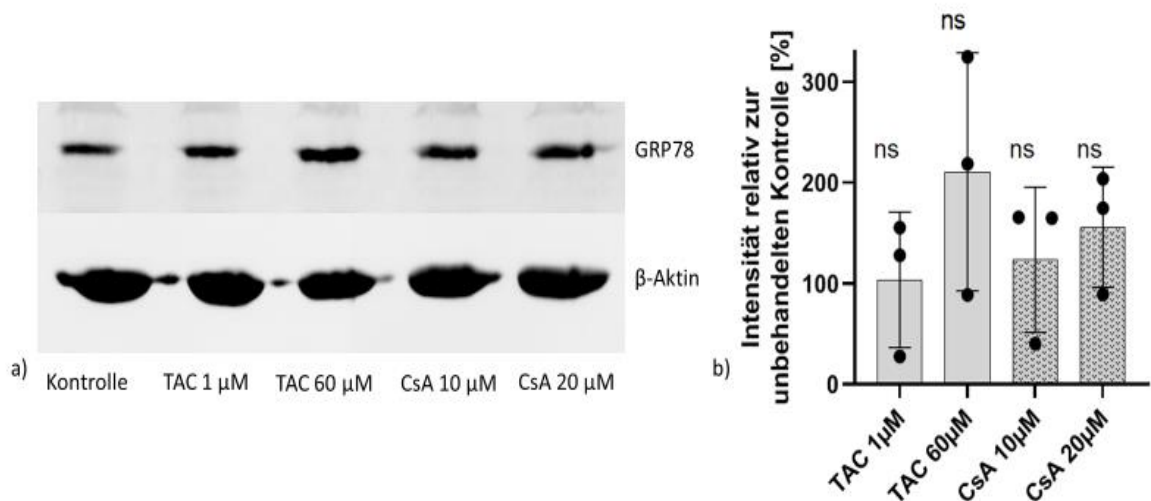


Abbildung 37: Western-Blot von TK-173 mit GRP78 Antikörper. a) Dargestellt ist exemplarisch eines von 3 Replikaten. b) Abgebildet sind die Werte von 3 Versuchen als Punkte und den Mittelwerten als Balken sowie mit der Standardabweichung als Whisker. Die Ordinate zeigt die Intensität in Relation zu der der Kontrolle. Auf der Abszisse sind die unterschiedlichen Konzentrationen von CNI mit denen behandelt wurde abgebildet. Auf die Abbildung der Kontrolle wurde verzichtet, weil diese in der gewählten Darstellung immer genau 100 betragen würde. Mittels t-Test wurde auf signifikante Unterschiede gegenüber einer unbehandelten Kontrolle getestet. Signifikante Unterschiede einer behandelten Probe gegenüber der Kontrolle sind wie folgt gekennzeichnet: ns: $p > 0,05$; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$; ****: $p \leq 0,0001$.

Keine der CNI-Behandlungen von TK-173 führte zu einer signifikanten Zunahme der Intensität der GRP78-Expression im Western-Blot (Abbildung 37). Die Behandlung mit 60 μ M TAC zeigt den stärksten Trend zu erhöhten GRP78-Expression mit einem Mittelwert von 210% ($p = 0,2822$).

3.3.2 Einfluss der CNI-Behandlung auf die Expression von ERp57

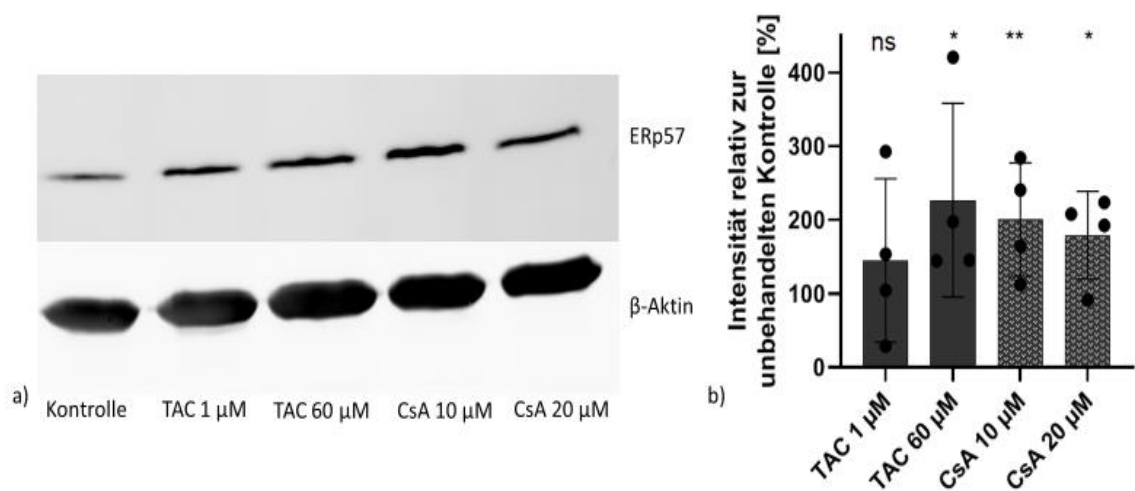


Abbildung 38: Western-Blot von HK-2 mit ERp57 Antikörper. a) Dargestellt ist exemplarisch eines von 4 Replikaten. b) Abgebildet sind die Werte von 4 Versuchen als Punkte und den Mittelwerten als Balken

sowie mit der Standardabweichung als Whisker. Die Ordinate zeigt die Intensität in Relation zu der der Kontrolle. Auf der Abszisse sind die unterschiedlichen Konzentrationen von CNI mit denen behandelt wurde abgebildet. Auf die Abbildung der Kontrolle wurde verzichtet, weil diese in der gewählten Darstellung immer genau 100 betragen würde. Mittels t-Test wurde auf signifikante Unterschiede gegenüber einer unbehandelten Kontrolle getestet. Signifikante Unterschiede einer behandelten Probe gegenüber der Kontrolle sind wie folgt gekennzeichnet: ns: $p > 0,05$; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$; ****: $p \leq 0,0001$.

Mit Ausnahme der 1 μM TAC Behandlung ($p = 0,5866$) zeigen alle behandelten HK-2 Zellen eine signifikante Zunahme in der Intensität ihrer ERp57-Bande (Abbildung 38). Bei der Behandlung mit 60 μM TAC beträgt sie 227% des Kontrollwertes ($p = 0,0187$). Die mit CsA behandelten Zellen zeigen eine Zunahme auf 200% ($p = 0,0043$) bei 10 μM und auf 179% ($p = 0,0493$) bei 20 μM .

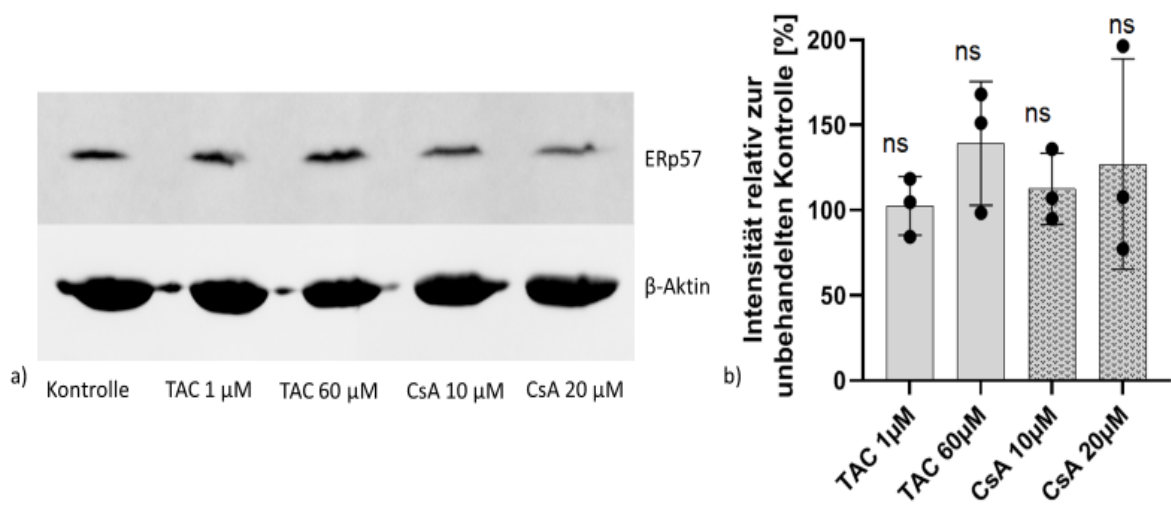


Abbildung 39: Western-Blot von TK-173 mit ERp57 Antikörper. a) Dargestellt ist exemplarisch eines von 3 Replikaten. b) Abgebildet sind die Werte von 4 Versuchen als Punkte und den Mittelwerten als Balken sowie mit der Standardabweichung als Whisker. Die Ordinate zeigt die Intensität in Relation zu der der Kontrolle. Auf der Abszisse sind die unterschiedlichen Konzentrationen von CNI mit denen behandelt wurde abgebildet. Auf die Abbildung der Kontrolle wurde verzichtet, weil diese in der gewählten Darstellung immer genau 100 betragen würde. Mittels t-Test wurde auf signifikante Unterschiede gegenüber einer unbeeideten Kontrolle getestet. Signifikante Unterschiede einer behandelten Probe gegenüber der Kontrolle sind wie folgt gekennzeichnet: ns: $p > 0,05$; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$; ****: $p \leq 0,0001$.

Keine der CNI-Behandlungen von TK-173 führte zu einer signifikanten Zunahme der Intensität der ERp57-Bande im Western-Blot (Abbildung 39). Die gemessenen Intensitäten zeigen Werte von 106-137% der Intensität der unbeeideten Kontrolle. Die stärkste Zunahme zeigt dabei die Behandlung mit 60 μM TAC (Mittelwert = 137 %, $p = 0,223$).

3.3.3 Einfluss der CNI-Behandlung auf die Expression von CALR

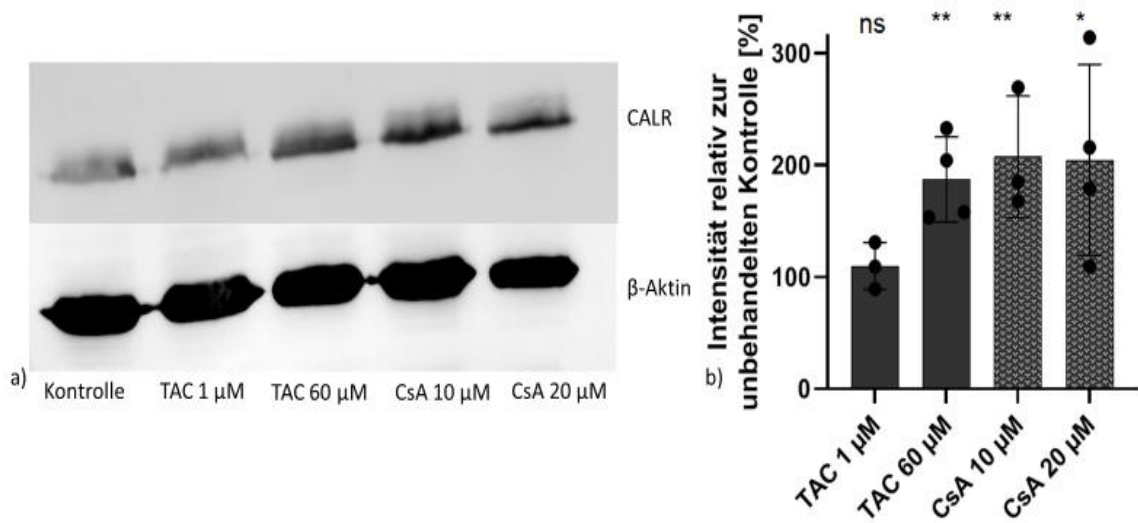


Abbildung 40: Western-Blot von HK-2 mit CALR Antikörper. a) Dargestellt ist exemplarisch eines von 4 Replikaten. b) Abgebildet sind die Werte von 4 Versuchen als Punkte und den Mittelwerten als Balken sowie mit der Standardabweichung als Whisker. Die Ordinate zeigt die Intensität in Relation zu der der Kontrolle. Auf der Abszisse sind die unterschiedlichen Konzentrationen von CNI mit denen behandelt wurde abgebildet. Auf die Abbildung der Kontrolle wurde verzichtet, weil diese in der gewählten Darstellung immer genau 100 betragen würde. Mittels t-Test wurde auf signifikante Unterschiede gegenüber einer unbehandelten Kontrolle getestet. Signifikante Unterschiede einer behandelten Probe gegenüber der Kontrolle sind wie folgt gekennzeichnet: ns: $p > 0,05$; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$; ****: $p \leq 0,0001$.

Mit Ausnahme der 1 μ M TAC Behandlung ($p = 0,382$) zeigen alle behandelten HK-2 Zellen eine signifikante Zunahme in der Intensität ihrer CALR-Bande (Abbildung 40). Bei der Behandlung mit 60 μ M TAC beträgt sie 207% des Kontrollwertes ($p = 0,0038$). Die mit CsA behandelten Zellen zeigen eine Zunahme auf 155,5% ($p = 0,0094$) bei 10 μ M und auf 178,3% ($p = 0,0498$) bei 20 μ M.

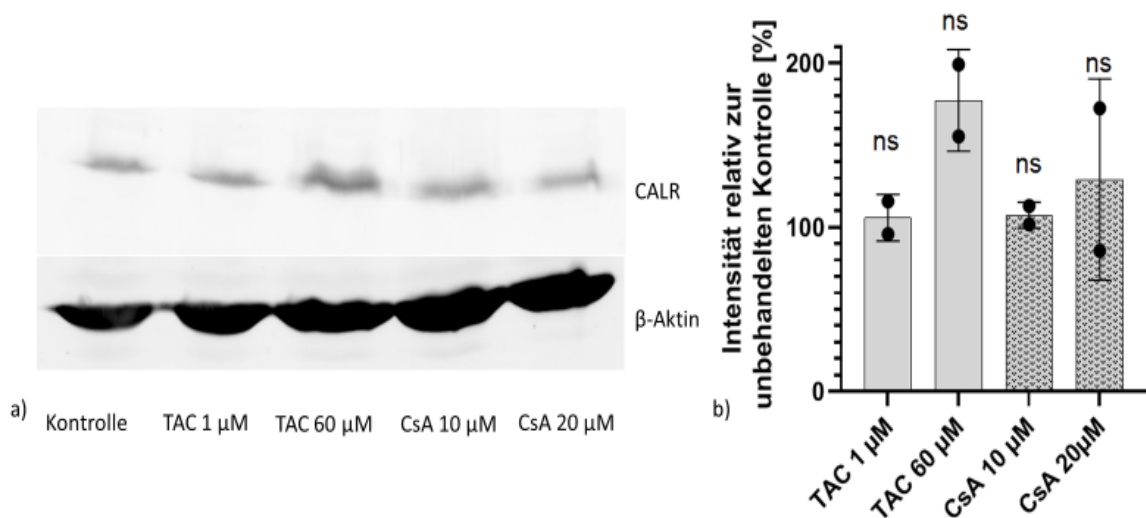


Abbildung 41: Western-Blot von TK-173 mit CALR Antikörper. a) Dargestellt ist exemplarisch eines von 2 Replikaten. b) Abgebildet sind die Werte von 2 Versuchen als Punkte und den Mittelwerten als Balken

sowie mit der Standardabweichung als Whisker. Die Ordinate zeigt die Intensität in Relation zu der der Kontrolle. Auf der Abszisse sind die unterschiedlichen Konzentrationen von CNI mit denen behandelt wurde abgebildet. Auf die Abbildung der Kontrolle wurde verzichtet, weil diese in der gewählten Darstellung immer genau 100 betragen würde. Mittels t-Test wurde auf signifikante Unterschiede gegenüber einer unbehandelten Kontrolle getestet. Signifikante Unterschiede einer behandelten Probe gegenüber der Kontrolle sind wie folgt gekennzeichnet: ns: $p > 0,05$; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$; ****: $p \leq 0,0001$.

Keine der CNI-Behandlungen von TK-173 führte zu einer signifikanten Zunahme der Intensität der CALR-Bande im Western-Blot (Abbildung 41). Die Behandlung mit 60 μM TAC führt zu der stärksten Zunahme (Mittelwert = 177 %, $p = 0,072$). Da nicht ausreichend Protein extrahiert werden konnte, wurden nur zwei Replikate der Western-Blots von TK.173 mit dem anti-CALR Antikörper quantifiziert.

3.4 Einfluss der Regulierung der ERp57 und CALR Expression auf die Zellreaktion auf CNI Behandlung.

In HK-2 Zellen wurden mit siRNA bzw. Plasmid-DNA die Proteine ERp57 und CALR herunter- bzw. hochreguliert. Der Erfolg der Transfektionen wurde mittels Western-Blot überprüft. Nach der Transfektion wurden die Zellen mit CNI in aufsteigenden Konzentrationen behandelt und mittels FACS die Anteile früh-, spät apoptotischer sowie nekrotischer Zellen ermittelt. Da die größten Unterschiede in den früh apoptotischen Anteilen zu sehen waren, wurden diese mittels t-Test auf signifikante Unterschiede untersucht.

3.4.1 Der Effekt der ERp57 Expressionsregulation auf die Zellantwort auf die CNI TAC und CsA

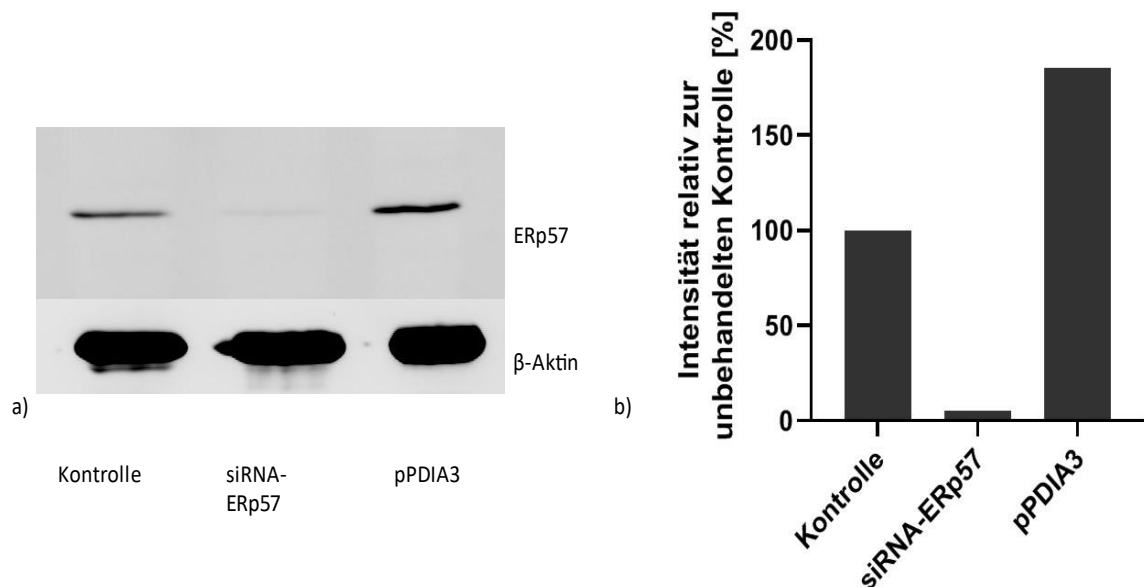
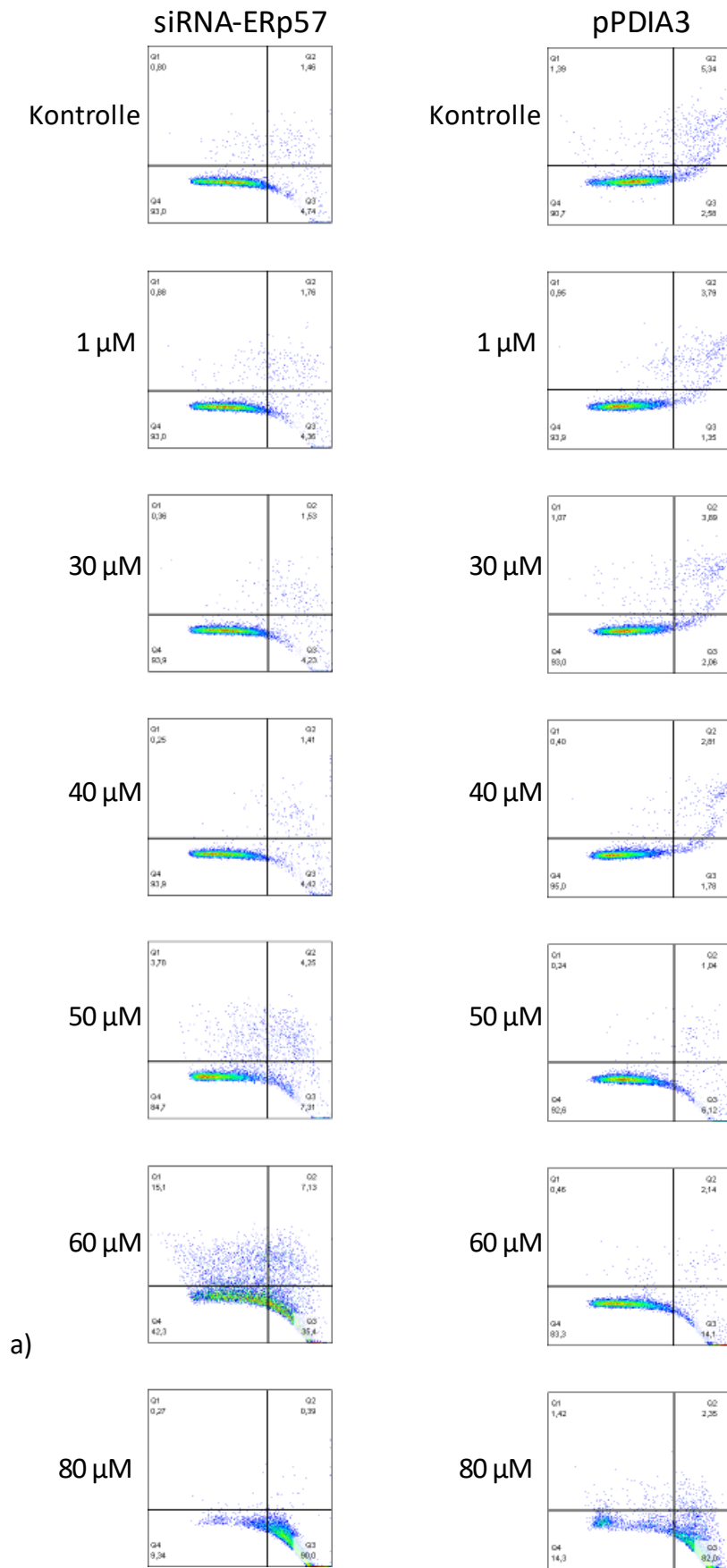


Abbildung 42: Western-Blot Kontrolle der Transfektionen von HK-2 mit ERp57. a) Dargestellt ist der Western-Blot zur Erfolgskontrolle der Transfektionen mit ERp57. b) Abgebildet sind die Werte der Transfektionskontrolle als Balken. Die Ordinate zeigt die Intensität in Relation zu der der Kontrolle. Auf der Abszisse sind die unterschiedlich transfizierten Proben aufgeführt. Zur besseren Nachvollziehbarkeit der regulatorischen Effekte der Transfektion ist in der Graphik auch die untransfizierte Kontrolle abgebildet.

Die mit siRNA transfizierten Zellen (ERp57⁻) zeigen im Western-Blot eine ERp57-Bande von 5,2 % der Intensität relativ zur Kontrolle. Die mit Plasmid-DNA transfizierten Zellen (ERp57⁺) zeigen eine ERp57-Bande von 185,6 % der Kontrolle (Abbildung 42). Aufgrund der geringen Menge an transfizierten Zellen wurde bei den Western-Blots zur Transfektionskontrolle auf das Anfertigen von Replikaten verzichtet.



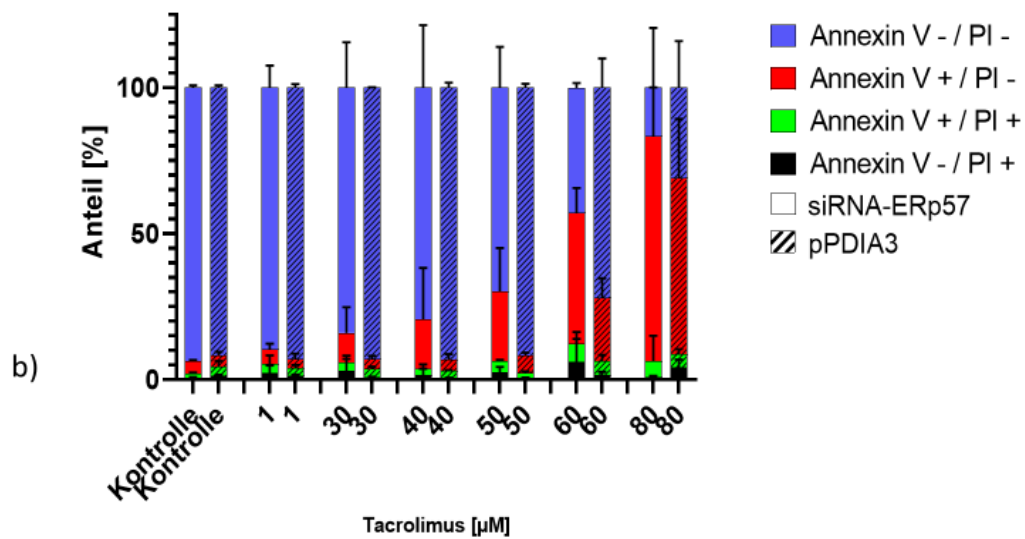


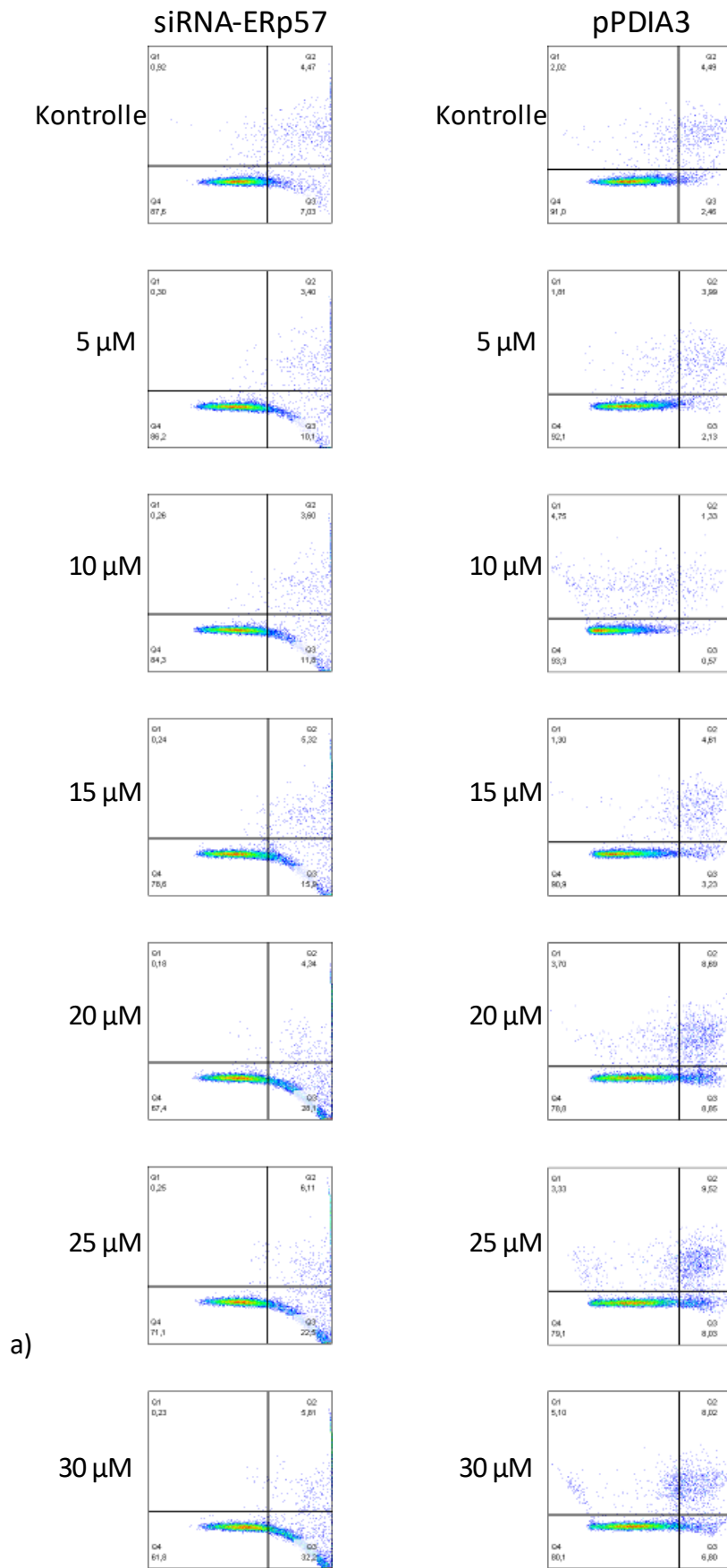
Abbildung 43: Durchflusszytometrie von ERp57-transfizierten HK-2, behandelt mit TAC.

a) Abgebildet sind exemplarisch die durchflusszytometrischen Ergebnisse von HK-2 Zellen, in denen ERp57 herunter- (links) und hochreguliert (rechts) wurden, die anschließend mit aufsteigenden Konzentrationen TAC behandelt wurden. Die Quadranten zeigen begonnen unten links und dann gegen den Uhrzeigersinn: vitale Zellen, frühapoptotische Zellen, spätapoptotische Zellen und nekrotische Zellen. b) Gezeigt sind die Mittelwerte von 3 Versuchen als farbige Balken mit der Standardabweichung als Whisker. Blaue Balken zeigen vitale Zellen, rote Balken früh apoptotische Zellen, grüne Balken spät apoptotische Zellen und schwarze Balken nekrotische Zellen. Balken ohne Strichelung bilden die mit siRNA transfizierten Zellen ab, die gestrichelten Balken zeigen die mit Plasmid DNA transfizierten Zellen.

Alle eingesetzten Konzentrationen von TAC führen bei den mit siRNA transfizierten Zellen (siRNA-ERp57) zu höheren Anteilen in der frühapoptotischen Fraktion gegenüber den mit Plasmid transfizierten Zellen (pPDIA3) (Abbildung 43). Lediglich bei 60 µM TAC zeigt sich dieser Unterschied als statistisch signifikant ($p = 0,02$). Alle Werte sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Tabelle 16: Zahlenwerte der früh apoptotischen HK-2 nach Behandlung mit TAC

Konzentration TAC [µM]	siRNA-ERp57 Mittelwert [%]	siRNA-ERp57 SD [%]	pPDIA3 Mittelwert [%]	pPDIA3 SD [%]	p-Wert
Kontrolle	4,31	0,3732	3,887	1,151	0,577
1	4,993	1,939	3,143	1,756	0,288
30	10,14	8,92	3,377	1,41	0,263
40	16,73	17,77	3,883	1,913	0,281
50	23,84	14,86	6,12	0,92	0,108
60	45,03	8,422	21,7	6,729	0,02
80	77,07	16,64	60,37	20,2	0,331



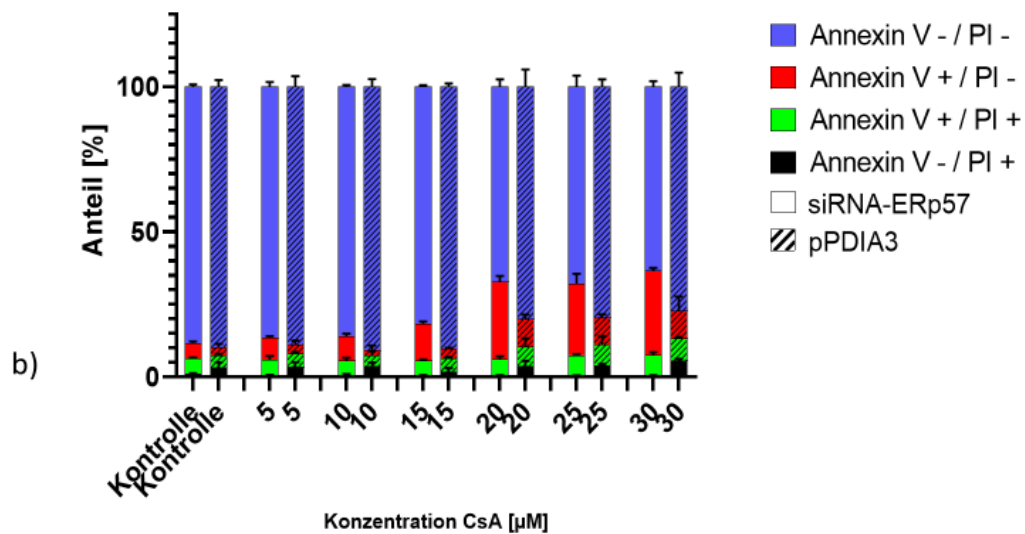


Abbildung 44: Durchflusszytometrie von ERp57-transfizierten HK-2, mit CsA behandelt.

a) Abgebildet sind exemplarisch die durchflusszytometrischen Ergebnisse von HK-2 Zellen, in denen ERp57 herunter- (links) und hochreguliert (rechts) wurden, die anschließend mit aufsteigenden Konzentrationen CsA behandelt wurden. Die Quadranten zeigen begonnen unten links und dann gegen den Uhrzeigersinn: vitale Zellen, frühapoptotische Zellen, spätapoptotische Zellen und nekrotische Zellen. b) Gezeigt sind die Mittelwerte von 3 Versuchen als farbige Balken mit der Standardabweichung als Whisker. Blaue Balken zeigen vitale Zellen, rote Balken frühapoptotische Zellen, grüne Balken spätapoptotische Zellen und schwarze Balken nekrotische Zellen. Balken ohne Strichelung bilden die mit siRNA transfizierten Zellen ab, die gestrichelten Balken zeigen die mit Plasmid DNA transfizierten Zellen.

Wie bei der Behandlung mit TAC führt auch die Behandlung mit CsA bei jeder eingesetzten Konzentration zu einer Erhöhung des Anteils früh apoptotischer Zellen bei siRNA-ERp57 gegenüber pPDIA3 (Abbildung 44). Die Unterschiede sind allesamt signifikant. Auch bei den unbehandelten Kontrollen besteht ein signifikanter ($p = 0,0457$) Unterschied von ca. 2,3 %. Alle Werte sind in Tabelle 17 aufgeführt.

Tabelle 17: Zahlenwerte der früh apoptotischen HK-2 nach Behandlung mit CsA

Konzentration CsA [μM]	siRNA-ERp57 Mittelwert [%]	siRNA-ERp57 SD [%]	pPDIA3 Mittelwert [%]	pPDIA3 SD [%]	p-Wert
Kontrolle	5,177	0,802	2,897	1,121	0,0457
5	7,65	0,524	2,97	1,551	0,0078
10	8,31	1,021	2,047	0,954	0,0047
15	12,6	0,954	3,42	0,364	< 0,0001
20	26,53	2,06	9,65	1,521	0,0003
25	24,6	3,576	9,25	1,187	0,0021
30	29,0	0,954	9,7	4,854	0,0025

3.4.2 Der Effekt der CALR Expressionsregulation auf die Zellantwort auf die CNI TAC und CsA

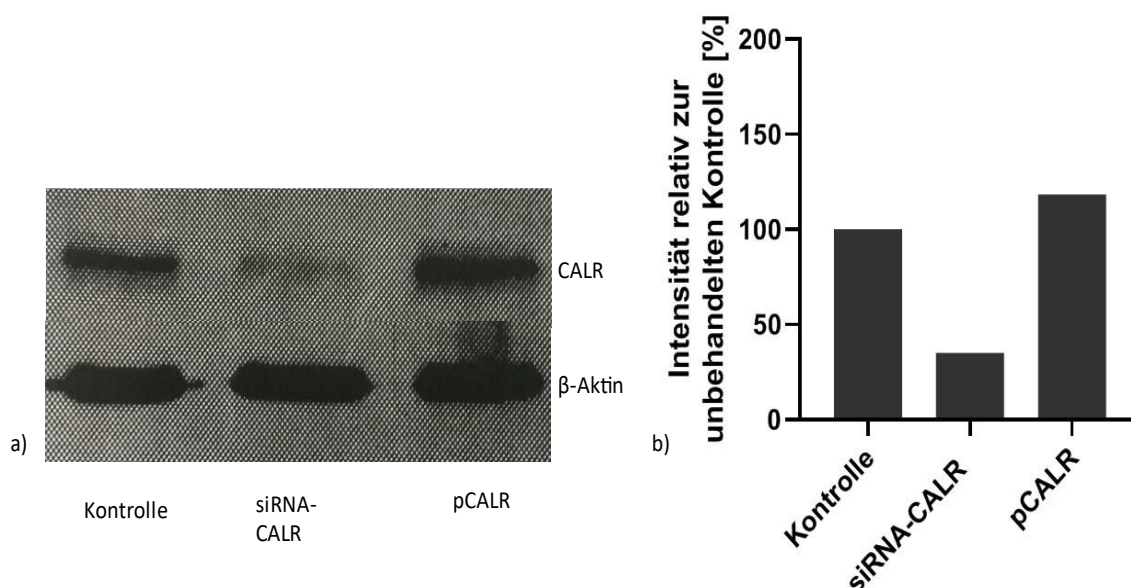
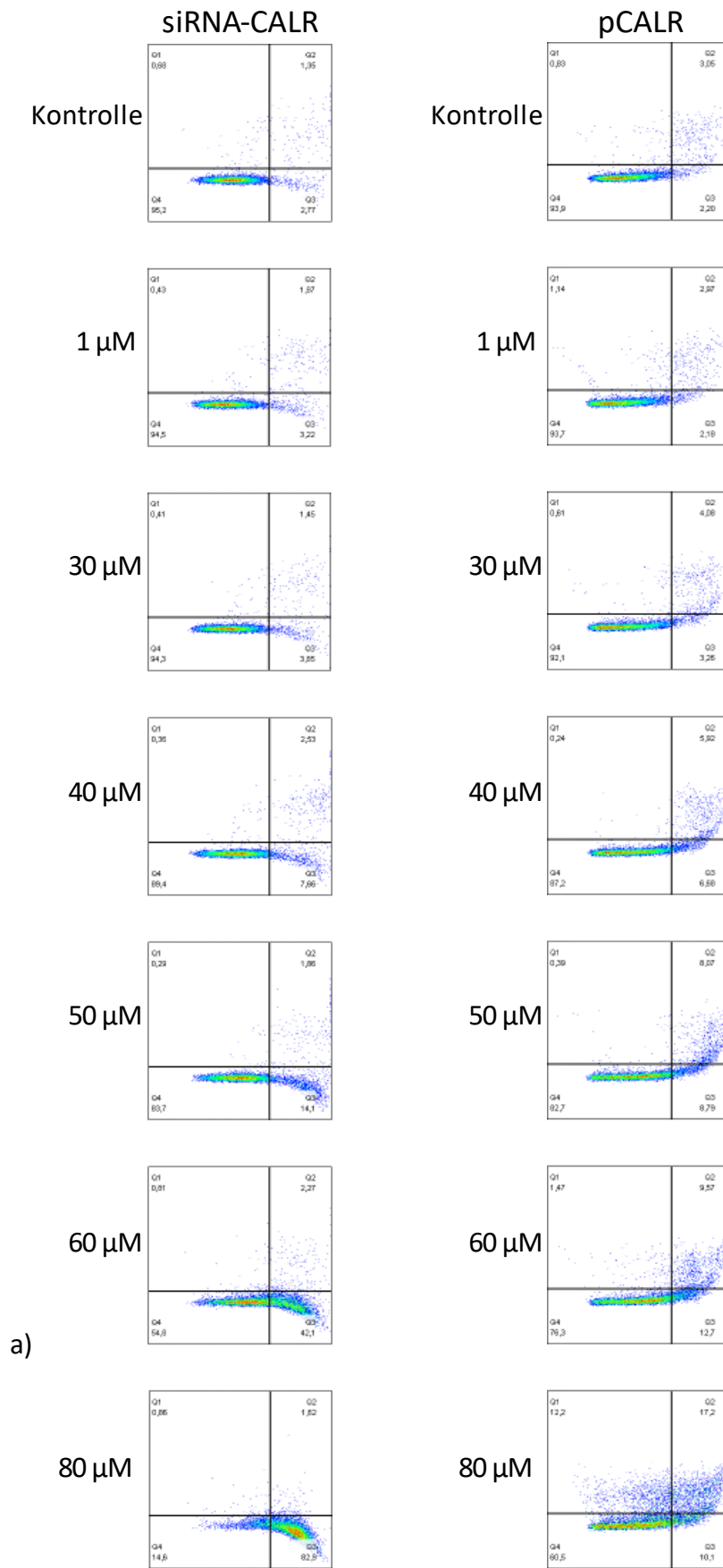


Abbildung 45: Western-Blot Kontrolle der Transfektionen von HK-2 mit CALR. a) Dargestellt ist der Western-Blot zur Erfolgskontrolle der Transfektionen mit ERp57. b) Abgebildet sind die Werte der Transfektionskontrolle als Balken. Die Ordinate zeigt die Intensität in Relation zu der der Kontrolle. Auf der Abszisse sind die unterschiedlich transfizierten Proben aufgeführt. Zur besseren Nachvollziehbarkeit der regulatorischen Effekte der Transfektion ist in der Graphik auch die untransfizierte Kontrolle abgebildet.

Die mit siRNA transfizierten Zellen (siRNA-CALR) zeigen im Western-Blot eine CALR-Bande von 35,1 % der Intensität relativ zur Kontrolle. Die mit Plasmid-DNA transfizierten Zellen (pCALR) zeigen eine CALR-Bande von 118,5 % der Kontrolle (Abbildung 45). Aufgrund der geringen Menge an transfizierten Zellen wurde bei den Western-Blots zur Transfektionskontrolle auf das Anfertigen von Replikaten verzichtet.



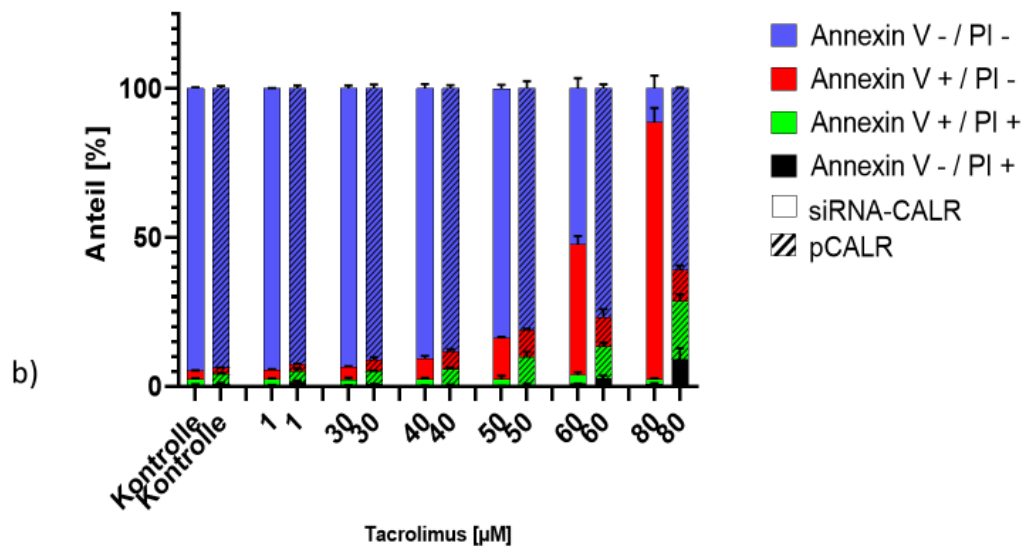


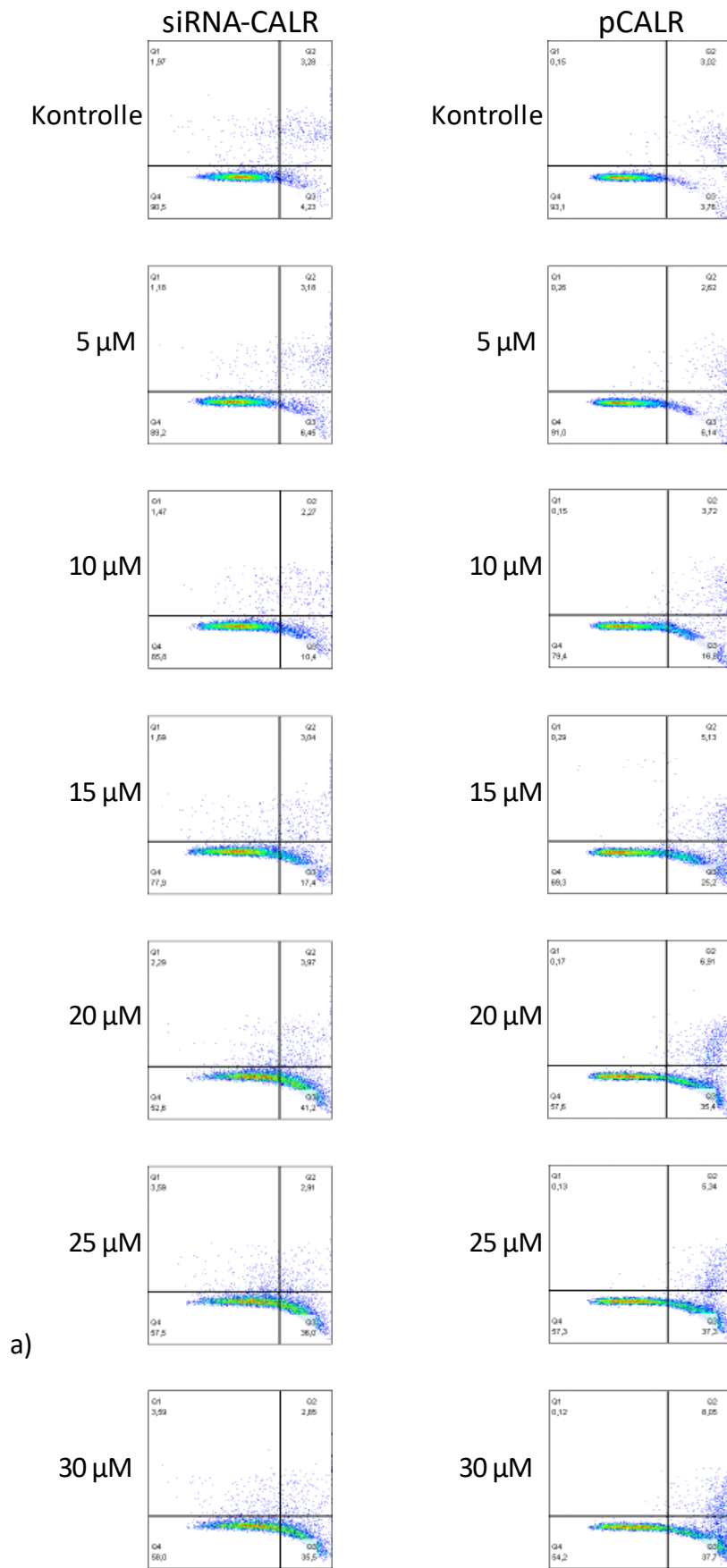
Abbildung 46: Durchflusszytometrie von CALR-transfizierten HK-2, mit TAC behandelt.

a) Abgebildet sind exemplarisch die durchflusszytometrischen Ergebnisse von HK-2 Zellen, in denen CALR herunter- (links) und hochreguliert (rechts) wurden, die anschließend mit aufsteigenden Konzentrationen TAC behandelt wurden. Die Quadranten zeigen begonnen unten links und dann gegen den Uhrzeigersinn: vitale Zellen, frühapoptotische Zellen, spätapoptotische Zellen und nekrotische Zellen. b) Gezeigt sind die Mittelwerte von 3 Versuchen als farbige Balken mit der Standardabweichung als Whisker. Blaue Balken zeigen vitale Zellen, rote Balken frühapoptotische Zellen, grüne Balken spätapoptotische Zellen und schwarze Balken nekrotische Zellen. Balken ohne Strichelung bilden die mit siRNA transfizierten Zellen ab, die gestrichelten Balken zeigen die mit Plasmid DNA transfizierten Zellen.

siRNA-CALR zeigt bei allen TAC-Konzentrationen einen größeren Anteil an frühapoptotischen Zellen im Vergleich zu pCALR (Abbildung 46). Mit Ausnahme von 40 µM TAC zeigt sich für jede eingesetzte TAC-Konzentration ein signifikanter Unterschied. Alle Werte sind in Tabelle 18 aufgeführt.

Tabelle 18: Zahlenwerte der früh apoptotischen HK-2 nach Behandlung mit TAC

Konzentration TAC [µM]	siRNA-CALR Mittelwert [%]	siRNA-CALR SD [%]	pCALR Mittelwert [%]	pCALR SD [%]	p-Wert
Kontrolle	2,82	0,21	2,137	0,11	0,0075
1	2,973	0,255	2,27	0,248	0,0267
30	4,16	0,392	3,82	0,947	0,5928
40	7,03	0,851	5,95	0,803	0,1861
50	13,8	0,361	9,06	0,384	< 0,0001
60	43,7	2,771	9,793	2,583	0,0001
80	86,2	4,795	10,67	1,343	< 0,0001



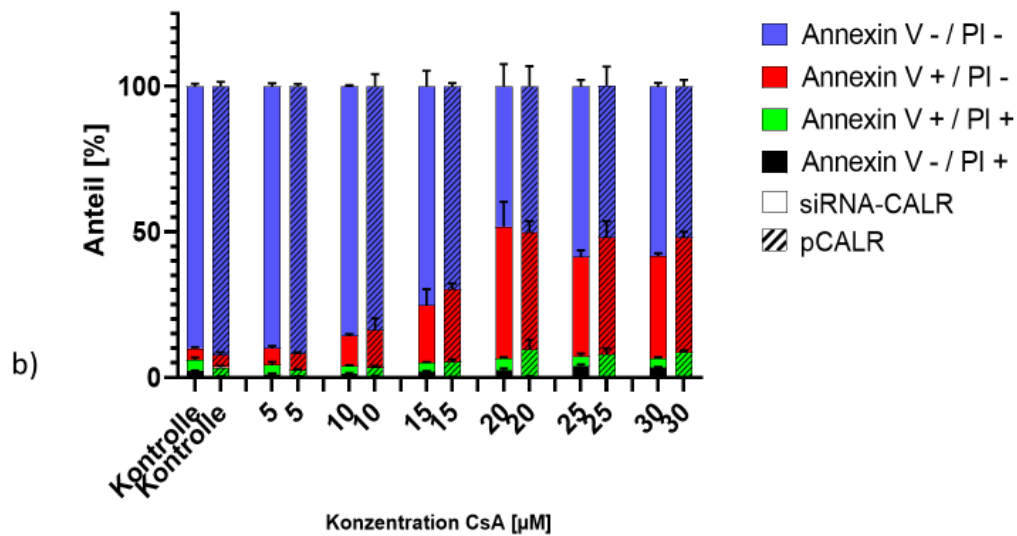


Abbildung 47: Durchflusszytometrie von CALR-transfizierten HK-2, mit CsA behandelt. a)

Abgebildet sind exemplarisch die durchflusszytometrischen Ergebnisse von HK-2 Zellen, in denen CALR herunter- (links) und hochreguliert (rechts) wurden, die anschließend mit aufsteigenden Konzentrationen CsA behandelt wurden. Die Quadranten zeigen begonnen unten links und dann gegen den Uhrzeigersinn: vitale Zellen, frühapoptotische Zellen, spätapoptotische Zellen und nekrotische Zellen. b) Gezeigt sind die Mittelwerte von 3 Versuchen als farbige Balken mit der Standardabweichung als Whisker. Blaue Balken zeigen vitale Zellen, rote Balken frühapoptotische Zellen, grüne Balken spätapoptotische Zellen und schwarze Balken nekrotische Zellen. Balken ohne Strichelung bilden die mit siRNA transfizierten Zellen ab, die gestrichelten Balken zeigen die mit Plasmid DNA transfizierten Zellen.

Nach der Behandlung von CALR-transfizierten Zellen mit CsA ist kein klares Muster zu erkennen, wie bei der Behandlung mit TAC (Abbildung 47). Einzig die Behandlung mit 30 µM CsA führt zu einem signifikanten Unterschied ($p = 0,02$). Alle Werte sind in Tabelle 19 aufgeführt.

Tabelle 19: Zahlenwerte der früh apoptotischen HK-2 nach Behandlung mit CsA

Konzentration CsA [µM]	siRNA-CALR Mittelwert [%]	siRNA-CALR SD [%]	pCALR Mittelwert [%]	pCALR SD [%]	p-Wert
Kontrolle	3,93	0,35	4,43	0,853	0,404
5	5,72	0,761	5,69	0,578	0,968
10	10,4	0,6	12,84	4,037	0,358
15	19,7	5,522	24,93	2,013	0,198
20	45,27	8,558	40,0	3,985	0,389
25	34,2	2,163	40,2	5,551	0,156
30	40,2	5,551	35,1	0,872	0,02

4 Diskussion

4.1 Auswahl der Versuchsmaterialien

Derzeit wird nach jeder Transplantation eines soliden Organs ein CNI zur Immunsuppression empfohlen (Kasiske et al. 2009). Die gewünschte Immunsuppression geht dabei mit unerwünschten Arzneimittelwirkungen einher, die therapielimitierend sein können (s. auch 1.3). Wie es zu den unerwünschten Arzneimittelwirkungen kommt, ist in großen Teilen nicht ausreichend geklärt, weshalb sich die vorliegende Arbeit mit den Veränderungen auf Proteinebene unter CNI-Behandlung beschäftigt. Speziell die unter CNI-Behandlung beobachtete Nierenfibrose (s. 1.4) wird untersucht. Dazu wurden an zwei Zelllinien von gesunden Nieren (s. 2.1.8) nach der Behandlung mit CNI in verschiedenen Konzentrationen Versuche durchgeführt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen der gleichen Zelllinie.

Für die Versuche wurden als Modell für die Nierenzellen im Menschen die in 2.1.8 näher beschriebenen Zelllinien HK-2 und TK-173 gewählt. V. a. HK-2 sind Gegenstand zahlreicher Untersuchungen von Nephrotoxizität (Li und Zhou 2016; Wang et al. 2017; Zhang et al. 2017; Qiu et al. 2018). Die Zellkultur macht es möglich, äußere Faktoren wie Temperatur, Nährstoff- und Gaszufuhr, etc. zu standardisieren und zu regulieren. Das Untersuchen einer homogenen Zellpopulation macht außerdem die Ergebnisse leicht vergleichbar und reproduzierbar. Das Untersuchen von kultivierten Zellen als Modell für die Zellen im Organ bzw. im Organismus birgt gleichzeitig Limitationen. Selbstverständlich besteht die Niere aus mehr als den zwei hier untersuchten Zellarten. Auch das Verhalten einer Zellpopulation kann sich in der Kultur von dem Verhalten im Organismus unterscheiden (Kaur und Dufour 2012). Letztlich ist auch das beste Modell ein artifiziell geschaffenes System, in welchem es zu Fehlern kommen kann. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse sollten deshalb u. a. mit Ergebnissen aus vergleichbaren Studien z. B. an Nierenbiopsien oder Tiermodellen verglichen werden.

4.2 Toxische Wirkung von CNI auf HK-2 und TK-173

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese formuliert, dass CNI eine toxische Wirkung auf Nierenzellen haben. Um diese Hypothese zu überprüfen und geeignete CNI-Konzentrationen für weitere Versuche zu finden, wurde die Zellviabilität der Modelzelllinien HK-2 und TK-173 mittels MTT-Tests untersucht. Dabei wurde sich an Arbeitsgruppen orientiert, die bereits proteomische Analysen zu CNI-Nephrotoxizität in der Zellkultur durchgeführt haben (Lamoureux et al. 2011). Die Zellen initial mikromolaren Konzentrationen von CsA und TAC auszusetzen, orientierte sich an den Plasmakonzentrationen in Patienten, die die Medikamente zur Immunsuppression nach Organtransplantation einnehmen (Nashan et al. 2002; Sikma et al. 2015).

Sowohl CsA als auch TAC verursachen in HK-2 und TK-173 eine signifikante Reduktion der Zellviabilität. Weiterhin auffällig wird, dass es v. a. bei der Behandlung mit CsA eine Antiproportionalität gibt zwischen der Höhe der eingesetzten CNI-Konzentration und der Zellviabilität. Bei der Behandlung mit TAC ist diese ebenfalls zu beobachten, jedoch sinkt die Zellviabilität erst ab deutlich höheren Konzentrationen. In der Zusammenschau zeigt sich, dass CNI eine toxische Wirkung sowohl auf HK-2 als auch auf TK-173 haben und es kann an dieser Stelle die Hypothese angenommen werden.

Eine Schwäche der hier durchgeführten Versuche ist, dass mittels MTT-Tests nicht unterschieden werden kann, ob die Reduktion der Viabilität der HK-2 und TK-173 Zellen durch die Behandlung mit CNI auf den Zelltod oder das Verlangsamen des Zellstoffwechsels zurückzuführen ist. Sowohl die Induktion von Apoptose (McDonald et al. 1996; McDonald et al. 1997) als auch die Induktion von Seneszenz (Jennings et al. 2007) sind für CNI beschrieben.

In vorangegangenen Arbeiten zur Toxizität von CNI an Zelllinien (u. a. HK-2) wurden vergleichbare Konzentrationen von CNI eingesetzt (Jennings et al. 2007; Lamoureux et al. 2011). Bei TAC sind die verwendeten Konzentrationen in dieser Arbeit im Vergleich hoch, so kamen bei Lamoureux et al. 2011 0,5 μM TAC für eine proteomische Analyse an HEK-Zellen zum Einsatz. In einer Studie zur Nierenfibrose in TK-173 Zellen wurden ebenfalls TAC-Konzentrationen dieser Größenordnung eingesetzt (Kern et al. 2014), allerdings sind auch Zellversuche mit 30 μM TAC beschrieben (Szabó et al. 2013; Kita et al. 2019). Auf Grund der niedrigeren TAC-Konzentrationen in vergleichbaren Arbeiten und weil in der klinischen Anwendung im Vergleich zu CsA geringere Mengen TAC eingesetzt werden, wurde in den MTT-Tests, Western-Blots und FACS-Analysen zusätzlich die Auswirkung einer geringen TAC-Konzentration (1 μM) mit untersucht. Ein Grund für die höheren benötigten TAC-Konzentrationen könnte sein, dass TAC eine sehr hohe Proteinbindung aufweist (Plekoszewski und Jusko 1993; Iwasaki et al. 1996). Um ungewollte Interaktion des TAC und den im FCS enthaltenen Proteinen zu vermeiden hätte man die Versuche auch in FCS-freiem Medium durchführen können. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurde jedoch dem Zellmedium immer FCS hinzugefügt, um den Zellen optimale Wachstumsbedingungen zu gewähren. FCS enthält Wachstumsfaktoren, die das Zellwachstum begünstigen weshalb man es zum Zellmedium hinzufügt (Shah 1999). Das Verwenden von FCS kann zu Artefakten in bestimmten Versuchen führen (Kerbel und Blakeslee 1976; Ostler und Ehl 2002), weswegen sich oft gegen das Verwenden von FCS bzw. ein Entfernen des FCS aus dem Zellmedium kurz vor den Versuchen entschieden wird.

Dass TAC in der klinischen Anwendung geringer dosiert wird als CsA, liegt an seiner immunsuppressiven Potenz, die im Vergleich bis zu einhundertmal größer ist (Kino et al. 1987). Gleichzeitig zeigt TAC bei Dosierungen mit gleicher immunsuppressiver Wirkung wie CsA weniger Nebenwirkungen (Kobashigawa et al. 2006). Diese Informationen gemeinsam mit den Ergebnissen aus den MTT-Tests legen nahe, dass die immunsuppressive und die

zytotoxische Wirkung der CNI nicht oder nur unvollständig über denselben Mechanismus erfolgt.

Die Mechanismen hinter der Reduktion der Zellviabilität besser zu verstehen ist Ziel der in Folge durchgeführten Experimente. Dafür wurden die Konzentrationen so gewählt, dass ein deutlicher Verlust von Zellviabilität vorliegt, jedoch gleichzeitig genug Zellviabilität erhalten bleibt, um mit den Zellen arbeiten zu können. Für die proteomische Analyse fiel die Wahl auf 10 μ M CsA und 60 μ M TAC. Bei den Western-Blots und der Durchflusszytometrie wurden zusätzliche Konzentrationen untersucht, um eventuelle Abstufungen der Effekte von CNI-Behandlung bzw. CNI-Behandlung nach Transfektion darstellen zu können.

4.3 Auswirkungen der CNI-Behandlung auf das Proteom von HK-2

Insgesamt konnten 4502 unterschiedliche Proteine identifiziert werden, davon konnten 4186 in allen dreien nachgewiesen werden. Typischerweise werden in dieser Art proteomischer Analyse 2000 - 4000 Proteine identifiziert (Cantin et al. 2008; de Godoy et al. 2008; Dephoure et al. 2008). Damit liegen die Ergebnisse dieser Arbeit betreffend der identifizierten Proteine am oberen Ende der Norm, allerdings sind auch proteomische Analysen beschrieben, die deutlich über 10.000 Proteine haben nachweisen können (Azimifar et al. 2014). Die hohe Anzahl identifizierter Proteine führt bei der statistischen Auswertung zu Schwierigkeiten, denn es sollte das Signifikanzniveau für multiples Testen angepasst werden, um nicht zu viele falsch positive Ergebnisse zu erhalten. Wie in dieser Arbeit kann das Anpassen des Signifikanzniveaus z. B. nach Bonferroni oder Benjamini-Hochberg dazu führen, dass kaum oder keine Ergebnisse mehr als signifikant anzusehen sind. Dies ist ein bekanntes Problem und die statistische Auswertung großer Datensätze wie in der Proteomik deshalb ein aktuell diskutiertes Thema ohne eine universell anwendbare definitive Lösung (Choi und Nesvizhskii 2008; Pascovici et al. 2016). Eine Möglichkeit diese Probleme anzugehen, ist die Anzahl der Replikate zu steigern, was jedoch, wie im Rahmen dieser Arbeit, oft wirtschaftlich nicht umzusetzen ist.

Das Untersuchen der Proteine, die exklusiv in den mit CNI behandelten Proben detektiert wurden mittels STRING, lieferte für CsA und TAC alleine keine signifikante Häufung von Interaktion. Bei den Proteinen, die in den beiden mit CNI behandelten Proben, aber nicht in der unbehandelten Kontrolle identifiziert werden konnten konnte STRING signifikant mehr Interaktionen als erwartet auffinden.

Unter den Proteinen, die exklusiv in der unbehandelten Kontrolle detektiert wurden waren Proteine angereichert, die bei der T-Zell-Rezeptorbindung eine Rolle spielen. Bei ihnen handelt es sich um die Proteine HLA-E (*HLA class I histocompatibility antigen, alpha chain E*) und LCK (*Tyrosine-protein kinase Lck*). HLA-E ist entscheidend an der Zellerkennung durch natürliche Killerzellen beteiligt (Braud et al. 1998). Je nachdem welcher der Rezeptoren der natürlichen Killerzellen das HLA-E bindet, ergibt sich ein inhibitorischer oder aktivierender

Effekt. Durch das Fehlen dieses Proteins in den mit CNI behandelten Proben lässt sich anhand der limitierten Informationen nicht ableiten, ob die CNI möglicherweise eine immunsuppressive Wirkung über die Modulation von natürlichen Killerzellen entfalten. Grundsätzlich ist eine solche Wirkung denkbar und könnte in Folgeuntersuchungen nachgegangen werden. LCK ist eine Tyrosinkinase, die vorwiegend in T-Zellen vorkommt. Sie spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Aktivierung von T-Zellen (Isakov und Biesinger 2000). In *knock-out* Zellmodellen konnte gezeigt werden, dass ohne die LCK die Produktion von IL-2 in T-Zellen nahezu aufgehoben ist (Luo und Sefton 1992). Die LCK wurde in dieser Arbeit nur in der unbehandelten Kontrolle nachgewiesen. Es ist also möglich, dass die CNI die Expression der LCK vermindern und so, neben der namensgebenden Inhibition von Calcineurin, zu einer Immunsuppression mittels verminderter Expression von IL-2 führen. Dieser Mechanismus ist im bisherigen Verständnis der Wirkweise von CNIs noch nicht enthalten und könnte eine ergänzende Rolle spielen. Ebenso denkbar ist die LCK als Ziel neuer Immunsuppressiva, die möglicherweise ein günstigeres Nebenwirkungsprofil besitzen, da die LCK vorwiegend in T-Lymphozyten vorkommt, nicht jedoch in den meisten Geweben.

Problematisch an dieser Art von Analyse ist in dieser Arbeit das Fehlen von Replikaten. Die teils nur in sehr geringer Zahl detektierten Proteine können aufgrund der Wirkung der CNI ausschließlich in einer der Proben detektiert worden sein, es könnte jedoch auch sein, dass sie allein aufgrund der geringen Anzahl in den anderen Proben nicht nachgewiesen wurden. Neben Replikaten der gesamten proteomischen Analyse wären zum Beispiel Western-Blot Analysen einzelner Proteine, die in dieser Arbeit als differentiell exprimiert gemessen wurden, eine kostengünstigere und arbeitssparende Maßnahme, um diese Unsicherheit zu beheben.

In der mit CsA behandelten Probe zeigen sich in der funktionellen Analyse zahlreiche zelluläre Funktionen gegenüber der Kontrolle reguliert. Außerdem zeigten die Nephrotoxizitätsanalyse signifikante Überschneidungen mit Signalwegen, die dafür bekannt sind, in Pathologien der Niere involviert zu sein. Zusammen lassen die funktionelle Analyse und die Toxizitätsanalyse den Schluss zu, dass CsA schädigende Effekte auf HK-2 Zellen besitzt und lässt weiter stark vermuten, dass diese Teil der CNI-Nephrotoxizität sind bei Patienten, die CsA einnehmen. Die Signalwegsanalyse ergab für die zuvor involviert vermuteten UPR- und ER-Stress-Signalwege teils signifikante Ergebnisse. Diese erfüllten aber die zuvor ausgegebenen *Fold Change* Grenzwerte nicht und sind deshalb nicht als reguliert aufgeführt. Auffällig ist, dass der *eukaryotic Initiation Factor 2* (eIF2) -Signalweg in beiden mit CNI behandelten Proben deutlich durch die Behandlung beeinflusst wird. Da der eIF2-Signalweg über PERK durch ER-Stress aktiviert wird (Teske et al. 2011), ergibt sich hier ein Hinweis auf Beteiligung der zuvor postulierten Proteine. Diese wurden in dieser Arbeit zusätzlich separat untersucht und weiter unten diskutiert. Gleiches gilt für die Behandlung mit TAC. In der mit TAC behandelten Probe zeigen die funktionelle Analyse und die Nephrotoxizitätsanalyse ähnliche Ergebnisse. Im Vergleich sind noch mehr zelluläre

Funktionen betroffen, während die Nephrotoxizität wesentlich der von der CsA-Behandlung gleicht. In der Zusammenschau gleichen sich die Ergebnisse der Nephrotoxizitätsanalyse mit Hinweisen auf bekannte Charaktereigenschaften der CNI-Nephrotoxizität, aber auch andere nephrotoxische Prozesse. So gibt es teilweise Ähnlichkeit mit einer vergleichbaren Nephrotoxizitätsanalyse an HK-2 mit Vancomycin (Li und Zhou 2016).

Bei der Betrachtung der mit CsA und TAC behandelten Proben in der proteomischen Analyse fällt auf, dass durch die Behandlung mit TAC deutlich mehr Proteine und damit mehr Signalwege reguliert sind. Ein naheliegender Grund für diesen Unterschied wäre die unterschiedliche Dosierung der beiden Medikamente CsA und TAC. Die für die proteomische Analyse gewählte TAC Konzentration führt zu mehr Stress als die CsA Konzentration, was vermuten lässt, dass entsprechend mehr Prozesse innerhalb der Zelle in Gang gesetzt wurden. Beim Vergleich der Signalwege, die in den beiden behandelten Proben reguliert sind, fällt jedoch auf, dass es sich bei den in der mit TAC behandelten Probe nicht überwiegend um Prozesse handelt, die vermehrten Zelltod oder -schaden widerspiegeln. Die höhere Anzahl regulierte Signalwege in der mit TAC behandelten Probe sind daher nicht allein Ausdruck der höheren Zelltodrate unter Behandlung. Eine Unterscheidung bzw. Vergleichbarkeit der Effekte, die für das jeweilige Medikament spezifisch sind, ist trotzdem schwierig. Idealerweise hätten zu diesem Zweck Medikamentenkonzentrationen verwendet werden müssen, die nahezu den gleichen toxischen Effekt auf die Zellen haben.

Die erzielten Ergebnisse bieten eine Grundlage für ein erweitertes Verständnis zellulärer Mechanismen und Funktionen, die verantwortlich für die CNI-Nephrotoxizität sind. Die vielen als reguliert identifizierten Signalwege können nun als potenzielle Ziele für eine therapeutische Intervention zur Linderung der CNI-Nephrotoxizität untersucht werden. Denn bis eine Möglichkeit zur Therapie der CNI-Nephrotoxizität gefunden wurde bleibt vor allem bei der chronischen CNI-Nephrotoxizität nur die Umstellung auf ein anderes Medikament. Natürlich müssen die Funde in weiteren Studien validiert werden, zumal die Anzahl von zwei Messungen auch im Kontext proteomischer Analysen gering ausgefallen ist.

4.4 Regulierung von ER-Stress Proteinen unter CNI-Therapie

Um der Hypothese, dass ER-Stress und der UPR-Signalweg eine Rolle in der CNI-Nephrotoxizität spielen, nachzugehen, wurden Western-Blots von HK-2 und TK-173 nach CNI-Behandlung durchgeführt. Die Western-Blots wurden mit spezifischen Antikörpern gegen die ER-Stress Proteine GRP78, ERp57 und CALR behandelt und anhand der Intensität der entstandenen Banden Rückschlüsse auf die Quantität der Proteine gezogen.

Zunächst wurde GRP78 betrachtet, da die gesteigerte Expression von GRP78 ein häufig herangezogener Indikator für das Vorliegen von ER-Stress ist (Kaira et al. 2016; Serrano-Negrón et al. 2018). In HK-2 führt die Behandlung mit 60 μ M TAC und 20 μ M CsA zu einer

signifikanten Zunahme der Intensität der GRP78-Bande im Western-Blot. Daraus lässt sich schließen, dass die Expression von GRP78 in den Zellen unter CNI-Behandlung steigt und weiter, dass die Behandlung mit CNI in HK-2 ER-Stress verursacht. In TK-173 zeigt keine der eingesetzten CNI-Behandlungen eine signifikante Zunahme der GRP78-Bande im Western-Blot. Die Behandlung mit 60 μM TAC sowie die Behandlung mit 10 μM und 20 μM CsA zeigen einen Trend in Richtung Erhöhung. Daher lässt sich hier das Verursachen von ER-Stress durch die CNI-Behandlung zwar vermuten, aber nicht nachweisen. Auffällig ist hier, dass eines der Replikate für alle eingesetzten CNI-Behandlung nicht nur keine Erhöhung des GRP78 anzeigt, sondern eine Verringerung.

Dies ist zumindest in Teilen auf die Quantifizierungsmethode, die hier angewendet wurde zurückzuführen. Die Kontrollbande wurde hier als besonders intensiv interpretiert. Das Quantifizieren von Western-Blot Banden ist eine kontrovers diskutierte Methode (Bell 2016). Trotz berechtigter Kritik an der Methode bietet sie doch eine Möglichkeit die Ergebnisse der Western-Blot Analysen miteinander zu vergleichen und auf signifikante Unterschiede hin untersuchen, weshalb sie in dieser Arbeit unter Berücksichtigung potenzieller Fehlerquellen verwendet wurde.

Eine vermehrte Expression von ERp57 und CALR ist eine Reaktion der Zelle auf ER-Stress (s. 1.5 und 1.6). Vorangestellte Mitglieder des UPR-Signalwegs (s. 1.6) wurden in dieser Arbeit nicht explizit untersucht, sodass genau genommen keine Aussage über dessen Aktivierung gemacht werden kann. Da GRP78 am Anfang der Signalkaskade steht und ERp57 und CALR dafür bekannt sind, an ihrem Ende zu stehen (Yoshida et al. 1998; Hoffman et al. 2013) wird an dieser Stelle von der Veränderung der letzteren Proteine indirekt auf die Aktivierung des UPR-Signalwegs geschlossen. Um sicherzugehen, dass es sich bei den Veränderungen von ERp57 und CALR um ein Resultat der Aktivierung des UPR-Signalweges handelt, hätten z. B. Western-Blot Analysen von ATF6, PERK oder IRE1 durchgeführt werden müssen.

Die Behandlung von HK-2 mit 60 μM TAC sowie 10 μM und 20 μM CsA führte zu einer signifikanten Zunahme der Intensität der ERp57-Bande im Western-Blot. Das bedeutet, dass ERp57 unter CNI-Behandlung vermehrt von HK-2 gebildet wird. Die Erhöhung der ERp57-Expression ist eine bekannte Reaktion auf ER-Stress (Roberson et al. 2012). Bei den Versuchen mit TK-173 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der ERp57-Expression. Anders als beim GRP78 ist auch kaum ein Trend zur vermehrten Expression zu erkennen. Die Western-Blot Ergebnisse für CALR stellten sich ähnlich zu denen von ERp57 dar. Signifikante Veränderungen zeigten die Behandlungen mit 60 μM TAC sowie 10 μM und 20 μM CsA in den Versuchen mit HK-2, während für TK-173 keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden konnten. An dieser Stelle sei erwähnt, dass sich die Western-Blots von TK-173 mit CALR als sehr schwierig darstellten. Für die Versuche war nur sehr wenig Zellextrakt vorhanden. In der Folge waren die Resultate insgesamt von

deutlich schlechterer Qualität als die Western-Blots von HK-2 und von TK-173 mit den anderen Antikörpern.

Die mittels Western-Blot gefundenen Ergebnisse sollten mit mindestens einer weiteren Methode validiert werden. Für HK-2 zeigt sich in der proteomischen Analyse ebenfalls ein signifikanter Anstieg von GRP78 und ERp57 gegenüber der Kontrolle, CALR zeigt einen Trend zur Erhöhung, ist jedoch nicht signifikant erhöht. Da an TK-173 keine proteomische Analyse durchgeführt wurde, entfällt diese Validierungsmöglichkeit. Es empfiehlt sich das Vergleichen der Ergebnisse beider Zelllinien mit Ergebnissen von Versuchen, die nicht auf Protein ebene stattgefunden haben, sondern z. B. auf der Transkriptionsebene. Darauf wurde in dieser Arbeit jedoch verzichtet.

Für HK-2 zeigt die Western-Blot Analyse über eine Hochregulierung von GRP78, ERp57 und CALR, dass ER-Stress und die Reaktion der Zelle auf diesen durch die Aktivierung des UPR-Signalwegs Teil der Mechanismen sind, die eine CNI-Behandlung in Gang setzt. Ob die vermehrte Expression von ERp57 und CALR ein Schutzmechanismus der Zelle ist oder ob diese Teil der Pathophysiologie der CNI-Nephrotoxizität ist, soll abschließend beleuchtet werden.

4.5 Rolle der ER-Stressproteine ERp57 und CALR in der CNI-Nephrotoxizität

Nachdem für HK-2 gezeigt werden konnte, dass es unter CNI-Behandlung zu einer Zunahme der Expression von ERp57 kommt und für CALR eine Zunahme sich zumindest andeutet, soll beleuchtet werden, welchen Effekt die beiden Proteine im Rahmen der CNI-Behandlung haben. Die zuvor formulierte Hypothese lautet: Eine Veränderung der Expression der ER-Stress-Proteine ERp57 und CALR bewirkt eine Veränderung der toxischen Wirkung der CNI. Außerdem von Interesse ist bei einer etwaigen Veränderung der toxischen Wirkung der CNI auf HK-2, in welche Richtung sie beeinflusst wird.

Das Fehlen von ERp57 und CALR führt bei beiden CNI zu mehr apoptotischen Zellen im Vergleich zu denen mit mehr ERp57 und CALR. Besonders deutlich wird dies in der Behandlung mit TAC. Der Grund könnte sein, dass die gewählten TAC-Konzentrationen von vornherein zu mehr Zelltod geführt haben und deshalb die Unterschiede auch deutlicher wurden. Dass erniedrigtes ERp57 zu vermehrtem Zelltod führt und das Vorhandensein von ERp57 gleichzeitig vor Zelltod schützen kann, zeigt sich auch in Pankreaszellen (Yamamoto et al. 2014) oder der Shikonin vermittelten Apoptose von Leukämiezellen (Trivedi et al. 2016). Gleichzeitig ist beschrieben, dass ein Unterdrücken der katalytischen Funktion von ERp57 vor Zelltod schützen kann, was im Widerspruch zu den hier beobachteten Ergebnissen steht (Hoffstrom et al. 2010; Anathy et al. 2012). Dieser Effekt zeigt sich bei Apoptose, die im Zusammenhang mit fehlgefalteten Proteinen eingeleitet wurde, nicht jedoch, wenn ein anderer Auslöser vorliegt (Xu et al. 2009; Hoffstrom et al. 2010). Ebenso

reduziert ein ERp57-Knockdown die Apoptoserate in Bronchialzellen, die mit ER-Stress induzierenden Hausstaubmilben in Kontakt gebracht wurden (Hoffman et al. 2013). Entscheidend bei der Rolle von ERp57 in Signalwegen, die zu Zelltod führen, ist seine Lokalisation, die nicht auf das ER begrenzt ist (Ozaki et al. 2008; Panaretakis et al. 2008; Hettinghouse et al. 2018). Deshalb ist die Darstellung der Lokalisation von ERp57 unter CNI-Behandlung zukünftig von Interesse. Für die Behandlung mit CNI sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit eher dafür, dass der Auslöser für die Apoptose nicht das Anfallen fehlgefalteter Proteine ist. Den tatsächlichen Auslöser zu benennen ist mit den hier angewandten Methoden nicht möglich und bedarf weiterer Untersuchung.

Wie bei ERp57 existieren Versuche, die zeigen, dass eine verstärkte Expression von CALR die Zellen vor Zelltod schützt (Liu et al. 1997). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass reduziertes oder funktionsunfähiges CALR vor Apoptose, die durch ER-Stress ausgelöst wurde schützt (Obakan-Yerlikaya et al. 2017; Salati et al. 2019). Diese Eigenschaft teilen CALR und ERp57 offensichtlich. Ebenso teilen sie, dass die Lokalisation innerhalb der Zelle von entscheidender Bedeutung für ihre Wirkung ist (Obeid et al. 2007; Panaretakis et al. 2009). Ob CALR und ERp57 vor Zelltod schützen oder diesen beschleunigen hängt offenbar vom Grund und der Art des Zelltodes ab.

Eine Schwäche der durchgeführten Versuche ist vor allem das Fehlen von FACS mit nicht transfizierten Zellen, hier wurde als Ersatz mit den Ergebnissen der MTT-Tests verglichen. Außerdem könnte der gezeigte Effekt unspezifisch für jede Transfektion auftreten, weshalb man mit „leerer“ siRNA bzw. Plasmid hätte transfizieren können. Dagegen spricht, dass die Hoch- und Herunterregulierung gegenteilige Effekte zeigen. Nicht zuletzt wurden mit der siRNA die Proteine fast vollständig entfernt, was unabhängig von der Behandlung mit CNI zu vermehrtem Zelltod führen kann (Hoffstrom et al. 2010). Die transfizierten, aber unbehandelten Zellen haben jedoch kaum Apoptose gezeigt. In HK-2 führt das *Knockdown* von ERp57 und CALR ohne weitere Stressoren offensichtlich nicht zu vermehrtem Zelltod.

Das Fehlen von ERp57 und CALR führte zu einer höheren Sterblichkeit der HK-2 Zellen unter CNI-Behandlung. Ein Grund dafür könnte sein, dass Calcineurin teil der physiologischen Antwort auf ER-Stress ist (Bollo et al. 2010). Ist diese inhibiert und der Zelle fehlen zusätzlich die wichtigen ER-Stress Proteine ERp57 oder CALR kann nicht mehr adäquat auf ER-Stress reagiert werden. Daher könnte es von Interesse sein, bei Patienten, die einen CNI einnehmen, auf Substanzen zu verzichten, die zu einer Reduktion der beiden Proteine führen. Außerdem von therapeutischem Interesse könnte das bessere Überleben der HK-2 Zellen bei gesteigerter Expression von ERp57 und CALR sein. Mit Substanzen, die die Expression von ERp57 und CALR anregen, kann so möglicherweise die Nephrotoxizität der CNI gedämpft und damit die Prognose von Patienten, die ein CNI einnehmen, verbessert werden. Dabei sollte besonderes Augenmerk auf der Entstehung von Nierenfibrose liegen, da diese zentraler Teil der CNI-Nephrotoxizität ist (s. 1.3) und durch eine Überexpression von ERp57 begünstigt wird (Dihazi et al. 2013). Ein weiterer potenziell

problematischer Effekt einer ERp57 Erhöhung in vivo könnte sein, dass es ein Aktivator der primäre Hämostase ist (Essex und Li 1999; Essex 2008) und auch eine Rolle in der sekundären Hämostase vermutet wird (Zhou et al. 2014), sodass vermehrt Thrombosen auftreten könnten. Weiterführende Studien zu dieser Fragestellung könnten im Tiermodell erfolgen. Entsprechende Mausmodelle mit Knockdown von ERp57 und CALR existieren (Mesaeli et al. 1999; Coe et al. 2010) und mit ihnen könnten eine potenzielle Übersterblichkeit sowie den Einfluss verschiedener ERp57- oder CALR-beeinflussender Substanzen auf die Prognose bei gleichzeitiger Berücksichtigung der Fibrosierung unter CNI-Therapie beurteilt werden.

5 Zusammenfassung

Immunsuppressiva haben die Organtransplantation als therapeutische Maßnahme möglich gemacht. Eine der ersten und bis heute wichtigsten Medikamentengruppen unter den Immunsuppressiva sind die Calcineurininhibitoren, zu denen Cyclosporin A und Tacrolimus zählen.

Die Nephrotoxizität der Calcineurininhibitoren als unerwünschte Arzneimittelwirkung tritt sowohl akut als auch chronisch auf. Häufig ist die Calcineurininhibitor-Nephrotoxizität therapielimitierend. Nierenfibrose spielt bei der chronischen Calcineurininhibitor-Nephrotoxizität eine wichtige Rolle. Die Nierenfibrose ist maßgeblich bedingt durch Stress im endo-plasmatischen Retikulum. Diesen Stress regulieren neben anderen die Proteine GRP78, ERP57 und Calretikulin.

Cyclosporin A und Tacrolimus zeigen bei Konzentrationen im mikromolaren Bereich eine toxische Wirkung auf die Nierenzelllinien HK-2 und TK-173. Diese toxische Wirkung zeigt sich in einer verminderten Zellviabilität und einer erhöhten Apoptoserate der Zellen. Dabei werden ER-Stress-Proteine vermehrt exprimiert.

In dieser Arbeit wurde erstmals eine proteomische Analyse der Nephrotoxizität von CNI an HK-2 Zellen durchgeführt. Dabei wurden regulierte Signalwege aufgedeckt, die bekanntermaßen zu Pathologien der Niere beitragen und viele weitere potenzielle Ziele einer therapeutischen Intervention zur Linderung der CNI-Nephrotoxizität.

Die vermehrte Expression von ER-Stress-Proteinen führt zu einer erhöhten Toleranz von HK-2 gegenüber Cyclosporin A und Tacrolimus. Gleichzeitig führt die verminderte Expression der gleichen ER-Stress-Proteine zu einer herabgesetzten Toleranz gegenüber Calcineurininhibitoren. Dies lässt eine protektive Wirkung der ER-Stress-Proteine gegenüber der von Calcineurininhibitoren vermittelten toxischen Wirkung auf renale Zelllinien vermuten.

6 Anhang

Tabelle A1: Regulierte Proteine nach CsA Behandlung

Entrez Gen Name	ID	Log ₂ FC	p	Lokalisation
HGF activator	HGFA_HUMAN	-3,837	1,3E-02	Extracellular Space
Bone marrow stromal cell antigen 2	BST2_HUMAN	-3,474	2,1E-03	Plasma Membrane
macroH2A.2 histone	H2AW_HUMAN	-3,322	1,6E-02	Nucleus
TNFAIP3 interacting protein 1	TNIIP1_HUMAN	-3,322	6,5E-03	Nucleus
Nucleolar protein 9	NOL9_HUMAN	-2,322	7,6E-04	Nucleus
Ubiquitin conjugating enzyme E2 T	UBE2T_HUMAN	-2,322	7,7E-03	Nucleus
Optineurin	OPTN_HUMAN	-2,322	5,2E-04	Cytoplasm
Torsin family 4 member A	TOR4A_HUMAN	-2,322	4,8E-02	other
Prolyl 3-hydroxylase family member 4	SC65_HUMAN	-2,322	4,3E-03	Nucleus
Kirre like nephrin family adhesion molecule 1	KIRR1_HUMAN	-2,322	1,0E-02	Plasma Membrane
Synaptotagmin 13	SYT12_HUMAN	-2,322	3,8E-02	Plasma Membrane
TruB pseudouridine synthase family member 1	TRUB1_HUMAN	-2,322	2,4E-02	other
Signal transducing adaptor molecule	STAM1_HUMAN	-2,322	7,1E-03	Cytoplasm
UDP-glucuronate decarboxylase 1	UXS1_HUMAN	-2,322	6,7E-03	Cytoplasm
Butyrylcholinesterase	CHLE_HUMAN	-2,322	2,5E-02	Plasma Membrane
Myelin expression factor 2	MYEF2_HUMAN	-2,322	5,6E-03	Nucleus
YME1 like 1 ATPase	YMEL1_HUMAN	-2,322	7,6E-03	Cytoplasm
3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase	HMDH_HUMAN	-2,322	7,6E-03	Cytoplasm
DNA ligase 1	DNLI1_HUMAN	-2,322	9,0E-03	Nucleus
AXL receptor tyrosine kinase	UFO_HUMAN	-2,322	2,4E-02	Plasma Membrane
Phosphatidylinositol transfer protein alpha	PIPNA_HUMAN	-2,322	7,7E-03	Cytoplasm
Peptidyl prolyl isomerase E	PPIE_HUMAN	-2,322	3,8E-02	Nucleus
Centrosomal protein 131	CP131_HUMAN	-2,322	7,3E-03	Cytoplasm
Amyloid beta precursor protein	A4_HUMAN	-2,322	7,8E-03	Plasma Membran
Serpin family E member 2	GDN_HUMAN	-2,322	4,9E-02	Extracellular Space

Entrez Gen Name	ID	Log ₂ FC	p	Lokalisation
Mitochondrial ribosomal protein L40	RM40_HUMAN	-2,322	7,6E-03	Cytoplasm
SCY like pseudokinase 1	SCYL1_HUMAN	-1,737	3,3E-03	Cytoplasm
DIS3 homolog, exosome endoribonuclease and 3'-5' exoribonuclease	RP44_HUMAN	-1,737	1,9E-02	Nucleus
Retinol dehydrogenase 12	RDH12_HUMAN	-1,737	3,3E-03	Cytoplasm
KIAA 1522	K1522_HUMAN	-1,737	3,3E-03	other
Mitochondrial genome maintenance exonuclease 1	MGME1_HUMAN	-1,737	1,0E-02	Cytoplasm
Ring finger protein 181	RN181_HUMAN	-1,737	2,0E-02	Cytoplasm
Small nuclear ribonucleoprotein U4/U6.U5 subunit 27	SNR27_HUMAN	-1,737	1,0E-02	Nucleus
THO complex 1	THOC1_HUMAN	-1,737	3,7E-04	Nucleus
Protein phosphatase 6 regulatory subunit 3	PP6R3_HUMAN	-1,737	3,2E-03	Cytoplasm
ABR activator of RhoGEF and GTPase	ABR_HUMAN	-1,737	1,0E-02	Cytoplasm
AT-rich interaction domain 48	ARI48_HUMAN	-1,737	1,0E-02	Nucleus
Threonyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	SYTM_HUMAN	-1,737	3,2E-02	Cytoplasm
Component of oligomeric golgi complex 6	COG6_HUMAN	-1,737	1,0E-02	Cytoplasm
BicC family RNA binding protein 1	BICC1_HUMAN	-1,737	9,5E-03	other
Mercaptopyruvate sulfurtransferase	THTM_HUMAN	-1,737	4,5E-02	Cytoplasm
Quiescin sulfhydryl oxidase 2	QSOX2_HUMAN	-1,737	2,0E-02	other
Dipeptidyl peptidase 9	DPP9_HUMAN	-1,737	3,6E-02	Cytoplasm
Replication initiator 1	REPI1_HUMAN	-1,737	3,3E-03	Nucleus
3-hydroxybutyrate dehydrogenase 2	BDH2_HUMAN	-1,737	3,0E-02	Cytoplasm
Scribble planar cell polarity protein	SCRIB_HUMAN	-1,737	3,6E-02	Cytoplasm
REX4 homolog, 3'-5' exonuclease	REXO4_HUMAN	-1,737	3,0E-03	Nucleus
Sulfatase modifying factor 2	SUMF2_HUMAN	-1,737	4,4E-02	Cytoplasm
WD repeat domain 61	WDR61_HUMAN	-1,737	2,1E-02	Nucleus
Myeloid leukemia factor 2	MLF2_HUMAN	-1,737	1,3E-02	Nucleus

Entrez Gen Name	ID	Log ₂ FC	p	Lokalisation
Pre-mRNA processing factor 38A	PR38A_HUMAN	-1,737	1,6E-02	Nucleus
orientation of chromosomes in cell division 1 like 1	BD1L1_HUMAN	-1,7373	4,8E-02	Nucleus
Sp1 family transcriptional repressor	MINT_HUMAN	-1,737	2,1E-02	Nucleus
Cleavage stimulation factor subunit 1	CSTF1_HUMAN	-1,737	1,1E-02	Nucleus
Serine peptidase inhibitor, Kunitz type 2	SPIT2_HUMAN	-1,737	3,0E-02	Extracellular Space
Kinesin light chain 4	KLC4_HUMAN	-1,737	1,3E-02	other
Syndecan 4	SDC4_HUMAN	-1,737	2,9E-02	Plasma Membrane
Torsin family 1 member B	TOR1B_HUMAN	-1,737	3,4E-02	Cytoplasm
Adhesion G-protein-coupled receptor G1	AGRG1_HUMAN	-1,737	1,8E-02	Plasma Membrane
Peroxisomal biogenesis factor 14	PEX14_HUMAN	-1,737	4,1E-02	Cytoplasm
Target of myb1 membrane trafficking protein	TOM1_HUMAN	-1,737	1,0E-02	Cytoplasm
COMM domain containing 4	COMD4_HUMAN	-1,737	3,3E-03	Cytoplasm
Ribulose-5-phosphate-3-epimerase	RPE_HUMAN	-1,737	1,0E-02	Cytoplasm
Lysine demethylase 1A	KDM1A_HUMAN	-1,737	4,7E-02	Nucleus
Cadherin 6	CADH6_HUMAN	-1,737	3,0E-02	Plasma Membrane
Very low density lipoprotein receptor	VLDLR_HUMAN	-1,737	4,6E-02	Plasma Membrane
Tumor protein p53 inducible protein 3	QORX_HUMAN	-1,737	3,3E-03	Cytoplasm
Transforming growth factor beta induced	BGH3_HUMAN	-1,322	3,8E-02	Extracellular Space
Kynurenine aminotransferase 3	KAT3_HUMAN	-1,322	1,4E-02	Cytoplasm
MICAL like 1	MILK1_HUMAN	-1,322	1,4E-02	Cytoplasm
GINS complex subunit 1	PSF1_HUMAN	-1,322	3,7E-02	Nucleus
Large 60S subunit nuclear export GTPase 1	LSG1_HUMAN	-1,322	4,9E-02	Cytoplasm
Mitochondrial ribosomal protein L44	RM44_HUMAN	-1,322	1,8E-02	Cytoplasm

Entrez Gen Name	ID	Log ₂ FC	p	Lokalisation
Mitochondrial ribosomal protein L15	RM15_HUMAN	-1,322	2,2E-03	Cytoplasm
RAB, member RAS oncogene family like 6	RABL6_HUMAN	-1,322	1,3E-02	Cytoplasm
RNA binding motif protein 42	RBM42_HUMAN	-1,322	1,3E-02	other
BRCA1/BRCA2-containing complex subunit 3	BRCC3_HUMAN	-1,322	4,1E-02	Nucleus
Chromosome X open reading frame 38	CX038_HUMAN	-1,322	4,1E-02	other
Mitochondrial ribosomal protein S30	RT30_HUMAN	-1,322	2,4E-02	Cytoplasm
AT-rich interaction domain 2	ARID2_HUMAN	-1,322	1,4E-02	Nucleus
Ring finger protein 149	RN149_HUMAN	-1,322	1,3E-02	Cytoplasm
Ring finger protein 40	BRE1B_HUMAN	-1,322	4,1E-02	Cytoplasm
Cysteine rich secretory protein LCCL domain containing 2	CRLD2_HUMAN	-1,322	1,3E-02	Cytoplasm
UBA domain containing 1	UBAC1_HUMAN	-1,322	1,4E-02	Nucleus
General transcription factor IIF subunit 1	T2FA_HUMAN	-1,322	7,4E-04	Nucleus
Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 4	PI3R4_HUMAN	-1,322	3,8E-02	Cytoplasm
5-hydroxymethylcytosine binding, ES cell specific	HMCES_HUMAN	-1,322	4,3E-02	Nucleus
Collagen type IV alpha 5 chain	CO4A5_HUMAN	-1,322	3,4E-02	Extracellular Space
Leucine zipper transcription factor like 1	LZTL1_HUMAN	-1,322	4,1E-02	Cytoplasm
Mitochondrial calcium uniporter	MCU_HUMAN	-1,322	4,2E-03	Cytoplasm
Multiple PDZ domain crumbs cell polarity complex component	MPDZ_HUMAN	-1,322	1,3E-02	Plasma Membrane
MRG domain binding protein	MRGBP_HUMAN	-1,322	1,4E-02	Nucleus
Ribonuclease H2 subunit C	RNH2C_HUMAN	-1,322	1,4E-02	other
Syntaxin 16	STX16_HUMAN	-1,322	1,4E-02	Cytoplasm
FAT atypical cadherin 1	FAT1_HUMAN	-1,322	1,8E-02	Plasma Membrane
Ubiquitin specific peptidase 7	UBP7_HUMAN	-1,322	5,0E-02	Nucleus
Acyl-CoA synthetase family member 3	ACSF3_HUMAN	-1,322	1,3E-02	Cytoplasm

Entrez Gen Name	ID	Log ₂ FC	p	Lokalisation
Guanosine monophosphate reductase 2	GMPR2_HUMAN	-1,322	1,4E-02	Cytoplasm
Multiple inositol-polyphosphate phosphatase 1	MINP_HUMAN	-1,322	1,3E-02	Cytoplasm
ATPase 13A3	AT133_HUMAN	-1,322	1,4E-02	Extracellular Space
D-glutamate cyclase	GLUCM_HUMAN	-1,322	1,3E-02	Cytoplasm
Nuclear receptor corepressor 1	NCOR1_HUMAN	-1,322	1,3E-02	Nucleus
Phospholipid scramblase 1	PLS1_HUMAN	-1,322	1,3E-02	Plasma Membrane
Piccolo presynaptic cytomatrix protein	PCLO_HUMAN	-1,322	8,4E-03	Cytoplasm
DNA primase subunit 2	PRI2_HUMAN	-1,322	1,3E-02	Nucleus
Mitochondrial ribosomal protein S28	RT28_HUMAN	-1,322	3,6E-02	Cytoplasm
Cyclin B1	CCNB1_HUMAN	-1,322	1,4E-02	Cytoplasm
Interferon induced protein 5	IN35_HUMAN	-1,322	1,2E-02	Nucleus
Caspase 7	CASP7_HUMAN	-1,322	1,4E-02	Cytoplasm
Solute carrier family 4 member 2	B3A2_HUMAN	-1,322	3,5E-02	Plasma Membrane
Solute carrier family 12 member 7	S12A7_HUMAN	-1,322	1,4E-02	Plasma Membrane
Ubiquitin like with PHD and ring finger domains 1	UHRF1_HUMAN	-1,322	4,6E-03	Nucleus
Histone deacetylase 3	HDAC3_HUMAN	-1,322	1,4E-02	Nucleus
General transcription factor IIIC subunit 2	TF3C2_HUMAN	-1,322	3,7E-02	Nucleus
Semaphorin 3C	SEM3C_HUMAN	-1,322	4,2E-02	Extracellular Space
Myelin basic protein	MBP_HUMAN	-1,322	3,2E-03	Extracellular Space
A-kinase anchoring protein 8	AKAP8_HUMAN	-1,322	2,3E-02	Nucleus
6-phosphofructo-2-kinase/fructose2,6-bisphosphatase 2	F262_HUMAN	-1,322	4,2E-02	Cytoplasm
COP9 signalosome subunit 6	CSN6_HUMAN	-1,322	3,4E-02	Nucleus
Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2	CHCH2_HUMAN	-1,322	4,3E-02	Cytoplasm
A-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase	ARAF_HUMAN	-1,322	1,4E-02	Cytoplasm
Citron rho-interacting serine/threonine kinase	CTRO_HUMAN	-1,322	1,4E-02	Cytoplasm

Entrez Gen Name	ID	Log ₂ FC	p	Lokalisation
Hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 7	DHB7_HUMAN	-1,322	1,3E-02	Cytoplasm
MNAT1 component of CDK activating kinase	MAT1_HUMAN	-1,322	1,4E-02	Nucleus
Taxilin alpha	TXLNA_HUMAN	-1	4,4E-03	Extracellular Space
GRIP and coiled-coil domain containing 2	GCC2_HUMAN	-1	1,1E-03	Cytoplasm
Ribosomal RNA processing 15 homolog	RRP15_HUMAN	-1	2,0E-02	Nucleus
DEAD-box helicase 23	DDX23_HUMAN	-1	7,1E-03	Nucleus
CGG triplet repeat binding protein 1	CGBP1_HUMAN	-1	4,7E-02	Nucleus
DEAD-box helicase 20	DDX20_HUMAN	-1	1,9E-02	Nucleus
PHD and ring finger domains 1	PHRF1_HUMAN	-1	7,4E-03	Nucleus
Endothelin converting enzyme 1	ECE1_HUMAN	-1	2,4E-03	Plasma Membrane
Mitochondrial ribosomal protein L38	RM38_HUMAN	-1	4,7E-02	Cytoplasm
Aldehyde dehydrogenase 4 family member A1	AL4A1_HUMAN	-1	1,5E-02	Cytoplasm
DEAH-box helicase 36	DHX36_HUMAN	-1	2,0E-02	Cytoplasm
Myelin protein zero like 1	MPZL1_HUMAN	-1	3,6E-02	Plasma Membrane
Prolyl 3-hydroxylase 2	P3H2_HUMAN	-1	1,1E-02	Cytoplasm
Serine and arginine rich splicing factor 11	SRS11_HUMAN	-1	7,2E-03	Nucleus
Mitochondrial ribosomal protein L37	RM37_HUMAN	-1	9,8E-03	Cytoplasm
Aldehyde dehydrogenase 1 family member B1	AL1B1_HUMAN	-1	1,1E-02	Cytoplasm
Metabolism of cobalamin associated B	MMAB_HUMAN	-1	1,6E-02	Cytoplasm
Solute carrier family 25 member 30	KMCP1_HUMAN	-1	2,6E-04	Cytoplasm
NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit V1	NDUV1_HUMAN	-1	4,0E-02	Cytoplasm
BCL2 antagonist/killer1	BAK_HUMAN	-1	1,1E-02	Cytoplasm
DNA polymerase delta 2, accessory subunit	DPOD2_HUMAN	-1	1,6E-02	Nucleus

ADAM metallopeptidase domain 10	ADA10_HUMAN	-1	1,0E-02	Plasma Membrane
Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 2	P4HA2_HUMAN	-1	4,4E-03	Cytoplasm
Laminin subunit alpha 5	LAMA5_HUMAN	-1	1,5E-02	Extracellular Space
Cartilage associated protein	CRTAP_HUMAN	-1	3,3E-02	Extracellular Space
Oxysterol binding protein like 11	OSB11_HUMAN	-1	2,9E-02	Cytoplasm
TNF alpha induced protein 2	TNAP2_HUMAN	-1	7,4E-03	Extracellular Space
Thrombospondin 3	TSP3_HUMAN	-1	1,4E-02	Extracellular Space
ATPase H+ transporting accessory protein 1	VAS1_HUMAN	-1	4,8E-02	Cytoplasm
Integral membrane protein 2B	ITM2B_HUMAN	-1	6,8E-03	Plasma Membrane
Mitochondrial ribosomal protein S5	RT05_HUMAN	-1	5,1E-03	Cytoplasm
Branched chain amino acid transaminase 2	BCAT2_HUMAN	-1	2,3E-02	Cytoplasm
Signal transducer and activator of transcription 3	STAT3_HUMAN	-1	1,3E-02	Nucleus
NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 6	NDK6_HUMAN	-1	1,8E-02	Cytoplasm
UTP15 small subunit processome component	UTP15_HUMAN	1	1,7E-02	Nucleus
ER membrane protein complex subunit 7	EMC7_HUMAN	1	2,4E-02	Cytoplasm
Exocyst complex component 3	EXOC3_HUMAN	1	2,1E-02	Plasma Membrane
RFT1 homolog	RFT1_HUMAN	1	1,7E-02	Other
Clustered mitochondria homolog	CLU_HUMAN	1	2,2E-02	Cytoplasm
Integrin linked kinase	ILK_HUMAN	1,07	3,7E-03	Plasma Membrane
MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase	MET_HUMAN	1,07	4,1E-02	Plasma Membrane
PNN interacting serine and arginine rich protein	PNISR_HUMAN	1,138	2,5E-02	Nucleus
Programmed cell death 11	RRP5_HUMAN	1,138	3,5E-02	Nucleus
Peroxidasin	PXDN_HUMAN	1,138	2,5E-02	Extracellular Space
NIPBL cohesion loading factor	NIPBL_HUMAN	1,138	2,5E-02	Nucleus
Ankyrin repeat and FYVE domain containing 1	ANFY1_HUMAN	1,138	1,9E-02	Cytoplasm
Ribosomal protein L14	RL14_HUMAN	1,138	1,5E-02	Cytoplasm

Entrez Gen Name	ID	Log ₂ FC	p	Lokalisation
LIM and cysteine rich domains 1	LMCD1_HUMAN	1,202	2,6E-02	Cytoplasm
Midasin AAA ATPase 1	MDN1_HUMAN	1,202	1,1E-02	Nucleus
General transcription factor IIIC subunit 1	TF3C1_HUMAN	1,202	9,5E-03	Nucleus
Forkhead box K1	FO XK1_HUMAN	1,202	9,5E-03	Nucleus
Serine/threonine kinase 39	STK39_HUMAN	1,202	4,0E-02	Nucleus
Sorbin and SH3 domain containing 3	VINEX_HUMAN	1,202	2,8E-03	Cytoplasm
Opioid growth factor receptor	OGFR_HUMAN	1,202	5,0E-02	Plasma Membrane
Chromosome 9 open reading frame 64	QSP_P_HUMAN	1,322	3,7E-02	other
G protein nucleolar 1	GNL1_HUMAN	1,322	1,7E-02	Nucleus
Exocyst complex component 2	EXOC2_HUMAN	1,379	2,6E-02	Cytoplasm
Rho guanine nucleotide exchange factor 5	ARHG5_HUMAN	1,379	3,5E-02	Cytoplasm
Cytochrome b-245 alpha chain	CY24A_HUMAN	1,379	2,4E-02	Cytoplasm
URB2 ribosome biogenesis homolog	URB2_HUMAN	1,433	1,7E-03	Nucleus
Junctional adhesion molecule 3	JAM3_HUMAN	1,433	7,1E-03	Plasma Membrane
Carbamoyl-phosphate synthase 1	CPSM_HUMAN	1,433	2,3E-02	Cytoplasm
Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor 2	ARHG2_HUMAN	1,433	3,9E-02	Cytoplasm
Tetratricopeptide repeat domain 37	TTC37_HUMAN	1,485	2,3E-02	Nucleus
Neurofibromin 2	MERL_HUMAN	1,485	5,3E-03	Plasma Membrane
FKBP prolyl isomerase 15	FKBP15_HUMAN	1,585	2,9E-02	Plasma Membrane
Ataxin 2	ATX2_HUMAN	1,585	2,7E-02	Nucleus
Exosome component 10	EXOSX_HUMAN	1,585	9,9E-03	Nucleus
Ribosomal protein S19	RS19_HUMAN	1,585	2,1E-02	Cytoplasm
Ribosomal protein L36	RL36_HUMAN	1,632	1,3E-02	Cytoplasm
NIMA related kinase 9	NEK9_HUMAN	1,722	3,8E-02	Nucleus
Adaptor protein, phosphotyrosine interacting with PH domain and ...	DP13A_HUMAN	1,722	4,2E-02	Cytoplasm
NADH:ubiquinone oxidoreductase complex assembly factor 3	NDUF3_HUMAN	1,722	3,8E-02	Nucleus

Entrez Gen Name	ID	Log ₂ FC	p	Lokalisation
Hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase	3BHS7_HUMAN	1,722	4,2E-02	Cytoplasm
Tensin 1	TENS1_HUMAN	1,766	2,9E-02	Plasma Membrane
CLN6 transmembrane ER protein	CLN6_HUMAN	1,766	1,2E-02	Cytoplasm
Bromodomain containing 8	BRD8_HUMAN	1,766	3,2E-02	Nucleus
Family with sequence similarity 83 member H	FA83H_HUMAN	1,807	1,2E-02	Cytoplasm
Prefoldin subunit 5	PFD5_HUMAN	1,807	1,0E-02	Nucleus
Selenophosphate synthetase 1	SPS1_HUMAN	1,807	8,2E-04	other
Histone deacetylase 6	HDAC6_HUMAN	1,888	5,3E-03	Nucleus
PTPRF interacting protein alpha 1	LIPA1_HUMAN	1,926	1,0E-02	Plasma Membrane
Replication timing regulatory factor 1	RIF1_HUMAN	1,926	2,5E-02	Nucleus
Major facilitator superfamily domain containing 1	MFSD1_HUMAN	2,036	1,7E-02	other
Ribosomal protein L30	RL30_HUMAN	2,036	2,1E-03	Cytoplasm
Queuine tRNA-ribosyltransferase catalytic subunit 1	TGT_HUMAN	2,07	2,2E-02	Cytoplasm
Ribosomal protein L35a	RL35A_HUMAN	2,07	2,2E-02	Cytoplasm
Translocase of inner mitochondrial membrane 17A	TI17A_HUMAN	2,07	1,9E-02	Cytoplasm
Heme oxygenase 1	HMOX1_HUMAN	2,263	1,5E-02	Cytoplasm
myosin light chain 6B	MYL6B_HUMAN	2,350	1,4E-02	Cytoplasm
LSM8 homolog, U6 small nuclear RNA associated	LSM8_HUMAN	2,35	1,4E-02	Nucleus
Ubiquitin conjugating enzyme E2 N	UBE2N_HUMAN	2,379	2,0E-03	Cytoplasm
Protein kinase C delta	KPCD_HUMAN	2,485	4,0E-02	Cytoplasm
Mediator of DNA damage checkpoint 1	MDC1_HUMAN	2,982	4,0E-02	Nucleus
Myeloid derived growth factor	MYDGF_HUMAN	3,138	3,0E-03	Extracellular Space
Small nuclear ribonucleoprotein D2 polypeptide	SMD2_HUMAN	3,138	3,0E-03	Nucleus
Mago homolog B, exon junction complex subunit	MGN2_HUMAN	3,7	2,0E-03	Nucleus
Myosin light chain 6	MYL6_HUMAN	3,7	1,3E-02	Cytoplasm

Entrez Gen Name	ID	Log ₂ FC	p	Lokalisation
Ribosomal protein L23	RL23_HUMAN	4,322	1,9E-03	Cytoplasm

Tabelle A2: Regulierte Proteine nach TAC Behandlung

Entrez Gen Name	ID	Log ₂ FC	p	Lokalisation
versican	CSPG2_HUMAN	-5,644	2,40E-03	Extracellular Space
cadherin 6	CADH6_HUMAN	-4,322	8,50E-03	Plasma Membrane
NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit S1	NDUS1_HUMAN	-4,322	4,00E-04	Cytoplasm
ADAM metalloproteinase domain 10	ADA10_HUMAN	-4,059	2,10E-04	Plasma Membrane
anoctamin 6	ANO6_HUMAN	-4,059	3,10E-03	Plasma Membrane
serine peptidase inhibitor, Kunitz type 2	SPT2_HUMAN	-4,059	7,40E-03	Extracellular Space
jagged canonical Notch ligand 1	JAG1_HUMAN	-3,837	3,40E-04	Extracellular Space
phospholipase C beta 4	PLCB4_HUMAN	-3,837	1,60E-02	Cytoplasm
CD70 molecule	CD70_HUMAN	-3,837	3,90E-03	Extracellular Space
pyrroline-5-carboxylate reductase 2	P5CR2_HUMAN	-3,837	2,60E-03	Cytoplasm
NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit V1	NDUV1_HUMAN	-3,837	1,10E-02	Cytoplasm
HGF activator	HGFA_HUMAN	-3,837	1,30E-02	Extracellular Space
centromere protein F	CENPF_HUMAN	-3,644	5,70E-03	Nucleus
microsomal glutathione S-transferase 3	MGST3_HUMAN	-3,644	2,90E-03	Cytoplasm
myelin basic protein	MBP_HUMAN	-3,644	8,90E-04	Extracellular Space
semaphorin 3C	SEM3C_HUMAN	-3,644	2,00E-02	Extracellular Space
lysosomal protein transmembrane 4 beta	LAP4B_HUMAN	-3,644	4,50E-02	Cytoplasm
spectrin repeat containing nuclear envelope protein 2	SYNE2_HUMAN	-3,474	3,40E-02	Nucleus
NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit B10	NDUBA_HUMAN	-3,474	6,00E-03	Cytoplasm
kirre like nephrin family adhesion molecule 1	KIRR1_HUMAN	-3,474	1,40E-03	Plasma Membrane
OXA1L mitochondrial inner membrane protein	OXA1L_HUMAN	-3,474	2,50E-02	Cytoplasm
milk fat globule EGF and factor V/VIII domain containing	MFGM_HUMAN	-3,474	2,50E-02	Extracellular Space
very low density lipoprotein receptor	VLDLR_HUMAN	-3,474	8,60E-03	Plasma Membrane
armadillo repeat containing X-linked 3	ARMX3_HUMAN	-3,474	3,90E-02	Cytoplasm
spen family transcriptional repressor	MINT_HUMAN	-3,474	1,30E-02	Nucleus
stromal antigen 2	STAG2_HUMAN	-3,474	1,10E-03	Nucleus
thymidylate synthetase	TYSY_HUMAN	-3,322	2,50E-02	Nucleus

Entrez Gen Name	ID	Log ₂ FC	p	Lokalisation
growth hormone inducible transmembrane protein	GHITM_HUMAN	-3,322	1,40E-02	Cytoplasm
DNA polymerase delta interacting protein 2	PDIP2_HUMAN	-3,322	5,30E-03	Cytoplasm
ceramide synthase 2	CERS2_HUMAN	-3,322	1,10E-03	Nucleus
structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain containing 1	SMHD1_HUMAN	-3,322	1,70E-03	Nucleus
N-acetylneuraminase synthase	SIAS_HUMAN	-3,322	1,30E-02	Cytoplasm
influenza virus NS1A binding protein	NS1BP_HUMAN	-3,322	5,50E-03	Nucleus
methylmalonyl-CoA mutase	MUTA_HUMAN	-3,322	3,80E-02	Cytoplasm
mitochondrial ribosomal protein S5	RT05_HUMAN	-3,322	3,80E-04	Cytoplasm
piccolo presynaptic cytomatrix protein	PCLO_HUMAN	-3,322	2,30E-04	Cytoplasm
serpin family E member 2	GDN_HUMAN	-3,322	1,20E-02	Extracellular Space
low density lipoprotein receptor	LDLR_HUMAN	-3,322	1,20E-02	Plasma Membrane
mitochondrial ribosomal protein L44	RM44_HUMAN	-3,322	7,00E-03	Cytoplasm
lysine demethylase 1A	KDM1A_HUMAN	-3,322	2,60E-02	Nucleus
apolipoprotein B	APOB_HUMAN	-3,322	1,60E-02	Extracellular Space
BCL2 interacting protein 3	BNIP3_HUMAN	-3,322	8,70E-04	Cytoplasm
RP2 activator of ARL3 GTPase	XRP2_HUMAN	-3,322	4,70E-03	Cytoplasm
LPS responsive beige-like anchor protein	LRBA_HUMAN	-3,322	1,70E-02	Cytoplasm
pseudouridine synthase 7	PUS7_HUMAN	-3,322	1,70E-02	Nucleus
mitochondrial ribosomal protein L45	RM45_HUMAN	-3,322	1,70E-02	Cytoplasm
Tax1 binding protein 1	TAXB1_HUMAN	-3,322	2,70E-02	Cytoplasm
cyclin dependent kinase 7	CDK7_HUMAN	-3,322	2,70E-02	Nucleus
CDC42 binding protein kinase beta	MRCKB_HUMAN	-3,322	3,70E-03	Cytoplasm
retention in endoplasmic reticulum sorting receptor 1	RER1_HUMAN	-3,322	3,70E-03	Cytoplasm
agrin	AGRIN_HUMAN	-3,322	1,10E-02	Plasma Membrane
fibronectin 1	FINC_HUMAN	-3,322	9,90E-04	Extracellular Space
prion protein	PRIO_HUMAN	-3,322	3,60E-02	Plasma Membrane
solute carrier family 38 member 2	S38A2_HUMAN	-3,322	3,60E-02	Plasma Membrane
myelin protein zero like 1	MPZL1_HUMAN	-3,322	1,10E-02	Plasma Membrane
bone marrow stromal cell antigen 2	BST2_HUMAN	-3,322	3,40E-03	Plasma Membrane
lamin B receptor	LBR_HUMAN	-3,322	2,00E-04	Nucleus

Entrez Gen Name	ID	Log ₂ FC	p	Lokalisation
thiosulfate sulfurtransferase	THTR_HUMAN	-3,322	1,20E-03	Cytoplasm
integral membrane protein 2B	ITM2B_HUMAN	-3,322	2,50E-03	Plasma Membrane
fibronectin type III domain containing 3B	FND3B_HUMAN	-3,322	8,40E-03	Cytoplasm
adhesion G protein-coupled receptor G1	AGRG1_HUMAN	-3,322	1,00E-02	Plasma Membrane
RALY RNA binding protein like	RALYL_HUMAN	-3,322	1,90E-02	Nucleus
mitochondrial ribosomal protein L3	RM03_HUMAN	-3,322	3,90E-04	Cytoplasm
transcription activation suppressor	TASOR_HUMAN	-3,322	3,90E-04	Nucleus
optineurin	OPTN_HUMAN	-3,322	3,90E-04	Cytoplasm
transmembrane 9 superfamily member 2	TM9S2_HUMAN	-3,322	7,00E-03	Plasma Membrane
cell division cycle 73	CDC73_HUMAN	-3,322	4,70E-03	Nucleus
carboxypeptidase D	CBPD_HUMAN	-3,322	1,50E-02	Extracellular Space
ESF1 nucleolar pre-rRNA processing protein homolog	ESF1_HUMAN	-3,322	4,80E-02	Nucleus
angiotensin II receptor associated protein	ATRAP_HUMAN	-3,322	4,80E-02	Plasma Membrane
poly(A) binding protein interacting protein 1	PAIP1_HUMAN	-3,322	1,10E-03	Cytoplasm
mitochondrial ribosomal protein L37	RM37_HUMAN	-3,322	1,70E-03	Cytoplasm
piezo type mechanosensitive ion channel component 1	PIEZ1_HUMAN	-3,322	6,50E-03	Cytoplasm
TNFAIP3 interacting protein 1	TNIP1_HUMAN	-3,322	6,50E-03	Nucleus
vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 like 1	VKORL_HUMAN	-3,322	6,50E-03	Cytoplasm
mitochondrial ribosomal protein S28	RT28_HUMAN	-3,322	1,40E-02	Cytoplasm
mitochondrial ribosomal protein S9	RT09_HUMAN	-3,322	2,30E-03	Cytoplasm
ribosomal RNA processing 15 homolog	RRP15_HUMAN	-3,322	2,30E-03	Nucleus
mitochondrial ribosomal protein S7	RT07_HUMAN	-3,322	1,80E-02	Cytoplasm
adaptor related protein complex 2 subunit mu 1	AP2M1_HUMAN	-3,322	6,20E-03	Cytoplasm
inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 2	ITPR2_HUMAN	-3,322	1,20E-03	Cytoplasm
itchy E3 ubiquitin protein ligase	ITCH_HUMAN	-3,322	2,60E-03	Nucleus
guanylate kinase 1	KGUA_HUMAN	-3,322	6,70E-03	Cytoplasm
endoplasmic reticulum metalloproteinase 1	ERMP1_HUMAN	-3,322	3,10E-02	Cytoplasm
deoxynucleotidyltransferase terminal interacting protein 2	TDIF2_HUMAN	-3,322	1,60E-02	Nucleus
AXL receptor tyrosine kinase	UFO_HUMAN	-3,322	1,60E-02	Plasma Membrane

Entrez Gen Name	ID	Log ₂ FC	p	Lokalisation
mitochondrial ribosomal protein L15	RM15_HUMAN	-3,322	1,50E-03	Cytoplasm
FAT atypical cadherin 1	FAT1_HUMAN	-3,322	8,40E-03	Plasma Membrane
SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 1	SRGP1_HUMAN	-3,322	8,40E-03	Cytoplasm
syndecan 2	SDC2_HUMAN	-3,322	4,30E-04	Plasma Membrane
collagen type IV alpha 5 chain	CO4A5_HUMAN	-2,322	1,80E-02	Extracellular Space
CD109 molecule	CD109_HUMAN	-2,322	1,20E-02	Plasma Membrane
holocytochrome c synthase	CCHL_HUMAN	-2,322	1,10E-02	Cytoplasm
regulator of microtubule dynamics 1	RMD1_HUMAN	-2,322	2,10E-02	Cytoplasm
lectin, mannose binding 2 like	LMA2L_HUMAN	-2,322	2,10E-02	Cytoplasm
torsin family 4 member A	TOR4A_HUMAN	-2,322	4,80E-02	Other
GRIP and coiled-coil domain containing 2	GCC2_HUMAN	-2,322	1,10E-03	Cytoplasm
interferon induced protein 35	IN35_HUMAN	-2,322	1,10E-03	Nucleus
transmembrane protein 9	TMEM9_HUMAN	-2,322	6,70E-03	Cytoplasm
BicC family RNA binding protein 1	BICC1_HUMAN	-2,322	6,70E-03	Other
heparan sulfate proteoglycan 2	PGBM_HUMAN	-2,322	2,50E-02	Extracellular Space
WD repeat domain 5	WDR5_HUMAN	-2,322	4,50E-02	Nucleus
testis expressed 10	TEX10_HUMAN	-2,322	4,50E-02	Nucleus
ATPase secretory pathway Ca ²⁺ transporting 1	AT2C1_HUMAN	-2,322	2,40E-02	Cytoplasm
mitochondrial ribosomal protein L2	RM02_HUMAN	-2,322	4,40E-02	Extracellular Space
transcription factor 25	TCF25_HUMAN	-2,322	4,40E-02	Nucleus
FRY like transcription coactivator	FRYL_HUMAN	-2,322	4,40E-02	Other
DEAH-box helicase 36	DHX36_HUMAN	-2,322	7,70E-03	Cytoplasm
protein phosphatase 2 phosphatase activator	PTPA_HUMAN	-2,322	3,30E-03	Cytoplasm
ubiquilin 1	UBQL1_HUMAN	-2,322	4,50E-03	Cytoplasm
translocase of inner mitochondrial membrane 21	TIM21_HUMAN	-2,322	9,10E-03	Cytoplasm
aldehyde dehydrogenase 6 family member A1	MMSA_HUMAN	-2,322	2,50E-02	Cytoplasm
butyrylcholinesterase	CHLE_HUMAN	-2,322	2,50E-02	Plasma Membrane
dipeptidyl peptidase 9	DPP9_HUMAN	-2,322	2,50E-02	Cytoplasm
synaptotagmin 13	SYT13_HUMAN	-2,322	2,50E-02	Plasma Membrane
inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3	ITPR3_HUMAN	-2,322	5,10E-03	Cytoplasm
mitochondrial ribosomal protein L13	RM13_HUMAN	-2,322	9,20E-03	Cytoplasm

Entrez Gen Name	ID	Log ₂ FC	p	Lokalisation
SPT6 homolog, histone chaperone and transcription elongation factor	SPT6H_HUMAN	-2,322	3,50E-02	Nucleus
TruB pseudouridine synthase family member 1	TRUB1_HUMAN	-2,322	2,40E-02	Other
lactamase beta	LACTB_HUMAN	-2,322	7,30E-03	Cytoplasm
karyopherin subunit alpha 2	IMA1_HUMAN	-2,322	2,10E-02	Nucleus
3'(2'), 5'-bisphosphate nucleotidase 1	BPNT1_HUMAN	-2,322	4,60E-02	Nucleus
tyrosyl-tRNA synthetase 2	SYYM_HUMAN	-2,322	3,00E-03	Cytoplasm
phosphoribosyl pyrophosphate synthetase associated protein 1	KPRA_HUMAN	-2,322	1,80E-02	Extracellular Space
ubiquitin like with PHD and ring finger domains 1	UHRF1_HUMAN	-2,322	9,90E-03	Nucleus
prostaglandin F2 receptor inhibitor	FPRP_HUMAN	-2,322	1,70E-02	Plasma Membrane
transmembrane 9 superfamily member 3	TM9S3_HUMAN	-2,322	3,60E-03	Cytoplasm
centrosomal protein 131	CP131_HUMAN	-2,322	7,10E-03	Cytoplasm
DIS3 homolog, exosome endoribonuclease and 3'-5' exoribonuclease	RRP44_HUMAN	-2,322	7,10E-03	Nucleus
glycosylphosphatidylinositol anchor attachment 1	GPAA1_HUMAN	-2,322	8,40E-03	Cytoplasm
WD repeat domain 44	WDR44_HUMAN	-2,322	8,40E-03	Cytoplasm
ATPase 13A1	AT131_HUMAN	-2,322	8,00E-03	Extracellular Space
quiescin sulfhydryl oxidase 2	QSOX2_HUMAN	-2,322	8,00E-03	Other
gamma-glutamyl carboxylase	VKGC_HUMAN	-2,322	8,00E-03	Cytoplasm
solute carrier family 4 member 2	B3A2_HUMAN	-2,322	8,00E-03	Plasma Membrane
ring finger protein 181	RN181_HUMAN	-2,322	8,00E-03	Cytoplasm
growth factor receptor bound protein 2	GRB2_HUMAN	-2,322	4,10E-02	Cytoplasm
heme binding protein 2	HEBP2_HUMAN	-2,322	4,70E-02	Cytoplasm
transmembrane 9 superfamily member 4	TM9S4_HUMAN	-2,322	4,20E-03	Cytoplasm
protein tyrosine kinase 2	FAK1_HUMAN	-2,322	8,30E-03	Cytoplasm
O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase	OGT1_HUMAN	-2,322	7,00E-04	Cytoplasm
MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase	MET_HUMAN	-2,322	5,80E-03	Plasma Membrane
bioorientation of chromosomes in cell division 1 like 1	BD1L1_HUMAN	-2,322	4,60E-02	Nucleus
Janus kinase 1	JAK1_HUMAN	-2,322	1,00E-02	Cytoplasm
solute carrier organic anion transporter family member 2A1	SO2A1_HUMAN	-2,322	1,90E-02	Plasma Membrane
RNA polymerase II subunit B	RPB2_HUMAN	-2,322	4,60E-03	Nucleus
mitochondrial ribosomal protein L24	RM24_HUMAN	-2,322	1,90E-03	Cytoplasm

Entrez Gen Name	ID	Log ₂ FC	p	Lokalisation
WD repeat domain 75	WDR75_HUMAN	-2,322	1,90E-02	Nucleus
farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1	FDFT_HUMAN	-2,322	6,20E-03	Cytoplasm
TANK binding kinase 1	TBK1_HUMAN	-2,322	3,10E-02	Cytoplasm
transmembrane protein 165	TM165_HUMAN	-2,322	2,60E-02	Plasma Membrane
syntaxin 8	STX8_HUMAN	-2,322	3,90E-02	Plasma Membrane
ribosomal RNA processing 1B	RRP1B_HUMAN	-2,322	3,50E-02	Nucleus
syndecan 4	SDC4_HUMAN	-2,322	1,70E-02	Plasma Membrane
synthesis of cytochrome C oxidase 2	SCO2_HUMAN	-2,322	3,50E-02	Cytoplasm
CLPTM1 like	CLP1L_HUMAN	-2,322	1,30E-03	Other
oxysterol binding protein like 11	OSB11_HUMAN	-2,322	1,30E-03	Cytoplasm
solute carrier family 38 member 1	S38A1_HUMAN	-2,322	2,70E-02	Plasma Membrane
programmed cell death 4	PDCD4_HUMAN	-2,322	1,10E-02	Nucleus
synuclein alpha	SYUA_HUMAN	-2,322	5,40E-03	Cytoplasm
DEXH-box helicase 30	DHX30_HUMAN	-2,322	6,50E-03	Nucleus
developmentally regulated GTP binding protein 1	DRG1_HUMAN	-2,322	1,40E-02	Cytoplasm
G protein-coupled receptor 143	GP143_HUMAN	-2,322	9,20E-04	Plasma Membrane
cytochrome c1	CY1_HUMAN	-2,322	3,70E-02	Cytoplasm
pyruvate dehydrogenase kinase 1	PDK1_HUMAN	-2,322	1,10E-02	Cytoplasm
DNA polymerase delta interacting protein 3	PDIP3_HUMAN	-2,322	1,90E-02	Nucleus
matrix metalloproteinase 14	MMP14_HUMAN	-2,322	3,60E-02	Extracellular Space
NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit S2	NDUS2_HUMAN	-2,322	8,30E-03	Cytoplasm
hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate	HGS_HUMAN	-2,322	8,30E-03	Cytoplasm
replication termination factor 2	RTF2_HUMAN	-2,322	7,70E-03	Nucleus
ubiquitin conjugating enzyme E2 T	UBE2T_HUMAN	-2,322	7,70E-03	Nucleus
haloacid dehalogenase like hydrolase domain containing 5	HDHD5_HUMAN	-2,322	3,40E-03	Cytoplasm
3'(2'), 5'-bisphosphate nucleotidase 2	IMPA3_HUMAN	-2,322	9,20E-03	Cytoplasm
2'-5'-oligoadenylate synthetase 3	OAS3_HUMAN	-2,322	1,50E-02	Cytoplasm
squalene epoxidase	ERG1_HUMAN	-2,322	1,50E-02	Cytoplasm
MAP7 domain containing 3	MA7D3_HUMAN	-2,322	1,50E-02	Cytoplasm
threonyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	SYTM_HUMAN	-2,322	1,50E-02	Cytoplasm
mitochondrial ribosomal protein L58	ICT1_HUMAN	-2,322	1,50E-02	Cytoplasm

Entrez Gen Name	ID	Log ₂ FC	p	Lokalisation
NFKB repressing factor	NKRF_HUMAN	-2,322	1,50E-02	Nucleus
parathyrosin	PTMS_HUMAN	-2,322	3,00E-02	Nucleus
mitochondrial ribosomal protein S2	RT02_HUMAN	-2,322	1,50E-02	Cytoplasm
phospholipase C gamma 1	PLCG1_HUMAN	-2,322	1,50E-02	Cytoplasm
X-ray repair cross complementing 1	XRCC1_HUMAN	-2,322	9,30E-04	Nucleus
7-dehydrocholesterol reductase	DHCR7_HUMAN	-2,322	4,50E-03	Cytoplasm
scribble planar cell polarity protein	SCRIB_HUMAN	-2,322	1,90E-02	Cytoplasm
mitochondrial ribosomal protein L11	RM11_HUMAN	-2,322	2,70E-02	Cytoplasm
pumilio RNA binding family member 3	PUM3_HUMAN	-2,322	4,00E-02	Nucleus
arginyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	SYRM_HUMAN	-2,322	4,00E-02	Cytoplasm
EGF like repeats and discoidin domains 3	EDIL3_HUMAN	-2,322	4,00E-02	Extracellular Space
Fas associated factor 1	FAF1_HUMAN	-2,322	2,00E-03	Nucleus
mitochondrial ribosomal protein S30	RT30_HUMAN	-2,322	2,00E-03	Cytoplasm
charged multivesicular body protein 4A	CHM4A_HUMAN	-2,322	2,00E-03	Cytoplasm
serine incorporator 1	SERC1_HUMAN	-2,322	1,60E-03	Plasma Membrane
HEAT repeat containing 1	HEAT1_HUMAN	-2,322	2,10E-02	Nucleus
ATRX chromatin remodeler	ATRX_HUMAN	-2,322	7,60E-04	Nucleus
YME1 like 1 ATPase	YMEL1_HUMAN	-2,322	7,60E-04	Cytoplasm
GDNF family receptor alpha 1	GFRA1_HUMAN	-2,322	7,60E-04	Plasma Membrane
NECAP endocytosis associated 2	NECP2_HUMAN	-2,322	7,60E-04	Cytoplasm
polycystin 2, transient receptor potential cation channel	PKD2_HUMAN	-2,322	7,60E-04	Plasma Membrane
EI24 autophagy associated transmembrane protein	EI24_HUMAN	-2,322	7,60E-04	Other
nucleolar protein 9	NOL9_HUMAN	-2,322	7,60E-04	Nucleus
mitochondrial ribosomal protein L40	RM40_HUMAN	-2,322	7,60E-04	Cytoplasm
origin recognition complex subunit 4	ORC4_HUMAN	-2,322	7,60E-04	Nucleus
3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase	HMDH_HUMAN	-2,322	7,60E-04	Cytoplasm
tetratricopeptide repeat domain 1	TTC1_HUMAN	-2,322	4,40E-02	Cytoplasm
solute carrier family 33 member 1	ACATN_HUMAN	-2,322	4,40E-02	Cytoplasm
DEAD-box helicase 10	DDX10_HUMAN	-2,322	4,40E-02	Nucleus
ubiquilin 4	UBQL4_HUMAN	-2,322	4,40E-02	Cytoplasm

Entrez Gen Name	ID	Log ₂ FC	p	Lokalisation
retinol dehydrogenase 13	RDH13_HUMAN	-2,322	3,40E-02	Cytoplasm
NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit B6	NDUB6_HUMAN	-2,322	9,00E-03	Cytoplasm
phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class K	GPI8_HUMAN	-2,322	9,00E-03	Cytoplasm
ATP synthase membrane subunit f	ATPK_HUMAN	-2,322	9,00E-03	Cytoplasm
apolipoprotein E	APOE_HUMAN	-2,322	9,00E-03	Extracellular Space
nicotinamide nucleotide transhydrogenase	NNTM_HUMAN	-2,322	3,40E-02	Cytoplasm
protein phosphatase 1 regulatory subunit 10	PP1RA_HUMAN	-2,322	6,10E-03	Nucleus
nitrilase 1	NIT1_HUMAN	-2,322	6,10E-03	Cytoplasm
CYFIP related Rac1 interactor A	FA49A_HUMAN	-2,322	1,30E-02	Other
ubiquitin like modifier activating enzyme 3	UBA3_HUMAN	-2,322	2,40E-02	Cytoplasm
phosphoglycolate phosphatase	PGP_HUMAN	-2,322	1,10E-02	Cytoplasm
NFS1 cysteine desulfurase	NFS1_HUMAN	-2,322	1,10E-02	Cytoplasm
mitochondrial ribosomal protein L30	RM30_HUMAN	-2,322	1,10E-02	Cytoplasm
regulation of nuclear pre-mRNA domain containing 2	RPRD2_HUMAN	-2,322	1,90E-02	Nucleus
trans-2,3-enoyl-CoA reductase	TECR_HUMAN	-2,322	1,90E-02	Plasma Membrane
phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 4	PI3R4_HUMAN	-2,322	8,50E-03	Cytoplasm
general transcription factor IIIC subunit 2	TF3C2_HUMAN	-2,322	8,50E-03	Nucleus
transforming growth factor beta induced	BGH3_HUMAN	-2,322	8,50E-03	Extracellular Space
autocrine motility factor receptor	AMFR_HUMAN	-2,322	8,50E-03	Plasma Membrane
lysocardiolipin acyltransferase 1	LCLT1_HUMAN	-2,322	8,50E-03	Cytoplasm
BCS1 homolog, ubiquinol-cytochrome c reductase complex chaperone	BCS1_HUMAN	-2,322	8,50E-03	Cytoplasm
DNA polymerase delta 2, accessory subunit	DPOD2_HUMAN	-2,322	8,50E-03	Nucleus
ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 1	ATPF1_HUMAN	-2,322	1,00E-03	Cytoplasm
mitochondrial ribosomal protein L47	RM47_HUMAN	-2,322	2,10E-02	Cytoplasm
mitochondrial ribosomal protein S15	RT15_HUMAN	-1,737	8,30E-03	Cytoplasm
THO complex 2	THOC2_HUMAN	-1,737	3,10E-02	Nucleus
two pore segment channel 1	TPC1_HUMAN	-1,737	3,10E-02	Plasma Membrane
CRK proto-oncogene, adaptor protein	CRK_HUMAN	-1,737	3,10E-02	Cytoplasm
synaptosome associated protein 29	SNP29_HUMAN	-1,737	3,10E-02	Cytoplasm

Entrez Gen Name	ID	Log ₂ FC	p	Lokalisation
vacuolar protein sorting 13 homolog C	VP13C_HUMAN	-1,737	3,00E-02	Cytoplasm
NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit S8	NDUS8_HUMAN	-1,737	3,00E-02	Cytoplasm
signal transducer and activator of transcription 6	STAT6_HUMAN	-1,737	3,00E-02	Nucleus
transmembrane O-mannosyltransferase targeting cadherins 3	TMTC3_HUMAN	-1,737	3,00E-02	Cytoplasm
mitochondrial ribosomal protein L16	RM16_HUMAN	-1,737	3,00E-02	Cytoplasm
inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1	ITPR1_HUMAN	-1,737	3,00E-02	Cytoplasm
nuclear receptor corepressor 2	NCOR2_HUMAN	-1,737	4,40E-02	Nucleus
protein tyrosine phosphatase 4A2	TP4A2_HUMAN	-1,737	3,20E-02	Cytoplasm
collagen type XVIII alpha 1 chain	COIA1_HUMAN	-1,737	6,20E-03	Extracellular Space
NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit S3	NDUS3_HUMAN	-1,737	4,70E-02	Cytoplasm
CD46 molecule	MCP_HUMAN	-1,737	2,00E-02	Plasma Membrane
pre-mRNA processing factor 38A	PR38A_HUMAN	-1,737	1,70E-02	Nucleus
pyrroline-5-carboxylate reductase 1	P5CR1_HUMAN	-1,737	3,10E-03	Cytoplasm
aconitase 1	ACOC_HUMAN	-1,737	1,70E-02	Cytoplasm
CD276 molecule	CD276_HUMAN	-1,737	2,40E-02	Plasma Membrane
coagulation factor III, tissue factor	TF_HUMAN	-1,737	4,60E-02	Plasma Membrane
transcription elongation factor A3	TCEA3_HUMAN	-1,737	1,00E-02	Nucleus
signal transducing adaptor molecule	STAM1_HUMAN	-1,737	1,00E-02	Cytoplasm
anoctamin 10	ANO10_HUMAN	-1,737	3,80E-03	Plasma Membrane
mitochondrial ribosomal protein L38	RM38_HUMAN	-1,737	3,80E-03	Cytoplasm
queuine tRNA-ribosyltransferase accessory subunit 2	QTRT2_HUMAN	-1,737	3,80E-03	Cytoplasm
aurora kinase B	AURKB_HUMAN	-1,737	3,80E-03	Nucleus
TRIO and F-actin binding protein	TARA_HUMAN	-1,737	1,10E-02	Nucleus
NAD(P)HX epimerase	NNRE_HUMAN	-1,737	1,10E-02	Extracellular Space
neurolysin	NEUL_HUMAN	-1,737	1,10E-02	Cytoplasm
amyloid beta precursor protein	A4_HUMAN	-1,737	1,10E-02	Plasma Membrane
COP9 signalosome subunit 6	CSN6_HUMAN	-1,737	1,10E-02	Nucleus
mitochondrial ribosomal protein S18B	RT18B_HUMAN	-1,737	1,10E-02	Cytoplasm
vitamin K epoxide reductase complex subunit 1	VKOR1_HUMAN	-1,737	1,10E-02	Cytoplasm
oxysterol binding protein like 8	OSBL8_HUMAN	-1,737	1,70E-02	Plasma Membrane

Entrez Gen Name	ID	Log ₂ FC	p	Lokalisation
hydroxysteroid dehydrogenase like 1	HSDL1_HUMAN	-1,737	9,90E-03	Cytoplasm
SPT16 homolog, facilitates chromatin remodeling subunit	SP16H_HUMAN	-1,737	2,60E-02	Nucleus
FAST kinase domains 5	FAKD5_HUMAN	-1,737	1,70E-02	Cytoplasm
phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase	PUR1_HUMAN	-1,737	3,70E-02	Cytoplasm
NDC1 transmembrane nucleoporin	NDC1_HUMAN	-1,737	2,60E-02	Nucleus
uridine-cytidine kinase 2	UCK2_HUMAN	-1,737	2,60E-02	Cytoplasm
mitochondrial ribosomal protein L1	RM01_HUMAN	-1,737	2,60E-02	Cytoplasm
thymidine kinase 1	KITH_HUMAN	-1,737	4,60E-03	Cytoplasm
Jupiter microtubule associated homolog 2	JUPI2_HUMAN	-1,737	1,40E-02	Cytoplasm
cadherin 2	CADH2_HUMAN	-1,737	4,70E-03	Plasma Membrane
5-hydroxymethylcytosine binding, ES cell specific	HMCES_HUMAN	-1,737	3,30E-03	Nucleus
BRCA1/BRCA2-containing complex subunit 3	BRCC3_HUMAN	-1,737	3,30E-03	Nucleus
alanyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	SYAM_HUMAN	-1,737	2,70E-02	Cytoplasm
mitochondrial genome maintenance exonuclease 1	MGME1_HUMAN	-1,737	1,30E-02	Cytoplasm
nucleoporin 210	PO210_HUMAN	-1,737	4,10E-03	Nucleus
COPI coat complex subunit epsilon	COPE_HUMAN	-1,737	3,20E-03	Cytoplasm
insulin degrading enzyme	IDE_HUMAN	-1,737	1,60E-02	Extracellular Space
DNA ligase 1	DNLI1_HUMAN	-1,737	4,40E-02	Nucleus
dihydroorotate dehydrogenase (quinone)	PYRD_HUMAN	-1,737	4,00E-02	Cytoplasm
ATPase H ⁺ transporting V1 subunit D	VATD_HUMAN	-1,737	4,00E-02	Cytoplasm
BICD cargo adaptor 2	BICD2_HUMAN	-1,737	9,90E-03	Cytoplasm
lon peptidase 1, mitochondrial	LONM_HUMAN	-1,737	4,50E-03	Cytoplasm
ATPase family AAA domain containing 1	ATAD1_HUMAN	-1,737	2,40E-02	Plasma Membrane
pentatricopeptide repeat domain 3	PTCD3_HUMAN	-1,737	1,60E-03	Cytoplasm
cytochrome c oxidase assembly homolog COX15	COX15_HUMAN	-1,737	1,60E-03	Cytoplasm
disco interacting protein 2 homolog B	DIP2B_HUMAN	-1,737	4,10E-02	Cytoplasm
UDP-glucuronate decarboxylase 1	UXS1_HUMAN	-1,737	4,10E-02	Cytoplasm
adaptor related protein complex 2 subunit alpha 2	AP2A2_HUMAN	-1,737	1,60E-02	Cytoplasm
twinfilin actin binding protein 1	TWF1_HUMAN	-1,737	1,90E-02	Cytoplasm
eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2	IF4G2_HUMAN	-1,737	1,50E-02	Cytoplasm

Entrez Gen Name	ID	Log ₂ FC	p	Lokalisation
pyruvate dehydrogenase E1 subunit beta	ODPB_HUMAN	-1,737	5,40E-03	Cytoplasm
mutL homolog 1	MLH1_HUMAN	-1,737	1,30E-02	Nucleus
RFT1 homolog	RFT1_HUMAN	-1,737	1,30E-02	Other
translocase of outer mitochondrial membrane 40	TOM40_HUMAN	-1,737	1,00E-02	Cytoplasm
palmitoyl-protein thioesterase 1	PPT1_HUMAN	-1,737	3,70E-02	Cytoplasm
NDRG family member 3	NDRG3_HUMAN	-1,737	3,70E-02	Cytoplasm
KIAA1143	K1143_HUMAN	-1,737	3,70E-02	Other
TPD52 like 1	TPD53_HUMAN	-1,737	3,10E-02	Cytoplasm
PBX homeobox interacting protein 1	PBIP1_HUMAN	-1,737	3,00E-02	Nucleus
UTP25 small subunit processor component	DIEXF_HUMAN	-1,737	1,10E-02	Nucleus
ETHE1 persulfide dioxygenase	ETHE1_HUMAN	-1,737	1,10E-02	Cytoplasm
CGG triplet repeat binding protein 1	CGBP1_HUMAN	-1,737	1,10E-02	Nucleus
thymopoietin	LAP2B_HUMAN	-1,737	5,00E-03	Nucleus
NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit S7	NDUS7_HUMAN	-1,737	3,60E-02	Cytoplasm
laminin subunit alpha 5	LAMA5_HUMAN	-1,737	2,60E-03	Extracellular Space
3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	3HIDH_HUMAN	-1,737	2,00E-03	Cytoplasm
LEM domain nuclear envelope protein 2	LEMD2_HUMAN	-1,737	4,70E-02	Nucleus
neuroplastin	NPTN_HUMAN	-1,737	3,90E-02	Plasma Membrane
elaC ribonuclease Z 2	RNZ2_HUMAN	-1,737	3,50E-02	Nucleus
phosphatidylinositol transfer protein alpha	PIPNA_HUMAN	-1,737	1,20E-02	Cytoplasm
3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 3	HACD3_HUMAN	-1,737	3,00E-03	Cytoplasm
AT-rich interaction domain 4B	ARI4B_HUMAN	-1,737	1,00E-02	Nucleus
sphingomyelin phosphodiesterase 4	NSMA3_HUMAN	-1,737	1,00E-02	Cytoplasm
SR-related CTD associated factor 1	SFR19_HUMAN	-1,737	1,00E-02	Extracellular Space
coiled-coil domain containing 50	CCD50_HUMAN	-1,737	1,00E-02	Cytoplasm
small nuclear ribonucleoprotein U4/U6.U5 subunit 27	SNR27_HUMAN	-1,737	1,00E-02	Nucleus
coenzyme Q9	COQ9_HUMAN	-1,737	1,00E-02	Cytoplasm
methyltransferase like 15	MET15_HUMAN	-1,737	1,00E-02	Other
cathepsin S	CATS_HUMAN	-1,737	1,00E-02	Cytoplasm
nudix hydrolase 16 like 1	TIRR_HUMAN	-1,737	1,00E-02	Cytoplasm

Entrez Gen Name	ID	Log ₂ FC	p	Lokalisation
adhesion molecule with Ig like domain 2	AMGO2_HUMAN	-1,737	1,00E-02	Plasma Membrane
angio associated migratory cell protein	AAMP_HUMAN	-1,737	1,00E-02	Plasma Membrane
transporter 2, ATP binding cassette subfamily B member	TAP2_HUMAN	-1,737	1,00E-02	Cytoplasm
SFT2 domain containing 3	SFT2C_HUMAN	-1,737	1,00E-02	Other
target of myb1 membrane trafficking protein	TOM1_HUMAN	-1,737	1,00E-02	Cytoplasm
RNA binding motif protein 15	RBM15_HUMAN	-1,737	4,00E-02	Nucleus
COP9 signalosome subunit 8	CSN8_HUMAN	-1,737	2,20E-02	Nucleus
transmembrane protein 106B	T106B_HUMAN	-1,737	2,20E-02	Cytoplasm
histone acetyltransferase 1	HAT1_HUMAN	-1,737	2,40E-02	Nucleus
nudix hydrolase 5	NUDT5_HUMAN	-1,737	4,90E-02	Cytoplasm
NPC intracellular cholesterol transporter 1	NPC1_HUMAN	-1,737	1,40E-03	Cytoplasm
methionine adenosyltransferase 2B	MAT2B_HUMAN	-1,737	1,30E-02	Cytoplasm
neuronal calcium sensor 1	NCS1_HUMAN	-1,737	1,30E-02	Plasma Membrane
complement C3	CO3_HUMAN	-1,737	4,50E-02	Extracellular Space
quinoid dihydropteridine reductase	DHPR_HUMAN	-1,737	4,00E-02	Cytoplasm
serine palmitoyltransferase long chain base subunit 1	SPTC1_HUMAN	-1,737	4,40E-02	Cytoplasm
NBAS subunit of NRZ tethering complex	NBAS_HUMAN	-1,737	4,10E-02	Nucleus
catenin beta 1	CTNB1_HUMAN	-1,737	2,10E-04	Nucleus
PHD and ring finger domains 1	PHRF1_HUMAN	-1,737	9,00E-03	Nucleus
WD repeat domain 36	WDR36_HUMAN	-1,737	9,00E-03	Extracellular Space
SCY1 like pseudokinase 1	SCYL1_HUMAN	-1,737	9,00E-03	Cytoplasm
MAPK activated protein kinase 2	MAPK2_HUMAN	-1,737	9,00E-03	Nucleus
REX4 homolog, 3'-5' exonuclease	REXO4_HUMAN	-1,737	9,00E-03	Nucleus
oxysterol binding protein like 10	OSB10_HUMAN	-1,737	9,00E-03	Cytoplasm
SON DNA and RNA binding protein	SON_HUMAN	-1,737	4,90E-03	Nucleus
utrophin	UTRO_HUMAN	-1,737	2,30E-03	Plasma Membrane
SH3 domain containing kinase binding protein 1	SH3K1_HUMAN	-1,737	2,40E-02	Cytoplasm
metabolism of cobalamin associated B	MMAB_HUMAN	-1,737	2,40E-02	Cytoplasm
guided entry of tail-anchored proteins factor 4	GET4_HUMAN	-1,737	4,80E-02	Cytoplasm
calcium binding protein 39	CAB39_HUMAN	-1,737	1,40E-02	Cytoplasm

Entrez Gen Name	ID	Log ₂ FC	p	Lokalisation
eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M	EIF3M_HUMAN	-1,737	2,50E-03	Cytoplasm
dynamin 1	DYN1_HUMAN	-1,737	3,00E-02	Cytoplasm
3-hydroxybutyrate dehydrogenase 2	BDH2_HUMAN	-1,737	5,00E-02	Cytoplasm
acyl-CoA dehydrogenase family member 9	ACAD9_HUMAN	-1,737	2,30E-02	Cytoplasm
golgi brefeldin A resistant guanine nucleotide exchange factor 1	GBF1_HUMAN	-1,737	4,80E-02	Cytoplasm
ubiquitin associated protein 2	UBAP2_HUMAN	-1,737	2,60E-02	Cytoplasm
proteolipid protein 1	MYPR_HUMAN	-1,737	2,60E-02	Plasma Membrane
sorting nexin 9	SNX9_HUMAN	-1,737	4,50E-02	Cytoplasm
adducin 3	ADDG_HUMAN	-1,737	3,00E-02	Cytoplasm
casein kinase 2 alpha 2	CSK22_HUMAN	-1,737	3,50E-03	Cytoplasm
chloride voltage-gated channel 7	CLCN7_HUMAN	-1,737	3,50E-03	Plasma Membrane
mitochondrial calcium uniporter	MCU_HUMAN	-1,737	3,50E-03	Cytoplasm
huntingtin	HD_HUMAN	-1,737	2,20E-02	Cytoplasm
albumin	ALBU_HUMAN	-1,737	5,90E-03	Extracellular Space
capping protein regulator and myosin 1 linker 1	CARL1_HUMAN	-1,737	2,20E-02	Cytoplasm
mitochondrial ribosomal protein S23	RT23_HUMAN	-1,737	4,90E-03	Cytoplasm
CCAAT enhancer binding protein zeta	CEBPZ_HUMAN	-1,322	3,60E-02	Nucleus
acyl-CoA synthetase family member 2	ACSF2_HUMAN	-1,322	3,40E-03	Cytoplasm
small glutamine rich tetratricopeptide repeat containing alpha	SGTA_HUMAN	-1,322	5,60E-03	Cytoplasm
WW domain binding protein 2	WBP2_HUMAN	-1,322	4,00E-03	Cytoplasm
aldo-keto reductase family 1 member A1	AK1A1_HUMAN	-1,322	4,80E-02	Cytoplasm
nuclear receptor corepressor 1	NCOR1_HUMAN	-1,322	1,30E-02	Nucleus
stromal cell derived factor 4	CAB45_HUMAN	-1,322	1,30E-02	Cytoplasm
vir like m6A methyltransferase associated	VIR_HUMAN	-1,322	1,30E-02	Nucleus
1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 4	PLCD_HUMAN	-1,322	1,30E-02	Cytoplasm
cyclin G associated kinase	GAK_HUMAN	-1,322	1,30E-02	Nucleus
acyl-CoA synthetase family member 3	ACSF3_HUMAN	-1,322	1,30E-02	Cytoplasm
VRK serine/threonine kinase 1	VRK1_HUMAN	-1,322	1,30E-02	Nucleus
RTF1 homolog, Paf1/RNA polymerase II complex component	RTF1_HUMAN	-1,322	1,30E-02	Nucleus

Entrez Gen Name	ID	Log ₂ FC	p	Lokalisation
SAM and HD domain containing deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase 1	SAMH1_HUMAN	-1,322	1,30E-02	Nucleus
farnesyltransferase, CAAX box, alpha	FNTA_HUMAN	-1,322	1,30E-02	Cytoplasm
secreted protein acidic and cysteine rich	SPRC_HUMAN	-1,322	1,30E-02	Extracellular Space
mitochondrial ribosomal protein S31	RT31_HUMAN	-1,322	1,30E-02	Cytoplasm
phospholipid scramblase 1	PLS1_HUMAN	-1,322	1,30E-02	Plasma Membrane
NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit S4	NDUS4_HUMAN	-1,322	1,30E-02	Cytoplasm
cytochrome c oxidase assembly factor 7 (putative)	COA7_HUMAN	-1,322	1,30E-02	Cytoplasm
hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 7	DHB7_HUMAN	-1,322	1,30E-02	Cytoplasm
multiple PDZ domain crumbs cell polarity complex component	MPDZ_HUMAN	-1,322	1,30E-02	Plasma Membrane
Ral GEF with PH domain and SH3 binding motif 2	RGPS2_HUMAN	-1,322	1,30E-02	Other
RAB, member RAS oncogene family like 6	RABL6_HUMAN	-1,322	1,30E-02	Cytoplasm
cysteine rich secretory protein LCCL domain containing 2	CRLD2_HUMAN	-1,322	1,30E-02	Cytoplasm
multiple inositol-polyphosphate phosphatase 1	MINP1_HUMAN	-1,322	1,30E-02	Cytoplasm
centromere protein B	CENPB_HUMAN	-1,322	1,30E-02	Nucleus
D-glutamate cyclase	GLUCM_HUMAN	-1,322	1,30E-02	Cytoplasm
ring finger protein 149	RN149_HUMAN	-1,322	1,30E-02	Cytoplasm
DNA primase subunit 2	PRI2_HUMAN	-1,322	1,30E-02	Nucleus
membrane bound O-acyltransferase domain containing 7	MBOA7_HUMAN	-1,322	2,70E-02	Plasma Membrane
solute carrier family 29 member 1 (Augustine blood group)	S29A1_HUMAN	-1,322	1,90E-02	Plasma Membrane
mitochondrial ribosomal protein S18A	RT18A_HUMAN	-1,322	8,90E-03	Cytoplasm
G protein-coupled receptor class C group 5 member A	RAI3_HUMAN	-1,322	1,90E-02	Plasma Membrane
NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit V2	NDUV2_HUMAN	-1,322	1,90E-02	Cytoplasm
ABR activator of RhoGEF and GTPase	ABR_HUMAN	-1,322	1,90E-02	Cytoplasm
mitochondrial assembly of ribosomal large subunit 1	MASU1_HUMAN	-1,322	1,90E-02	Extracellular Space
component of oligomeric golgi complex 6	COG6_HUMAN	-1,322	1,90E-02	Cytoplasm
sorting nexin 1	SNX1_HUMAN	-1,322	4,90E-02	Cytoplasm
COMM domain containing 4	COMD4_HUMAN	-1,322	2,30E-02	Cytoplasm
RNA binding motif protein 34	RBM34_HUMAN	-1,322	2,30E-02	Nucleus
general transcription factor IIIC subunit 3	TF3C3_HUMAN	-1,322	2,30E-02	Nucleus

Entrez Gen Name	ID	Log ₂ FC	p	Lokalisation
leucine zipper transcription factor like 1	LZTL1_HUMAN	-1,322	2,30E-02	Cytoplasm
tumor protein p53 inducible protein 3	QORX_HUMAN	-1,322	2,30E-02	Cytoplasm
coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2	CHCH2_HUMAN	-1,322	2,30E-02	Cytoplasm
deoxyribose-phosphate aldolase	DEOC_HUMAN	-1,322	1,00E-02	Cytoplasm
coproporphyrinogen oxidase	HEM6_HUMAN	-1,322	4,30E-02	Cytoplasm
trio Rho guanine nucleotide exchange factor	TRIO_HUMAN	-1,322	1,50E-02	Cytoplasm
GINS complex subunit 1	PSF1_HUMAN	-1,322	1,50E-02	Nucleus
acidic nuclear phosphoprotein 32 family member E	AN32E_HUMAN	-1,322	1,50E-02	Nucleus
solute carrier family 16 member 1	MOT1_HUMAN	-1,322	8,40E-03	Plasma Membrane
collagen type IV alpha 1 chain	CO4A1_HUMAN	-1,322	2,50E-02	Extracellular Space
prosaposin	SAP_HUMAN	-1,322	2,70E-03	Extracellular Space
myelin expression factor 2	MYEF2_HUMAN	-1,322	5,70E-03	Nucleus
leucine rich repeats and WD repeat domain containing 1	LRWD1_HUMAN	-1,322	4,50E-02	Nucleus
NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 6	NDK6_HUMAN	-1,322	1,60E-02	Cytoplasm
metaxin 1	MTX1_HUMAN	-1,322	3,20E-02	Cytoplasm
HSPA (Hsp70) binding protein 1	HPBP1_HUMAN	-1,322	3,20E-02	Cytoplasm
EF-hand domain family member D1	EFHD1_HUMAN	-1,322	3,20E-02	Cytoplasm
ubiquitin specific peptidase 39	SNUT2_HUMAN	-1,322	4,70E-03	Nucleus
BCL2 antagonist/killer 1	BAK_HUMAN	-1,322	4,70E-03	Cytoplasm
junction plakoglobin	PLAK_HUMAN	-1,322	4,10E-02	Plasma Membrane
ADP ribosylation factor like GTPase 6 interacting protein 5	PRAF3_HUMAN	-1,322	3,70E-02	Cytoplasm
nicastrin	NICA_HUMAN	-1,322	3,70E-02	Plasma Membrane
mannosidase alpha class 1B member 1	MA1B1_HUMAN	-1,322	3,70E-02	Cytoplasm
solute carrier family 2 member 1	GTR1_HUMAN	-1,322	7,40E-03	Plasma Membrane
endothelin converting enzyme 1	ECE1_HUMAN	-1,322	4,70E-03	Plasma Membrane
macroH2A.1 histone	H2AY_HUMAN	-1,322	4,70E-02	Nucleus
complement C1q binding protein	C1QBP_HUMAN	-1,322	6,70E-03	Cytoplasm
RAN binding protein 3	RANB3_HUMAN	-1,322	6,70E-03	Nucleus
mitochondrial ribosomal protein L20	RM20_HUMAN	-1,322	2,00E-02	Cytoplasm
STE20 like kinase	SLK_HUMAN	-1,322	7,30E-03	Nucleus

Entrez Gen Name	ID	Log ₂ FC	p	Lokalisation
motile sperm domain containing 1	MSPD1_HUMAN	-1,322	4,00E-02	Other
methenyltetrahydrofolate synthetase	MTHFS_HUMAN	-1,322	4,00E-02	Cytoplasm
high mobility group box 3	HMGB3_HUMAN	-1,322	1,80E-02	Nucleus
ubiquitin protein ligase E3 component n-recogin 4	UBR4_HUMAN	-1,322	3,50E-02	Nucleus
axin interactor, dorsalization associated	AIDA_HUMAN	-1,322	7,70E-03	Cytoplasm
leucine rich repeat containing 40	LRC40_HUMAN	-1,322	1,90E-02	Nucleus
general transcription factor III C subunit 4	TF3C4_HUMAN	-1,322	1,40E-02	Nucleus
citron rho-interacting serine/threonine kinase	CTRO_HUMAN	-1,322	1,40E-02	Cytoplasm
nucleolar protein 10	NOL10_HUMAN	-1,322	1,40E-02	Nucleus
endonuclease G	NUCG_HUMAN	-1,322	1,40E-02	Cytoplasm
copper chaperone for superoxide dismutase	CCS_HUMAN	-1,322	1,40E-02	Cytoplasm
bromodomain containing 4	BRD4_HUMAN	-1,322	1,40E-02	Nucleus
B-TFIID TATA-box binding protein associated factor 1	BTAF1_HUMAN	-1,322	1,40E-02	Nucleus
myosin XIX	MYO19_HUMAN	-1,322	1,40E-02	Cytoplasm
AT-rich interaction domain 2	ARID2_HUMAN	-1,322	1,40E-02	Nucleus
taxilin gamma	TXLNG_HUMAN	-1,322	1,40E-02	Nucleus
origin recognition complex subunit 3	ORC3_HUMAN	-1,322	1,40E-02	Nucleus
ATPase 13A3	AT133_HUMAN	-1,322	1,40E-02	Extracellular Space
MNAT1 component of CDK activating kinase	MAT1_HUMAN	-1,322	1,40E-02	Nucleus
kynurenine aminotransferase 3	KAT3_HUMAN	-1,322	1,40E-02	Cytoplasm
transmembrane and ubiquitin like domain containing 1	TMUB1_HUMAN	-1,322	1,40E-02	Extracellular Space
histone deacetylase 3	HDAC3_HUMAN	-1,322	1,40E-02	Nucleus
cyclin B1	CCNB1_HUMAN	-1,322	1,40E-02	Cytoplasm
syntaxin 16	STX16_HUMAN	-1,322	1,40E-02	Cytoplasm
integrin subunit beta 3	ITB3_HUMAN	-1,322	2,90E-02	Plasma Membrane
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L like	HNRL1_HUMAN	-1,322	9,70E-03	Other
KIAA1522	K1522_HUMAN	-1,322	9,70E-03	Other
FtsJ RNA 2'-O-methyltransferase 3	SPB1_HUMAN	-1,322	2,80E-02	Nucleus
DEAH-box helicase 37	DHX37_HUMAN	-1,322	2,70E-02	Nucleus
serine/threonine kinase 10	STK10_HUMAN	-1,322	2,70E-02	Cytoplasm

Entrez Gen Name	ID	Log ₂ FC	p	Lokalisation
receptor interacting serine/threonine kinase 1	RIPK1_HUMAN	-1,322	2,70E-02	Plasma Membrane
tensin 3	TENS3_HUMAN	-1,322	2,70E-02	Plasma Membrane
protein kinase AMP-activated non-catalytic subunit gamma 1	AAKG1_HUMAN	-1,322	2,70E-02	Nucleus
RNA binding motif protein 42	RBM42_HUMAN	-1,322	2,70E-02	Other
CYFIP related Rac1 interactor B	FA49B_HUMAN	-1,322	7,10E-03	Extracellular Space
Rho GTPase activating protein 4	RHG04_HUMAN	-1,322	2,30E-02	Cytoplasm
F11 receptor	JAM1_HUMAN	-1,322	1,70E-02	Plasma Membrane
sorting nexin 2	SNX2_HUMAN	-1,322	2,80E-04	Cytoplasm
Ts translation elongation factor, mitochondrial	EFTS_HUMAN	-1,322	3,30E-02	Cytoplasm
AFG3 like matrix AAA peptidase subunit 2	AFG32_HUMAN	-1,322	7,20E-03	Cytoplasm
proteasome 26S subunit, non-ATPase 7	PSMD7_HUMAN	-1,322	1,20E-02	Cytoplasm
mitochondrial ribosomal protein L17	RM17_HUMAN	-1,322	3,60E-02	Cytoplasm
isocitrate dehydrogenase (NAD(+)) 3 non-catalytic subunit beta	IDH3B_HUMAN	-1,322	2,70E-02	Cytoplasm
WD repeat and FYVE domain containing 1	WDFY1_HUMAN	-1,322	2,10E-02	Cytoplasm
calcineurin like EF-hand protein 1	CHP1_HUMAN	-1,322	4,10E-02	Cytoplasm
nardilysin convertase	NRDC_HUMAN	-1,322	1,20E-02	Cytoplasm
frizzled class receptor 6	FZD6_HUMAN	-1,322	4,10E-02	Plasma Membrane
magnesium transporter 1	MAGT1_HUMAN	-1,322	4,10E-02	Plasma Membrane
SSU72 homolog, RNA polymerase II CTD phosphatase	SSU72_HUMAN	-1,322	4,10E-02	Other
SAMM50 sorting and assembly machinery component	SAM50_HUMAN	-1,322	2,30E-02	Cytoplasm
activated leukocyte cell adhesion molecule	CD166_HUMAN	-1,000	4,20E-02	Plasma Membrane
adenylosuccinate synthase 2	PURA2_HUMAN	-1,000	3,20E-02	Cytoplasm
RAB22A, member RAS oncogene family	RB22A_HUMAN	-1,000	3,20E-02	Cytoplasm
general transcription factor IIIi	GTF2I_HUMAN	-1,000	5,80E-03	Nucleus
nipsnap homolog 1	NIPS1_HUMAN	-1,000	2,40E-02	Cytoplasm
golgin A2	GOGA2_HUMAN	-1,000	4,30E-03	Cytoplasm
translocation associated membrane protein 1	TRAM1_HUMAN	-1,000	4,70E-02	Cytoplasm
GTP binding protein 4	NOG1_HUMAN	-1,000	1,60E-03	Nucleus
ArfGAP with FG repeats 1	AGFG1_HUMAN	-1,000	2,30E-02	Nucleus
ribulose-5-phosphate-3-epimerase	RPE_HUMAN	-1,000	2,30E-02	Cytoplasm

Entrez Gen Name	ID	Log ₂ FC	p	Lokalisation
PYM homolog 1, exon junction complex associated factor	PYM1_HUMAN	-1,000	2,30E-02	Nucleus
cytochrome P450 family 20 subfamily A member 1	CP20A_HUMAN	-1,000	2,30E-02	Other
TSPY like 5	TSYL5_HUMAN	-1,000	2,30E-02	Other
saccharopine dehydrogenase (putative)	SCPDL_HUMAN	-1,000	4,30E-02	Cytoplasm
DEAD-box helicase 23	DDX23_HUMAN	-1,000	1,20E-02	Nucleus
ADP-ribosylserine hydrolase	ARHL2_HUMAN	-1,000	1,80E-02	Cytoplasm
catenin delta 1	CTND1_HUMAN	-1,000	2,00E-02	Nucleus
QKI, KH domain containing RNA binding	QKI_HUMAN	-1,000	2,30E-02	Nucleus
transmembrane protein 214	TM214_HUMAN	-1,000	3,70E-02	Extracellular Space
acetyl-CoA acetyltransferase 2	THIC_HUMAN	-1,000	4,30E-03	Cytoplasm
integrin subunit alpha V	ITAV_HUMAN	-1,000	1,20E-02	Plasma Membrane
general transcription factor IIF subunit 1	T2FA_HUMAN	-1,000	1,10E-02	Nucleus
leukotriene A4 hydrolase	LKHA4_HUMAN	-1,000	4,00E-02	Cytoplasm
WD repeat domain 74	WDR74_HUMAN	-1,000	3,60E-02	Nucleus
5'-nucleotidase, cytosolic II	5NTC_HUMAN	-1,000	3,60E-02	Cytoplasm
solute carrier family 12 member 7	S12A7_HUMAN	-1,000	3,60E-02	Plasma Membrane
mitochondrial poly(A) polymerase	PAPD1_HUMAN	-1,000	3,60E-02	Cytoplasm
dehydrogenase/reductase 7	DHRS7_HUMAN	-1,000	3,60E-02	Other
ubiquitin conjugating enzyme E2 J1	UB2J1_HUMAN	-1,000	3,60E-02	Cytoplasm
caspase 7	CASP7_HUMAN	-1,000	3,60E-02	Cytoplasm
GLI pathogenesis related 1	GLIP1_HUMAN	-1,000	3,60E-02	Extracellular Space
MICAL like 1	MILK1_HUMAN	-1,000	3,60E-02	Cytoplasm
synaptosome associated protein 91	AP180_HUMAN	-1,000	3,60E-02	Plasma Membrane
afadin, adherens junction formation factor	AFAD_HUMAN	-1,000	1,10E-02	Nucleus
solute carrier family 16 member 3	MOT4_HUMAN	-1,000	3,30E-02	Plasma Membrane
methyltransferase like 1	TRMB_HUMAN	-1,000	9,10E-03	Nucleus
transmembrane protein 43	TMM43_HUMAN	-1,000	2,00E-02	Nucleus
centrosomal protein 170	CE170_HUMAN	-1,000	2,60E-03	Nucleus
VHL binding protein 1	PFD3_HUMAN	-1,000	1,80E-02	Cytoplasm
nuclear mitotic apparatus protein 1	NUMA1_HUMAN	-1,000	2,80E-02	Nucleus
midasin AAA ATPase 1	MDN1_HUMAN	-1,000	3,00E-02	Nucleus

Entrez Gen Name	ID	Log ₂ FC	p	Lokalisation
FUN14 domain containing 2	FUND2_HUMAN	-1,000	3,00E-02	Cytoplasm
carbonic anhydrase 2	CAH2_HUMAN	-1,000	3,90E-02	Cytoplasm
ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 2	QCR2_HUMAN	-1,000	6,60E-03	Cytoplasm
adaptor related protein complex 2 subunit alpha 1	AP2A1_HUMAN	-1,000	2,10E-02	Cytoplasm
lactamase beta 2	LACB2_HUMAN	-1,000	2,70E-02	Cytoplasm
EBP cholesterol delta-isomerase	EBP_HUMAN	-1,000	1,40E-02	Cytoplasm
phosphatidylinositol transfer protein beta	PIPNB_HUMAN	-1,000	4,90E-02	Cytoplasm
ribophorin II	RPN2_HUMAN	-1,000	2,00E-02	Cytoplasm
N-alpha-acetyltransferase 15, NatA auxiliary subunit	NAA15_HUMAN	-1,000	6,10E-03	Nucleus
major vault protein	MVP_HUMAN	-1,000	4,80E-02	Nucleus
sulfide quinone oxidoreductase	SQOR_HUMAN	-1,000	3,30E-02	Cytoplasm
STT3 oligosaccharyltransferase complex catalytic subunit A	STT3A_HUMAN	-1,000	5,00E-02	Plasma Membrane
carbonyl reductase 1	CBR1_HUMAN	-1,000	2,60E-02	Cytoplasm
AHNAK nucleoprotein 2	AHNAK2_HUMAN	-1,000	9,50E-03	Cytoplasm
eukaryotic translation termination factor 1	ERF1_HUMAN	-1,000	2,60E-02	Cytoplasm
ornithine aminotransferase	OAT_HUMAN	-1,000	4,50E-02	Cytoplasm
ATP binding cassette subfamily B member 7	ABCB7_HUMAN	-1,000	3,20E-02	Cytoplasm
RAB29, member RAS oncogene family	RAB7L_HUMAN	-1,000	3,20E-02	Plasma Membrane
keratin 72	K2C72_HUMAN	-1,000	3,20E-02	Cytoplasm
high mobility group box 2	HMGB2_HUMAN	-1,000	4,20E-02	Nucleus
proteasome activator subunit 2	PSME2_HUMAN	-1,000	1,20E-02	Cytoplasm
enolase 2	ENOG_HUMAN	-1,000	3,80E-02	Cytoplasm
galectin 3 binding protein	LG3BP_HUMAN	-1,000	2,40E-02	Plasma Membrane
mitochondrial ribosomal protein L9	RM09_HUMAN	-1,000	6,70E-03	Cytoplasm
phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein	PICAL_HUMAN	-1,000	1,10E-02	Cytoplasm
core-binding factor subunit beta	PEBB_HUMAN	-1,000	3,60E-02	Nucleus
2'-deoxynucleoside 5'-phosphate N-hydrolase 1	DNPH1_HUMAN	-1,000	3,60E-02	Nucleus
charged multivesicular body protein 1B	CHM1B_HUMAN	-1,000	3,60E-02	Plasma Membrane
clathrin light chain B	CLCB_HUMAN	-1,000	3,60E-02	Plasma Membrane
PYD and CARD domain containing	ASC_HUMAN	-1,000	3,60E-02	Cytoplasm

Entrez Gen Name	ID	Log ₂ FC	p	Lokalisation
pseudouridine 5'-phosphatase	HDHD1_HUMAN	-1,000	3,60E-02	Cytoplasm
transcription elongation factor A like 3	TCAL3_HUMAN	-1,000	3,60E-02	Other
isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 1	IDHC_HUMAN	-1,000	8,50E-03	Cytoplasm
WASH complex subunit 4	WASC4_HUMAN	-1,000	3,70E-03	Cytoplasm
immunoglobulin binding protein 1	IGBP1_HUMAN	-1,000	1,50E-02	Cytoplasm
autophagy related 3	ATG3_HUMAN	-1,000	3,70E-02	Cytoplasm
aminopeptidase puromycin sensitive	PSA_HUMAN	-1,000	3,20E-02	Cytoplasm
acyl-CoA dehydrogenase medium chain	ACADM_HUMAN	-1,000	1,20E-02	Cytoplasm
mitochondrial antiviral signaling protein	MAVS_HUMAN	-1,000	6,70E-03	Cytoplasm
pitrilysin metallopeptidase 1	PREP_HUMAN	-1,000	4,60E-02	Cytoplasm
LRR binding FLII interacting protein 1	LRRF1_HUMAN	1,000	1,70E-02	Cytoplasm
RNA polymerase II subunit H	RPAB3_HUMAN	1,000	3,10E-02	Nucleus
protein phosphatase 1 regulatory subunit 18	PPR18_HUMAN	1,000	1,30E-03	Other
pinin, desmosome associated protein	PININ_HUMAN	1,000	3,00E-03	Plasma Membrane
plectin	PLEC_HUMAN	1,000	5,60E-03	Cytoplasm
mitotic spindle positioning	MISP_HUMAN	1,000	3,40E-03	Plasma Membrane
canopy FGF signaling regulator 2	CNPY2_HUMAN	1,000	7,40E-03	Plasma Membrane
calcium regulated heat stable protein 1	CHSP1_HUMAN	1,000	3,40E-02	Cytoplasm
proteolipid protein 2	PLP2_HUMAN	1,070	1,10E-02	Cytoplasm
pre-mRNA processing factor 3	PRPF3_HUMAN	1,070	3,40E-02	Nucleus
ribosomal RNA processing 9, U3 small nucleolar RNA binding protein	U3IP2_HUMAN	1,070	4,50E-03	Nucleus
BAG cochaperone 3	BAG3_HUMAN	1,070	3,90E-02	Cytoplasm
prefoldin subunit 4	PFD4_HUMAN	1,070	1,10E-02	Cytoplasm
armadillo repeat containing 8	ARMC8_HUMAN	1,070	3,50E-02	Nucleus
serine and arginine rich splicing factor 4	SRSF4_HUMAN	1,138	2,30E-03	Nucleus
four and a half LIM domains 3	FHL3_HUMAN	1,138	2,00E-02	Plasma Membrane
translocator protein	TSPO_HUMAN	1,138	1,60E-03	Cytoplasm
asparagine synthetase (glutamine-hydrolyzing)	ASNS_HUMAN	1,138	4,70E-02	Cytoplasm
TATA element modulatory factor 1	TMF1_HUMAN	1,138	2,70E-02	Cytoplasm
RAD50 double strand break repair protein	RAD50_HUMAN	1,138	1,30E-03	Nucleus

Entrez Gen Name	ID	Log ₂ FC	p	Lokalisation
glyceronephosphate O-acyltransferase	GNPAT_HUMAN	1,138	2,10E-02	Cytoplasm
clustered mitochondria homolog	CLU_HUMAN	1,138	2,50E-02	Cytoplasm
adenine phosphoribosyltransferase	APT_HUMAN	1,138	6,40E-03	Cytoplasm
dystrophin	DMD_HUMAN	1,202	3,90E-02	Plasma Membrane
notchless homolog 1	NLE1_HUMAN	1,202	3,90E-02	Nucleus
high mobility group AT-hook 1	HMGAI_HUMAN	1,202	1,90E-02	Nucleus
laminin subunit gamma 2	LAMC2_HUMAN	1,202	2,80E-02	Extracellular Space
destrin, actin depolymerizing factor	DEST_HUMAN	1,263	6,30E-03	Cytoplasm
vav guanine nucleotide exchange factor 2	VAV2_HUMAN	1,263	4,50E-02	Cytoplasm
nucleolar complex associated 4 homolog	NOC4L_HUMAN	1,263	4,50E-02	Nucleus
DDB1 and CUL4 associated factor 7	DCAF7_HUMAN	1,263	4,50E-02	Cytoplasm
SUB1 regulator of transcription	TCP4_HUMAN	1,263	5,90E-03	Nucleus
ribosomal protein S23	RS23_HUMAN	1,263	1,90E-02	Cytoplasm
ribosomal protein S14	RS14_HUMAN	1,263	4,10E-02	Cytoplasm
PDZK1 interacting protein 1	PDZ1I_HUMAN	1,322	1,30E-02	Extracellular Space
NSA2 ribosome biogenesis factor	NSA2_HUMAN	1,322	4,20E-02	Nucleus
ER membrane protein complex subunit 7	EMC7_HUMAN	1,322	2,10E-02	Cytoplasm
signal recognition particle 19	SRP19_HUMAN	1,322	2,20E-03	Cytoplasm
keratin 1	K2C1_HUMAN	1,322	5,90E-04	Cytoplasm
treacle ribosome biogenesis factor 1	TCOF_HUMAN	1,322	3,20E-02	Nucleus
zinc finger CCCH-type containing, antiviral 1	ZCCHV_HUMAN	1,379	1,00E-02	Plasma Membrane
myosin heavy chain 13	MYH13_HUMAN	1,379	4,20E-02	Cytoplasm
zinc finger C3HC-type containing 1	NIPA_HUMAN	1,379	3,00E-02	Nucleus
integrin linked kinase	ILK_HUMAN	1,433	2,50E-02	Plasma Membrane
paternally expressed 10	PEG10_HUMAN	1,433	2,50E-02	Nucleus
structural maintenance of chromosomes 2	O95347-DECOY	1,433	4,90E-02	Nucleus
ataxin 2	ATX2_HUMAN	1,433	3,80E-02	Nucleus
myosin heavy chain 7B	MYH7B_HUMAN	1,433	2,50E-02	Other
acid phosphatase 1	PPAC_HUMAN	1,485	9,60E-04	Cytoplasm
RHO family interacting cell polarization regulator 1	RIPR1_HUMAN	1,536	1,60E-02	Cytoplasm
rabaptin, RAB GTPase binding effector protein 2	RABE2_HUMAN	1,536	3,40E-02	Cytoplasm

Entrez Gen Name	ID	Log ₂ FC	p	Lokalisation
DEAD-box helicase 24	DDX24_HUMAN	1,585	2,00E-02	Nucleus
GTP binding protein 3, mitochondrial	Q969Y2-DECOY	1,585	2,00E-02	Cytoplasm
coiled-coil domain containing 9	CCDC9_HUMAN	1,585	2,00E-02	Extracellular Space
component of oligomeric golgi complex 7	COG7_HUMAN	1,585	2,00E-02	Cytoplasm
mitochondrial ribosomal protein L49	RM49_HUMAN	1,585	2,00E-02	Cytoplasm
chromosome 6 open reading frame 47	CF047_HUMAN	1,585	2,00E-02	Cytoplasm
gem nuclear organelle associated protein 6	GEMI6_HUMAN	1,585	2,00E-02	Nucleus
dynein light chain Tctex-type 1	DYLT1_HUMAN	1,585	2,00E-02	Cytoplasm
tRNA methyltransferase subunit 11-2	TR112_HUMAN	1,585	2,00E-02	Cytoplasm
pleckstrin homology and FYVE domain containing 2	PKHF2_HUMAN	1,585	2,00E-02	Cytoplasm
pleckstrin homology like domain family A member 3	PHLA3_HUMAN	1,585	2,00E-02	Plasma Membrane
La ribonucleoprotein 1, translational regulator	LARP1_HUMAN	1,632	1,00E-02	Cytoplasm
ribosomal protein L34	RL34_HUMAN	1,678	1,10E-03	Cytoplasm
ribosomal protein S19	RS19_HUMAN	1,722	1,20E-02	Cytoplasm
microsomal glutathione S-transferase 1	MGST1_HUMAN	1,722	1,50E-02	Cytoplasm
target of EGR1, exonuclease	TOE1_HUMAN	1,766	3,60E-03	Nucleus
ribosomal protein L31	RL31_HUMAN	1,766	1,00E-02	Cytoplasm
keratin 9	K1C9_HUMAN	1,807	4,40E-04	Cytoplasm
heme oxygenase 1	HMOX1_HUMAN	1,807	2,20E-02	Cytoplasm
golgin A4	GOGA4_HUMAN	1,888	2,00E-02	Cytoplasm
mitochondrial ribosomal protein S16	RT16_HUMAN	1,888	2,00E-02	Cytoplasm
synaptojanin 2 binding protein	SYJ2B_HUMAN	1,888	2,00E-02	Cytoplasm
hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 7	3BHS7_HUMAN	1,888	2,00E-02	Cytoplasm
ubiquinol-cytochrome c reductase hinge protein	QCR6_HUMAN	1,888	2,00E-02	Cytoplasm
reactive intermediate imine deaminase A homolog	RIDA_HUMAN	1,888	2,00E-02	Cytoplasm
LSM3 homolog, U6 small nuclear RNA and mRNA degradation associated	LSM3_HUMAN	1,888	2,60E-02	Nucleus
crystallin alpha B	CRYAB_HUMAN	1,888	1,30E-02	Nucleus
ring finger protein 20	BRE1A_HUMAN	1,888	4,70E-02	Nucleus
FKBP prolyl isomerase 15	FKB15_HUMAN	1,888	1,90E-02	Plasma Membrane

Entrez Gen Name	ID	Log ₂ FC	p	Lokalisation
prefoldin subunit 5	PFD5_HUMAN	1,926	1,90E-02	Nucleus
ATP synthase F1 subunit delta	ATPD_HUMAN	2,036	4,90E-02	Cytoplasm
lipocalin 2	NGAL_HUMAN	2,036	7,80E-03	Extracellular Space
ribosomal protein L36	RL36_HUMAN	2,104	3,90E-03	Cytoplasm
hexosaminidase subunit alpha	HEXA_HUMAN	2,170	1,50E-02	Cytoplasm
abhydrolase domain containing 2, acylglycerol lipase	ABHD2_HUMAN	2,170	1,50E-02	Cytoplasm
peroxidasin	PXDN_HUMAN	2,233	4,00E-02	Extracellular Space
SEC61 translocon subunit beta	SC61B_HUMAN	2,233	1,50E-02	Cytoplasm
Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor 2	ARHG2_HUMAN	2,263	2,20E-02	Cytoplasm
ATPase H ⁺ transporting V1 subunit G1	VATG1_HUMAN	2,379	3,40E-03	Cytoplasm
membrane magnesium transporter 1	MMGT1_HUMAN	2,379	3,40E-03	Cytoplasm
cystatin B	CYTB_HUMAN	2,585	1,30E-02	Cytoplasm
family with sequence similarity 136 member A	F136A_HUMAN	2,585	1,30E-02	Cytoplasm
trafficking protein particle complex 6B	TPC6B_HUMAN	2,585	1,30E-02	Cytoplasm
ubiquitin conjugating enzyme E2 N	UBE2N_HUMAN	2,609	2,00E-04	Cytoplasm
ribosomal protein L30	RL30_HUMAN	2,632	6,10E-04	Cytoplasm
ISG15 ubiquitin like modifier	ISG15_HUMAN	2,678	3,30E-03	Extracellular Space
PHD finger protein 5A	PHF5A_HUMAN	2,744	3,00E-04	Nucleus
golgin A7	GOGA7_HUMAN	2,744	3,00E-04	Cytoplasm
hornerin	HORN_HUMAN	2,848	1,30E-02	Cytoplasm
5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase	METH_HUMAN	2,868	1,50E-02	Cytoplasm
vesicle associated membrane protein 8	VAMP8_HUMAN	2,868	1,50E-02	Plasma Membrane
fatty acid binding protein 5	FABP5_HUMAN	2,907	1,20E-02	Cytoplasm
profilin 2	PROF2_HUMAN	2,907	1,20E-02	Cytoplasm
FKBP prolyl isomerase 2	FKBP2_HUMAN	3,053	4,20E-02	Cytoplasm
splicing factor 3b subunit 6	SF3B6_HUMAN	3,170	1,20E-02	Nucleus
S100 calcium binding protein A11	S10AB_HUMAN	3,170	1,20E-02	Cytoplasm
SH3 domain binding glutamate rich protein like	SH3L1_HUMAN	3,170	1,20E-02	Cytoplasm
elongin C	ELOC_HUMAN	3,248	2,30E-02	Nucleus
cytochrome c, somatic	CYC_HUMAN	3,263	4,80E-04	Cytoplasm
proliferation and apoptosis adaptor protein 15	PEA15_HUMAN	3,263	4,80E-04	Cytoplasm

Entrez Gen Name	ID	Log ₂ FC	p	Lokalisation
dual specificity phosphatase 23	DUS23_HUMAN	3,293	3,50E-02	Cytoplasm
small nuclear ribonucleoprotein D1 polypeptide	SMD1_HUMAN	3,322	2,70E-03	Nucleus
programmed cell death 5	PDCD5_HUMAN	3,700	1,90E-02	Nucleus
tubulin folding cofactor A	TBCA_HUMAN	3,700	3,60E-03	Cytoplasm
myosin light chain 6B	MYL6B_HUMAN	3,807	4,60E-02	Cytoplasm
ribosomal protein S15a	RS15A_HUMAN	3,807	3,20E-02	Cytoplasm
small nuclear ribonucleoprotein D3 polypeptide	SMD3_HUMAN	3,807	4,50E-03	Nucleus
SRA stem-loop interacting RNA binding protein	SLIRP_HUMAN	3,807	4,50E-03	Cytoplasm
small nuclear ribonucleoprotein 13	NH2L1_HUMAN	3,907	1,10E-02	Nucleus
myeloid derived growth factor	MYDGF_HUMAN	4,087	3,20E-03	Extracellular Space
laminin subunit beta 3	LAMB3_HUMAN	4,170	6,30E-04	Extracellular Space
ribosomal protein L35a	RL35A_HUMAN	4,248	3,80E-03	Cytoplasm
galectin 1	LEG1_HUMAN	4,322	8,90E-03	Extracellular Space
ribosomal protein S12	RS12_HUMAN	4,524	4,50E-03	Cytoplasm
mago homolog B, exon junction complex subunit	MGN2_HUMAN	4,700	5,00E-03	Nucleus
ribosomal protein L23	RL23_HUMAN	4,954	1,50E-02	Cytoplasm
small nuclear ribonucleoprotein D2 polypeptide	SMD2_HUMAN	5,322	2,30E-04	Nucleus
myosin light chain 6	MYL6_HUMAN	5,322	3,70E-03	Cytoplasm
profilin 1	PROF1_HUMAN	5,833	1,00E-03	Cytoplasm

Tabelle A3: Regulierte Signalwege nach CsA Behandlung

Ingenuity Canonical Pathways	-log(p-value)	Molecules
NER Pathway	4,15E00	COPS6,LIG1,MNAT1,POLD2, PRIM2,UBE2N,USP7
Tight Junction Signaling	2,86E00	ARHGEF2,CSTF1,JAM3,MPDZ ,MYL6,MYL6B,STX16
RAR Activation	2,51E00	ARID2,MNAT1,NCOR1,PRKC D,RDH12,SORBS3,TNIP1
Phospholipase C Signaling	2,4E00	ARHGEF2,ARHGEF5,HDAC3, HDAC6,HMOX1,MYL6
HIF1 α Signaling	2,38E00	ARAF,HMOX1,KDM1A,MET, PIK3R4,PRKCD,STAT3

Ingenuity Canonical Pathways	-log(p-value)	Molecules
GP6 Signaling Pathway	2,19E00	ADAM10,COL4A5,LAMA5,PIK3R4,PRKCD
Macropinocytosis Signaling	2,18E00	ANKFY1,MET,PIK3R4,PRKCD
EIF2 Signaling	2,17E00	PIK3R4,RPL14,RPL23,RPL30,RPL35A,RPL36,RPS19
Assembly of RNA Polymerase III Complex	2,16E00	GTF3C1,GTF3C2
Reelin Signaling in Neurons	2,05E00	APP,ARHGEF2,ARHGEF5,PIK3R4,VLDLR
Huntington's Disease Signaling	2,04E00	CASP7,HDAC3,HDAC6,NCOR1,PIK3R4,PRKCD,STX16
Signaling by Rho Family GTPases	1,97E00	ARHGEF2,ARHGEF5,CDH6,CIT,MYL6,MYL6B,PIK3R4
Endothelin-1 Signaling	1,97E00	ARAF,CASP7,ECE1,HMOX1,PIK3R4,PRKCD
Spliceosomal Cycle	1,94E00	DDX23,MAGOHB,PPIE
Histamine Degradation	1,93E00	ALDH1B1,ALDH4A1
Hereditary Breast Cancer Signaling	1,91E00	ARID2,CCNB1,HDAC3,HDAC6,PIK3R4
Oxidative Ethanol Degradation III	1,83E00	ALDH1B1,ALDH4A1
Fatty Acid α -oxidation	1,79E00	ALDH1B1,ALDH4A1
Apelin Cardiomyocyte Signaling Pathway	1,79E00	MYL6,MYL6B,PIK3R4,PRKCD
Putrescine Degradation III	1,75E00	ALDH1B1,ALDH4A1
UDP-D-xylose and UDP-D-glucuronate Biosynthesis	1,71E00	UXS1
L-cysteine Degradation III	1,71E00	MPST
4-hydroxyproline Degradation I	1,71E00	ALDH4A1
Ethanol Degradation IV	1,67E00	ALDH1B1,ALDH4A1
HGF Signaling	1,62E00	MET,PIK3R4,PRKCD,STAT3
Thrombopoietin Signaling	1,62E00	PIK3R4,PRKCD,STAT3
Tryptophan Degradation X (Mammalian, via Tryptamine)	1,61E00	ALDH1B1,ALDH4A1

Ingenuity Canonical Pathways	-log(p-value)	Molecules
Sirtuin Signaling Pathway	1,6E00	ADAM10,APP,CPS1,GTF3C2,N DUFV1,STAT3,TIMM17A
Proline Degradation	1,54E00	ALDH4A1
Thiosulfate Disproportionation III (Rhodanese)	1,54E00	MPST
RhoGDI Signaling	1,49E00	ARHGEF2,ARHGEF5,CDH6, MYL6,MYL6B
Growth Hormone Signaling	1,49E00	PIK3R4,PRKCD,STAT3
Superpathway of Cholesterol Biosynthesis	1,49E00	HMGCR,HSD17B7
Dopamine Degradation	1,46E00	ALDH1B1,ALDH4A1
Synaptogenesis Signaling Pathway	1,46E00	CDH6,PIK3R4,PRKCD,STX16, SYT13,THBS3,VLDLR
Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation	1,44E00	COL4A5,ECE1,MET,MYL6,MY L6B
Heme Degradation	1,41E00	HMOX1
Arginine Degradation I (Arginase Pathway)	1,41E00	ALDH4A1
Ethanol Degradation II	1,41E00	ALDH1B1,ALDH4A1
Gα12/13 Signaling	1,41E00	CDH6,MYL6,MYL6B,PIK3R4
IL-9 Signaling	1,38E00	PIK3R4,STAT3
IL-7 Signaling Pathway	1,38E00	BAK1,MET,PIK3R4
IL-3 Signaling	1,37E00	PIK3R4,PRKCD,STAT3
Adipogenesis pathway	1,36E00	HDAC3,HDAC6,KDM1A,MNA T1
Estrogen Receptor Signaling	1,36E00	HDAC3,MCU,MYL6,MYL6B,N COR1,PIK3R4,PRKCD
Role of BRCA1 in DNA Damage Response	1,36E00	ARID2,BRCC3,MDC1
Leukocyte Extravasation Signaling	1,35E00	CYBA,JAM3,MYL6,PIK3R4,PR KCD
Prolactin Signaling	1,34E00	PIK3R4,PRKCD,STAT3
Cyclins and Cell Cycle Regulation	1,34E00	CCNB1,HDAC3,HDAC6
Noradrenaline and Adrenaline Degradation	1,34E00	ALDH1B1,ALDH4A1
Interferon Signaling	1,31E00	BAK1,IFI35

Ingenuity Canonical Pathways	-log(p-value)	Molecules
TR/RXR Activation	1,3E00	HDAC3,NCOR1,PIK3R4
FGF Signaling	1,3E00	MET,PIK3R4,STAT3

Tabelle A4: Regulierte Signalwege nach TAC Behandlung

Ingenuity Canonical Pathways	-log(p-value)	Molecules
Mitochondrial Dysfunction	8,44E00	ACO1,APP,ATP5F1D,ATP5MF,ATPAF1,COX15,CYC1,CYCS,DHODH,NCSTN,NDUFB10,NDUFB6,NDUFS1,NDUFS2,NDUFS3,NDUFS4,NDUFS7,NDUFS8,NDUFV1,NDUFV2,SNCA,UQCRC2,UQCRH
Oxidative Phosphorylation	8,16E00	ATP5F1D,ATP5MF,ATPAF1,COX15,CYC1,CYCS,NDUFB10,NDUFB6,NDUFS1,NDUFS2,NDUFS3,NDUFS4,NDUFS7,NDUFS8,NDUFV1,NDUFV2,UQCRC2,UQCRH
Clathrin-mediated Endocytosis Signaling	6,79E00	ALB,AP2A1,AP2A2,AP2M1,APOB,APOE,CHP1,CLTB,CSNK2A2,DNM1,GAK,GRB2,HGS,ITGB3,LDLR,MET,PICALM,PIK3R4,SH3KBP1,SNAP91,SNX9,STAM
Cholesterol Biosynthesis I	5,9E00	DHCR7,EBP,FDFT1,HSD17B7,LBR,SQLE
Cholesterol Biosynthesis II (via 24,25-dihydrolanosterol)	5,9E00	DHCR7,EBP,FDFT1,HSD17B7,LBR,SQLE
Cholesterol Biosynthesis III (via Desmosterol)	5,9E00	DHCR7,EBP,FDFT1,HSD17B7,LBR,SQLE
Superpathway of Cholesterol Biosynthesis	5,7E00	ACAT2,DHCR7,EBP,FDFT1,HMGCR,HSD17B7,LBR,SQLE

Ingenuity Canonical Pathways	-log(p-value)	Molecules
Sirtuin Signaling Pathway	4,36E00	ADAM10,AGTRAP,APP,ATG3,ATP5F1D,CYC1,GTF3C2,NDUFB10,NDUFB6,NDUFS1,NDUFS2,NDUFS3,NDUFS4,NDUFS7,NDUFS8,NDUFV1,NDUFV2,PKD1,RRP9,SLC2A1,TOMM40,TSPO,UQCRC2
Huntington's Disease Signaling	4,26E00	AP2A2,ATP5F1D,CASP7,CLTB,CYCS,DNM1,GPAA1,GRB2,HDAC3,HTT,ITPR1,NCOR1,NCOR2,PIK3R4,PLCB4,POLR2B,POLR2H,PSME2,SNCA,STX16
EGF Signaling	3,56E00	CSNK2A2,GRB2,ITPR1,ITPR2,ITPR3,JAK1,PIK3R4,PLCG1
Proline Biosynthesis II (from Arginine)	3,55E00	OAT,PYCR1,PYCR2
NER Pathway	3,45E00	CDK7,COPS6,COPS8,LIG1,MNAT1,POLD2,POLR2B,POLR2H,PRIM2,UBE2N,XRCC1
Arginine Degradation VI (Arginase 2 Pathway)	3,25E00	OAT,PYCR1,PYCR2
Synaptogenesis Signaling Pathway	3,09E00	AFDN,AP2A1,AP2A2,AP2M1,APOE,CDH2,CDH6,CRK,CTNNB1,CTNND1,GPAA1,GRB2,ITPR1,PIK3R4,PLCG1,PRKAG1,SGTA,SNCA,STX16,SYT13,VLDLR
Epoxycholesterol Biosynthesis	3,02E00	FDFT1,SQLE
GP6 Signaling Pathway	2,92E00	ADAM10,COL18A1,COL4A1,COL4A5,ITGB3,ITPR1,LAMA5,LAMB3,LAMC2,PIK3R4,PTK2
Insulin Secretion Signaling Pathway	2,79E00	EIF4G2,GPAA1,ITPR1,ITPR2,ITPR3,JAK1,PAIP1,PDHB,PIK3R4,PLCB4,PLCG1,PRKAG1,SEC61B,SLC2A1,SRP19,STAT6,STX16
EIF2 Signaling	2,75E00	EIF3M,EIF4G2,GRB2,PAIP1,PIK3R4,RPL23,RPL30,RPL31,RPL34,RPL35A,RPL36,RPS12,RPS14,RPS15A,RPS19,RPS23

Ingenuity Canonical Pathways	-log(p-value)	Molecules
Tight Junction Signaling	2,63E00	AFDN,ARHGEF2,CTNNB1, F11R,GPAA1,MPDZ,MYH13, MYH7B,MYL6,MYL6B, PRKAG1,PTPA,STX16
Epithelial Adherens Junction Signaling	2,55E00	AFDN,CDH2,CRK,CTNNB1, CTNND1,JUP,MET,MYH13, MYH7B,MYL6,MYL6B,VAV2
Leukocyte Extravasation Signaling	2,45E00	AFDN,ARHGAP4,CRK, CTNNB1,CTNND1,EDIL3, F11R,ITGB3,MMP14,MYL6, PIK3R4,PLCG1,PTK2,VAV2
Proline Biosynthesis I	2,26E00	PYCR1,PYCR2
CTLA4 Signaling in Cytotoxic T Lymphocytes	2,19E00	AP2A1,AP2A2,AP2M1,CLTB, GRB2,PIK3R4,PLCG1,PTPA
Assembly of RNA Polymerase III Complex	2,17E00	GTF3C2,GTF3C3,GTF3C4
Reelin Signaling in Neurons	2,15E00	AFDN,APOE,APP,ARHGEF2, CDH2,CRK,ITGB3,PDK1, PIK3R4,VLDLR
Cellular Effects of Sildenafil (Viagra)	2,11E00	ITPR1,ITPR2,ITPR3,MYH13, MYH7B,MYL6,MYL6B,PLCB4, PLCG1,PRKAG1
Lipid Antigen Presentation by CD1	2,1E00	AP2A1,AP2A2,AP2M1,PSAP
DNA Double-Strand Break Repair by Homologous Recombination	2,08E00	ATRX,LIG1,RAD50
GDNF Family Ligand-Receptor Interactions	2,03E00	GFRA1,GRB2,ITPR1,ITPR2, ITPR3,PIK3R4,PLCG1
Regulation of eIF4 and p70S6K Signaling	2E00	EIF3M,EIF4G2,GRB2,PAIP1, PIK3R4,PTPA,RPS12,RPS14, RPS15A,RPS19,RPS23
IL-7 Signaling Pathway	1,97E00	BAK1,GRB2,JAK1,MET, PIK3R4,PTK2,SLC2A1
Granzyme B Signaling	1,91E00	CYCS,ENDOGL,NUMA1
LXR/RXR Activation	1,88E00	ALB,APOB,APOE,C3,FDFT1, HMGCR,LDLR,NCOR1, NCOR2
Zymosterol Biosynthesis	1,88E00	HSD17B7,LBR
TR/RXR Activation	1,81E00	HDAC3,LDLR,NCOR1, NCOR2,PIK3R4,SLC16A3, SLC2A1

Ingenuity Canonical Pathways	-log(p-value)	Molecules
FGF Signaling	1,81E00	CRK,GRB2,ITPR1, MAPKAPK2,MET,PIK3R4, PLCG1
Stearate Biosynthesis I (Animals)	1,79E00	BDH2,GNPAT,MBOAT7, PPT1,TECR
PDGF Signaling	1,76E00	ACP1,CRK,CSNK2A2, GRB2,JAK1,PIK3R4,PLCG1
Virus Entry via Endocytic Pathways	1,74E00	AP2A1,AP2A2,AP2M1,CLTB, DNM1,ITGB3,PIK3R4,PLCG1
Coronavirus Pathogenesis Pathway	1,72E00	JAK1,MAVS,PYCARD,RIPK1, RPS12,RPS14,RPS15A,RPS19, RPS23,TBK1
Actin Cytoskeleton Signaling	1,72E00	CRK,FN1,GRB2,MYH13, MYH7B,MYL6,MYL6B,PFN1, PFN2,PIK3R4,PTK2,TRIO, VAV2
Assembly of RNA Polymerase II Complex	1,72E00	CDK7,GTF2F1,MNAT1, POLR2B,POLR2H
Nucleotide Excision Repair Pathway	1,65E00	CDK7,MNAT1,POLR2B, POLR2H
CDP-diacylglycerol Biosynthesis I	1,64E00	AGPAT4,LCLAT1,MBOAT7
Interferon Signaling	1,61E00	BAK1,IFI35,ISG15,JAK1
Non-Small Cell Lung Cancer Signaling	1,59E00	GRB2,ITPR1,ITPR2,ITPR3, PIK3R4,PLCG1
GPCR-Mediated Integration of Enteroendocrine Signaling Exemplified by an L Cell	1,59E00	ITPR1,ITPR2,ITPR3,PLCB4, PLCG1,PRKAG1
Calcium Signaling	1,56E00	ATP2C1,CHP1,HDAC3,ITPR1, ITPR2,ITPR3,MCU,MYH13, MYH7B,MYL6,MYL6B, PRKAG1
Estrogen Receptor Signaling	1,55E00	ATP5F1D,CYC1,GRB2, HDAC3,JAK1,MCU,MMP14, MYL6,MYL6B,NCOR1, NCOR2,PIK3R4,PLCB4, PLCG1,POLR2B,PRKAG1
Cell Cycle Control of Chromosomal Replication	1,53E00	CDK7,LIG1,ORC3,ORC4, PRIM2
Phosphatidylglycerol Biosynthesis II (Non-plastidic)	1,53E00	AGPAT4,LCLAT1,MBOAT7
Folate Transformations I	1,52E00	MTHFS,MTR

Ingenuity Canonical Pathways	-log(p-value)	Molecules
Renin-Angiotensin Signaling	1,51E00	GRB2,ITPR1,ITPR2,ITPR3,PIK3R4,PLCG1,PRKAG1,PTK2
Asparagine Biosynthesis I	1,51E00	ASNS
Alanine Biosynthesis III	1,51E00	NFS1
tRNA Charging	1,49E00	AARS2,RARS2,TARS2,YARS2
Inhibition of Matrix Metalloproteases	1,49E00	ADAM10,HSPG2,MMP14,SDC2
Superpathway of D-myo-inositol (1,4,5)-trisphosphate Metabolism	1,48E00	BPNT1,BPNT2,MINPP1
ILK Signaling	1,45E00	CTNNB1,FN1,ILK,ITGB3,MYH13,MYH7B,MYL6,MYL6B,PIK3R4,PTK2,PTPA
Ketolysis	1,44E00	ACAT2,BDH2
Tumoricidal Function of Hepatic Natural Killer Cells	1,43E00	CASP7,CYCS,ENDO G
Neuropathic Pain Signaling In Dorsal Horn Neurons	1,42E00	ITPR1,ITPR2,ITPR3,PIK3R4,PLCB4,PLCG1,PRKAG1
Renal Cell Carcinoma Signaling	1,42E00	CRK,ELOC,GRB2,MET,PIK3R4,SLC2A1
Endometrial Cancer Signaling	1,42E00	CTNNB1,GRB2,ILK,MLH1,PIK3R4
Ketogenesis	1,36E00	ACAT2,BDH2
Purine Nucleotides De Novo Biosynthesis II	1,36E00	ADSS2,PPAT
Synaptic Long Term Potentiation	1,32E00	CHP1,ITPR1,ITPR2,ITPR3,PLCB4,PLCG1,PPP1R10,PRKAG1
Axonal Guidance Signaling	1,31E00	ADAM10,AFG3L2,BRCC3,CHP1,CRK,FZD6,GRB2,MET,MMP14,MYL6,MYL6B,PFN1,PFN2,PIK3R4,PITRM1,PLCB4,PLCG1,PRKAG1,PTK2,SDC2,SEMA3C,SRGAP1
Gα12/13 Signaling	1,3E00	CDH2,CDH6,CTNNB1,MYL6,MYL6B,PIK3R4,PTK2,VAV2

7 Literaturverzeichnis

- Anathy V, Roberson E, Cunniff B, Nolin JD, Hoffman S, Spiess P, Guala AS, Lahue KG, Goldman D, Flemer S et al. (2012): Oxidative Processing of Latent Fas in the Endoplasmic Reticulum Controls the Strength of Apoptosis. *Mol Cell Biol* 32, 3464–3478
- Antoniou AN, Ford S, Alphey M, Osborne A, Elliott T, Powis SJ (2002): The oxidoreductase ERp57 efficiently reduces partially folded in preference to fully folded MHC class I molecules. *EMBO J* 21, 2655–2663
- Azimifar SB, Nagaraj N, Cox J, Mann M (2014): Cell-Type-Resolved Quantitative Proteomics of Murine Liver. *Cell Metab* 20, 1076–1087
- Barbarino JM, Staats CE, Venkataramanan R, Klein TE, Altman RB (2013): PharmGKB summary: cyclosporine and tacrolimus pathways. *Pharmacogenet Genomics* 23, 563–585
- Barros EJG, Boim MA, Ajzen H, Ramos OL, Schor N (1987): Glomerular hemodynamics and hormonal participation on cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 32, 19–25
- Bell G (2016): Quantifying western blots: none more black. *BMC Biol* 14
- Bennett J, Cassidy H, Slattery C, Ryan MP, McMorrow T (2016): Tacrolimus Modulates TGF- β Signaling to Induce Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Renal Proximal Tubule Epithelial Cells. *J Clin Med* 5
- Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D (2000): Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 2, 326–332
- Bohle A, Christ H, Grund KE, Mackensen S (1979): The role of the interstitium of the renal cortex in renal disease. *Contrib Nephrol* 16, 109–114
- Bollo M, Paredes RM, Holstein D, Zheleznova N, Camacho P, Lechleiter JD (2010): Calcineurin Interacts with PERK and Dephosphorylates Calnexin to Relieve ER Stress in Mammals and Frogs. *PLOS ONE* 5, e11925
- Border WA, Noble NA (1994): Transforming Growth Factor β in Tissue Fibrosis. *N Engl J Med* 331, 1286–1292
- Borel JF (1976): Comparative study of in vitro and in vivo drug effects on cell-mediated cytotoxicity. *Immunology* 31, 631–641
- Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248–254
- Braud VM, Allan DSJ, O’Callaghan CA, Söderström K, D’Andrea A, Ogg GS, Lazetic S, Young NT, Bell JI, Phillips JH et al. (1998): HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 391, 795–799
- Brewer JW, Diehl JA (2000): PERK mediates cell-cycle exit during the mammalian unfolded protein response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12625–12630
- Calne RY (1960): The rejection of renal homografts. *Lancet* 275, 417–418

- Calne RY, Thiru S, McMaster P, Craddock GN, White DJG, Evans DB, Dunn DC, Pentlow BD, Rolles K (1978): Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet* 312, 1323–1327
- Cantin GT, Yi W, Lu B, Park SK, Xu T, Lee J-D, Yates JR (2008): Combining Protein-Based IMAC, Peptide-Based IMAC, and MudPIT for Efficient Phosphoproteomic Analysis. *J Proteome Res* 7, 1346–1351
- Carney EF (2021): Tracing the origins and differentiation of human kidney myofibroblasts. *Nat Rev Nephrol* 17, 151–151
- Choi H, Nesvizhskii AI (2008): False Discovery Rates and Related Statistical Concepts in Mass Spectrometry-Based Proteomics. *J Proteome Res* 7, 47–50
- Clapham DE (2007): Calcium Signaling. *Cell* 131, 1047–1058
- Cnop M, Foufelle F, Velloso LA (2012): Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends Mol Med* 18, 59–68
- Coe H, Jung J, Groenendyk J, Prins D, Michalak M (2010): ERp57 Modulates STAT3 Signaling from the Lumen of the Endoplasmic Reticulum. *J Biol Chem* 285, 6725–6738
- De Godoy LMF, Olsen JV, Cox J, Nielsen ML, Hubner NC, Fröhlich F, Walther TC, Mann M (2008): Comprehensive mass-spectrometry-based proteome quantification of haploid versus diploid yeast. *Nature* 455, 1251–1254
- De la Cadena SG, Hernández-Fonseca K, Camacho-Arroyo I, Massieu L (2014): Glucose deprivation induces reticulum stress by the PERK pathway and caspase-7- and calpain-mediated caspase-12 activation. *Apoptosis* 19, 414–427
- De Nicola L, Thomson SC, Wead LM, Brown MR, Gabbai FB (1993): Arginine feeding modifies cyclosporine nephrotoxicity in rats. *J Clin Invest* 92, 1859–1865
- Dephoure N, Zhou C, Villén J, Beausoleil SA, Bakalarski CE, Elledge SJ, Gygi SP (2008): A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 10762–10767
- Deutsche Stiftung Organtransplantation DSO Jahresbericht.
<https://dso.de/organspende/statistiken-berichte/jahresbericht>; Zugriff am 13.03.2020
- 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
- Elion GB (1993): The George Hitchings and Gertrude Elion Lecture. The pharmacology of azathioprine. *Ann N Y Acad Sci* 685, 400–407
- English J, Evan A, Houghton DC, Bennett WM (1987): Cyclosporine-induced acute renal dysfunction in the rat. Evidence of arteriolar vasoconstriction with preservation of tubular function. *Transplantation* 44, 135–141

- Essex DW (2008): Redox Control of Platelet Function. *Antioxid Redox Signal* 11, 1191–1225
- Essex DW, Li M (1999): Protein disulphide isomerase mediates platelet aggregation and secretion. *Br J Haematol* 104, 448–454
- Fagone P, Jackowski S (2009): Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function. *J Lipid Res* 50, S311–S316
- Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M (1987): Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci* 84, 7413–7417
- Fischer G, Bang H, Mech C (1984): Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides. *Biomed Biochim Acta* 43, 1101–1111
- Flanagan WM, Corthésy B, Bram RJ, Crabtree GR (1991): Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A. *Nature* 352, 803
- Flechner SM, Kurian SM, Solez K, Cook DJ, Burke JT, Rollin H, Hammond JA, Whisenant T, Lanigan CM, Head SR, Salomon DR (2004): De Novo Kidney Transplantation Without Use of Calcineurin Inhibitors Preserves Renal Structure and Function at Two Years. *Am J Transplant* 4, 1776–1785
- Gething M-J (1999): Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin Cell Dev Biol* 10, 465–472
- Gething M-J, McCammon K, Sambrook J (1986): Expression of wild-type and mutant forms of influenza hemagglutinin: The role of folding in intracellular transport. *Cell* 46, 939–950
- Givol D, Goldberger RF, Anfinsen CB (1964): Oxidation and Disulfide Interchange in the Reactivation of Reduced Ribonuclease. *J Biol Chem* 239, PC3114–PC3116
- Goodwin WE, Kaufman JJ, Mims MM, Turner RD, Glasscock R, Goldman R, Maxwell MM (1963): Human renal transplantation. I. Clinical experiences with six cases of renal homotransplantation. *J Urol* 89, 13–24
- Handschumacher RE, Harding MW, Rice J, Drugge RJ, Speicher DW (1984): Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* 226, 544–547
- Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D (2000a): Perk Is Essential for Translational Regulation and Cell Survival during the Unfolded Protein Response. *Mol Cell* 5, 897–904
- Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D (2000b): Regulated Translation Initiation Controls Stress-Induced Gene Expression in Mammalian Cells. *Mol Cell* 6, 1099–1108
- Harding MW, Galat A, Uehling DE, Schreiber SL (1989): A receptor for the immuno-suppressant FK506 is a cis–trans peptidyl-prolyl isomerase. *Nature* 341, 758
- Hart A, Smith JM, Skeans MA, Gustafson SK, Wilk AR, Castro S, Robinson A, Wainright JL, Snyder JJ, Kasiske BL, Israni AK (2019): OPTN/SRTR 2017 Annual Data Report: Kidney. *Am J Transplant* 19, 19–123

- Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K (1999): Mammalian Transcription Factor ATF6 Is Synthesized as a Transmembrane Protein and Activated by Proteolysis in Response to Endoplasmic Reticulum Stress. *Mol Biol Cell* 10, 3787–3799
- Herold KC, Lancki DW, Moldwin RL, Fitch FW (1986): Immunosuppressive effects of cyclosporin A on cloned T cells. *J Immunol* 136, 1315–1321
- Hettinghouse A, Liu R, Liu C (2018): Multifunctional Molecule ERp57: From Cancer To Neurodegenerative Diseases. *Pharmacol Ther* 181, 34–48
- Hoffman SM, Tully JE, Nolin JD, Lahue KG, Goldman DH, Daphtary N, Aliyeva M, Irvin CG, Dixon AE, Poynter ME, Anathy V (2013): Endoplasmic reticulum stress mediates house dust mite-induced airway epithelial apoptosis and fibrosis. *Respir Res* 14, 141
- Hoffstrom BG, Kaplan A, Letso R, Schmid R, Turmel GJ, Lo DC, Stockwell BR (2010): Inhibitors of protein disulfide isomerase suppress apoptosis induced by misfolded proteins. *Nat Chem Biol* 6, 900–906
- Isakov N, Biesinger B (2000): Lck protein tyrosine kinase is a key regulator of T-cell activation and a target for signal intervention by Herpesvirus saimiri and other viral gene products. *Eur J Biochem* 267, 3413–3421
- Iwasaki K, Miyazaki Y, Teramura Y, Kawamura A, Tozuka Z, Hata T, Undre N (1996): Binding of tacrolimus (FK506) with human plasma proteins re-evaluation and effect of mycophenolic acid. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 24, 251–257
- Jeffrey KL, Camps M, Rommel C, Mackay CR (2007): Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses. *Nat Rev Drug Discov* 6, 391–403
- Jennings P, Koppelstaetter C, Aydin S, Abberger T, Wolf AM, Mayer G, Pfaller W (2007): Cyclosporine A induces senescence in renal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 293, F831–838
- Jordan R, Wang L, Graczyk TM, Block TM, Romano PR (2002): Replication of a Cytopathic Strain of Bovine Viral Diarrhea Virus Activates PERK and Induces Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Apoptosis of MDBK Cells. *J Virol* 76, 9588–9599
- Kahan BD (1989): Cyclosporine. *N Engl J Med* 321, 1725–1738
- Kaira K, Toyoda M, Shimizu A, Mori K, Shino M, Sakakura K, Takayasu Y, Takahashi K, Oyama T, Asao T, Chikamatsu K (2016): Expression of ER stress markers (GRP78/BiP and PERK) in patients with tongue cancer. *Neoplasma* 63, 588–594
- Kasiske BL, Zeier MG, Craig JC, Ekberg H, Garvey CA, Green MD, Jha V, Josephson MA, Kiberd BA, Kreis HA et al. (2009): KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg* 9 Suppl 3, S1–155
- Kaur G, Dufour JM (2012): Cell lines. *Spermatogenesis* 2, 1–5
- Kerbel RS, Blakeslee D (1976): Rapid adsorption of a foetal calf serum component by mammalian cells in culture. A potential source of artifacts in studies of antisera to cell-specific antigens. *Immunology* 31, 881–891

- Kern G, Mair SM, Noppert S-J, Jennings P, Schramek H, Rudnicki M, Mueller GA, Mayer G, Koppelstaetter C (2014): Tacrolimus Increases Nox4 Expression in Human Renal Fibroblasts and Induces Fibrosis-Related Genes by Aberrant TGF-Beta Receptor Signalling. *PLOS ONE* 9, e96377
- Kino T, Hatanaka H, Miyata S, Inamura N, Nishiyama M, Yajima T, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H (1987): FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. *J Antibiot* 40, 1256–1265
- Kita T, Uchida K, Kato K, Suzuki Y, Tominaga M, Yamazaki J (2019): FK506 (tacrolimus) causes pain sensation through the activation of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) channels. *J Physiol Sci* 69, 305–316
- Klee CB, Krinks MH (1978): Purification of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase inhibitory protein by affinity chromatography on activator protein coupled to Sepharose. *Biochemistry* 17, 120–126
- Klee CB, Crouch TH, Krinks MH (1979): Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci* 76, 6270–6273
- Klee CB, Draetta GF, Hubbard MJ: Calcineurin. In: *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Ltd 2006, 149–200
- Klintmalm G, Sundelin B, Bohman S-O, Wilczek H (1984): Interstitial fibrosis in renal allografts after 12 to 46 months of Cyclosporin treatment: Beneficial effect of low doses in early post-transplantation period. *Lancet* 324, 950–954
- Klintmalm GBG, Iwatsuki S, Starzl TE (1981): Nephrotoxicity of Cyclosporin A in Liver and Kidney Transplant Patients. *Lancet* 1, 470–471
- Kobashigawa JA, Patel J, Furukawa H, Moriguchi JD, Yeatman L, Takemoto S, Marquez A, Shaw J, Oeser BT, Subherwal S et al. (2006): Five-Year Results of a Randomized, Single-Center Study of Tacrolimus vs Microemulsion Cyclosporine in Heart Transplant Patients. *J Heart Lung Transplant* 25, 434–439
- Kopp JB, Klotman PE (1990): Cellular and molecular mechanisms of cyclosporin nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol* 1, 162–179
- Kozutsumi Y, Segal M, Normington K, Gething MJ, Sambrook J (1988): The presence of malformed proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature* 332, 462–464
- Krönke M, Leonard WJ, Depper JM, Arya SK, Wong-Staal F, Gallo RC, Waldmann TA, Greene WC (1984): Cyclosporin A inhibits T-cell growth factor gene expression at the level of mRNA transcription. *Proc Natl Acad Sci* 81, 5214–5218
- Laemmli UK (1970): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680
- Lamoureux F, Mestre E, Essig M, Sauvage FL, Marquet P, Gastinel LN (2011): Quantitative proteomic analysis of cyclosporine-induced toxicity in a human kidney cell line and comparison with tacrolimus. *J Proteomics* 75, 677–694

- Lanese DM, Conger JD (1993): Effects of endothelin receptor antagonist on cyclosporine-induced vasoconstriction in isolated rat renal arterioles. *J Clin Invest* 91, 2144–2149
- Laskow DA, Vincenti F, Neylan JF, Mendez R, Matas AJ (1996): An open-label, concentration-ranging trial of FK506 in primary kidney transplantation: a report of the United States Multicenter FK506 Kidney Transplant Group. *Transplantation* 62, 900–905
- Lee AS (2005): The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods* 35, 373–381
- Li ZL, Zhou SF (2016): A SILAC-Based Approach Elicits the Proteomic Responses to Vancomycin-Associated Nephrotoxicity in Human Proximal Tubule Epithelial HK-2 Cells. *Molecules* 21, 148
- Lin JH, Li H, Yasumura D, Cohen HR, Zhang C, Panning B, Shokat KM, LaVail MM, Walter P (2007): IRE1 Signaling Affects Cell Fate During the Unfolded Protein Response. *Science* 318, 944–949
- Linden PK (2009): History of solid organ transplantation and organ donation. *Crit Care Clin* 25, 165–184, ix
- Liu H, Bowes RC, Water B van de, Sillence C, Nagelkerke JF, Stevens JL (1997): Endoplasmic Reticulum Chaperones GRP78 and Calreticulin Prevent Oxidative Stress, Ca²⁺ Disturbances, and Cell Death in Renal Epithelial Cells. *J Biol Chem* 272, 21751–21759
- Liu J, Farmer JD, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL (1991): Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66, 807–815
- Lovisa S, Fletcher-Sananikone E, Sugimoto H, Hensel J, Lahiri S, Hertig A, Taduri G, Lawson E, Dewar R, Revuelta I et al. (2020): Endothelial-to-mesenchymal transition compromises vascular integrity to induce Myc-mediated metabolic reprogramming in kidney fibrosis. *Sci Signal* 13, eaaz2597
- lukemiller.org» Blog Archive » Analyzing gels and western blots with ImageJ.
<https://lukemiller.org/index.php/2010/11/analyzing-gels-and-western-blots-with-image-j/>;
Zugriff am 02.05.2019
- Luo K, Sefton BM (1992): Activated lck tyrosine protein kinase stimulates antigen-independent interleukin-2 production in T cells. *Mol Cell Biol* 12, 4724–4732
- Mackensen-Haen S, Bader R, Grund KE, Bohle A (1981): Correlations between renal cortical interstitial fibrosis, atrophy of the proximal tubules and impairment of the glomerular filtration rate. *Clin Nephrol* 15, 167–171
- Marchioro TL, Axtell HK, LaVia MF, Waddell WR, Starzl TE (1964): The role of adrenocortical steroids in reversing established homograft rejection. *Surgery* 55, 412–417
- Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S, Novoa I, Zhang Y, Jungreis R, Nagata K, Harding HP, Ron D (2004): CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 18, 3066–3077

- Matsuda S, Shibasaki F, Takehana K, Mori H, Nishida E, Koyasu S (2000): Two distinct action mechanisms of immunophilin–ligand complexes for the blockade of T-cell activation. *EMBO Rep* 1, 428–434
- Mauer SM, Lane P, Zhu D, Fioretto P, Steffes MW (1992): Renal structure and function in insulin-dependent diabetes mellitus in man. *J Hypertens Suppl Off J Int Soc Hypertens* 10, S17-20
- McDonald JW, Goldberg MP, Gwag BJ, Chi S-I, Choi DW (1996): Cyclosporine induces neuronal apoptosis and selective oligodendrocyte death in cortical cultures. *Ann Neurol* 40, 750–758
- McDonald JW, Behrens MI, Chung C, Bhattacharyya T, Choi DW (1997): Susceptibility to apoptosis is enhanced in immature cortical neurons. *Brain Res* 759, 228–232
- Merrill JP, Murray JE, Harrison JH, Guild WR (1956): Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins. *J Am Med Assoc* 160, 277–282
- Mesaeli N, Nakamura K, Zvaritch E, Dickie P, Dziak E, Krause K-H, Opas M, MacLennan DH, Michalak M (1999): Calreticulin Is Essential for Cardiac Development. *J Cell Biol* 144, 857–868
- Michalak M, Milner RE, Burns K, Opas M (1992): Calreticulin. *Biochem J* 285, 681–692
- Milner RE, Baksh S, Shemanko C, Carpenter MR, Smillie L, Vance JE, Opas M, Michalak M (1991): Calreticulin, and not calsequestrin, is the major calcium binding protein of smooth muscle sarcoplasmic reticulum and liver endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 266, 7155–7165
- Müller GA, Rodemann HP (1991): Characterization of human renal fibroblasts in health and disease: I. Immunophenotyping of cultured tubular epithelial cells and fibroblasts derived from kidneys with histologically proven interstitial fibrosis. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found* 17, 680–683
- Munro S, Pelham HR (1986): An Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell* 46, 291–300
- Murray BM, Paller MS, Ferris TF (1985): Effect of cyclosporine administration on renal hemodynamics in conscious rats. *Kidney Int* 28, 767–774
- Murray JE, Merrill JP, Dammin GJ, Dealy JB, Walter CW, Brooke MS, Wilson RE (1960): Study on transplantation immunity after total body irradiation: Clinical and experimental investigation. *Surgery* 48, 272–284
- Myers BD, Newton L (1991): Cyclosporine-induced chronic nephropathy: an obliterative microvascular renal injury. *J Am Soc Nephrol* 2, S45
- Myers BD, Ross J, Newton L, Luetscher J, Perloth M (1984): Cyclosporine-Associated Chronic Nephropathy. *N Engl J Med* 311, 699–705
- Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL-S, O’Connell PJ, Chapman JR, Allen RDM (2004): Calcineurin Inhibitor Nephrotoxicity: Longitudinal Assessment by Protocol Histology. *Transplantation* 78, 557
- Nashan B, Cole E, Levy G, Therivet E (2002): Clinical validation studies of neoral C2 monitoring: a review. *Transplantation* 73, S3–11

- Neuhaus P, Pichlmayer R, Williams (1994): Randomised trial comparing tacrolimus (FK506) and cyclosporin in prevention of liver allograft rejection. *Lancet* 344, 423–428
- Obakan-Yerlikaya P, Arisan ED, Coker-Gurkan A, Adacan K, Ozbey U, Somuncu B, Baran D, Palavan-Unsal N (2017): Calreticulin is a fine tuning molecule in epibrassinolide-induced apoptosis through activating endoplasmic reticulum stress in colon cancer cells. *Mol Carcinog* 56, 1603–1619
- Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini J-L, Castedo M, Mignot G, Panaretakis T, Casares N et al. (2007): Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 13, 54–61
- Oliver JD, van der Wal FJ, Bulleid NJ, High S (1997): Interaction of the thiol-dependent reductase ERp57 with nascent glycoproteins. *Science* 275, 86–88
- Oliver JD, Roderick HL, Llewellyn DH, High S (1999): ERp57 functions as a subunit of specific complexes formed with the ER lectins calreticulin and calnexin. *Mol Biol Cell* 10, 2573–2582
- Opas M, Dziak E, Fliegel L, Michalak M (1991): Regulation of expression and intracellular distribution of calreticulin, a major calcium binding protein of nonmuscle cells. *J Cell Physiol* 149, 160–171
- Ostler T, Ehl S (2002): A cautionary note on experimental artefacts induced by fetal calf serum in a viral model of pulmonary eosinophilia. *J Immunol Methods* 268, 211–218
- Ostwald TJ, MacLennan DH (1974): Isolation of a High Affinity Calcium-binding Protein from Sarcoplasmic Reticulum. *J Biol Chem* 249, 974–979
- Ozaki T, Yamashita T, Ishiguro S (2008): ERp57-associated mitochondrial μ -calpain truncates apoptosis-inducing factor. *Biochim Biophys Acta* 1783, 1955–1963
- Özcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee A-H, Iwakoshi NN, Özdelen E, Tuncman G, Görgün C, Glimcher LH, Hotamisligil GS (2004): Endoplasmic Reticulum Stress Links Obesity, Insulin Action, and Type 2 Diabetes. *Science* 306, 457–461
- Palade G (1975): Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189, 347–358
- Panaretakis T, Joza N, Modjtahedi N, Tesniere A, Vitale I, Durchschlag M, Fimia GM, Kepp O, Piacentini M, Froehlich K-U et al. (2008): The co-translocation of ERp57 and calreticulin determines the immunogenicity of cell death. *Cell Death Differ* 15, 1499–1509
- Panaretakis T, Kepp O, Brockmeier U, Tesniere A, Bjorklund A-C, Chapman DC, Durchschlag M, Joza N, Pierron G, van Endert P et al. (2009): Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *EMBO J* 28, 578–590
- Paschen W, Doutheil J (1999): Disturbances of the Functioning of Endoplasmic Reticulum: A Key Mechanism Underlying Neuronal Cell Injury? *J Cereb Blood Flow Metab* 19, 1–18
- Pascovici D, Handler DCL, Wu JX, Haynes PA (2016): Multiple testing corrections in quantitative proteomics: A useful but blunt tool. *Proteomics* 16, 2448–2453
- Plekoszewski W, Jusko WJ (1993): Plasma Protein Binding of Tacrolimus in Humans. *J Pharm Sci* 82, 340–341

- Qiu X, Zhou X, Miao Y, Li B (2018): An in vitro method for nephrotoxicity evaluation using HK-2 human kidney epithelial cells combined with biomarkers of nephrotoxicity. *Toxicol Res* 7, 1205–1213
- Roberson EC, Tully JE, Guala AS, Reiss JN, Godburn KE, Pociask DA, Alcorn JF, Riches DWH, Dienz O, Janssen-Heininger YMW, Anathy V (2012): Influenza Induces Endoplasmic Reticulum Stress, Caspase-12–Dependent Apoptosis, and c-Jun N-Terminal Kinase–Mediated Transforming Growth Factor– β Release in Lung Epithelial Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 46, 573–581
- Roberts IS, Burrows C, Shanks JH, Venning M, McWilliam LJ (1997): Interstitial myofibroblasts: predictors of progression in membranous nephropathy. *J Clin Pathol* 50, 123–127
- Rosenthal JT, Hakala TR, Iwatsuki S, Shaw BW, Starzl TE (1983): Cadaveric renal transplantation under cyclosporine-steroid therapy. *Surg Gynecol Obstet* 157, 309–315
- Rutkowski DT, Kaufman RJ (2004): A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol* 14, 20–28
- 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
- Salati S, Genovese E, Carretta C, Zini R, Bartalucci N, Prudente Z, Pennucci V, Ruberti S, Rossi C, Rontauoli S et al. (2019): Calreticulin Ins5 and Del52 mutations impair unfolded protein and oxidative stress responses in K562 cells expressing CALR mutants. *Sci Rep* 9, 10558
- Schreier MH, Iscove NN, Tees R, Aarden L, von Boehmer H (1980): Clones of killer and helper T cells: growth requirements, specificity and retention of function in long-term culture. *Immunol Rev* 51, 315–336
- Selkoe DJ (2003): Folding proteins in fatal ways. *Nature* 426, 900
- Serrano-Negrón JE, Zhang Z, Rivera-Ruiz AP, Banerjee A, Romero-Nutz EC, Sánchez-Torres N, Baksi K, Banerjee DK (2018): Tunicamycin-induced ER stress in breast cancer cells neither expresses GRP78 on the surface nor secretes it into the media. *Glycobiology* 28, 61–68
- Shah G (1999): Why do we still use serum in the production of biopharmaceuticals? *Dev Biol Stand* 99, 17–22
- Shaw JP, Utz PJ, Durand DB, Toole JJ, Emmel EA, Crabtree GR (1988): Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science* 241, 202–205
- Shen J, Chen X, Hendershot L, Prywes R (2002): ER Stress Regulation of ATF6 Localization by Dissociation of BiP/GRP78 Binding and Unmasking of Golgi Localization Signals. *Dev Cell* 3, 99–111
- Sheng L, Zhuang S (2020): New Insights Into the Role and Mechanism of Partial Epithelial-Mesenchymal Transition in Kidney Fibrosis. *Front Physiol* 11, 569322
- Shin GT (1998): In vivo expression of transforming growth factor-beta1 in humans: stimulation by cyclosporine. *Transplantation* 65, 313–318

- Siekevitz P, Palade GE (1960): A Cytochemical Study on the Pancreas of the Guinea Pig. *J Biophys Biochem Cytol* 7, 619–630
- Sikma MA, Maarseveen EM van, Graaf EA van de, Kirkels JH, Verhaar MC, Donker DW, Kesecioglu J, Meulenbelt J (2015): Pharmacokinetics and Toxicity of Tacrolimus Early After Heart and Lung Transplantation. *Am J Transplant* 15, 2301–2313
- Sis B, Dadras F, Khoshjou F, Cockfield S, Mihatsch MJ, Solez K (2006): Reproducibility Studies on Arteriolar Hyaline Thickening Scoring in Calcineurin Inhibitor-Treated Renal Allograft Recipients. *Am J Transplant* 6, 1444–1450
- Starzl TE (2001): The Birth of Clinical Organ Transplantation. *J Am Coll Surg* 192, 431–446
- Strutz F, Okada H, Lo CW, Danoff T, Carone RL, Tomaszewski JE, Neilson EG (1995): Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J Cell Biol* 130, 393–405
- Sudhir K, MacGregor JS, DeMarco T, De Groot CJ, Taylor RN, Chou TM, Yock PG, Chatterjee K (1994): Cyclosporine impairs release of endothelium-derived relaxing factors in epicardial and resistance coronary arteries. *Circulation* 90, 3018–3023
- Szabó L, Szentandrassy N, Kistamás K, Hegyi B, Ruzsnavszky F, Vácsi K, Horváth B, Magyar J, Bányász T, Pál B, Nánási PP (2013): Effects of tacrolimus on action potential configuration and transmembrane ion currents in canine ventricular cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 386, 239–246
- Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Doncheva NT, Morris JH, Bork P et al. (2019): STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res* 47, D607–D613
- Taft JL, Nolan CJ, Yeung SP, Hewitson TD, Martin FI (1994): Clinical and Histological Correlations of Decline in Renal Function in Diabetic Patients With Proteinuria. *Diabetes* 43, 1046–1051
- Tang S, Sheerin NS, Zhou W, Brown Z, Sacks SH (1999): Apical Proteins Stimulate Complement Synthesis by Cultured Human Proximal Tubular Epithelial Cells. *J Am Soc Nephrol* 10, 69–76
- Taylor JP, Hardy J, Fischbeck KH (2002): Toxic Proteins in Neurodegenerative Disease. *Science* 296, 1991–1995
- Teske BF, Wek SA, Bunpo P, Cundiff JK, McClintick JN, Anthony TG, Wek RC (2011): The eIF2 kinase PERK and the integrated stress response facilitate activation of ATF6 during endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* 22, 4390–4405
- Thomson AW, Bonham CA, Zeevi A (1995): Mode of action of tacrolimus (FK506): molecular and cellular mechanisms. *Ther Drug Monit* 17, 584–591
- Trivedi R, Müller GA, Rathore MS, Mishra DP, Dihazi H (2016): Anti-Leukemic Activity of Shikonin: Role of ERP57 in Shikonin Induced Apoptosis in Acute Myeloid Leukemia. *Cell Physiol Biochem* 39, 604–616
- van der Vlies D, Makkinje M, Jansens A, Braakman I, Verkleij AJ, Wirtz KWA, Post JA (2003): Oxidation of ER resident proteins upon oxidative stress: effects of altering cellular

- redox/antioxidant status and implications for protein maturation. *Antioxid Redox Signal* **5**, 381–387
- Vincenz L, Jäger R, O'Dwyer M, Samali A (2013): Endoplasmic Reticulum Stress and the Unfolded Protein Response: Targeting the Achilles Heel of Multiple Myeloma. *Mol Cancer Ther* **12**, 831–843
- Wang C, Feng L, Ma L, Chen H, Tan X, Hou X, Song J, Cui L, Liu D, Chen J et al. (2017): Alisol A 24-Acetate and Alisol B 23-Acetate Induced Autophagy Mediates Apoptosis and Nephrotoxicity in Human Renal Proximal Tubular Cells. *Front Pharmacol* **8**, 172
- Wang JH, Desai R (1976): A brain protein and its effect on the CA²⁺-and protein modulator-activated cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochem Biophys Res Commun* **72**, 926–932
- Wang S-N, LaPage J, Hirschberg R (1999): Glomerular ultrafiltration and apical tubular action of IGF-I, TGF- β , and HGF in nephrotic syndrome. *Kidney Int* **56**, 1247–1251
- Watterson DM, Vanaman TC (1976): Affinity chromatography purification of a cyclic nucleotide phosphodiesterase using immobilized modulator protein, a troponin C-like protein from brain. *Biochem Biophys Res Commun* **73**, 40–46
- Wileman T, Kane LP, Carson GR, Terhorst C (1991): Depletion of cellular calcium accelerates protein degradation in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **266**, 4500–4507
- Williams D, Haragsim L (2006): Calcineurin Nephrotoxicity. *Adv Chronic Kidney Dis* **13**, 47–55
- Wolf G, Thaiss F, Stahl RA (1995): Cyclosporine stimulates expression of transforming growth factor-beta in renal cells. Possible mechanism of cyclosporines antiproliferative effects. *Transplantation* **60**, 237–241
- Xu D, Perez RE, Rezaiekhaliq MH, Bourdi M, Truog WE (2009): Knockdown of ERp57 increases BiP/GRP78 induction and protects against hyperoxia and tunicamycin-induced apoptosis. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol* **297**, L44–L51
- Yamamoto E, Uchida T, Abe H, Taka H, Fujimura T, Komiya K, Hara A, Ogihara T, Fujitani Y, Ueno T et al. (2014): Increased expression of ERp57/GRP58 is protective against pancreatic beta cell death caused by autophagic failure. *Biochem Biophys Res Commun* **453**, 19–24
- Yoshida H, Haze K, Yanagi H, Yura T, Mori K (1998): Identification of the cis-Acting Endoplasmic Reticulum Stress Response Element Responsible for Transcriptional Induction of Mammalian Glucose-regulated Proteins Involvement of Basic Leucine Zipper Transcription Factors. *J Biol Chem* **273**, 33741–33749
- Zapun A, Darby NJ, Tessier DC, Michalak M, Bergeron JJ, Thomas DY (1998): Enhanced catalysis of ribonuclease B folding by the interaction of calnexin or calreticulin with ERp57. *J Biol Chem* **273**, 6009–6012
- Zhang Y, Tao X, Yin L, Xu L, Xu Y, Qi Y, Han X, Song S, Zhao Y, Lin Y et al. (2017): Protective effects of dioscin against cisplatin-induced nephrotoxicity via the microRNA-34a/sirtuin 1 signalling pathway. *Br J Pharmacol* **174**, 2512–2527
- Zhou J, Wu Y, Wang L, Rauova L, Hayes VM, Poncz M, Essex DW (2014): The disulfide isomerase ERp57 is required for fibrin deposition in vivo. *J Thromb Haemost* **12**, 1890–1897

-
- Zukoski CF, Lee HM, Hume DM (1960): The prolongation of functional survival of canine renal homografts by 6-mercaptopurine. *Surg Forum* 11, 470–472
- Zukoski CF, Callaway JM, Rhea WG (1963): Tolerance to a canine renal homograft induced by prednisolone. *Surg Forum* 14, 208–210

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen meinen herzlichen Dank aussprechen, die mich bei der Erstellung dieser Dissertation unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt Professor Hassan Dihazi für die ausgezeichnete Betreuung und wertvollen Anregungen über den gesamten Zeitraum der Arbeit hinweg. Professor Dihazi hat mich seinerzeit in einem Seminar über Proteinurie beeindruckt - selbst für nephrologisch Interessierte halte ich das für eine besondere Auszeichnung und deshalb erwähnenswert. Darüber hinaus möchte ich Frau Elke Brunst-Knoblich und Frau Christina Decker für ihre umfassende Anleitung und die vielen Stunden im Labor danken, die mir stets Freude bereitet haben. Für die Vorbereitung auf die Arbeit im Labor möchte ich außerdem allen beteiligten des Jakob-Henle Programms für experimentelle Medizin danken, die den Grundstein für meine weiteren wissenschaftlichen Tätigkeiten gelegt haben.