

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

Untersuchung der pharmakologischen Modulation von ARNT-Homodimeren auf die Renoprotektion

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Gregor Christof Rapp

aus

München

Göttingen 2022

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer: Prof. Dr. med. M. Zeisberg

Ko-Betreuer: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. A. Neeße

Prüfungskommission

Referent: Prof. Dr. med. M. Zeisberg

Ko-Referent: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. A. Neeße

Drittreferentin: Prof. Dr. hum. biol. M. Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 11.10.2023

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Untersuchung der pharmakologischen Modulation von ARNT-Homodimeren auf die Renoprotektion" 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:

Nyamsuren G, **Rapp G***, Dihazi H, Zeisberg EM, Tampe D, Tampe B, Zeisberg M (2021): PP2A phosphatase inhibition is anti-fibrotic through Ser77 phosphorylation-mediated ARNT/ARNT homodimer formation. *Sci Rep* 11, 24075

Tampe B, Tampe D, Nyamsuren G, Klöpper F, **Rapp G**, Kauffels A, Lorf T, Zeisberg EM, Müller GA, Kalluri R, Hakrroush S, Zeisberg M (2018): Pharmacological induction of hypoxia-inducible transcription factor ARNT attenuates chronic kidney failure. *J Clin Invest* 128, 3053–3070

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung	1
1.1 Chronische Nierenerkrankung	1
1.1.1 Definition und Klassifikation	1
1.1.2 Gesellschaftliche Krankheitslast	2
1.1.3 Progressionsfaktoren und renoprotektive Maßnahmen.....	3
1.1.4 Gesundheitsökonomische Belastung	4
1.2 Pathophysiologie der renalen Fibrose	5
1.2.1 Histopathologie der tubulointerstitiellen Fibrose.....	5
1.2.2 Zelluläre und molekulare Mechanismen der Fibrogenese	5
1.2.3 BMP7 verhindert die Progression der Fibrose	7
1.3 Modulation der FKBP12/YY1/ARNT/ALK3-Signalkaskade	7
1.3.1 FK506 assoziierte Induktion des renoprotektiven Rezeptors ALK3	7
1.3.2 Transkriptioneller Repressor-Komplex FKBP12/YY1	9
1.3.3 FKBP12/YY1-Komplexe reprimieren die ARNT-Expression.....	9
1.3.4 Pharmakologische Modulation der FKBP12/YY1/ARNT/ALK3-Signalkaskade zur Ogranprotektion.....	11
1.3.5 ARNT-Homodimerisierung	12
1.4 Protein-Phosphatase-2A-Inhibitor	14
1.4.1 Protein-Phosphatase-2A.....	14
1.4.2 Relevanz der PP2A-Inhibition	14
1.5 Zielsetzung der Arbeit	15
2 Material	17
2.1 Gebrauchsmaterialien	17
2.2 Chemikalien und Reagenzien.....	18
2.3 Kitsysteme	21
2.4 Software	23
2.5 Geräte	24
2.6 Allgemeine Puffer und Lösungen	26
2.6.1 Puffer und Lösungen für SDS Page und Western Blotting.....	26
2.6.2 Puffer und Lösungen für Nativ Page und Western Blotting.....	28
2.6.3 Puffer und Lösungen für Immunpräzipitation.....	29
2.6.4 Puffer und Lösungen für Histochemie und Immunfluoreszenz	29
2.7 Antikörper	30
2.8 Primer.....	32
2.9 Stimulanzen	32

2.10	Expressionsvektoren.....	32
2.11	Zelllinien	33
2.12	Murines Nierengewebe und Lebergewebe	33
3	Methoden	34
3.1	Zellbiologische Methoden.....	34
3.1.1	Allgemeine Arbeitstechnik.....	34
3.1.2	Kultivierung der Zellen	34
3.1.3	Zytotoxizitätstestung.....	35
3.1.4	Stimulation von MCT-Zellen mit LB-100 und Degradationsuntersuchung durch <i>Cyclobeximide-chase</i>	36
3.1.5	Stimulation von MCT-Zellen mit LB-100, Okadasäure und Tautomycetin.....	36
3.1.6	Stimulation von MCT- und HEK293-Zellen mit LB-100 und anschließende Analyse durch MALDI-TOF MS	37
3.1.7	Liposomale Transfektion von HEK293-Zellen mit ARNT-EGFP und ARNT-myc und Stimulation durch LB-100, Okadasäure und Tautomycetin.....	37
3.1.8	Liposomale Transfektion von HEK293-Zellen mit mutiertem Ser77/Asp-mut-ARNT und Stimulation durch LB-100.....	38
3.1.9	Stimulation von MCT-Zellen mit LB-100 und qRT-PCR-basierte Expressionsanalyse von <i>Arnt</i> und <i>Alk3</i>	38
3.2	Mausstudien.....	39
3.2.1	Tiermodelle und Studiendesign.....	39
3.2.2	Berechnung und Dosierung der Pharmaka	39
3.2.3	Unilaterale Ureterobstruktion.....	39
3.2.4	Intraperitoneale Injektionen von Tetrachlormethan	40
3.2.5	Präparation der Versuchstiere	40
3.3	Histologie.....	41
3.3.1	Anfertigung von Gewebeschnitten.....	41
3.3.2	Masson-Trichrom-Färbung	41
3.3.3	Pikro-Siriusrot-Färbung und Fast Green FCF-Färbung.....	42
3.3.4	Perjodsäure-Schiff-Reaktion.....	42
3.3.5	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	43
3.3.6	Immunfloreszenz.....	43
3.3.7	Histologische Auswertung	44
3.4	SDS-PAGE und Western Blot.....	45
3.4.1	Proteinisolation aus MCT-Zellen.....	45
3.4.2	Proteinisolation aus murinem Nierengewebe und Leberwebe	45
3.4.3	Quantitative Messung der Proteinkonzentration	45
3.4.4	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	46
3.4.5	Semi-Dry-Western Blot: Proteintransfer	46
3.4.6	Semi-Dry-Western Blot: Immundetektion.....	47
3.5	Blue Native-PAGE und Western Blot.....	48
3.5.1	Proteinisolation aus MCT-Zellen und murinem Nierengewebe.....	48
3.5.2	Blue Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Blue Native-PAGE).....	48
3.5.3	Wet-Blot: Proteintransfer.....	49
3.5.4	Blue Native-PAGE: Immundetektion	49

3.6	Immunpräzipitation mit Protein-G Agarose.....	49
3.6.1	Proteinisolierung und Preclearing.....	49
3.6.2	Immunpräzipitation und Elution des Zielproteins.....	50
3.7	Ko-Immunpräzipitation.....	50
3.8	MALDI-TOF Massenspektrometrie zum Nachweis von ARNT Homodimeren.....	51
3.9	Immunpräzipitation mit Dynabeads.....	52
3.10	Identifizierung der LB-100-präservierten Peptid-Phosphorylierungsstellen von ARNT durch massenspektrometrische Analyse.....	52
3.11	Quantitative real-time PCR (qRT-PCR).....	53
3.11.1	RNA-Isolation.....	53
3.11.2	cDNA-Synthese.....	54
3.11.3	Quantitative real-time PCR (qRT-PCR).....	54
3.12	Statistische Auswertung.....	56
4	Ergebnisse.....	57
4.1	Verstärkte Formierung von ARNT-Homodimeren durch selektive PP2A-Inhibition.....	57
4.1.1	PP2A-Inhibition akkumuliert endogenes ARNT.....	57
4.1.2	PP2A-Inhibition induziert ARNT-Homodimer-Formierung.....	58
4.1.3	Einfluss der PP2A-Inhibition auf die <i>ALK3</i> -Expression.....	60
4.2	Relevanz der Serin-77-Phosphorylierung für die ARNT-Homodimerisierung.....	61
4.3	LB-100 induziert ARNT-Homodimere und verstärkt die Renoprotektion von FK506 und GPI-1046 <i>in vivo</i>	63
4.3.1	LB-100 induziert ARNT-Homodimerisierung in der murinen UUO-Niere.....	63
4.3.2	LB-100 verstärkt additiv die Renoprotektion von FK506 bzw. GPI-1046 <i>in vivo</i>	64
4.4	PP2A-Inhibition mildert experimentelle Leberfibrose.....	68
5	Diskussion.....	71
5.1	Methodischer Nachweis von endogenen ARNT-Homodimeren.....	71
5.2	Formierung von ARNT-Homodimeren.....	72
5.3	Modulation von ARNT-Homodimeren durch PP2A-Inhibition im Kontext der FKBP12/YY1/ARNT/ALK3-Signalachse.....	75
5.4	Einfluss der PP2A-Inhibition auf die renale Fibrogenese.....	77
5.5	Relevanz und Limitation der CCL ₄ -Studie.....	79
5.6	Therapeutische Modulation von ARNT-Homodimeren.....	80
5.6.1	Theoretische Limitation.....	80
5.6.2	Potentielle klinische Translation und Ausblick.....	81
6	Zusammenfassung.....	83
7	Anhang.....	85
8	Literaturverzeichnis.....	86

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Klassifikation der CKD und renales Risiko.	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung des FKBP12/YY1/ARNT/ALK3-Signalwegs.	10
Abbildung 3: Vergleichende Strukturformeln von FK506 und GPI-1046.	11
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von ARNT.	12
Abbildung 5: Strukturformel LB-100.	15
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Ko-Immünpräzipitation.	51
Abbildung 7: Selektiv vermehrte Induktion des Proteinlevel von Arnt in Abhängigkeit einer PP2A-Inhibition.	57
Abbildung 8: PP2A-Inhibition ohne Einfluss auf die transkriptionelle <i>Arnt</i> -Expression.	58
Abbildung 9: Abbildung 8: Endogene Arnt-Akkumulation durch LB-100-vermittelte Proteinstabilität.	58
Abbildung 10: Verstärkte Formierung von transgenen ARNT-Homodimeren durch PP2A- Inhibition.	59
Abbildung 11: PP2A-Inhibition induziert selektiv endogene ARNT-Homodimer-Formierung.	60
Abbildung 12: Verstärkte Bildung von endogenen ARNT-Homodimeren durch selektive PP2A-Inhibition.	60
Abbildung 13: LB-100-modulierte ARNT-Homodimerisierung induziert <i>Alk3</i> -Expression.	61
Abbildung 14: Phosphorylierungsstelle von ARNT ist lokalisiert an Serin-77.	62
Abbildung 15: ARNT-Homodimerisierung ist abhängig von der Phosphorylierungsstelle Serin- 77.	62
Abbildung 16: LB-100 induziert endogene ARNT-Homodimerisierung in der murinen UUO- Niere.	63
Abbildung 17: LB-100 und FK506 bzw. GPI-1046 induziert additiv vermehrt ARNT- Homodimere.	64
Abbildung 18: LB-100 und FK506 bzw. GPI-1046 verstärken additive Arnt-Induktion <i>in vivo</i>	64
Abbildung 19: Vermehrte Alk3-Expression <i>in vivo</i> durch additiven LB-100- und FK506- Synergismus.	65
Abbildung 20: Vermehrte Alk3-Expression <i>in vivo</i> durch additiven LB-100- und GPI-1046- Synergismus.	65
Abbildung 21: Milderung der UUO-induzierte Fibrogenese durch simultane Applikation von LB-100 und FK506 bzw. GPI-1046.	67
Abbildung 22: Vermehrte Alk3-Expression im CCL ₄ -Mausmodell durch LB-100-Applikation.	68
Abbildung 23: LB-100 mildert die experimentelle hepatische Fibrose.	69
Abbildung 24: Dreidimensionale Proteinstrukturvorhersage von ARNT und Lokalisation von Serin-77.	74
Abbildung 25: Identische Aminosäuresequenzen des identifizierten Phosphopeptides und des kodierenden Exon-5 der alternativen Spleißvariante von ARNT.	75
Abbildung 26: Schematische Darstellung der additiven Wirkungsweise von FK506 bzw. GPI- 1046 und LB-100.	77
Abbildung 27: Etablierung von Konzentration und Wirkdauer der Stimulanzen durch MTT- Testung.	85

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gesamtkosten der CKD.	4
Tabelle 2: Verwendete Antikörper für Western Blot, Immunpräzipitation, Ko- Immunpräzipitation, Immunfluoreszenz und Immunhistochemie	30
Tabelle 3: Verwendete Primer für qRT-PCR.....	32
Tabelle 4: Verwendete Stimulanzien in Zell- und Tierversuchen.....	32
Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Zellkulturformate, Mengenangaben und Anwendungen	35
Tabelle 6: Versuchsansatz zur Etablierung von Konzentration und Wirkdauer der Stimulanzien.....	36
Tabelle 7: Stimulation von MCT-Zellen durch Protein-Phosphatasen-Inhibitoren.....	36
Tabelle 8: Versuchsansatz für die LB-100-Stimulation von MCT-Zellen und Analyse mit qRT- PCR.....	38
Tabelle 9: Absteigende Ethanolreihe für Rehydrierung.....	41
Tabelle 10: Histopathologische Klassifizierung des tubulären Schaden.....	44
Tabelle 11: Arbeitsschritte der cDNA-Synthese	54
Tabelle 12: qRT-PCR-Mastermix-Ansatz.....	55
Tabelle 13: Reaktionsschritte der qRT-PCR.....	55

Abkürzungsverzeichnis

ACR	Albumin-Kreatinin-Quotient (<i>Albumine Creatinine Ratio</i>)
AHR	<i>aryl hydrocarbon receptor</i>
ALK3	<i>activin receptor-like kinase-3</i>
ARNT	<i>aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i>
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
BMP7	<i>bone morphogenetic protein-7</i>
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CAS	CAS-Nummer (<i>chemical abstracts service</i>)
CCl ₄	Tetrachlormethan
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CHX	Cycloheximid
CKD	chronischen Nierenerkrankung (<i>chronic kidney disease</i>)
CKD-MBD	<i>chronic kidney disease – mineral and bone disorder</i>
CK2	<i>casein kinase-2</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsDNA	doppelsträngige DNA (<i>double stranded DNA</i>)
dT	Desoxythymidin
DTT	Dithiothreitol
E-box	<i>enhancer box</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
ESRD	terminale Niereninsuffizienz (<i>end-stage renal disease</i>)

EZM	extrazellulärer Matrix
FCS	fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FK506	Tacrolimus
FKBP	<i>FK506-binding protein</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GKV	Gesetzliche Krankenversicherung
GPI-1046	<i>3-(3-pyridyl)-1-propyl-(2S)-1-(3,3-dimethyl-1,2-dioxopentyl)-2-pyrrolidinecarboxylate</i>
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HEK293	<i>human embryonic kidney 293</i>
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor (<i>hypoxia-inducible factor</i>)
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IF	tubulointerstitieller Fibrose
KDIGO	<i>Kidney Disease: Improving Global Outcomes</i>
KG	Körpergewicht
LB-100	<i>3-(4-methylpiperazine-1-carbonyl)-7-oxabicyclo[2.2.1]heptane-2-carboxylic acid</i>
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
MALDI-TOF MS	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry</i>
MCT	<i>murine tubular epithelial cells</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
MTS	Masson-Trichrom-Färbung (<i>Masson's trichrome stain</i>)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
OA	Okadasäure
PAS	Per/ARNT/Sim
PAS-Reaktion	Perjodsäure-Schiff-Reaktion (<i>periodic acid-Schiff reaction</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)

PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pEMT	partielle-epitheliale-mesenchymale Transition
PP2A	Proteinphosphatase 2A (<i>protein phosphatase 2A</i>)
pSMAD	<i>phosphorylated SMAD</i>
PSR-Färbung	Pikro-Siriusrot-Färbung
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-PCR (<i>quantitative real-time PCR</i>)
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
rhBMP7	<i>recombinant human BMP7</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
R-SMAD	<i>receptor-regulated SMAD</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SGLT-2	<i>sodium-glucose-co-transporter-2</i>
SMAD	<i>Mothers against decapentaplegic homolog</i>
ssDNA	einzelsträngige DNA (<i>single stranded DNA</i>)
TA	Tubulusatrophie
TAD	<i>transactivation domain</i>
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (<i>tris-buffered saline</i>)
TGF- β	<i>transforming growth factor-beta</i>
TMC	Tautomycetin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UUO	unilaterale Ureterobstruktion
YY1	Yin Yang 1
α -SMA	<i>alpha-smooth muscle actin</i>

1 Einleitung

Eine chronische Schädigung parenchymaler Organe führt zu einer Inflammation, einer Fibrosierung, einem konsekutiven Funktionsverlust und schließlich zu einem Organversagen. Spezifische Therapien zum Erhalt des funktionellen Parenchyms und zur Verhinderung einer progressiven Fibrosierung sind limitiert (Zeisberg und Kalluri 2013; Tsochatzis et al. 2014; Rokey et al. 2015; Tampe et al. 2018). Die chronische Nierenerkrankung (CKD) stellt hierbei weltweit eine zunehmende medizinische Herausforderung dar (Nugent et al. 2011; Stevens und Levin 2013; Bikbov et al. 2020). Die CKD ist durch einen progredienten Funktionsverlust der Nieren gekennzeichnet; glomeruläre, tubuläre sowie endokrine Funktionen der Nieren sind vermindert. Im zeitlichen Verlauf mündet dies letztlich in eine terminale Niereninsuffizienz (ESRD) mit Indikation zur Nierenersatztherapie bzw. zur Nierentransplantation (Webster et al. 2017; Kalantar-Zadeh et al. 2021).

1.1 Chronische Nierenerkrankung

1.1.1 Definition und Klassifikation

Der Begriff der CKD umfasst nach aktueller *Kidney-Disease-Improving-Global-Outcomes*(KDIGO)-Leitlinie (2013) definitionsgemäß: Eine Abweichung von der normalen Nierenstruktur sowie ein anhaltender Verlust der Nierenfunktion über 3 Monate. Eine CKD wird daher, bei Vorliegen (d.h. ≥ 3 Monate) eines oder mehrerer Kriterien diagnostiziert:

1. Marker einer Nierenschädigung: Albuminurie ≥ 30 mg/24 h bzw. ACR ≥ 30 mg/g; ≥ 3 mg/mmol, pathologisches Urinsediment, renal-tubuläre Syndrome, histologisch oder bildmorphologisch gesicherte Nierenschädigung, Z. n. Nierentransplantation
2. Abnahme der Glomerulären Filtrationsrate: GFR < 60 ml/min/1,73 m²

Die CKD ist nach KDIGO unter Berücksichtigung der Ätiologie (*cause*), der GFR und der Albuminurie zu klassifizieren. In Kombination der genannten Parameter ergibt sich die sog. CGA-Klassifikation, die eine genauere Prognoseabschätzung der CKD und des damit verbundenen kardiovaskulären Risikos ermöglichen. Es bestehen die Empfehlungen, die GFR als *estimated*-GFR (eGFR) anzugeben und nach der Schätzformel *CKD-Epidemiology Collaboration* (CKD-EPI) zu ermitteln (Stevens und Levin 2013). Da der Parameter „*race*“ in Vergangenheit kontrovers diskutiert wurde, verzichtet die aktualisierte CKD-EPI-Formel auf diese Variable (Inker et al. 2021). Die Krankheitsprogression der CKD unterliegt multifaktoriellen Einflüssen, unabhängig dieser, definiert die KDIGO-Leitlinie eine Progression der CKD als eine Abnahme der GFR > 25 % vom Ausgangswert; eine rasche Progression der CKD ist als Reduktion der GFR > 5 ml/min/1,73 m² pro Jahr beschrieben

(KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease 2013).

			Albuminurie-Kategorie			
			(Albuminurie in mg/g)			
			A1	A2	A3	
			Normal / leicht erhöht < 30	Moderat erhöht 30 – 300	Stark erhöht ≥ 300	
GFR-Kategorie Glomeruläre Filtrationsrate (ml/min/1,73 m ²)	G1	Normal oder hoch	≥ 90			
	G2	Mild eingeschränkt	60 – 89			
	G3a	Mild / moderat eingeschränkt	45 – 59			
	G3b	Moderat / schwer eingeschränkt	30 – 44			
	G4	Schwer eingeschränkt	15 – 29			
	G5	Nierenversagen (ESRD)	≤ 15			

Abbildung 1: Klassifikation der CKD und renales Risiko. Klassifikation und Prognose der CKD; Legende: Grün: geringes Risiko; Gelb: mäßig erhöhtes Risiko; Orange: hohes Risiko; Rot: sehr hohes Risiko (modifiziert nach KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease 2013)

1.1.2 Gesellschaftliche Krankheitslast

Die globale Prävalenz der CKD wird nach der *Global-Burden-of-Disease*-Studie 2017 (GBD) mit 9,7 % bzw. 697,5 Millionen Fällen weltweit angegeben. Zwischen 1990 und 2017 hat demnach die Prävalenz der CKD um 29,3 % kontinuierlich zugenommen. Im gleichen Zeitraum ist die altersstandardisierte Inzidenz der dialysepflichtigen Patienten¹ um 43,1 %, die der Nierentransplantierten um 34,4 % angestiegen. Die Autoren der GBD-Studie 2017 errechneten eine globale Krankheitslast von 35,8 Millionen *disability-adjusted life years* (DALYs) und bezifferten für das Jahr 2017 rund 1,2 Millionen CKD bedingte Todesfälle weltweit. Damit ist die Mortalität der CKD zwischen 1990 und 2017 um 41,5 % angestiegen (Bikbov et al. 2020). Für das Jahr 2016 wird die CKD als 16. häufigste Todesursache angeführt; in einem Modellszenario für das Jahr 2040 prognostizieren Foreman et al., dass anhand der errechneten *years of life lost* (YLLs) die CKD weltweit die fünfthäufigste Todesursache sein wird (Foreman et al. 2018). Diesen Entwicklungen liegen der globale demographische Wandel und die Zunahme der Lebensstil-assozierten Erkrankungen – insbesondere von Diabetes Mellitus Typ 2, der Arteriellen Hypertonie und Adipositas – zugrunde (Nugent et al. 2011). Auch hierzulande, in Deutschland, ist die Ätiologie der CKD überwiegend Lebensstil-assoziert. Dem durch den Gemeinsamen Bundesausschuss (G-BA) erstellten „Jahresbericht 2019 zur Qualität der Dialysen“ zufolge ist die Genese meist sekundär und ist in 23,36 % der Fälle durch eine diabetische Nephropathie bedingt bzw. zu 21,88 % einer hypertensiven Nephropathie geschuldet. Eine jährliche Steigerung der Inzidenz von

¹ Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird im Folgenden das generische Maskulinum benutzt. Hierbei sind stets Personen aller Geschlechter gemeint.

dialysepflichtigen Patienten um 1,5 bis 2,5 % in Deutschland wird genannt. Rund 75.000 dialysepflichtige Patienten wurden im Jahr 2019 behandelt, davon 94 % mittels Hämodialyse und 6 % durch Peritonealdialyse (Hecken 2020).

Infolge der mit der CKD vergesellschafteten Komorbiditäten ist die Gesamtmortalität chronisch Nierenkranker stadienabhängig (ohne Nierenersatztherapie) 1,4- bis 18,6-fach erhöht (Go et al. 2004; Girndt et al. 2016). Patienten mit einer terminaler Niereninsuffizienz weisen im Vergleich zur altersstandardisierte Gesamtbevölkerung eine 10- bis 100-fach erhöhte kardiovaskuläre Mortalität auf (Rucker und Tonelli 2009). Zudem ist die Prävalenz eines cerebrovaskulären Ereignisses rund 4-fach erhöht; daneben besteht ein hohes Risiko kognitive Störungen oder eine Demenz zu entwickeln (Bugnicourt et al. 2013). Eine vermehrte Inzidenz von Malignomen bei chronisch Nierenkranken ist Gegenstand aktueller Studien (Rosner et al. 2021).

1.1.3 Progressionsfaktoren und renoprotektive Maßnahmen

Die individuelle Progression der CKD unterliegt vielseitigen Variablen und verläuft nicht unmittelbar linear, so determinieren genetische und epigenetische Varianz den Verlauf einer CKD (Zhong et al. 2017). Die funktionelle Kapazität einer Niere wird durch die Gesamtzahl der Nephrone definiert (Denic et al. 2017). Physiologisch nimmt die Anzahl funktioneller Nephrone mit steigendem Lebensalter ab, die Inzidenz der Nephrosklerose nimmt zu (Denic et al. 2016). So führt dies ab dem dritten Lebensjahrzehnt zu einer jährlichen Abnahme der GFR um $-1 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ (Denic et al. 2016; Waas et al. 2021). Das Lebensalter gilt daher als ein wichtiger unbeeinflussbarer Risikofaktor der CKD. Als weitere unbeeinflussbare Risikofaktoren gelten zudem: männliches Geschlecht, die Ethnizität und das Geburtsgewicht (Kazancioğlu 2013; Denic et al. 2016). Als beeinflussbare Risikofaktoren sind Adipositas, Bluthochdruck, Dyslipidämie, Hyperglykämie, die Einnahme nephrotoxischer Substanzen und Tabakkonsum zu nennen (Reichel 2012).

Eine kausale Heilung der CKD ist grundsätzlich ausgeschlossen (Kalantar-Zadeh et al. 2021). Nach KDIGO-Empfehlung ist daher eine weitere Progression der CKD durch präventive Maßnahmen und Pharmakotherapie zu verhindern, zugleich sollen Risikofaktoren die zur Entwicklung von Komorbiditäten führen, kontrolliert und reduziert werden (KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease 2013). Für die Verhinderung eines Progress der CKD ist die Einstellung des Blutdrucks von zentraler Bedeutung; ein systolischer Zielblutdruck von $< 120 \text{ mmHg}$ sollte angestrebt werden. Primär sollte die antihypertensiven Therapie mit Renin-Angiotensin-Aldosteron-System(RAAS)-Inhibitoren erfolgen; die nephroprotektive Wirkung einer RAAS-Blockade beruht auf der Reduktion des intraglomerulären Drucks, eine Abnahme der Proteinurie und Vermittlung von antiinflammatorisch sowie antifibrotischen Effekten (Rodrigues Prestes et al. 2017; KDIGO 2021 Clinical Practice Guideline for the Management of Blood Pressure in Chronic Kidney Disease 2021). Lange Zeit galt die RAAS-Blockade als pharmakologische

Standardtherapie der CKD; im Jahr 2021 wurde Dapagliflozin aus der Gruppe der *sodium-glucose-co-transporter-2*(SGLT-2)-Inhibitoren unabhängig vom Vorliegen eines Diabetes Mellitus zur Therapie der CKD durch die Europäische Union zugelassen (Fischer von Weikersthal 2021; Kalantar-Zadeh et al. 2021). Zur weiteren Progressionshemmung ist bei Diabetikern eine Einstellung des Blutzuckers innerhalb eines individuellen HbA1c-Zielkorridors (< 6,5 % bis < 8,0 %) indiziert (KDIGO 2020 Clinical Practice Guideline for Diabetes Management in Chronic Kidney Disease 2020). Nephrotoxische Substanzen, die Entwicklung eines akuten Nierenversagens und Infektionen sollen nach Möglichkeit vermieden werden. Diätische Maßnahmen, wie eine reduzierte Natrium-, Kalium- und Phosphataufnahme, eine angepasste Proteinzufuhr und allgemeine Lebensstilmaßnahmen sind außerdem empfohlen. Die durch den Funktionsverlust der Nieren bedingten Begleiterkrankungen, renale Anämie, CKD-*mineral-and-bone-disorder* (CKD-MBD) und metabolische Azidose sind leitliniengerecht mit zu behandeln. Falls indiziert, sollen durch Optimierung des Lipidstatus und des Blutdrucks das kardiovaskuläre Risiko gesenkt werden (KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease 2013; KDIGO 2017 Clinical Practice Guideline Update for the Diagnosis, Evaluation, Prevention, and Treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD) 2017).

1.1.4 Gesundheitsökonomische Belastung

Vor dem Hintergrund der zunehmenden Prävalenz der CKD nehmen die sozioökonomische Gewichtung und die damit verbundene finanziellen Mehrbelastungen für die Gesundheitssysteme erheblich zu. Demnach ergaben sich im Jahr 2014 allein durch die Dialysebehandlungen der terminal niereninsuffizienten Patienten Gesamtkosten von 3,3 Milliarden Euro, dies stellte 1,6 % der jährlichen Gesamtausgaben (206 Milliarden Euro) der gesetzlichen Krankenversicherung (GKV) dar. Auf Grundlage von Prävalenzschätzungen wurden 20,9 Milliarden Euro (10,2 %) für die Versorgung aller Patienten in den CKD-Stadien 3 und 4 aufgewendet (Gandjour et al. 2020).

Tabelle 1: Gesamtkosten der CKD. Jährliche Kosten pro Person und CKD-Stadium sowie Gesamtkosten im Jahr 2014. Modifiziert nach (Gandjour et al. 2020)

CKD-Stadium	Durchschnittliche Kosten pro Patient im Jahr 2014 (in Euro)	Prävalenz (von GKV erfasst)	Gesamtkosten (in Euro)
G3	8030	2.446.295	19.644.066.150
G4	9760	130.976	1.278.389.513
G5 (ESRD)	44.374	75.000	3.328.014.750
Referenzgruppe	2876		

1.2 Pathophysiologie der renalen Fibrose

1.2.1 Histopathologie der tubulointerstitiellen Fibrose

Das histopathologische Korrelat der CKD ist die interstitielle Fibrose (IF) (Bülow und Boor 2019); eine Fibrosierung weiterer renaler Kompartimente führt außerdem zur Glomerulosklerose, Atherosklerose und perivaskuläre Fibrose (Djudjaj und Boor 2019). Fibrose ist ein pathologischer Wundheilungsprozess, der mit einer übermäßigen Desposition extrazellulärer Matrix (EZM) einhergeht und eine Destruktion des funktionellen Organparenchym bewirkt (Zeisberg und Kalluri 2013; Rockey et al. 2015). Eine ausgeprägte IF korreliert hierbei mit einem fortgeschrittenen Nierenfunktionsverlust (Farris und Colvin 2012; Djudjaj und Boor 2019). Charakteristisch für die IF ist eine Expansion des Raums zwischen Basalmembran und peritubulären Kapillaren aufgrund der Akkumulation von EZM. Typischerweise setzt sich die Matrix insbesondere aus den Kollagen I und III sowie aus den Kollagen IV, V, VI, VII, XV, Glykoproteinen und Fibronectin zusammen (Farris und Alpers 2014; Humphreys 2018). Durch die Expansion ist die physiologische Mikroarchitektur gestört, wodurch die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung des Tubulusepithels beeinträchtigt sind (Djudjaj und Boor 2019). Die IF ist oftmals mit einer Tubulusatrophie (TA) assoziiert, die durch eine Basalmembranverdickung, eine Abflachung des Tubulusepithels, ein dilatiertes Tubuluslumen und ein helles Zytoplasma histologisch charakterisiert ist (Farris und Colvin 2012). Das gemeinsame Auftreten von IF und TA wird in Kombination als „IFTA“ bezeichnet und ist von klinischer Bedeutung für die histopathologische Graduierung von Nierenschädigungen (Farris und Colvin 2012; Farris und Alpers 2014).

1.2.2 Zelluläre und molekulare Mechanismen der Fibrogenese

Dem Prozess der Fibrosierung liegen gemeinsame Pathomechanismen zugrunde, die von Herz, Leber, Lunge und Niere geteilt werden (Zeisberg und Kalluri 2013; Rockey et al. 2015). Einem renalen Schädigungsreiz tubuloepithelialer Zellen folgt eine Zytokin- (u. a. Interleukin-1 und Tumornekrosefaktor- α) und Chemokin-vermittelte Infiltration und Rekrutierung von Entzündungszellen – insbesondere T-Lymphozyten, Mastzellen/Makrophagen und Natürliche-Killerzellen migrieren in das Interstitium (Strutz und Neilson 2003; Rockey et al. 2015). Während des inflammatorischen Prozesses setzen die Entzündungszellen und das geschädigte Tubulusepithel profibrotische Zytokine, wie *transforming growth factor-beta-1* (TGF- β 1), *platelet-derived growth factor* (PDGF), *basic fibroblast growth factor* (FGF-2) und *interleukin-13* (IL-13), frei, welche eine Aktivierung und Proliferation interstitieller Fibroblasten auslösen (Vaughan et al. 2000; Strutz und Neilson 2003; Wynn 2008). Auch umgebungsabhängige Stimuli wie Hyperglykämie und Hypoxie können eine Fibroblastenaktivierung bedingen (Zeisberg und Zeisberg 2013). Im Rahmen der Aktivierung vollziehen residente Fibroblasten eine Transition zu Myofibroblasten, diese bilden exzessiv EZM und sind aufgrund dessen bedeutende Effektorzellen der Fibrogenese

(Zeisberg et al. 2000; Kuppe et al. 2021). Typischerweise exprimieren Myofibroblasten *alpha-smooth muscle actin* (α -SMA), das durch seine mechanische Kontraktilität zur Reorganisation und Verdichtung der Matrix beiträgt; eine Aggravation der TA ist die unmittelbare Folge. α -SMA dient als ein histopathologischer Marker einer fortgeschrittenen Krankheitsprogression und korreliert mit dem Nierenfunktionsverlust (Badid et al. 2002; Ina et al. 2011; Djurdjaj und Boor 2019).

Des Weiteren verursachen renale Schädigungsreize eine tubuläre Dedifferenzierung, welche durch das Konzept der partiellen-epithelialen-mesenchymalen Transition (pEMT) beschrieben werden kann (Humphreys 2018; Lovisa 2021). Die tubuläre Schadensantwort ist typischerweise mit einem Verlust der Expression von epithelialen Proteinen wie Cadherin und *zonula occludens-1* assoziiert, stattdessen folgt eine Hochregulation von mesenchymalen Proteinen wie Vimentin (Gewin 2018). Auch ist die Schadensreaktion des tubulären Epithels durch einen Zellzyklusarrest (G2/M-Phase) mit Verlust des regenerativen Potentials und einer tubulären Dysfunktion gekennzeichnet. Ähnlich wie aktivierte Fibroblasten bzw. Myofibroblasten besitzen pEMT-Zellen ein reaktives proinflammatorisches Sekretom (Lovisa et al. 2015; Humphreys 2018; Lovisa 2021).

Als Schlüsselmediator der Fibrose gilt das profibrotische Zytokin *transforming growth factor-beta-1* (TGF- β 1), das entscheidend zur Aktivierung und Proliferation von Fibroblasten beiträgt (Massagué 2000; Meng et al. 2015). Die Isoform TGF- β 1 gehört neben zwei weiteren Vertretern zur übergeordneten TGF- β -Superfamilie der Säuger (Roberts et al. 1991). Die TGF- β -Superfamilie steuert zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose im Kontext u. a. der Embryogenese, Wundheilung, Inflammation oder der Tumorgenese (Massagué 1998; Gordon und Blobel 2008). Nach der Synthese bildet TGF- β 1 einen latenten Komplex, der assoziiert mit *latent TGF- β -binding protein* (LTBP) inaktiv im EZM einlagert. Stimuli wie *reactive oxygen species* (ROS), Plasmin oder ein azidotisches Milieu führen zur Freisetzung und Aktivierung von TGF- β 1 (Meng et al. 2015). In Folge dessen bindet TGF- β 1 an den Typ II TGF- β Rezeptor, dieser rekrutiert den Typ I TGF- β Rezeptor zu einem heterodimeren Ligand-Rezeptor-Komplex, der wiederum eine Phosphorylierung von SMAD2/3 katalysiert. Die Signaltransduktion der membranständigen TGF- β 1-Rezeptoren erfolgt über eine zytosolische Serin/Threonin-Kinasendomäne (Massagué 2000). Phosphoryliertes SMAD2/3 (funktionell: R-SMAD) bildet mit SMAD4 einen oligomeren Komplex, dieser wandert in den Zellkern, bindet an spezifische DNA-Sequenzmotive und vermittelt dort die Transkription profibrotischer EZM-Zielgene. Konsekutiv folgt eine Aktivierung von Fibroblasten und gesteigerte EZM-Disposition – insbesondere von α -SMA, Kollagen I, Fibronectin und anti-degenerativen *tissue inhibitor of metalloproteinase* (TIMPs). Durch Konkurrenz um die Bindung an den TGF- β 1-Rezeptoren reguliert SMAD7 die R-SMAD-abhängige Signaltransduktion (Böttlinger und Bitzer 2002; Meng et al. 2015). Es besteht eine Reihe weiterer TGF- β 1/SMAD-assoziiierter profibrotischer Signalwege; beispielsweise sind *crossstalks* in Abhängigkeit von p38 *mitogen-*

activated protein kinase (MAPK), Wnt/ β -catenin oder auch *epidermal growth factor receptor* (EGFR) zu nennen (Meng et al. 2016).

1.2.3 BMP7 verhindert die Progression der Fibrose

Das Protein *bone morphogenetic protein-7* (BMP7) ist ein weiterer Vertreter der TGF- β -Superfamilie (Ozkaynak et al. 1990). Das Morphogen BMP7 vermittelt antifibrotische, organregenerative Effekte und gilt als endogener Gegenspieler von TGF- β 1 (Zeisberg et al. 2003). Während der Embryogenese ist BMP7 ein obligater Induktor der Nephrogenese und auch für die Entwicklung der Augen und des Skelettsystems verantwortlich. Eine Deletion von *Bmp7*^{-/-} führt zur perinatalen Letalität (Luo et al. 1995; Ducy und Karsenty 2000). Physiologisch wird BMP7 im Knochen und in der adulten gesunden Niere exprimiert; in Tierversuchen mit Schädigungsmodell der Nieren konnte eine Abnahme der BMP7-Expression aufgezeigt werden. Durch die Gabe von rekombinantem BMP7 (rhBMP7) konnte in unterschiedlichen Mausmodellen der Nierenschädigung eine Hemmung der renalen Fibrogenese erzielt werden (Wang und Hirschberg 2003; Zeisberg 2006; Bramlage und Müller 2010; Sugimoto et al. 2012). Nach proteolytischer Aktivierung und extrazellulärer Modulation bindet BMP7 an die transmembranständige Typ II BMP-Rezeptoren der Zielzelle. Über eine Serin/Threonin-Kinasendomäne werden die Typ I BMP-Rezeptoren (Synonym: *activin receptor-like kinase-3* und *-6*; ALK3/ALK6) aktiviert, diese phosphorylieren SMAD1/5/8 zu pSMAD1/5/8 (funktionell: R-SMAD). Es folgt eine Hetero-Komplexierung mit SMAD4, eine Aufnahme in den Zellkern und Regulierung der Zielgene (Massagué 1998; Bechtel und Zeisberg 2009). Zusammenfassend besteht die TGF- β 1-antagonisierende-Wirkung von BMP7 in einer Inhibition der Fibroblastenaktivierung, Hemmung des EMT-Programms, Regeneration des tubulären Epithels und Vermittlung antiinflammatorischer Effekte (Zeisberg et al. 2003; Zeisberg und Kalluri 2004). Aufgrund seiner pharmakologischen Komplexität findet rhBMP7 bislang im klinischen Kontext keine systemische Anwendung. Das ALK3-spezifische-Peptid THR-123 vermittelt in präklinischen Studien BMP7-analoge Effekte (Bechtel und Zeisberg 2009; Sugimoto et al. 2012). Aus diesen präklinischen Studien resultierte die Entwicklung eines THR-123-Analoga (THR-184). In Phase II-Studien verhinderte THR-184 – insbesondere in Hochrisikogruppen mit Vorliegen einer CKD – die Entstehung einer akuten Nierenschädigung während kardiochirurgischer Eingriffe (McVicker und Bennett 2017; Himmelfarb et al. 2018).

1.3 Modulation der FKBP12/YY1/ARNT/ALK3-Signalkaskade

1.3.1 FK506 assoziierte Induktion des renoprotektiven Rezeptors ALK3

Die Regenerationsfähigkeit einer geschädigten Niere wird nicht allein durch die Negativregulation von BMP7 limitiert, sondern ist auch von der Expression des Typ I BMP-Rezeptors ALK3 des Tubulusepithels abhängig. Sugimoto (2012) konnte anhand transgener

Mäuse (*Alk3^{-/-}*) im Modell der nephrotoxischen Serumnephritis (NTN) nachweisen, dass eine tubuläre *Alk3*-Deletion mit einer verstärkten Aktivierung der TGF- β 1-Signalkaskade und einer Zunahme der IF als auch des renalen Funktionsverlust assoziiert ist. Zusammenfassend besitzt der ALK3-Rezeptor eine antifibrotische und regenerative Wirkungsweise und ist für die Protektion des funktionellen Parenchyms von zentraler Bedeutung.

Die nachfolgenden Inhalte beziehen sich im Wesentlichen auf die Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe (Tampe et al. 2018).

Übergeordnetes Ziel der Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe war es daher, die antifibrotischen und regenerativen Effekte von ALK3 zu nutzen, pharmakologisch die Hochregulation von tubulären ALK3-Rezeptoren zu induzieren und damit Grundlagen für einen möglichen Therapieansatz im Kontext der chronischen Nierenschädigung zu schaffen.

Hinsichtlich eines Pharmakons, das die Expression tubulärer ALK3 Rezeptoren induzieren kann, konnte mittels Datenbankanalysen das Immunsuppressivum Tacrolimus (FK506) identifiziert werden (Tampe et al. 2018).

Bei FK506 handelt es sich um einen Calcineurin-Inhibitor aus der Gruppe der Makrolide; FK506 findet zur Immunsuppression im Rahmen allogener Organtransplantationen breite Anwendung. Nach Bindung von FK506 an *FK506-binding protein-12* (FKBP12) vermittelt FK506 seine immunsuppressive Wirkung durch Hemmung der Phosphataseaktivität von Calcineurin. In der Folge werden proinflammatorische Transkriptionsfaktor wie *nuclear factor of activated T-cells* (NF-AT) und *nuclear factor kappa-light-chain-enhance* (NF- κ B) inhibiert (Thomson et al. 1995; Randhawa et al. 1997). Trotz bekannter Nephrotoxizität des FK506 bietet die Literatur zahlreiche Publikationen, die eine Protektion der Niere und anderer parenchymaler Organe (Herz, Lunge, Leber) durch FK506 Supplementation in experimentellen Präkonditionierungsregimen beschreiben (Sakr et al. 1992; Randhawa et al. 1997; Hüser et al. 2009; Feng et al. 2011; Spiekerkoetter et al. 2013). Ausgehend von den organprotektiven Effekten des supplementierten FK506, welches unterhalb der immunsuppressiv wirkenden Schwelle dosiert war, folgerte Tampe (2018), dass die Wirkungsweise einer niedrig dosierten FK506 Supplementation (*low-dose*) einem Calcineurin-unabhängigen Mechanismus unterliegt. (Spiekerkoetter et al. 2013).

Beruhend auf den Dosisangaben der Präkonditionierungsregime (Sakr et al. 1992; Sharkey und Butcher 1994; Hüser et al. 2009; Feng et al. 2011; Spiekerkoetter et al. 2013) konnte eine niedrig dosierte Applikationsdosis des FK506 etabliert werden (0,2 mg/kgKG/d), welche signifikant die experimentelle Fibrogenese im Mausmodell der unilaterale Ureterobstruktion (UUO) (s. Kapitel 3.2.3) verminderte. Der murine FK506-Blutspiegel wurde in Höhe einer pikomolaren sowie nicht-immunsuppressiven Konzentration gemessen. Niederdosiertes FK506 vermittelt die vermehrte Expression von ALK3 und induziert, in Abhängigkeit der kanonischen pSMAD1/5/8-Signalkaskade, eine konsekutive Renoprotektion und Minderung der Fibrogenese. (Tampe et al. 2018).

1.3.2 Transkriptioneller Repressor-Komplex FKBP12/YY1

Durch Depletion verschiedener Vertreter der FKBP-Familie (z. B. *Fkbp12*, *Fkbp38*, *Fkbp52*), konnte *in vitro* nachgewiesen werden, dass nur die Depletion von *Fkbp12* – unabhängig von einer FK506-Stimulation – eine *Alk3* Transkription induziert (Tampe et al. 2018). Das zytoplasmatische Immunophilin FKBP12 interagiert mit Typ I BMP-Rezeptoren; FKBP12 bindet an die GS-Domäne ligandenfreier Typ I Rezeptoren, blockiert dessen Phosphorylierungsstelle und unterdrückt damit eine Typ II BMP-Rezeptor-abhängige Signaltransduktion (Wang et al. 1996). Bei niederdosierter FK506-Stimulation bindet FKBP12 an FK506; in Folge dessen dissoziiert der repressive Typ I BMP-Rezeptoren-FKBP12-Komplex, ALK3-Rezeptoren werden aktiviert und die kanonischen pSMAD1/5/8-Signalkaskade induziert (Spiekerkoetter et al. 2013).

Da sich mittels Immunpräzipitation keine direkte Interaktion zwischen *Alk3* und *Fkbp12* nachweisen lassen konnte, wurde ein putativer transkriptioneller Regulator in Präsenz von FKBP12 angenommen. Eine Datenbank-basierte Genexpressionsanalyse mittels *Gene Expression Omnibus* zeigte eine FK506-assoziierte Motiv-Anreicherung des Transkriptionsfaktors *Yin-Yang-1* (YY1). Zudem konnte mittels Protein-Netzwerk-basierter Softwareanalyse eine Protein-Proteininteraktion zwischen FKBP12 und YY1 ermittelt werden (Tampe et al. 2018). Der Transkriptionsfaktor YY1 ist ein ubiquitär exprimiertes Zinkfingerprotein und gehört zur der GLI-Krüppel-Genfamilie (Shi et al. 1991; Gordon et al. 2006). Funktionell kann YY1 durch Aktivierung und Repression die Transkription, direkt oder Kofaktor-assoziiert regulieren (Gordon et al. 2006). Yang et al. demonstrierten, dass sich YY1 mit FKBP12 zu einem repressiven YY1-FKBP12-Komplex formiert und dass diese Komplexierung durch die Gabe von FK506 gelöst werden kann (Yang et al. 1995). Durch eine Ko-Immunpräzipitation ließ sich die FK506-abhängige Dissoziation der Protein-Proteininteraktion zwischen *Fkbp12* und *Yy1* methodisch bestätigen; eine Depletion von *Fkbp12* bzw. *Yy1* oder eine pharmakologische Disruption mit FK506 induzieren eine Expression von *Alk3 in vitro*. Eine tubuläre *Yy1*^{-/-}-Deletion führte im UO-Modell zu einer vermehrten Expression von *Alk3* und damit assoziierter Renoprotektion. Additive Effekte durch FK506-Supplementation konnten jedoch nicht erzielt werden (Tampe et al. 2018).

1.3.3 FKBP12/YY1-Komplexe reprimieren die ARNT-Expression

Da sich im *Cycloheximide-chase* keine *Alk3*-Transkription nach FK506-Supplementierung *in vitro* nachweisen lassen konnte, nahmen Tampe (2018) einen hypothetisch weiteren Mediator an, der translationsabhängig nach erfolgter YY1-FKBP12-Dissoziation die *Alk3*-Transkription induziert. Durch PCR-Array und Datenbankanalyse konnten sechs Transkriptionsfaktoren (AR, ARNT, CEPBP, CREB1, GATA3, MAX), die durch FK506-Stimulation induziert werden und zusätzlich ein Bindemotiv im proximalen *ALK3*-Promotor besitzen, identifiziert werden.

ARNT rückte damit als putativer determinierender Mediator der ALK3-Induktion in den nahen Fokus der Studien: In Knockdown- sowie Überexpressionsversuchen bestätigte sich, dass die FK506-vermittelte *Alk3*-Induktion von der *Arnt*-Transkription abhängig ist und von dem Transkriptionsfaktor ARNT mediiert wird.

Die *ARNT*-Transkription unterliegt dabei dem YY1-FKBP12-Repressorkomplex. Der Transkriptionsfaktor YY1 bindet an seinem Motiv im proximalen *ARNT*-Promotor und reprimiert somit die Transkription von *ARNT*. Eine FK506-Supplementierung führt durch Dissoziation des YY1-FKBP12-Repressorkomplex zu einer Lösung der Bindung zwischen YY1 und *ARNT*-Promoter; konsekutiv folgt eine gesteigerte transkriptionelle *ARNT*-Induktion (Tampe et al. 2018).

Funktionell kann sich ARNT zu Homodimeren-Komplexen (s. Kapitel 1.3.5) formieren und über Bindung palindromischer *enhancer box*-Motive (E-box) die transkriptionelle Aktivität seiner Zielgene regulieren (Antonsson et al. 1995; Swanson et al. 1995; Lee et al. 2004). Mittels Chromatin-Immunpräzipitation-PCR konnte nach FK506-Stimulation eine spezifische Bindung von Arnt, an sein (Homodimer-)Motiv 5'-CACGTG-3' im proximalen *Alk3*-Promotor nachgewiesen werden. Die Bindung von ARNT-Homodimer-Komplexen an die *ALK3*-Promotorregion aktiviert eine Expression von ALK3 (Tampe et al. 2018).

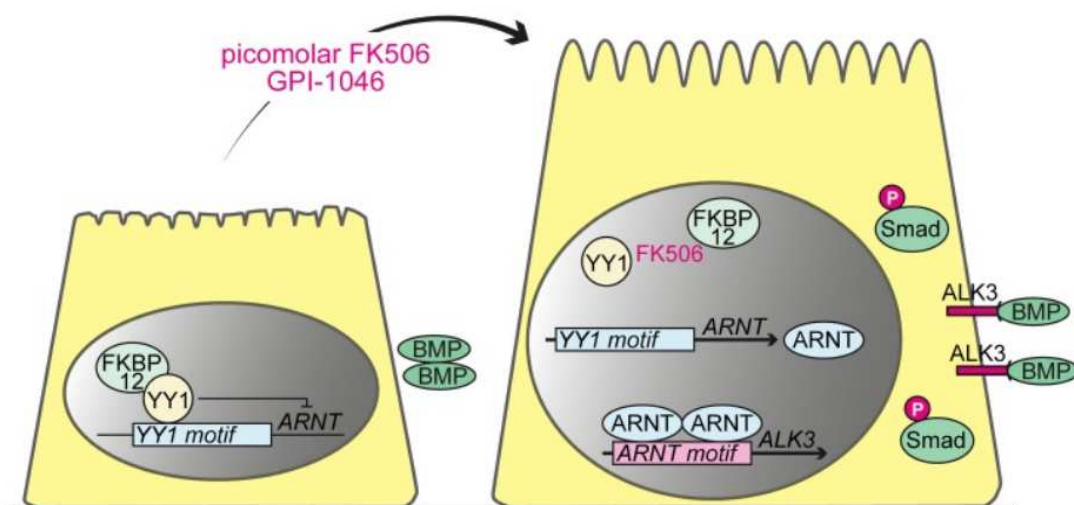


Abbildung 2: Schematische Darstellung des FKBP12/YY1/ARNT/ALK3-Signalwegs. Durch repressive FKBP12/YY1-Komplexe ist die *ARNT*-Transkription im Tubulusepithel gehemmt. Infolge einer Supplementation mit FK506 bzw. GPI-1046 dissoziieren die repressiven FKBP12/YY1-Komplexe und *ARNT* wird vermehrt transkribiert. ARNT-Homodimer-Komplexe formieren sich, binden an ihre spezifische *ALK3*-Promoterregion und induzieren eine verstärkte *ALK3*-Transkription. Konsekutiv folgt eine ALK3

vermittelte Renoprotektion über Aktivierung der BMP-pSMAD1/5/8-Singalkaskade. (Abbildung modifiziert nach Tampe et al. 2018). Lizenziert unter CC BY 4.0; <https://doi.org/10.1172/JCI89632>

1.3.4 Pharmakologische Modulation der FKBP12/YY1/ARNT/ALK3-Signalkaskade zur Organprotektion

Bei GPI-1046 handelt es sich um einen spezifischen FKBP12-Liganden aus der pharmakologischen Gruppierung aktiver niedermolekulare synthetischer Moleküle (Synonym: *small molecules*). Im Unterschied zu FK506 inhibiert GPI-1046 nicht die Phosphataseaktivität von Calcineurin und besitzt somit keine immunsuppressive Wirkung (Steiner et al. 1997). Trotz geringer Bindungsaffinität zwischen GPI-1046 und FKBP12 beschreibt die Literatur FK506-analoge Effekte durch GPI-1046 (Steiner et al. 1997; Graziani et al. 1999). Im Hinblick auf einen potentiell therapeutischen Nutzen von GPI-1046 und eine mögliche Modulation der FKBP12/YY1/ARNT/ALK3-Singalaxe folgte eine *In-vivo*-Studie im UUO-Mausmodell. GPI-1046 induziert die *Arnt*- sowie *Alk3*-Transkription und vermittelt über Aktivierung der kanonischen pSmad1/5/8-Singalkaskade eine Renoprotektion und Remission der Fibrosierung *in vivo*. Die Effekte zeigten sich vergleichbar einer niederdosierten FK506-Supplimentation und blieben ohne signifikante Unterschiede (Tampe et al. 2018).

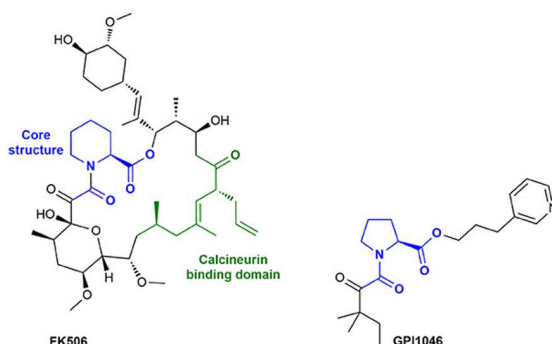


Abbildung 3: Vergleichende Strukturformeln von FK506 und GPI-1046. Modifiziert nach (Kolos et al. 2018). Lizenziert unter CC BY 4.0; <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01425>

Nachfolgend wurde die organprotektive Wirkung der GPI-1046-abhängigen Modulation der FKBP12/YY1/ARNT/ALK3-Singalaxe in zwei weiteren murinen Organsystemen modellhaft untersucht. Durch Implantation einer osmotischen Minipumpe, die kontinuierlich Angiotensin II freigibt, wurde eine kardiale Fibrose erzeugt. Zur Induktion einer Leberfibrose folgte in einem weiteren Mausmodell die Applikation von Tetrachlormethan (s. Kapitel 3.2.4.). Sowohl im kardialen als auch im hepatischen Schädigungsmodell induziert GPI-1046 eine Arnt-abhängige *Alk3*-Transkription und vermittelt über Aktivierung der pSmad1/5/8-Singalkaskade organprotektive Effekte sowie einen Schutz vor einer progredienten Fibrosierung (Tampe et al. 2018).

1.3.5 ARNT-Homodimerisierung

Das regulatorische Protein *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator* (ARNT) gehört zur dimerisierenden Familie der *basic helix-loop-helix*(bHLH)-Transkriptionsfaktoren und kann aufgrund seiner Per/ARNT/Sim(PAS)-Domäne der Subgruppe der bHLH-PAS-Transkriptionsfaktoren zugeordnet werden (Semenza et al. 1997; Kewley et al. 2004). Biochemisch handelt es sich bei ARNT um ein 789 Aminosäuren langes, 86 kDa großes, konstitutiv sowie abundant exprimiertes Protein (Mandl und Depping 2014). Die Expression von ARNT konnte u. a. in Herz, Lunge, Niere, Leber, Gehirn, Plazenta oder Milz nachgewiesen werden und ist in allen mammalischen Geweben ubiquitär. (Carver et al. 1994; Kewley et al. 2004). Strukturell besitzt ARNT, ausgehend vom Amino-Terminus, ein Kernlokalisierungssignal (*nuclear localization signal*; NLS). Importin- α/β -assoziiert tritt ARNT Liganden-unabhängig vom Zytoplasma in den Nukleus über und ist dort prädominant lokalisiert (Eguchi et al. 1997; Depping et al. 2008). Klassenspezifisch verfügt ARNT über ein N-Terminus-nahes bHLH-Motiv, das einerseits eine sequenzspezifische DNA-Bindung und andererseits eine Protein-Dimerisierung ermöglicht. Eine Dimerisierung mit anderen bHLH-Transkriptionsfaktoren ist folglich gegeben (Sogawa et al. 1995). Subgruppentypisch liegen zudem zwei evolutionär hochkonservierte PAS-Domänen (PAS-A, PAS-B) vor, die eine Stimuli-abhängige Dimerisierung der Transkriptionsfaktoren aktivieren (Huang et al. 1993; Levine und Perdew 2002; Kewley et al. 2004; Rankin und Giaccia 2008). Solche Stimuli sind beispielsweise Xenobiotika, Sauerstoff, Licht oder Hormone (McIntosh et al. 2010). Außerdem befindet sich am Carboxy-Terminus von ARNT eine potente Transaktivierungsdomäne (*transactivation domain*; TAD), die eine Aktivierung der Transkription der Zielgene mediiert (Sogawa et al. 1995; Rankin und Giaccia 2008).

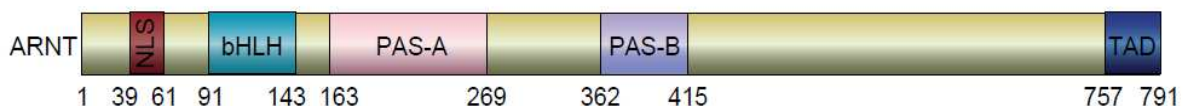


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von ARNT. Modifiziert nach (Crews 1998; Lindebro et al. 1995). Erstellt von G. Nyamsuren.

Da ARNT funktionell als nukleärer Dimerisierungspartner und Stabilisator anderer bHLH-PAS-Transkriptionsfaktoren agiert, wird ARNT *traditionell* der Klasse II der bHLH-PAS-Transkriptionsfaktoren zugerechnet. Hingegen sind bHLH-PAS-Transkriptionsfaktoren der Klassen I unmittelbar an der Gentranskription ihrer Zielgene beteiligt; bedeutende Vertreter dieser Klasse sind *aryl hydrocarbon receptor* (AHR), *hypoxia-inducible factor-alpha* (HIF- α) und *single-minded-1/2* (SIM 1/2). Eine Induktion der Transkriptionsaktivierung setzt jedoch eine Heterodimerisierung mit ARNT voraus (Swanson et al. 1995; Kewley et al. 2004; Lee et al. 2004). Initial wurde ARNT als Dimerisierungspartner von AHR (*Dioxinrezeptor*) im Kontext des xenobiotischen Metabolismus beschrieben (Hoffman et al. 1991). Nach Bindung von Xenobiotika wie Benzo[a]pyren, 2,3,7,8-Tetrachlordibenzodioxin oder polycyclische

aromatische Kohlenwasserstoffe, dissoziiert AHR von 90-kDa *heat-shock protein* (Hsp90), transloziert zum Nukleus und heterodimerisiert mit ARNT. Der aktivierte Transkriptionsfaktoren-Komplex AHR/ARNT bindet an *xenobiotic response elements* (XRE) seiner Zielgene, induziert letztlich die Expression Ahr-assoziierter Proteine (Bacsi und Hankinson 1996). ARNT ist zudem als Dimerisierungspartner von HIF- α essentiell für die Aufrechterhaltung der zellulären Sauerstoffhämostase (Kewley et al. 2004). Unter hypoxischen Konditionen ist die Sauerstoff-abhängige Degradation von HIF- α inhibiert, HIF- α transloziert in den Nukleus und heterodimerisiert mit ARNT. Aufgrund dieser Wirkungsweise im Kontext der Hypoxie wird ARNT auch als „HIF-1 β “ bezeichnet (Lee et al. 2004; Rankin und Giaccia 2008). Über eine Bindung an das *hypoxia responsive element* (HRE) aktiviert der HIF- α /ARNT-Komplex die Transduktion seiner Zielgene, die den Glukose-Metabolismus, Erythropoese oder Zellproliferation regulieren (Rankin und Giaccia 2008). Die obligate Funktion von ARNT zeigt sich im experimentellen Knockout von Arnt. Eine *Arnt*^{-/-}-Deletion führt ca. 10 \pm 0,5 Tage nach Gestation zur embryonalen Letalität (Kozak et al. 1997; Maltepe et al. 1997). Während der physiologische Mechanismus der kontinuierlichen HIF- α -Degradation verstanden ist, ist dieser bei der Degradation von ARNT nicht hinreichend bekannt (Choi et al. 2006; Rankin und Giaccia 2008; Mandl und Depping 2014; Kim et al. 2020). Eine experimentelle Curcumin- und Sulfonsäureamid-vermittelte Degradation von ARNT sind *in vitro* beschrieben (Choi et al. 2006; Kim et al. 2020).

Neben der bedeutenden Funktion von ARNT, mit anderen bHLH-PAS-Transkriptionsfaktoren zu heterodimerisieren, kann sich ARNT auch zu Homodimeren-Komplexen formieren (Sogawa et al. 1995). Über die Bindung palindromischer kanonischer E-box 5'-CACGTG-3'-Motive können ARNT-Homodimere, wie andere bHLH-PAS-Transkriptionsfaktoren auch, die Transkription ihrer Zielgene *in vitro* und *in vivo* induzieren (Antonsson et al. 1995; Sogawa et al. 1995; Swanson et al. 1995). Zudem besitzt ARNT eine eigenständige TAD, so dass unabhängig von einer Heterodimerisierung mit anderen bHLH-PAS-Transkriptionsfaktoren, ARNT-Homodimere auch transkriptionell aktiv sind (Lee et al. 2004). Während bei der Heterodimerisierung von AHR und ARNT die PAS-A-Domäne eine essentielle Funktion besitzt, konnte diese im Kontext der ARNT-Homodimerisierung nicht abschließend bestätigt werden (Huffman et al. 2001). Studien zur Homodimerisierung von ARNT erfolgten mithilfe von transgenem ARNT, die Evidenz von endogenen ARNT-Homodimeren und deren physiologische Funktion sind weitestgehend unbekannt (Antonsson et al. 1995; Sogawa et al. 1995; Huffman et al. 2001; Levine und Perdew 2002; Kewley et al. 2004).

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte die Evidenz und organprotektive Funktion von endogenen ARNT-Homodimeren innerhalb der FKBP12/YY1/ARNT/ALK3-Signalachse *in vitro* und *in vivo* demonstriert werden (s. Kapitel 1.3.3.). Zusammenfassend führt eine FK506- bzw. GPI-1046-Stimulation zu einer verstärkten *ARNT*-Expression. Infolgedessen wird eine Formierung von ARNT zu ARNT-Homodimeren begünstigt und es kommt damit zu einer vermehrten ARNT-Homodimer-Bildung. Methodisch konnte

mittels Ko-Immünpräzipitation und Blue Native-PAGE eine FK506-induzierte ARNT-Homodimer-Komplexierung *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden. Durch eine verstärkte Induktion der Expression des protektiven Alk3 verhindern ARNT-Homodimere eine progrediente Fibrosierung der Niere, Leber und des Herzen in verschiedenen Mausmodellen (Tampe et al. 2018).

1.4 Protein-Phosphatase-2A-Inhibitor

1.4.1 Protein-Phosphatase-2A

Posttranslationale Proteinmodifikation durch reversible Phosphorylierung ist ein zentraler Regulator eukaryotischer Zellfunktion (Mayer-Jaekel und Hemmings 1994). Eine Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren aktiviert diese und bedingt u. a. eine DNA-Bindung, eine Protein-Proteininteraktion und deren Translokation (Roach 1991; Levine und Perdue 2002). Die evolutionär hochkonservierte und ubiquitär exprimierte Protein-Phosphatase-2A (PP2A) gehört zur Superfamilie der Serin/Threonin-Phosphatasen und ist aufgrund ihrer dephosphorylierenden Aktivität an zahlreichen zellulären Prozessen beteiligt (Sontag und Sontag 2014; Wlodarchak und Xing 2016). Innerhalb ihrer Superfamilie ordnet sich die PP2A u. a. mit PP1 und Calcineurin (PP2B) der Subgruppe der Phosphoprotein-Phosphatase zu (Nygren und Scott 2016; Wlodarchak und Xing 2016). Die PP2A ist ein heterotrimeres Enzym und besteht aus drei variablen Untereinheiten: Die Untereinheit A ist von struktureller Funktion und kann, wie die katalytische Untereinheit C als Isoform α oder β vorliegen. Die regulatorische Untereinheit B ist gewebespezifisch und determiniert die funktionelle Spezifität; insgesamt sind 23 Isoformen beschrieben. Natürliche Proteinphosphatase-Inhibitoren wie Okadasäure, Calyculin A oder Fostriecin binden direkt an die katalytische Untereinheit C (PP2Ac) und hemmen die Phosphataseaktivität (Eichhorn et al. 2009; Sontag und Sontag 2014; Hong et al. 2015). Die Relevanz der PP2Ac-Aktivität konnte auch im Kontext der CKD und der Fibrogenese identifiziert werden (Deng et al. 2016). Zudem trägt eine Dysregulation PP2A-abhängiger Signalwege zur Entstehung von Malignomen, Leukämien und neurodegenerativen Erkrankungen bei; eine PP2A-Inhibition, als ein potentieller Therapieansatz, ist jüngst von verstärktem wissenschaftlichen Interesse (Bai et al. 2014; Hong et al. 2015; Hu et al. 2017; Ho et al. 2018; Conlon et al. 2018; D'Arcy et al. 2019; Bryant et al. 2021).

1.4.2 Relevanz der PP2A-Inhibition

Der von marinen Dinoflagellaten produzierte Proteinphosphatase-Inhibitor Okadasäure (OA), akkumuliert in Schwämmen (*halichondria okadaii*) sowie Muscheln, führt bei Verzehr zu einer diarrhäischen Muschelvergiftung (Yasumoto et al. 1978; Holmes et al. 1990). Bei OA handelt es sich um einen potenten Inhibitor der katalytischen Untereinheit C von PP1 und PP2A. Die Affinität von OA zu PP1 und PP2A ist dabei konzentrationsabhängig (Cohen et

al. 1990). Levine und Perdeu (2002) konnten *in vitro* demonstrieren, dass eine OA-Stimulation zu einer verstärkten Formierung von ARNT-Homodimeren führt. Diese Modulation bedingt eine vermehrte Bindung der ARNT-Homodimeren an der E-box, infolgedessen die Transaktivierung hochreguliert wird. Levine und Perdeu (2002) postulierten, dass die transkriptionelle Aktivität der ARNT-Homodimere vom Phosphorylierungsstatus von ARNT abhängig ist. In der Studie wurde nicht näher differenziert, ob die Homodimerisierung von ARNT in Abhängigkeit der Inhibition von PP1 oder PP2A erfolgt und welchem Mechanismus die Homodimerisierung unterliegt.

Das von verschiedenen Ölkäfern (*meloidae*) synthetisierte Cantharidin ist im Unterschied zu OA ein spezifischer PP2A-Inhibitor (Cohen et al. 1990; Li und Casida 1992). Aufgrund der Pharmakokinetik und der Toxizität findet Cantharidin jedoch, genauso wie OA, keine klinische Anwendung (Ho et al. 2018; D'Arcy et al. 2019). Ein strukturelles Derivat von Cantharidin stellt dabei das neuartige *small molecule* LB-100 (LIXTE Biotechnology Holdings, Inc. Pasadena (CA), USA) dar (Hong et al. 2015; D'Arcy et al. 2019). LB-100 ist ein membrangängiger sowie spezifischer Inhibitor der katalytischen Untereinheit C der PP2A und partiell der PPP5c (Lu et al. 2009; Zhang et al. 2010; D'Arcy et al. 2019). In präklinischen Studien konnte LB-100 bereits als ein potenter Chemo- und Radiosensitizer mit einer additiven tumorsuppressiven Wirkung etabliert werden (Bai et al. 2014; Hong et al. 2015; Hu et al. 2017; Ho et al. 2018; Conlon et al. 2018; D'Arcy et al. 2019; Bryant et al. 2021). Basierend auf den Ergebnissen präklinischer Studien, wird LB-100 aktuell in Phase II-Studien zur Behandlung von Glioblastomen (NCT03027388) und des Myelodysplastischen Syndroms (NCT03886662) sowie Phase I-Studien der Therapie fortgeschrittener Kleinzelliger Lungenkarzinome (NCT04560972) evaluiert (ClinicalTrials.gov 2022).

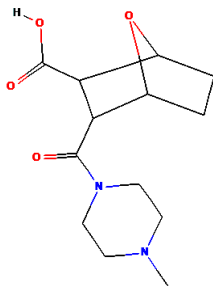


Abbildung 5: Strukturformel LB-100. (National Center for Biotechnology Information. PubChem. 2022)

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die progrediente Fibrosierung und der konsekutive Verlust des funktionellen Parenchyms der chronisch geschädigten Niere ist ein ungelöstes medizinisches Problem. Über die FKBP12/YY1/ARNT/ALK3-Signalachse vermitteln FK506 und GPI-1046 eine therapeutische Hemmung der Fibrosierung in multiplen Organsystemen. Der bHLH-PAS-Transkriptionsfaktor ARNT formiert sich zu Homodimeren-Komplexen und induziert dabei die Expression des antifibrotischen ALK3. Während FK506 und GPI-1046 die

Transkription des protektiven *ARNT* aktivieren, führt eine Stimulation mit dem PP1/PP2A-Inhibitor Okadasäure zu einer verstärkten Formierung von ARNT-Homodimeren. Der Mechanismus der Homodimerisierung von ARNT ist dabei nicht abschließend geklärt.

Zentrales Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, einen potentiellen Mechanismus der Formierung von ARNT-Homodimeren zu identifizieren und therapeutische Effekte durch eine pharmakologische Modulation von ARNT-Homodimere im chronischen Nierenversagen nachzuweisen. Folgende Fragestellungen galt es initial zu beantworten: Eine PP1/PP2A-Inhibition verstärkt die Bildung von ARNT-Homodimeren. Die Inhibition welcher spezifischen Proteinphosphatase-Aktivität ist für die Formierung von ARNT Homodimeren relevant? Studien zur Homodimerisierung von ARNT erfolgten bislang mithilfe von transgenem ARNT. Lassen sich endogene ARNT-Homodimere in der Säugerzelle nachweisen?

Mit Identifikation der durch PP2A-Inhibition induzierten Bildung von ARNT-Homodimeren ergaben sich nachstehende weitere Fragestellungen: Welchem Mechanismus unterliegt die PP2A-Inhibition-abhängige Bildung von ARNT-Homodimeren? Inwiefern hat die PP2A-Inhibition einen Einfluss auf die FKBP12/YY1/ARNT/ALK3-Signalachse?

Da ARNT-Homodimere eine Organprotektion über ALK3-Induktion vermitteln, sollte der therapeutische Nutzen der Modulation von ARNT-Homodimeren untersucht werden. Es galt folgende Fragen zu beantworten: Können ARNT-Homodimere in der murinen UUO-Niere nachgewiesen werden? Kann eine PP2A-Inhibition durch induzierte Bildung von ARNT-Homodimeren die Renoprotektion von FK506 und GPI-1046 additiv verstärken?

In vorangegangenen Studien konnte bereits nachgewiesen werden, dass FK506 und GPI-1046 über die FKBP12/YY1/ARNT/ALK3-Signalachse die hepatische Fibrogenese im CCL₄-Modell mildern: Kann eine PP2A-Inhibition, durch induzierte Bildung von ARNT-Homodimeren, die Hepatoprotektion von FK506 und GPI-1046 additiv verstärken?

2 Material

2.1 Gebrauchsmaterialien

Adhäsionsobjektträger, SuperFrost® Plus	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), USA
Deckglas, Microscope Cover Slips 24x40 mm	Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Einbettkassetten, Rotilabo®	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Einwegkanüle, BD Microlance, 27 G	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (NJ), USA
Feindosierungsspritze, Injekt-F, 1ml	B. Braun SE, Melsungen, Deutschland
Filterpapier	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (CA), USA
Filterspitzen, 10, 100, 1000 µl, Biosphere®	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Gefrierbehälter, Mr. Frosty™	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), USA
Glas-Pasteurpipetten	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kryoröhrchen, Nunc CryoTube™ Vials 1,8 ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), USA
Markierungsstift, Superior, Marienfeld	Biosystems Switzerland AG, Muttenz, Schweiz
MicroAmp® Fast 8-Tube Strip	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0,1 ml	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Mikropipetten, 10, 100, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mehrkanalpipette (8-Kanal, 100 µl)	
Mikroröhrchen mit Schraubverschluss, 1,5ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), USA

Nahtmaterial, nicht resorbierbar, Prolene 6-0	Ethicon, Inc., Raritan (NJ), USA
Nahtmaterial, resorbierbar, Vicryl 4-0,	Ethicon, Inc., Raritan (NJ), USA
Polyacrylamid-Mini-Gel-System, NativePAGE Bis-Tris	life technologies™, Novex®, Carlsbad (CA), USA
Polyacrylamid-Mini-Gel-System, NuPAGE 4-12 % Bis-Tris and Bolt Bis-Tris Plus Gels (10-well / 15-well)	life technologies™, Novex®, Carlsbad (CA), USA
Reaktionsgefäße, Safe Look Tubes 1.5, 2ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Röhrchen, Tubes, 15 / 50ml CELLSTAR® Polypropylen Röhrchen (Falcon)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Serologische Pipette, 5, 10, 25, 50 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Skalpelle, FEATHER	Safety Razor Co., Osaka, Japan
Stahlkugeln, Stainless Steel Beads, 5mm	Qiagen, Hilden, Deutschland
Sterilfilter, Steril Filter Unit, 0,5-0,22 µm	Millex, Billerica (MA), USA
TC-Zellkulturflasche für adhärente Zellen, steril, T-25, T-75	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Zellkultur Multiwellplatte, 6-Well, transparent CELLSTAR®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatte, 96-Well	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturschale, TC-Schale 100 Cell+	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Zellzählungs-Kammerobjektträger, Countess™ Cell Counting Chamber Slides	Invitrogen™, Carlsbad (CA), USA

2.2 Chemikalien und Reagenzien

20X LumiGLO® Reagent and 20X Peroxide	Cell Signaling, Danvers (MA), USA
Albumin Fraktion V	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Amphotericin B, 250 µg/ml	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland

Bouin'sche Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
cOmplete ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
DAPI	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat Merck	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Direkt Rot 80	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
dNTP Mix (10 mM ea)	Invitrogen™, Carlsbad (CA), USA
Dulbecco's PBS Gibco® (DPBS 1X)	life technologies™, Gibco ®, Carlsbad (CA), USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium, low glucose, pyruvate, (DMEM 1X)	life technologies™, Gibco ®, Carlsbad (CA), USA
Eindeckmittel, Entellan®	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Eosin G-Lösung 0,5 %, wässrig	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Epredia™ Shandon™ Immu-Mount™, Eindeckmittel, nicht permanent	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), USA
Essigsäure 100 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Fast Green FCF	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fast SYBR™ Green Master Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), USA
Fetales Kälberserum	life technologies™, Gibco ®, Carlsbad (CA), USA
Forene® 100 % (V/V), Wirkstoff: Isofluran	AbbVie GmbH & Co. KG, Ludwigshafen am Rhein, Deutschland
Hämalaunlösung, sauer nach Mayer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent	Invitrogen™, Carlsbad (CA), USA
Metamizol (500 mg/ml)	Sanofi, Paris, Frankreich

Methanol ≥ 99 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver, Blotting Grade	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nitrocellulose Blotting Membrane 0,45 μm NC, Amersham TM Protran Premium	Amersham Bioscience Europe GmbH, Freiburg, Deutschland (GE Healthcare)
Novex [®] Sharp Pre-Stained Protein Standard	life technologies TM , Novex [®] , Carlsbad (CA), USA
Novex TM NuPAGE TM Transferpuffer (20x)	life technologies TM , Novex [®] , Carlsbad (CA), USA
NP40 Cell Lysis Buffer	Invitrogen TM , Carlsbad (CA), USA
Nuklease-freies Wasser	Qiagen, Hilden, Deutschland
NuPAGE [®] MOPS SDS Running Buffer	life technologies TM , Novex [®] , Carlsbad (CA), USA
Oligo(dt) 12-18 Primer	Invitrogen TM , Carlsbad (CA), USA
Opti-MEM [®] I Reduced Serum Media (1X)	life technologies TM , Gibco [®] , Carlsbad (CA), USA
Pen Strep, Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	life technologies TM , Gibco [®] , Carlsbad (CA), USA
Perjodsäurelösung 1 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Phosphataseinhibitor Cocktail 2	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
Phosphatgepufferte Formaldehydlösung, ROTI [®] Histofix 4 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pierce TM Fast Semi-Dry Transfer Buffer (10X)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), USA
Pikrinsäure-Lösung 1,3 %	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
PVDF Membrane, Filter Paper Sandwich, 0,2 μm Pore Size	life technologies TM , Novex [®] , Carlsbad (CA), USA
RNaseOUT TM Recombinant Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen TM , Carlsbad (CA), USA
Schiffs Reagenz	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Stripping Puffer, Restore TM Western Blot Stripping-Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), USA
SuperScript TM II Reverse Transcriptase	Invitrogen TM , Carlsbad (CA), USA

Target Retrieval Solution, Citrate pH 6.1 (10x)	Dako, Glostrup, Dänemark
Trifluoressigsäure 99.5 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
TRIS Puffer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRIzol™ Reagent	Invitrogen™, Carlsbad (CA), USA
Trypan Blue Stain (0.4%)	life technologies™, Gibco®, Carlsbad (CA), USA
Trypsin-EDTA-Lösung (0,25 %)	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
Tween® 20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonolaurat)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylol (Isomere) ≥98,5 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.3 Kitsysteme

Pierce™ BCA™ Protein Assay	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), USA
Bca™ Reagent A	2x 500 ml
Bca™ Reagent B	1x 25 ml
Albumin Standard Ampules, 2mg/ml	10x 1 ml
NativePAGE™ Sample Prep Kit	life technologies™, Novex®, Carlsbad (CA), USA
DDM (Dodecyl-β-D-maltosid), 10 %	1x 1 ml
Digitonin, 5 %	1x 1 ml
NativePAGE™ 4X Sample Buffer	1x 10 ml
NativePAGE™ 5 % G-250 Sample Additive	1x 0,5 ml
Novex™ NativePAGE™ Laufpuffer-Kit	life technologies™, Novex®, Carlsbad (CA), USA
NativePAGE™ Running Buffer (20X)	1x 1000 ml

NativePAGE™ Cathode Buffer Additive (20X)	1x 250 ml
Immunoprecipitation Kit (Protein G)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Core buffer, Lösung von 250 mM Tris-HCl, pH 7.5	1x 50 ml
NaCl, Lösung von 1 M NaCl	1x 50 ml
Detergent mix, Lösung von 10 mM Tris-HCl, 10 % Nonidet P40, 5 % sodiumdeoxycholate, pH 7.5	1x 15 ml
Complete Protease inhibitor cocktail, Tablette	5 Tabletten
Protein-G-agarose	1x 1 ml
PureLink RNA Mini Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), USA
Lysis Buffer	125 ml
Wash Buffer I	50 ml
Wash Buffer II	15 ml
RNase-Free Water	15,5 ml
Spin Cartridges	50 Stück
Collection Tubes	50 Stück
Recovery Tubes	50 Stück
Trichrom-Färbungskit (Masson)	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
Biebrich-Scharlachrot-Säurefuchsin-Lösung, HT15-1	250 ml
Phosphorwolframlösung, HT15-2	250 ml
Phosphormolybdänsäure-Lösung, HT15-3	250 ml
Anilinblau-Lösung	250 ml

Weigerts Eisenhämatoxylin Kit	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
Eisenhämatoxylin-Lösung nach Weigert, Part A, HT107	500 ml
Eisenhämatoxylin-Lösung nach Weigert, Part B, HT109	500 ml
Cell Proliferation Kit I (MTT)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
MTT labeling reagent, 1x conc	3x 5 ml
Solubilization buffer, 1x conc.	3x 90 ml
Dynabeads™ Protein G Immunoprecipitation Kit	G Invitrogen™, Carlsbad (CA), USA
Dynabeads™ Protein G	2 ml
Ab Binding & Washing Buffer	16 ml
Washing Buffer	28 ml
Elution Buffer	1 ml

2.4 Software

Adobe Illustrator 26.1	Adobe, San Jose (CA), USA
cell^D	OLYMPUS SIS, Münster, Deutschland
cellSens Dimension 1.6	OLYMPUS SIS, Münster, Deutschland
Citavi 6.11.0	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz
GraphPad Prism 9.2	GraphPad Software, La Jolla (CA), USA
Image Lab 5.0 Software	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (CA), USA
ImageJ 1.53	NIH, Bethesda (MD), USA
Microsoft Office 2021	Microsoft, Redmond (WA), USA
StepOnePlus™ Software v2.3	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

2.5 Geräte

Analysewaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Ausgießstation Leica EG 1120H	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Autoklav	Biosciences, Fernwald, Deutschland
Blot-Modul, XCell II	Invitrogen™, Novex®, Carlsbad (CA), USA
CCD-Kamera, OLYMPUS XM10	OLYMPUS, Hamburg, Deutschland
ChemiDoc™ MP System	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (CA), USA
CO ₂ -Inkubator/CO ₂ -Brutschrank, Sanyo MCO-20AIC	Sanyo Denki K.K., Moriguchi, Japan
Dampfgarer, BRAUN, 3216	BRAUN GmbH, Kronberg, Deutschland
Eismaschine, AF80	Scotsman-ice, Vernon Hills (IL), USA
Farbkamera, OLYMPUS SC30	OLYMPUS, Hamburg, Deutschland
Fastblot™B44 Biometra	Analytik Jena AG, Deutschland
Fluoreszenzkamera ColorView	Olympus, Münster, Deutschland
Gefrierschrank, Premium NoFrost	LIEBHERR, Bulle, Schweiz
Gelelektrophorese-Kammer, XCell SureLock Mini-Cell	Invitrogen™, Novex®, Carlsbad (CA), USA
Gewebeinfiltrationsautomat, Leica TP1020	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Inkubationsschüttler, Thriller	VWR Peqlab, Radnor (PA), USA
Kühlschrank	LIEBHERR, Bulle, Schweiz
Kühlzentrifuge, Mikroliterzentrifuge R5424	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Magnetrührer	IKAMAG RCT IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Massenspektrometer, Q Exactive™ Plus Hybrid Quadrupole-Orbitrap™	Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), USA
Mikroskop, Axiovert S100 TV	ZEISS, Oberkochen, Deutschland
Mikroskop, Nikon Eclipse TS100	Nikon Corporation, Tokio, Japan
Mikroskop, OLYMPUS BX43	OLYMPUS, Hamburg, Deutschland
Mikrotom, Leica RM 2165	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland

Multi-Detektions-Reader, Synergy™ 2 Multi-Mode Microplate Reader	BioTek Instruments, Inc., Winooski (VT), USA
Paraffinstreckbad, GFL 1052	GFL-GmbH, Burgwedel, Deutschland
pH-Meter, MP 220	Mettler Toledo, Columbus (OH), USA
Pipettierhilfe, pipetus®	Hirschmann®, Eberstadt, Deutschland
Plattformschüttler, Rotamax 120	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Reagenzschüttler, Heidolph REAX top	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Rollermixer, SRT6	Bibby Scientific, Stuart®, Staffordshire, UK
Rotator, Labquake	Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), USA
Sicherheitsbunsenbrenner, FIREBOY	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal, Deutschland
Spannungsgerät, Electrophoresis Power Supply, Ev2xx Serie	VWR International, Radnor (PA), USA
Spektralphotometer ,NanoDrop™ 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), USA
Spektrometer Typ MALDI-TOF - rapifleX™	Bruker Corporation, Billerica (MA), USA
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Sterilbank, Kojair Biowizard SL 130	Kojair Tech Oy, Mänttä-Vilppula, Finnland
Stickstofftank, APOLLO	Messer Griesheim, Deutschland
The Belly Dancer	Stovall Life science incorporated, Greenboro (NC), USA
Thermocycler Mastercycler ep gradient S	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Thermomixer® 5355 Comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
TissueLyser LT	Qiagen, Hilden, Deutschland
Trockenschrank	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland
Ultrasonic Liquid Processors S-4000	Misonix Sonicators, Newtown (CT), USA

Ultratiefkühlgerät, MDF-U54V	SANYO biomedical, Wood Dale (IL),USA
Vakuumpumpe, VACUSAFE	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal, Deutschland
Vortex Genie 2™	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Wasserbad, WNB 7	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland
Zellzähler, Invitrogen™ Countess™ Automated Cell Counter	Invitrogen™, Carlsbad (CA), USA
Zentrifuge, ROTOFIX 32 A	Andreas Hettich GmbH & Co., Tuttlingen Deutschland

2.6 Allgemeine Puffer und Lösungen

10xPBS (pH 7,25)

NaCl	80 g
KCL	10 g
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	6,5 g
K ₂ HPO ₄ x 3H ₂ O	5 g
ddH ₂ O	1000 ml

TBS (10x), pH 7,5

NaCl	87,6 g
Tris	60,5 g
ddH ₂ O	1000 ml

2.6.1 Puffer und Lösungen für SDS Page und Western Blotting

TBS-T (1x)

TBS (10x)	100 ml
Tween 20	1 ml
ddH ₂ O	899 ml

2 % Waschlösung

TBS-T (1x)	200 ml
Milchpulver	4 g
Tween 20	200 μ l

5 % Blocklösung

TBS-T (1x)	10 ml
Milchpulver	0,5 g
Tween 20	40 μ l

Laufpuffer (SDS-Page)

NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20x)	50 ml
ddH ₂ O	950 ml

Lysispuffer (SDS-Page)

NP40 Cell Lysis Buffer	10 ml
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	100 μ l
cOmplete ULTRA Tablets	1 Tablette

LDS-Probenpuffer (SDS-Page)

Novex™ NuPAGE™ LDS-Probenpuffer (4x)	200 μ l
β -Mercaptoethanol	80 μ l
ddH ₂ O	120 μ l

Transferpuffer (SDS-Page)

Pierce™ Fast Semi-Dry Transfer Buffer (10x)	5 ml
Methanol \geq 99 %	13 ml
ddH ₂ O	82 ml

2.6.2 Puffer und Lösungen für Nativ Page und Western Blotting

Lysispuffer (Native-Page)

DDM (Dodecyl- β -D-maltosid), 10 %	100 μ l
Digitonin, 5 %	200 μ l
NativePAGE™ 4X Sample Buffer	250 μ l
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	10 μ l
ddH ₂ O	440 μ l

Anoden-Laufpuffer (Native-Page)

NativePAGE™ Running Buffer (20X)	50 ml
ddH ₂ O	950 ml

Kathoden-Laufpuffer „Dark Blue“ (Native-Page)

NativePAGE™ Running Buffer (20X)	50 ml
NativePAGE™ Cathode Buffer Additive (20X)	50 ml
ddH ₂ O	900 ml

Kathoden-Laufpuffer „Light Blue“ (Native-Page)

NativePAGE™ Running Buffer (20X)	50 ml
NativePAGE™ Cathode Buffer Additive (20X)	5 ml
ddH ₂ O	945 ml

Transferpuffer (Native-Page)

Novex™ NuPAGE™ Transferpuffer (20x)	50 ml
ddH ₂ O	950 ml

Fixationspuffer (Native-Page)

Essigsäure 100 %	10 ml
Methanol \geq 99 %	25 ml

ddH₂O 65 ml

2.6.3 Puffer und Lösungen für Immunpräzipitation

Lysispuffer/Waschpuffer 1 (Kitsystem)

Core buffer, Lösung von 250 mM Tris-HCl 5 ml
NaCl, Lösung von 1 M NaCl 3,75 ml
Detergent mix 2,5 ml
Complete Tablette 1 Tablette
ddH₂O 13,75 ml

Waschpuffer 2 (Kitsystem)

Core buffer, Lösung von 250 mM Tris-HCl 10 ml
NaCl, Lösung von 1 M NaCl 25 ml
Detergent mix 0,5 ml
ddH₂O 14,5 ml

Waschpuffer 3 (Kitsystem)

Core buffer, Lösung von 250 mM Tris-HCl 1 ml
Detergent mix 0,25 ml
ddH₂O 23,75 ml

2.6.4 Puffer und Lösungen für Histochemie und Immunfluoreszenz

Pikro-Siriusrot-Lösung 0,1 %

Pikrinsäure-Lösung 1,3 % 100 ml
Direkt Rot 80 0,1 g

Fast Green-Lösung 0,1 %

Fast Green FCF 0,1 g
Essigsäure 1 % 100 ml

Citratpuffer

Target Retrieval Solution, Citrate pH 6.1	10 ml
(10x)	
ddH ₂ O	90 ml

BSA-Blocklösung (1 %)

Albumin Fraktion V	0,5 g
PBS	50 ml

Die genannten Puffer und Lösungen wurden mit zweifach entsalztem Wasser aus der Millipore-Anlage MilliQ angesetzt.

2.7 Antikörper

Tabelle 2: Verwendete Antikörper für Western Blot, Immunpräzipitation, Ko-Immunpräzipitation, Immunfluoreszenz und Immunhistochemie

Antikörper	Spezies	Hersteller	Verdünnung
AHR monoklonal IgG	Maus	Invitrogen™, Carlsbad (CA), USA (Cat.-No.: MA1-514)	WB: 1:1000
Alexa Fluor 488 dye, Ziege-anti- Maus polyklonal IgG	Ziege	Invitrogen™, Carlsbad (CA), USA (Cat.-No.: A-11001)	IF: 1:250
Alexa Fluor 568 dye, Ziege-anti- Maus polyklonal IgG	Ziege	Invitrogen™, Carlsbad (CA), USA (Cat.-No.: A-11031)	IF: 1:250
ALK3/BMPRI1A monoklonal IgG	Maus	Invitrogen™, Carlsbad (CA), USA (Cat.-No.: MA5-17036)	WB: 1:1000
Alpha-Smooth- Muscle-Actin monoklonal IgG	Maus	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA (Cat.- No.: A5228)	IF: 1:500
ARNT/HIF-1 β	Kaninchen	Cell Signaling, TECHNOLOGY®, Danvers (MA), USA (Cat.-No.: D28F3)	WB: 1:1000

Antikörper	Spezies	Hersteller	Verdünnung
monoklonal IgG			IF: 1:100
Collagen I polyklonal IgG	Kaninchen	abcam, Cambridge, UK (Cat.-No.: ab34710)	IF: 1:200
EGFP monoklonal IgG	Maus	Invitrogen™, Carlsbad (CA), USA (Cat.-No.: MA5-15256)	WB: 1:1000 PLA: 1:100
GAPDH monoklonal IgG	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas (TX), USA (Cat.-No.: sc-47724)	WB: 1:8000
Goat Anti-Type I Collagen-Alexa Fluor® 488	Ziege	Southern BioTech Birmingham (AL), USA (Cat.-No.: 1310-30)	IF: 1:250
HIF-1 α monoklonal IgG	Maus	Invitrogen™, Carlsbad (CA), USA (Cat.-No.: MA1-16511)	WB: 1:1000
HIF-2 α polyklonal IgG	Kaninchen	abcam, Cambridge, UK (Cat.-No.: ab20654)	WB: 1:1000
HRP-konjugiertes Kaninchen-anti- Maus polyklonal IgG	Kaninchen	Dako, Glostrup, Dänemark, Cat.-No.: P 0161)	WB: 1:2000
HRP-konjugiertes Ziege-anti- Kaninchen polyklonal IgG	Ziege	Cell Signaling, TECHNOLOGY®, Danvers (MA), USA (Cat.-No.: 7074)	WB: 1:2000
Maus IgG monoklonal IgG	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas (TX), USA (Cat.-No.: sc-2025)	IP: 1:1000
Myc-Tag monoklonal IgG	Maus	Cell Signaling, TECHNOLOGY®, Danvers (MA), USA (Cat.-No.: 9B11)	WB: 1:1000 PLA: 1:100
pSMAD158 polyklonal IgG	Kaninchen	Cell Signaling, TECHNOLOGY®, Danvers (MA), USA (Cat.-No.: 13820)	WB: 1:1000

2.8 Primer

Tabelle 3: Verwendete Primer für qRT-PCR

Bezeichnung	Primer Vorwärtsstrang
Spezies: Maus	Primer Rückwärtsstrang
<i>Alk3</i>	5'-TGGCACTGGTATGAAATCAGAC-3' 5'-CAAGGTATCCTCTGGTGCTAAAG-3'
<i>Arnt</i>	5'-TCTCCCTCCCAGATGATGAC-3' 5'-CAATGTTGTGTCTCGGGAGATG-3'
<i>Gapdh</i>	5'-TGACCTCAACTACATGGTCTACA-3' 5'-CTTCCCATTTCTCGGCCTTG-3

2.9 Stimulanzien

Tabelle 4: Verwendete Stimulanzien in Zell- und Tierversuchen

Bezeichnung	CAS-Nummer	Hersteller
Cycloheximid	CAS 66-81-9	Merck, Darmstadt, Deutschland
FK506	CAS 104987-11-3	abcam, Cambridge, UK
GPI-1046	CAS 186452-09-5	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas(TX), USA
LB-100	CAS 1026680-07-8	Selleck Chemicals LLC, Houston (TX), USA
Okadasäure	CAS 78111-17-8	Cell Signaling, TECHNOLOGY®, Danvers (MA), USA
Tautomycetin	CAS 119757-73-2	Tocris Bioscience, Bristol, UK
Tetrachlormethan	CAS 56-23-5	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA

2.10 Expressionsvektoren

ARNT-EGFP

ARNT-myc

Ser77/Asp-mut-ARNT-EGFP

Ser77/Asp-mut-ARNT-myc

2.11 Zelllinien

Die Zelllinie HEK293-Zellen (ATCC CRL-1573) entstammt humanen embryonalen Nierenzellen, die durch Transfektion mit DNA-Abschnitten des Adenovirus 5 entwickelt worden sind (Graham et al. 1977). In Folge dessen exprimieren HEK293-Zellen E1A/ E1B; die Apoptose ist hierdurch inhibiert, die Zellen leicht transfizierbar und die Transkriptionsfähigkeit verstärkt. HEK293-Zellen sind zudem hypotriploid und besitzen einem komplexen und variierenden Karyotypen (Berk 2005). HEK293-Zellen wachsen adhärent. Die Zelllinie wurde vom Hersteller *American Type Culture Collection*, USA bezogen.

Die MCT-Zelllinie (CVCL_0416) wurde aus proximalen tubuloepitheliale Zellen des renalen Kortex von SJL/J Mäusen gewonnen. Anschließend wurden die Zellen mittels Simian-Virus 40 immortalisiert und damit für die Langzeit-Zellkultivierung etabliert. MCT-Zellen exprimieren u. a. Kollagen IV, V und Lamin, in der Zusammensetzung ähnelt dies der Basalmembran. Zudem weisen MCT-Zellen *epidermal growth factor* (EGF)-Rezeptoren auf. MCT-Zellen wachsen adhärent (Haverty et al. 1988). Die Zellen entstammen aus dem Vorrat der Arbeitsgruppe Zeisberg und wurden ehemals aus dem Labor Eric G Neilson bezogen.

2.12 Murines Nierengewebe und Lebergewebe

Eine Genehmigung für die Tierversuchsvorhaben erfolgte vonseiten der Tierschutzkommission der Universitätsmedizin Göttingen und des Weiteren durch das Dezernat 33 des Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVIS) (Aktenzeichen: G16/2322). Die Tierstudien wurden nach ARRIVE-Richtlinie gestaltet (Kilkenny et al. 2010). Für die Versuche wurden 8-12 Wochen alte C57BL/6J Wildtyp-Mäuse verwendet. Die Unterbringung der Tiere erfolgte im European Neuroscience Institute Göttingen (ENI), als auch in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE), der Universitätsmedizin Göttingen (UMG). Die Tiere wurden in individuell belüfteten Käfigsystemen gehalten. Konstante Umgebungsbedingungen wie Temperatur und Luftfeuchtigkeit, als auch ein zwölfständiger Tag-Nacht-Rhythmus waren gegeben. Alle 48 Stunden wurden die Tiere zudem mit Nahrung und frischem Trinkwasser versorgt. Die Tiere wurden während des Versuchs regelmäßig veterinärmedizinisch begutachtet.

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Allgemeine Arbeitstechnik

Alle Arbeitsschritte im Rahmen der zellbiologischen Methoden wurden unter kontaminationsfreien Bedingungen an der Sterilbank durchgeführt. Vor und nach den einzelnen zellbiologischen Tätigkeiten wurde das Innere der Sterilbank mit 70%igen Ethanol und UV-Licht (für 30 Minuten) desinfiziert. Nur autoklavierte bzw. sterile Materialien wurden für die Arbeit an den Zellkulturen verwendet. Die Zelllinien wurden bei einer Temperatur von 37 °C, bei 95%iger Luftfeuchtigkeit und einem CO₂-Gehalt von 5 % im CO₂-Inkubator kultiviert. Die Zellzahl wurde durch den Countess™ Zellzähler ermittelt, hierfür wurden 10 µl einer Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau verdünnt, auf einen Zellzählungs-Kammerobjektträger, gegeben und in den Zellzähler eingegeben. Die Vitalität und Konfluenz der Zellen wurde unter dem Mikroskop Nikon Eclipse TS100 täglich beurteilt. Zellexperimente wurden bei einer etwa 80%igen Konfluenz der Zellen durchgeführt.

3.1.2 Kultivierung der Zellen

Die verwendeten Zelllinien wurden in DMEM-Nährmedium mit 10%igen Zusatz von FCS und bei Beigabe von Amphotericin B, Penicillin und Streptomycin (jeweils 1 %) angezüchtet. Das FCS wurde initial einmalig gefiltert. Die Zelllinien wurden bei -80 °C gelagert; die Zellen wurden bei Raumtemperatur kurz angetaut, in ein 15-ml-Röhrchen gegeben, mit 5 ml DMEM-Vollmedium versetzt und durch Zentrifugation bei 1200 U/min für fünf Minuten pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in einer T-75 Zellkulturflasche ausgesät am Folgetag wurde das DMEM-Vollmedium gewechselt.

Während der Wachstumsphase folgte alle zwei Tage ein Wechsel des DMEM-Vollmediums. Hierfür wurde eine Glas-Pasteurpipette über einem Bunsenbrenner kurz erhitzt, das alte Medium abgesaugt und – durch ein Wasserbad – aufgewärmtes Vollmedium vorsichtig dazugegeben. Bei Erreichen einer 70-80%igen Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Das verbrauchte Medium wurde abgesaugt, die Zellen wurden einmalig mit PBS gewaschen und für drei Minuten mit einer Trypsin-EDTA-Lösung im Brutschrank inkubiert. Die enzymatische Proteolyse durch das Trypsin wurde durch die Zugabe einer äquivalenten Menge DMEM-Vollmedium gestoppt, die suspendierten Zellen wurde in ein 15-ml-Röhrchen überführt und für fünf Minuten abzentrifugiert (1200 U/min). Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet wurde in 400 µl frischen Vollmedium resuspendiert. Zur Subkultivierung wurden die Zellen auf weitere Zellkulturflaschen bzw. -Platten verteilt. Vor der Durchführung von Zellexperimenten wurde stets auf ein antibiotikafreies Nährmedium gewechselt.

Zur Kryokonservierung der Zellen wurden diese nach der vorangegangenen Trypsinierung und Pelletierung einmalig in 5 ml PBS resuspendiert und erneut für fünf Minuten bei 1200 U/min zentrifugiert. Nach dieser Waschung wurden die Zellen mit 500 μ l Einfriermedium (DMEM, versetzt mit 10 % DMSO) resuspendiert, auf Kryoröhrchen verteilt und bei -80 °C eingefroren.

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Zellkulturformate, Mengenangaben und Anwendungen

Kulturformat	Medium (ml)	Trypsin (ml)	Verwendung
Zellkulturschale TC-Schale 100	10	3	Transfektion
Zellkulturplatte (6- <i>well</i>)	2	0,5	Stimulation
Zellkulturplatte (96- <i>well</i>)	50 – 200 μ l	entfällt	MTT-Test
T-25 Zellkulturflasche	3,5	1	Immunpräzipitation MALDI-TOF MS
T-75 Zellkulturflasche	13	3	Kultivierung Immunpräzipitation MALDI-TOF MS

3.1.3 Zytotoxizitätstestung

Zur Etablierung von Konzentration und Wirkdauer der Stimulanzen wurde vor den geplanten *In-vitro*-Versuche eine MTT-Testung durchgeführt. Insbesondere für die Substanz LB-100 bot die Literatur nur wenige Dosierungsempfehlungen. Das Prinzip des MTT-Tests basiert auf einer kolorimetrischen Quantifizierung der Zellproliferation und Zellvitalität mittels Spektralphotometer. Nach Zugabe des gelblichen MTT wird dieses partiell durch mitochondriale Dehydrogenasen der vitalen Zellen zum violetten MTT-Formazan reduziert, die Ausprägung des kumulierten MTT-Formazan ist hierbei proportional zur Vitalität der Zellen, es folgt eine spektralphotometrische Quantifizierung (Mosmann 1983).

Auf einer Zellkulturplatte (96-*well*) wurden je *well* 10^3 MCT-Zellen bzw. HEK293-Zellen in jeweils 100 μ l DMEM-Vollmedium ausgesät und kultiviert. Die Zellen wurden, wie in nachstehender Tabelle angegeben, in variierender Konzentration und Wirkdauer mit LB-100, Okadasäure oder Tautomycetin stimuliert. Nach Herstellerprotokoll wurde eine 12 mM MTT-Arbeitslösung angesetzt, hierfür wurde 1 ml steriles PBS in *MTT labeling reagent* gelöst. Mittels Mehrkanalpipette wurde jedes *well* mit 10 μ l der 12 mM MTT-Arbeitslösung versetzt, anschließend wurde die Zellkulturplatte für vier Stunden in den Inkubator gegeben. Nach der Inkubation wurde je *well*, 25 μ l des MTT versetzten Mediums, abgesaugt und jeweils 50 μ l DMSO zugeführt. Nach einer erneuten Inkubation von zehn Minuten wurde die

Zellkulturplatten bei einer Wellenlänge von 550 nm im Spektralphotometer Multi-Detektions-Reader Synergy™ 2 ausgelesen und ausgewertet.

Tabelle 6: Versuchsansatz zur Etablierung von Konzentration und Wirkdauer der Stimulanzen

Stimulanz	Stimulationsdauer: jeweils 5, 10, 24 (h) Konzentration:
LB-100	0; 2,5; 5; 10; 15 (μM)
Okadasäure	0; 10; 25; 50; 100 (nM)
Tautomycetin	0; 100; 200; 400; 800 (nM)

3.1.4 Stimulation von MCT-Zellen mit LB-100 und Degradationsuntersuchung durch *Cycloheximide-chase*

Cycloheximid inhibiert die Translation von Proteinen durch Hemmung der Peptidyltransferase an der ribosomalen 60S-Untereinheit (Garreau de Loubresse et al. 2014). Zur kinetischen Untersuchung der Degradation bzw. Proteininstabilität von ARNT wurden in einer 6-well-Zellkulturplatte je well 2×10^5 MCT-Zellen ausgesät und bis zu einer 80%igen Konfluenz kultiviert. Cycloheximid (12,5 $\mu\text{g/ml}$) wurde zum Medium gegeben; die Zellen wurden mit LB-100 (5 μM) stimuliert bzw. wurde die Kontrollgruppe mit DMSO versetzt. Nach einer Inkubation in einem definierten Zeitintervall von 0, 3, 6 und 10 Stunden wurden die Zellen entnommen, durch Zentrifugation pelletiert und dreifach mit PBS gewaschen. Zur weiteren Analyse der Abbauraten von Arnt schloss sich ein SDS-PAGE und Western Blot an.

3.1.5 Stimulation von MCT-Zellen mit LB-100, Okadasäure und Tautomycetin

Auf einer 6-well-Zellkulturplatte wurden je well 2×10^5 MCT-Zellen in serumfreiem DMEM ausgesät und kultiviert. Nach 24 Stunden wurden die MCT-Zellen für drei Stunden mit LB-100, Okadasäure oder Tautomycetin stimuliert. Zur Kontrolle dienten mit DMSO versetzte MCT-Zellen. Die Zellen wurden nach Versuchsende mit PBS von der Zellkulturplatte gelöst und durch Zentrifugation pelletiert. Nach abgeschlossener Proteinisolation folgte zum Nachweis des endogenen Arnt-Proteinlevel ein SDS-PAGE und Western Blot.

Tabelle 7: Stimulation von MCT-Zellen durch Protein-Phosphatasen-Inhibitoren

Stimulanz	Konzentration
LB-100	2,5, 5, 10, 15 (μM)
Okadasäure	10, 25, 50, 100 (nM)
Tautomycetin	100, 200, 400, 800 (nM)

3.1.6 Stimulation von MCT- und HEK293-Zellen mit LB-100 und anschließende Analyse durch MALDI-TOF MS

Für den Nachweis von endogenen ARNT-Homodimeren bzw. der Phosphorylierungsstelle von ARNT wurden 8×10^6 MCT- bzw. HEK293-Zellen je T-75 Zellkulturflaschen ausgesät und 24 Stunden kultiviert. Die Zellen wurden für vier Stunden mit LB-100 ($5 \mu\text{M}$) stimuliert, die Kontrollgruppe wurde mit DMSO versetzt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und durch Zentrifugation pelletiert. Eine Immunpräzipitation und massenspektrometrische Analyse schlossen sich an.

3.1.7 Liposomale Transfektion von HEK293-Zellen mit ARNT-EGFP und ARNT-myc und Stimulation durch LB-100, Okadasäure und Tautomycetin

Zur Untersuchung der Homodimerisierung von ARNT wurden zwei Expressionsvektoren (ARNT-EGFP und ARNT-myc) durch Dr. rer. nat. Gunsmaa Nyamsuren (Klinik für Nephrologie und Rheumatologie, Universitätsmedizin Göttingen) konstruiert und etabliert.

Für die transiente Transfektion der HEK293-Zellen wurde als methodischer Ansatz das Lipofectamine™ 2000 Reagenz gewählt. Das Lipofectamine™ 2000 Reagenz beruht auf dem Prinzip der liposomalen Transfektion eukaryotischer Zellen. Unter hydrophilen Bedingungen binden negativ geladene Nukleinsäuren (z. B. Plasmid-DNA) an kationische Lipide von Liposomen. Die Komplexe aus Nukleinsäuren und kationische Lipide fusionieren mit der Zellmembran und geben im Zytoplasma die Nukleinsäuren frei (Felgner et al. 1987).

Für den Versuch wurden 4×10^6 HEK293-Zellen auf vier Zellkulturschalen ausgesät und bis Erreichen einer 70%igen Konfluenz kultiviert. Zwei Stunden vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt und Opti-MEM® zu den Zellen gegeben. Zur Erzeugung von Liposomen wurden insgesamt 6 ml Opti-MEM® und 200 μl Lipofectamine™ 2000 bei Raumtemperatur für fünf Minuten miteinander inkubiert. Parallel wurden jeweils 30 μg der Plasmid-DNA beider Expressionsvektoren ARNT-EGFP und ARNT-myc in 6 ml Opti-MEM® gegeben. Daraufhin wurde die verdünnte Plasmid-DNA zum lipofectamin-haltigen Medium gegeben und erneut für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In diesem Schritt folgte die Ausbildung von Komplexen aus Plasmid-DNA und Liposomen. Anschließend wurden die Zellen transfiziert; hierfür wurde das Gemisch in gleichen Teilen auf die vier Zellkulturschalen verteilt, nach sechs Stunden Inkubation wurde das Opti-MEM® entfernt und DMEM-Vollmedium hinzugefügt. Nach 48 Stunden wurden die transfizierten HEK293-Zellen für vier Stunden mit LB-100 ($5 \mu\text{M}$), Okadasäure (50 nM) oder Tautomycetin (200 nM) stimuliert. Die Homodimerisierung von ARNT wurde nachfolgend durch eine Ko-Immunpräzipitation mit SDS-PAGE und Western Blot untersucht.

3.1.8 Liposomale Transfektion von HEK293-Zellen mit mutiertem Ser77/Asp-mut-ARNT und Stimulation durch LB-100

Der Methodik der liposomalen Transfektion folgend wurden HEK293-Zellen zusätzlich mit mutierten Expressionsvektoren (Ser77/Asp-mut-ARNT-EGFP und Ser77/Asp-mut-ARNT-myc) transfiziert.

Der Versuchsansatz bot die Möglichkeit die Homodimerisierung von ARNT in Abhängigkeit der Phosphorylierungsstelle von Serin 77 zu untersuchen. Durch Dr. rer. nat. Gunsmaa Nyamsuren (Klinik für Nephrologie und Rheumatologie, Universitätsmedizin Göttingen) wurde ARNT mutiert, Serin 77 wurde durch die negativ geladene Asparaginsäure ausgetauscht. Anschließend wurde das mutierte Ser77/Asp-mut-ARNT in eine Expressionskassette eines PCMV6-EGFP- bzw. PCMV6-myc-Expressionsvektors einkloniert.

Zusammenfassend wurden für den Versuch HEK293-Zellen mit Wildtyp ARNT-EGFP und ARNT-myc als auch mit mutiertem Ser77/Asp-mut-ARNT-EGFP und Ser77/Asp-mut-ARNT-myc ko-transfiziert, für 48 Stunden kultiviert, weitere vier Stunden mit LB-100 (5 μ M) stimuliert und anschließend durch eine Ko-Immunpräzipitation mit SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

3.1.9 Stimulation von MCT-Zellen mit LB-100 und qRT-PCR-basierte Expressionsanalyse von *Arnt* und *Alk3*

Um einen möglichen Einfluss von LB-100 auf die Expression von *Arnt* bzw. *Alk3* zu untersuchen wurde eine qRT-PCR durchgeführt. Hierfür wurden in *6-well*-Zellkulturplatten je 10^5 MCT-Zellen in 2 ml serumfreiem DMEM ausgesät. Diese wurden mit je 5 μ M LB-100 über variierende Stimulationsdauern inkubiert. Auch wurde der Einfluss von wechselnden Konzentrationen von LB-100 über vier Stunden untersucht. Als Kontrolle dienten mit DMSO inkubierte MCT-Zellen.

Tabelle 8: Versuchsansatz für die LB-100-Stimulation von MCT-Zellen und Analyse mit qRT-PCR

Ziel-mRNA	Konzentration LB-100 (μ M)	Stimulationsdauer (h)
<i>Alk3</i>	0, 2,5, 5, 10, 15	4
<i>Arnt</i>	5	0, 1, 3, 5, 10, 24
<i>Arnt</i>	0, 2,5, 5, 10, 15	4

3.2 Mausstudien

3.2.1 Tiermodelle und Studiendesign

Um den organprotektiven Effekt der Pharmaka *in vivo* zu untersuchen, wurden zwei Tiermodelle gewählt; die unilaterale Ureterobstruktion (UUO) und die intraperitoneale Injektion von Tetrachlormethan (CCl₄). Je Tiermodell wurden sechs Kohorten eingeteilt, jede Kohorte umfasste sechs C57BL/6J Wildtyp-Mäuse in gleichen Teilen weiblichen und männlichen Geschlechts. Die Kohorten wurden jeweils für den Versuch mit unterschiedlichen Pharmaka behandelt; LB-100, FK506, GPI-1046, FK506 in Kombination mit LB-100 sowie GPI-1046 kombiniert mit LB-100. Zudem bestand eine Kontrollgruppe die nur Glukoselösung erhielt. PD Dr. med. Björn Tampe (Klinik für Nephrologie und Rheumatologie, Universitätsmedizin Göttingen) führte alle Interventionen an den Tieren aus.

3.2.2 Berechnung und Dosierung der Pharmaka

Nach Literaturangabe wurde eine Dosis von 2,0 mg/kg KG des LB-100 für die Mausstudien gewählt (Bai et al. 2014). Dieses wurde alle zwei Tage intraperitoneal injiziert. Zur Herstellung einer 50 mM Stammlösung wurden 5 mg LB-100 in 0,3727 ml ddH₂O gelöst. Die Stammlösung wurde mit sterilem PBS weiter verdünnt (0,4 µg/µl), so dass letztlich einer 20 g schweren Maus, durch eine Injektion, 40 µg LB-100 verabreicht werden konnte. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte bereits eine Tagesdosis des FK506 von 0,2 mg/kg KG (oral) ermittelt werden, welche unterhalb der immunsuppressiven Wirkung liegt, jedoch eine signifikante Organprotektion vermittelt. Zudem wurde eine tägliche Dosis des GPI-1046 von 10 mg/kg KG (subkutan) gewählt (Tampe et al. 2018). Die Kontrollgruppe erhielt 5%ige Glukoselösung. Einen Tag vor der geplanten Intervention (UUO bzw. CCl₄) wurde mit der pharmakologischen Behandlung der C57BL/6J Wildtyp-Mäuse begonnen. Die Pharmaka wurden bei -20 °C gelagert.

3.2.3 Unilaterale Ureterobstruktion

Zur Erzeugung einer renalen tubulointerstitiellen Fibrose wurde das etablierte Modell der unilaterale Ureterobstruktion gewählt. Die einseitige unilaterale Ureterobstruktion führt zur Abnahme der renalen Durchblutung, Reduktion der glomerulären Filtration, Ausbildung einer Hydronephrose, Inflammation und begleitender progressiven renalen Fibrosierung (Chevalier et al. 2009). Die kontralaterale Niere bleibt während der Studiendauer funktionsfähig und wird als scheinoperiert (*sham*) bezeichnet. Nach einer Analgesie mit Buprenorphin (0,1 mg/kg KG, subkutan) wurden die C57BL/6J-Mäuse mit Isofluran (2 – 3 %) narkotisiert. Für die Gesamtdauer der Intervention wurde die Isofluran-Gabe kontinuierlich fortgesetzt. Auf einer Wärmeplatte erfolgte zunächst die Rasur und Desinfektion der Bauchdecke, anschließend wurde diese median auf einer Länge von 10 mm

eröffnet. Der linksseitige Ureter wurde aufgesucht, vorsichtig freipräpariert und dargestellt. Im oberen und mittleren Drittel des Harnleiters wurden in einem Abstand von 5 mm zwei Ligaturen mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial gesetzt. Es folgten ein Wundverschluss der Faszie und eine Hautnaht mit resorbierbarem Nahtmaterial. Postoperativ wurde je 300 ml des Trinkwassers mit je 15 Tropfen Metamizol (500 mg/ml) versetzt, hierdurch wurde eine suffiziente Analgesie erzielt. Am zehnten Tag nach der Intervention und anhaltender Harnleiterokklusion folgte die Tötung und Sektion der Tiere. Entsprechend der Kohorte wurde die jeweilige Maus zudem mit LB-100, GPI-1046, oder FK506 während der Studiendauer behandelt.

3.2.4 Intraperitoneale Injektionen von Tetrachlormethan

Ein etabliertes *In-vivo*-Modell zur Induktion von Leberfibrose ist die intraperitoneale Injektion von Tetrachlormethan (Constandinou et al. 2005). Über hepatische CYP P450 Monooxygenasen wird im Organismus Tetrachlormethan zu Trichlormethyl-Radikal (CCl_3) reduziert. In Abhängigkeit von Expositionsdauer und -Dosis wirkt das entstehende Trichlormethyl-Radikal massiv hepatotoxisch; sowohl Leberverfettung, Inflammation, Nekrose, Fibrose, Zirrhose als auch die Ausbildung von hepatozellulären Karzinomen, sind die dosisabhängigen Folgen (Scholten et al. 2015). Für den Versuch wurde das lipophile und flüchtige Tetrachlormethan mit einer Volumenkonzentration von 25 % in sterilem Mineralöl gelöst. Die C57BL/6J-Mäuse wurden gewogen, anschließend wurde 1 ml/kg KG in die Leistenfalte intraperitoneal injiziert. Hierfür diente eine 27 G Einwegkanüle und 1 ml Feindosierungsspritze. Über eine Dauer von 42 Tagen, erfolgten pro Woche zwei intraperitoneale Injektionen. Dieser Zeitraum wurde gewählt, um insbesondere zirrhotische Veränderungen der Leber auszulösen. Entsprechend ihrer Versuchsgruppe wurde die jeweilige Maus zudem mit LB-100, GPI-1046 oder FK506 während der Studiendauer behandelt.

3.2.5 Präparation der Versuchstiere

Mit Beendigung der jeweiligen Mausstudie (UUO-, bzw. CCl_4 -Studie) folgten die Tötung und die Sektion der Tiere. Nach einer Inhalationsnarkose mit Isofluran wurden die Tiere durch eine zervikale Dislokation getötet. Die Bauchdecke wurde mit einer Pinzette angehoben und anschließend mit einer Schere median eröffnet; der Sektionsschnitt wurde entlang der Sagittalebene über den Thorax bis zur *symphysis mandibulae* fortgeführt. Herz, Lunge, Leber, Intestinum, Nieren (UUO-Niere, *sham*-Niere) wurden entnommen und mit einem Skalpell halbiert. Ein Gewebestück wurde kryokonserviert, das andere wurde in eine Einbettkassette überführt und in einer phosphatgepufferten Formaldehydlösung (4,5 %) fixiert. Entsprechend der Richtlinien wurden die Tierkadaver entsorgt.

3.3 Histologie

3.3.1 Anfertigung von Gewebeschnitten

Um eine Autolyse nach Organentnahme zu verhindern wurden die in den Einbettkassetten befindlichen Organe über Nacht in einer phosphatgepufferten Formaldehydlösung (4,5 %) gelagert. Am Folgetag wurde über vier Stunden hinweg unter laufendem Leitungswasser überschüssiges Formaldehyd aus dem Gewebe gewaschen. Anschließend wurden die Präparate in den Gewebeeinfiltrationsautomat Leica TP1020 verbracht. Hier wurde das fixierte Gewebe durch eine Ethanolreihe aufsteigender Konzentration automatisiert entwässert. Abschließend wurde das Gewebe in Paraffinblöcke gegossen und auf einer Kälteplatte abgekühlt. Mittels des Mikrotoms Leica RM 2165 wurden 3 µm dicke Gewebeschnitte aus den Paraffinblöcken gewonnen, mit einem Pinsel aufgenommen, auf einen Adhäsionsobjektträger gegeben und über Nacht bei 37 °C getrocknet. Vor den geplanten Färbungen mussten die histologischen Schnitte entparaffiniert und rehydriert werden. Für die Entparaffinierung wurden die Schnitte zweimal je zehn Minuten in Xylol gegeben. Zur Rehydrierung folgte eine Ethanolreihe in absteigender Konzentration.

Tabelle 9: Absteigende Ethanolreihe für Rehydrierung

Ethanol-Konzentration (%)	100	96	80	70	50	30	ddH ₂ O
Anzahl der Zyklen (Dauer je 5 min)	2	1	1	1	1	1	2

3.3.2 Masson-Trichrom-Färbung

Mittels MTS-Färbung lassen sich bindegewebige Strukturen, insbesondere Kollagenfasern, selektiv darstellen, wodurch es ermöglicht wird, den Anteil der Fibrose morphometrisch zu quantifizieren. Hierbei reagiert das verwendete Anilinblau mit den Kollagenfasern und färbt diese blau. In der klinischen Routine findet die MTS-Färbung insbesondere für die Quantifizierung von Nierenbiopsien häufig Verwendung (Farris und Alpers 2014).

Vor der geplanten Färbung wurden die Gewebeschnitte entparaffiniert, rehydriert und mit erwärmter Bouin'sche Lösung (56 °C) für 15 Minuten fixiert. Überschüssige Fixierlösung wurde unter fließendem Leitungswasser ausgewaschen. Durch fünfminütige Inkubation der Schnitte in Eisenhämatoxylin-Lösung wurden die Zellkerne gefärbt, weitere fünf Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut und dreifach mit ddH₂O gespült. Für den nächsten Färbeschritt, der zytoplasmatischen Färbung, wurden die Schnitte fünf Minuten in Biebrich-Scharlachrot-Säurefuchsin-Lösung inkubiert und erneut dreifach mit ddH₂O gespült. Nach einer fünfminütigen Vorbereitung der histologischen Schnitte in Phosphorwolfram- und Phosphormolybdänsäure-Lösung folgte die eigentliche Färbung der Kollagenfasern mit

Anilinblau; in diesem Arbeitsschritt wurden die Schnitte für zehn Minuten in Anilinblau-Lösung inkubiert und rasch in Essigsäure (1 %) und ddH₂O getaucht. Zur Dehydrierung wurden die Schnitte kurz in 96%igen sowie 100%igen Ethanol gegeben und insgesamt zehn Minuten in Xylol inkubiert und abschließend mit Entellan eingedeckt.

3.3.3 Pikro-Siriusrot-Färbung und Fast Green FCF-Färbung

Um den Fibrosegrad der murinen Nieren weiter evaluieren zu können, wurden Pikro-Siriusrot-Färbungen der histologischen Schnitte gefertigt. Die basischen Aminogruppen des Kollagens binden hierbei den sauren Farbstoff. Diese Färbung lässt, in der hier verwendeten Lichtmikroskopie, Kollagene rot erscheinen. Eine Differenzierung zwischen Kollagen I und Kollagen III ist jedoch nur in der Polarisationsmikroskopie möglich (Farris und Alpers 2014).

Nach Entparaffinierung und Rehydrierung wurden die Schnitte für 45 Minuten in Pikro-Siriusrot-Lösung (0,1 %) gegeben, für zwei Minuten in 0,01%ige Salzsäure inkubiert und anschließend mit ddH₂O gespült. Auf eine Kernfärbung wurde verzichtet. Es folgten eine Dehydrierung über eine aufsteigende Ethanolreihe und die Eindeckung der histologischen Schnitte.

Zur besseren Kontrastierung wurden die histologischen Schnitte der murinen Leber in Kombination von Pikro-Siriusrot-Lösung und Fast Green FCF gefärbt. Den Arbeitsschritten der Pikro-Siriusrot-Lösung folgend, schließt sich nach der Inkubation in Salzsäure eine zweiminütige Behandlung der gefärbten Gewebeschnitte in 0,1%iger Fast Green-Lösung an. Daraufhin wurden die Schnitte fünffach mit ddH₂O gespült und über eine aufsteigende Ethanolreihe dehydriert und abschließend mit Entellan eingedeckt.

3.3.4 Perjodsäure-Schiff-Reaktion

Durch eine Färbung basierend auf der PAS-Reaktion können kohlenhydratreiche Strukturen des Gewebes wie Glykogen, Mukopolysacchariden, Glykolipide oder Glykoproteine (z. B. Basalmembranen) sichtbar gemacht werden. Diese Färbung wurde gewählt, um insbesondere den tubulären Schaden im UUO-Modell zu quantifizieren. Perjodsäure oxidiert die Hydroxylgruppen freier Glykolgruppe zu Aldehyden, welche wiederum mit fuchsinschwefliger Säure (Schiffs Reagenz) unter rötlicher Komplexbildung reagiert und damit kohlenhydratreiche Strukturen einfärbt (Lüllmann-Rauch 2006).

Initial wurden die Schnitte entparaffiniert und durch eine absteigende Ethanolreihe rehydriert. Es folgte eine zehnminütige Inkubation der Schnitte in einer Perjodsäurelösung (1 %), woraufhin die Schnitte für zehn Minuten mit Leitungswasser gespült wurden und anschließend kurz in ddH₂O geschwenkt wurden. Für die Perjodsäure-Schiff-Reaktion wurden die Gewebeschnitte für 20 Minuten im Schiffs Reagenz belassen, anschließend wurde überschüssiges Reagenz für zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser ausgespült. Für die Färbung der Zellkerne wurden die Schnitte für fünf Minuten in die Hämalaunlösung gegeben und für zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut.

Es schloss sich eine Dehydrierung mit 96%igen (1 Min.), 100%igen (4 Min.), Ethanol und Xylol (2x 5 Min.) an, abschließend wurden die fertigen Schnitte mit Entellan eingedeckt.

3.3.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur Gewinnung standardisierter histologischer Übersichtsaufnahmen wurden HE-Färbungen angefertigt. Basophile Strukturen wie der Zellkern oder das endoplasmatische Retikulum werden durch Hämatoxylin blau gefärbt; gegensätzlich dazu färbt das azidophile Eosin zytoplasmatische sowie extrazelluläre Strukturen rot (Lüllmann-Rauch 2006).

Für die Kernfärbung wurden die Schnitte für dreimal je zwei Minuten in Hämalaulösung nach Mayer gegeben und für zehn Minuten unter Leitungswasser gewaschen. Für die zytoplasmatische Färbung wurden die Präparate anschließend in angesäuerte Eosin G-Lösung (pH 5) für zwei Minuten inkubiert, dreimal mit ddH₂O gespült und zur Dehydrierung in eine aufsteigende Ethanolreihe gegeben: 96 % (1 Min.), 100 % (4 Min.) und Xylol (2x 5 Min.). Abschließend wurden die fertigen Gewebeschnitte mit dem Eindeckmittel Entellan eingedeckt.

3.3.6 Immunfloreszenz

Die indirekte Immunfloreszenz ermöglicht durch eine gekoppelte Antikörperreaktion einen spezifischen Nachweis des Zielantigens. Hierfür bindet ein Primärantikörper an das Epitop des Antigens, ein Fluorophor markierter Sekundärantikörper lagert sich spezifisch an den Primärantikörper, die durch Fluorophor emittierten Lichtsignale können mittels Floreszenzmikroskop detektiert werden (Lüllmann-Rauch 2006).

Analog zu der vorangegangenen histochemischen Färbungen wurden die Präparate initial mit Xylol entparaffiniert und durch eine absteigende Ethanolreihe rehydriert, für fünf Minuten in ddH₂O gewässert und für zweimal fünf Minuten in PBS vorbereitet. Durch eine 40-minütige Behandlung der Schnitte im Dampfgerar, unter Verwendung von Citratpuffer, folgte das *Antigen Retrieval* zur Demaskierung von Antigenen. Nach einer Abkühlung der Schnitte schlossen sich für jeweils fünf Minuten zwei weitere Waschschrte mit PBS an. Um spätere, nicht spezifische Antikörperbindungen zu verhindern, wurden die Schnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur, in einer BSA-Blocklösung (1 %) abgesättigt. Entsprechend der Herstellerempfehlung wurde der Primärantikörper in BSA-Blocklösung (1 %) verdünnt und auf die Schnitte gegeben. Über Nacht erfolgte die Inkubation des Primärantikörpers in einer Feuchtkammer bei 4 °C, am nächsten Tag wurden die Schnitte in drei Waschschrten für jeweils fünf Minuten mit PBS gewaschen, der in einer BSA-Blocklösung (1 %) gelöste Sekundärantikörper wurde aufgetragen und für 45 Minuten bei Raumtemperatur auf den Schnitten belassen. Eine wiederholte Waschung der histologischen Schnitte mit PBS für jeweils fünf Minuten schloss sich an daraufhin wurde zur Kernfärbung DAPI (1:1000) aufgebracht, die Schnitte einmalig mit PBS gespült und abschließend mit Immu-Mount eingedeckt. Die angefertigten Schnitte wurden bei 4 °C unter Lichtabschluss gelagert.

3.3.7 Histologische Auswertung

Zur morphometrischen Auswertung und Bildaufnahmen der histochemischen Färbungen (MTS, PSR, Fast Green FCF) wurde das Lichtmikroskop OLYMPUS BX43 in Kombination mit der Farbkamera OLYMPUS SC30 und der Software cellSens Dimension 1.6 verwendet.

Anhand eines Folien-Rasters (567 x 10mm²) wurden bei 400-facher Vergrößerung Fibrose positive Areale in zehn unterschiedlichen Gesichtsfeldern ausgezählt, das arithmetische Mittel bestimmt und anschließend der prozentuale Gesamtanteil der Fibrose je Gewebeschnitt berechnet. Für die Quantifizierung des Fibrosegrades der murinen Nieren wurden Gesichtsfelder am Übergang zwischen *correx* und *medulla* gewählt. Positive Anfärbungen von stark kollagenhaltigen Strukturen wie die *adventitia* von Gefäßen, Glomeruli oder die Organkapsel wurden durch die Auszählung nicht erfasst. Ähnliche Ausnahmen galten ebenfalls für die Beurteilung der histologischen Leberpräparate. Um die septenartigen Fibroseareale bewerten zu können, wurden Gesichtsfelder zwischen zwei benachbarten Periportalfeldern (Leberazinuszone 3) eingestellt. Die histologischen Schnitte wurden für die Quantifizierung des Fibrosegrades mäanderförmig abgefahren.

Die mittels PAS-Reaktion angefärbten Gewebeschnitte dienten der semiquantitativen Erfassung des tubulären Schadens der murinen Niere. Bei 200-facher Vergrößerung wurden unter dem Lichtmikroskop OLYMPUS BX43 je histologischem Schnitt 100 *tubuli* graduiert und das arithmetische Mittel berechnet. Zur Beurteilung wurden die Ausprägung von Zelluntergang, der tubulären Dilatation, Verlust von Bürstensaum und Basalmembran sowie Auftreten von hyalinen Zylindern erfasst. Die histopathologische Klassifizierung der Veränderung erfolgte an anhand nachstehender Tabelle.

Tabelle 10: Histopathologische Klassifizierung des tubulären Schaden

Histopathologische Veränderung	normal	mild	moderat	schwer
Grad	0	1	2	3

Die immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der Fibroblasten-Aktivität erfolgte anhand Markierungen gegen Kollagen 1 und α -SMA mit Hilfe des Mikroskops Axiovert S100 TV, der CCD-Kamera OLYMPUS XM10 und der Software cell[^]D. Je Präparat wurden zehn Gesichtsfelder bei 400-facher Vergrößerung als Bild aufgenommen, die Antigen-positiven Areale mittels Folien-Rasters (567 x 10mm²) ausgezählt und der prozentuale Gesamtanteil, analog der Auswertung der histochemischen Färbungen berechnet. Zudem wurden Arnt positiv markierte Zellkerne von proximalen tubuloepithelialen Zellen durch Auszählung quantitativ erfasst.

Repräsentative Bildaufnahmen wurden von Dr. rer. nat. Gunsmaa Nyamsuren (Klinik für Nephrologie und Rheumatologie, Universitätsmedizin Göttingen) am Konfokalmikroskop erstellt.

3.4 SDS-PAGE und Western Blot

3.4.1 Proteinisolation aus MCT-Zellen

Nach Abschluss der jeweiligen *In-vitro*-Versuche wurden die Zellen einmalig mit PBS gewaschen, das PBS abgesaugt und erneut PBS dazugegeben. Durch wiederholtes Vorwärts- und Rückwärtspipettieren des PBS lösten sich die Zellen rückstandslos vom Boden der Kulturflaschen. Die Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt, abzentrifugiert und das Zellpellet mit 200 µl NP40-Zellysispuffer versetzt. Anschließend erfolgte die Inkubation auf Eis für 30 Minuten, dabei wurde die Probe alle zehn Minuten mittels Vortex gerührt. Das Homogenisat wurde mittels Ultraschallsonde im Eisbad über 90 Sekunden bei 50%iger Amplitude bei 15 sekündigem Puls fragmentiert. Zelltrümmer wurden für 20 Minuten, bei 13.000 U/min in einer bei 4 °C gekühlter Zentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt.

3.4.2 Proteinisolation aus murinem Nierengewebe und Leberwebe

Ein Probestück von etwa 4 mm³ wurde mit dem Skalpell aus dem murinen Nierengewebe bzw. Lebergewebe geschnitten und in ein 2-ml-Reaktionsgefäß mit 200 µl NP40-Zellysispuffer gegeben. Das Gewebestück wurde mit einer 5 mm Edelstahlkugel bei 50 Hz für fünf Minuten im TissueLyser LT aufgeschlossen. Die Proben inkubierten für 40 Minuten auf Eis und wurden dabei alle zehn Minuten mittels Vortex gerührt. Die darauf folgenden einzelnen Arbeitsschritte sind gleich zur Proteinisolation aus MCT-Zellen.

3.4.3 Quantitative Messung der Proteinkonzentration

Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte methodisch mittels BCA-Test unter Verwendung des Pierce BCA Protein Assay-Kit. Der BCA-Test basiert auf einer Komplexbildung, die im alkalischen Milieu, zwischen Protein und zweiwertigen Kupfer-Ionen stattfindet. Bei dieser Reaktion wird durch die Peptidketten des Proteins Cu²⁺ zu Cu⁺ reduziert. Die reduzierten Kupfer-Ionen Cu⁺ bilden jeweils mit zwei Molekülen Bicinchinonsäure (BCA) einen violetten Chelatkomplex mit einer Lichtabsorption von 562 nm. Die Lichtextinktion des so entstandenen Chelatkomplex ist proportional zur Menge an reduzierten Kupfer-Ionen und damit letztlich gleichwertig zur Proteinkonzentration der Probe. Mittels Spektralphotometer kann die spezifische Lichtabsorption der jeweiligen Probe photometrisch quantifiziert werden und durch eine Albumin-Standardkurve berechnet werden (Smith et al. 1985).

Dem Herstellerprotokoll folgend wurden 10 µl der Proteinlysate mit 200 µl des *Bca-Reagent-A* und 4 µl der *Bca-Reagent-B* gemischt, 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und dann photometrisch durch das Spektralphotometer NanoDrop 2000 gemessen. Die Proben wurden bis zur Weiterverwendung bei -80 °C gelagert.

3.4.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli erfolgt die Auftrennung der Proteine anhand des Molekulargewichts (Laemmli 1970). Bei dieser Methode wandern die aufgetrennten Proteine unter Anlegen einer elektrischen Spannung über ein Gel aus Polyacrylamid. Hierbei legen größere Proteine, d.h. solche mit einer höheren Molekülmasse, eine geringe Laufstrecke zurück als kleinere Proteine. Diese Methode der räumlichen Auftrennung im Gel setzt jedoch eine Denaturierung der Proteinstrukturen voraus. Durch Wärmeexposition der Proteinlösungen werden die Wasserstoffbrückenbindungen der Quartärstruktur aufgebrochen. Zudem maskiert das hinzugegebene negativ geladene Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) die Eigenladung des Proteins, sodass zusätzlich zur Quartärstruktur, auch die Tertiärstruktur des Proteins zerstört wird. Darüber hinaus werden durch Verwendung des Reduktionsmittels β -Mercaptoethanol bestehende Disulfidbrückenbindungen reduziert (Schäfer et al. 2017).

Die Umsetzung der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) erfolgte mit Geräten und Materialien der Firma Invitrogen, aus der Produktlinie Novex.

Zur Vorbereitung der Proben für den SDS-PAGE wurden diese entsprechend ihrer, durch den BCA-Test ermittelten, Proteinkonzentration mit PBS verdünnt, um eine einheitliche Proteinmenge zu erhalten. Für die Proteinisolate aus dem Mausmodell wurde eine Konzentration von 12 μ g Protein gewählt, hingegen wurde für Proben aus *In-vitro*-Versuchen 4 μ g Protein genutzt. Versetzt wurden diese anschließend mit LDS-Probenpuffer (3x LDS Gewebeprobe / 1x LDS *In-vitro*-Proben). Bei 95 °C wurden die Proben im Thermomixer für fünf Minuten denaturiert. Um kleine Kondensstropfen auf der Innenseite des Reaktionsgefäßes zu beseitigen wurden diese für 10 Sekunden zentrifugiert.

Die Gelelektrophorese-Kammer, XCell SureLock Mini-Cell wurde nach Hersteller Protokoll aufgebaut, das vorgefertigte Polyacrylamid Gel, NuPAGE 4-12 % Bis-Tris and Bolt Bis-Tris Plus Gels (10-*well* bzw.15-*well*) eingesetzt und die Kammer mit Laufpuffer befüllt. Die Geltaschen (*well*) wurden mehrfach mit Laufpuffer gespült und eine Gleichstromspannung von 80 V wurde für zehn Minuten angelegt, bevor die *wells* mit den Proben beladen wurden. Für die eigentliche Gelelektrophorese wurde eine Gleichstromspannung von zunächst 80 V für 30 Minuten, dann von 120 V von 120 – 180 Minuten angelegt. Zur Größenreferenz fungierte der vorgefärbte Proteinstandard Novex Sharp Pre-Stained Protein Standard, mit dem sich Proteine in einem von 3,5 – 260 kDa innerhalb der Lauffront erfassen lassen.

3.4.5 Semi-Dry-Western Blot: Proteintransfer

Das Prinzip des Semi-Dry Western Blot besteht in der Übertragung der durch die Gelelektrophorese aufgetrennten, noch im Gel befindlichen Proteine auf eine Membran. Auf dieser Membran können die zu untersuchenden Proteine durch Zugabe eines spezifischen Antikörpers detektiert werden (Kyhse-Andersen 1984). Der Aufbau des Semi-Dry Western Blots erfolgte in nachstehender Reihenfolge: Auf die Anode des Fastblot B44 Biometra

wurden hierfür sechs Lagen Filterpapier gelegt, anschließend eine Nitrocellulosemembran, darauf folgte luftblasenfrei das SDS-PAGE Gel und abschließend sechslagiges Filterpapier. Abgedeckt wurde der Aufbau mit der Kathode des Fastblot B44 Biometra. Das Filterpapier wurde zuvor mit methanolhaltigem Transferpuffer getränkt, um die Wirkung des SDS zu verdrängen und eine Bindung der Proteine an die Membran zu ermöglichen (Kyhse-Andersen 1984). Für den Proteintransfer von Gel zu Membran wurde eine Stromstärke von 68 mA über 90 Minuten an die beiden Elektroden des Fastblot B44 Biometra angelegt.

3.4.6 Semi-Dry-Western Blot: Immundetektion

Die Membran wurde nach Abschluss des Proteintransfers in ein 50-ml-Röhrchen gelegt und mit der 5%igen Blocklösung für eine Stunde bei Raumtemperatur abgesättigt. Durch das Blocken werden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran reduziert (Reinard 2018). Der Primärantikörper wurde nach Herstellerangabe in 2%iger Milchlösung verdünnt anschließend über Nacht bei 4 °C auf dem Rollbrett inkubiert. Am Folgetag wurde die Membran für 60 Minuten auf dem Rollermixer bei Raumtemperatur inkubiert, nachfolgend dreifach für jeweils zehn Minuten mit 2%iger Milchlösung gewaschen und anschließend wurde ein HRP-konjugierter-Sekundärantikörper für 80 Minuten Inkubationszeit dazugeben. Nach drei weiteren Waschschrritten mit 2%iger Milchlösung und einer Waschung mit PBS war die Membran präpariert für die Immundetektion durch die sog. Chemolumineszenzreaktion. Hierbei setzt die an den Sekundärantikörper konjugierte Meerrettichperoxidase die Reagenzien Luminol und Wasserstoffperoxid unter Photonenemission zu 3-Aminophthalat-Dianion um (Thorpe und Kricka 1986). Durch eine CCD-Kamera kann das entstehende Lichtsignal detektiert werden. Die beschriebene Chemolumineszenzreaktion wurde durch den Einsatz des Kit-System 20X LumiGLO Reagent and 20X Peroxide induziert und die Photonenemission mittels ChemiDoc MP System, mit Hilfe der Software Image Lab 5.0, detektiert. Die Bandenintensität wurde unter Verwendung der Software ImageJ densitometrisch gemessen. Als Ladekontrolle diente das ubiquitär exprimierte Gapdh. Um die Membran für die Immundetektion durch einen anderen Primärantikörper vorzubereiten wurde diese durch einen säurehaltigen Puffer „gestrippt“; hierfür wurde die Membran mit Restore™ Western Blot Stripping-Puffer benetzt und für zehn Minuten auf der Rüttelplatte bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Entfernung von Säurerückständen folgte die zweimalige Waschung mit PBS für jeweils fünf Minuten, abschließend wurde die Membran mit 5%iger Blocklösung für eine Stunde geblockt.

3.5 Blue Native-PAGE und Western Blot

3.5.1 Proteinisolation aus MCT-Zellen und murinem Nierengewebe

Zur Analyse von endogener Homodimerisierung von ARNT, wurde der sog. Blue Native-PAGE gewählt. Unter Verwendung des Herstellerprotokolls des NativePAGE Sample Prep Kit wurde der Lysispuffer angesetzt. Die darin enthaltenen nichtionischen Tenside Digitonin und Dodecyl- β -D-maltosid dienen der Solubilisierung der Proteine (Hovers et al. 2011). Für die Proteinisolation aus LB-100 bzw. DMSO stimulierten MCT-Zellen wurden die Proben mit 100 μ l Lysispuffer versetzt, für 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend bei einer Beschleunigung von 20.000 g für 30 Minuten, gekühlt bei 4 °C, zentrifugiert. Die Proteinkonzentration wurde mit dem Pierce BCA Protein Assay-Kit und dem Spektralphotometer NanoDrop 2000 quantitativ gemessen und die Proben für den Gellauf auf jeweils 10 μ g Protein verdünnt. Die Proben des murinen UUO-Nierengewebes wurden vor der Lyse im TissueLyser LT aufgeschlossen. Es folgte eine Immunpräzipitation zur Anreicherung von Arnt (s. Kapitel 3.6.1).

3.5.2 Blue Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Blue Native-PAGE)

Im Unterschied zum SDS-PAGE werden beim Native-PAGE die Proteine nicht denaturiert. Die Auftrennung der Proteine im Gel erfolgt daher nicht allein nach Molekülmasse, sondern aufgrund des Verhältnisses von isoelektrischem Punkt zu Größenstruktur der Proteine (Rehm 2016). Eine Weiterentwicklung des Native-PAGE ist der sog. Blue Native-PAGE nach Schagger. Hierbei werden die Proteine unter Erhalt der Quartärstruktur nach Molekülmasse im Gel aufgetrennt, ohne dass eine vorherige Denaturierung notwendig ist. Physiologische Protein-Protein-Interaktionen können aufgrund der hierbei erhaltenen Quartärstruktur identifiziert werden. Bei dieser modifizierten Native-PAGE Methode wird Coomassie-Brilliantblau (G-250) zu den Proteinproben und dem Kathoden-Laufpuffer gegeben, dies verleiht allen Proteinen während der gesamten Gelelektrophorese eine negative elektrische Grundladung. Beim Anlegen einer elektrischen Spannung wandern dadurch die Proteine in Richtung Anode und werden anhand der jeweiligen Molekülmasse durch den Porengrößen-Gradienten des Polyacrylamid-Gels aufgetrennt (Wittig et al. 2006).

Der Blue Native-PAGE wurde mit den Materialien und dem Herstellerprotokoll der Firma Invitrogen, Produktlinie Novex durchgeführt.

In der Gelelektrophorese-Kammer, XCell SureLock Mini-Cell wurde das vorgefertigte Gel NativePAGE Bis-Tris installiert, anschließend die gesamte Kammer auf Eis gelagert, um konstant niedrige Temperaturbedingungen zu gewährleisten. Nach Befüllen des inneren Kammerteils mit dem Kathoden-Laufpuffer „Dark Blue“ und des äußeren Kammerteils mit dem Anoden-Laufpuffer wurden die Proteinproben in die Laufaschen pipettiert und eine elektrische Spannung von zunächst 100 V für 30 Minuten, dann von 150 V bis zum Ende der Gelelektrophorese angelegt. Die beiden Laufpuffer enthalten Coomassie-Brilliantblau

(G-250), welches während der gesamten Gelelektrophorese in das Gel nachströmt und dort kontinuierliche Ladungs- und pH-Bedingungen schafft.

3.5.3 Wet-Blot: Proteintransfer

Nach Herstellerempfehlung wurde als ein schonendes Verfahren für den Proteintransfer der Wet-Blot auf eine Coomassie beständige PVDF Membran (Polyvinylidenfluorid) gewählt. Als Blot Tank diente der modulare Einschub des Blot-Modul, XCell II in die Kammer XCell SureLock Mini-Cell. Aufgebaut wurde der Blot ausgehend von dem Kathodenteil in nach stehender Reihenfolge: Zwei Blotpads, Filterpapier, Gel, PVDF Membran, Filterpapier und abschließend erneut zwei Blotpads. Die PVDF Membran wurde zuvor mit Methanol aktiviert. Der Transferpuffer wurde in das vorbereitete Blot Modul gegeben, der Rest der Kammer mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Eine elektrische Spannung von 12 V wurde über Nacht angelegt. Der gesamte Wet-Blot Proteintransfer wurde im 4 °C Kühlraum durchgeführt.

3.5.4 Blue Native-PAGE: Immundetektion

Am nachfolgenden Tag wurde die Membran für 15 Minuten im Fixationspuffer inkubiert, hierdurch werden die Proteine fixiert und die Membran entfärbt. Abschließend wurde die Membran luftgetrocknet und mit 5%iger Milch für 60 Minuten geblockt. Die nachfolgenden Schritte der Immundetektion sind analog zur Immundetektion des Semi-Dry-Western Blots (s. Kapitel 3.4.6.).

3.6 Immunpräzipitation mit Protein-G Agarose

3.6.1 Proteinisolierung und Preclearing

Die Immunpräzipitation ist ein immunologisches Verfahren der spezifischen Proteinaufreinigung, über die Entstehung von Antikörper-Antigen-Bindungen kann das zu untersuchende (Ziel-)Protein ausgefällt und angereichert werden. Möglich ist die Immunpräzipitation durch die indirekte Koppelung von einem spezifischen Antikörper, der an Protein-A oder -G beschichtete Agarose Kügelchen (*Protein-A/G-Sepharose-Beads*, kurz: *Beads*) bindet und das Zielprotein über die Ausbildung eines Antikörper-Antigen-Komplex (Immunpräzipitat) präzipitiert (Hermey 2011). Bei dem hier verwendeten Protein-G handelt es sich um ein Oberflächenprotein der Streptokokken Gruppe G mit hoher Bindungsaffinität an den Fc-Bereich von Immunglobulinen Typ G (IgG) des Subtyps IgG1, IgG2 insbesondere aus Maus, Mensch und Kaninchen (Reinard 2018).

Die Immunpräzipitation wurde mit dem Kitsystem Immunoprecipitation Kit (Protein G) der Firma Roche Diagnostics GmbH durchgeführt.

Für die Immunpräzipitation von endogenem Arnt wurden mit LB-100 (5 μM) und DMSO stimulierte MCT-Zellen (s. Kapitel 3.1.6) zunächst lysiert. Die in einer T-75 Zellkulturflasche ausgesäten MCT-Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen, durch wiederholtes Vorwärts- und Rückwärtspipettieren rückstandslos gelöst, in ein 15-ml-Röhrchen überführt und bei 4 °C für zehn Minuten bei 1000 rpm abzentrifugiert. Das so gewonnene Zellpellet wurde in 500 μl Lysispuffer aufgenommen, in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und für 40 Minuten auf Eis inkubiert. Das Homogenisat wurde in Mikroröhrchen mit Schraubverschluss überführt. Nach der erfolgten Proteinextraktion schließt sich das sog. *Preclearing* an bei diesem Arbeitsschritt wurde zu jedem Proteinlysat 50 μl Protein-G-Sepharose-*Beads* gegeben und für drei Stunden auf dem Probenrotator inkubiert. Während der Inkubation binden unspezifisch Proteine und ungebundene Antikörper an die *Beads* und können dadurch aus dem Lysat entfernt werden, was letztlich zur Reduktion des *Background* der Immunpräzipitation führt. Die *Beads* wurden durch eine kurze Zentrifugation sedimentiert und der aufgereinigte Überstand in ein neues Reaktionsröhrchen gegeben.

3.6.2 Immunpräzipitation und Elution des Zielproteins

Durch die Zugabe eines spezifischen Antikörpers gegen das zu präzipitierende Protein beginnt der Arbeitsschritt der eigentlichen Immunpräzipitation. Hierfür wurden zunächst je Proteinlysat 5 μl des Antikörper für 60 Minuten auf dem Probenrotator gegen natives Arnt inkubiert, anschließend wurde jeweils 50 μl der Protein-G--Sepharose-*Beads* hinzugefügt und über Nacht bei 4 °C auf dem Probenrotator inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die entstandenen *Beads*-Antikörper-Antigen-Komplexe durch eine kurze Zentrifugation pelletiert. Um unspezifische Proteinbindungen zu unterdrücken und nicht relevante Proteine zu entfernen, schlossen sich mehrfache Waschschrte an mit Puffern abnehmender Salzkonzentration. Die Proben wurden jeweils zweimal mit dem Waschpuffer 2 (50 mM Tris-HCl), einmal mit dem Waschpuffer 3 (10 mM Tris-HCl) und für je 20 Minuten auf dem Probenrotator gewaschen. Nach der letzten Waschung wurden die *Beads*-Antikörper-Antigen-Komplexe durch kurze Zentrifugation sedimentiert und der Überstand vorsichtig abgetrennt. Das präzipitierte Protein wurde durch die Zugabe von 30 μl chaotrop wirkende 0,3%ige Trifluoressigsäure eluiert, was der Vorbereitung der Proben für die MALDI-TOF Massenspektrometrie diente.

3.7 Ko-Immunpräzipitation

Die Ko-Immunpräzipitation dient dem Nachweis einer Protein-Protein-Interaktion. Die molekularbiologische Methodik gleicht dem der Immunpräzipitation (s. Kapitel 3.6) jedoch mit dem Ziel den putativen Interaktionspartner (hier: ARNT-Homodimerisierung) des zu untersuchenden Proteins über eine Präzipitation und anschließenden SDS-Western Blot zu identifizieren (Hermey 2011). Als Ausgangsmaterial dienten die mit dem

Expressionsvektoren ARNT-myc und ARNT-EGFP transfizierten und mit LB-100, OA, oder TMC stimulierten HEK293-Zellen. Darüber hinaus wurde eine weitere Ko-Immunpräzipitation durchgeführt, hier wurden die mit den Expressionsvektoren Wildtyp ARNT-EGFP, ARNT-myc sowie Ser77/Asp-mut-ARNT-EGFP und Ser77/Asp-mut-ARNT-myc transfizierten HEK293-Zellen untersucht (s. Kapitel 3.1.7, Kapitel 3.1.8). Entsprechend dem gekoppelten Protein-Tag wurden die Proben entweder mit EGFP- bzw. mit myc-Antikörper präzipitiert. Zur Elution des präzipitierten Proteins von dem Antikörper-*Bead*-Komplex wurde zu den Proben jeweils 30 µl 2x LDS-Probenpuffer gegeben und diese auf dem Thermomixer bei 95 °C für fünf Minuten erhitzt. Der so gewonnene Überstand diente der Auftrennung durch einen SDS-PAGE und schließende Analyse mittels Western Blot. Hierfür wurde jeweils der Antikörper gegen das ko-präzipitierte Protein verwendet. Als Kontrolle diente ein nicht-präzipitiertes Lysat und eine Leeransatz mit IgG Antikörper.

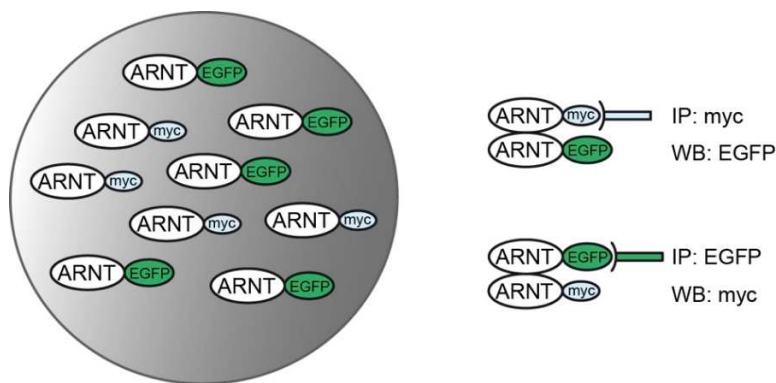


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Ko-Immunpräzipitation. Darstellung der Ko-Immunpräzipitation am Beispiel von ARNT-myc und ARNT-EGFP. IP: immunpräzipitiert; WB: mittels Western Blot immundetektiert. Erstellt durch B. Tampe.

3.8 MALDI-TOF Massenspektrometrie zum Nachweis von ARNT Homodimeren

Zum Nachweis einer endogenen ARNT Homodimerisierung wurde eine Massenanalyse mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie gewählt. Dieses Verfahren basiert in einer Kombination von Ionisierung des Proteins durch MALDI-Technik (Karas und Hillenkamp 1988) und anschließender Massentrennung mittels TOF Analysator. Die durch die Immunpräzipitation angereicherten Proben (s. Kapitel 3.6.1, Kapitel 3.9) wurden in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, anschließend mit 10 µl einer 0,1%igen Trifluoressigsäure resuspendiert und in einer MALDI-Matrix aus Sinapinsäure eingebettet. Nach Auskristallisieren der Proben und Matrix erfolgte die Messung des Molekulargewichts der immunpräzipitierten Proteine. Die Durchführung der Massenspektrometrie mittels Spektrometer Typ MALDI-TOF rapifleX™ und die Auswertung der erhobenen Daten erfolgten durch Prof. Dr. rer. nat. Hassan Dihazi (Klinik für Nephrologie und Rheumatologie, Universitätsmedizin Göttingen).

3.9 Immunpräzipitation mit Dynabeads

Für den massenspektrometrischen Nachweis endogener ARNT-Homodimere der murinen Niere folgte zunächst eine Anreicherung von Arnt durch eine Immunpräzipitation mit *Dynabeads*. Ein 4 mm³ messendes Gewebestück einer UUO-Niere (LB-100 Kohorte und Kontrollgruppe) wurde hierfür zunächst lysiert. Das Gewebestück wurde nach der Zugabe von 300 µl Lysispuffer mit einer 5 mm Edelstahlkugel bei 50 Hz für fünf Minuten im TissueLyser LT aufgeschlossen und dann ebenfalls für 40 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zelltrümmer wurden für zehn Minuten bei 12.000 U/min in einer bei 4 °C gekühlten Zentrifuge abzentrifugiert.

Die auf *Dynabeads* basierende Immunpräzipitation wurde darüber hinaus genutzt, um ausreichend ARNT für eine massenspektrometrische Analyse der Phosphorylierungsstellen zu präzipitieren. Für die Immunpräzipitation wurde das Proteinlysate von LB-100 (5 µM) bzw. DMSO stimulierten HEK293-Zellen genutzt.

Bei den hier verwendeten *Dynabeads* zum *pull-down* von ARNT handelt es sich um superparamagnetische, monodisperse Eisenoxide beschichtete Polystyren-*Beads*, die an Protein-G-gekoppelt sind und eine hohe Zielproteinausbeute ermöglichen (Neurauter et al. 2007). Je Mikroröhrchen wurden 50 µl der *Dynabeads* gegeben, durch Platzierung der Mikroröhrchen auf einem magnetischen *rack* wurde die flüssige Oberphase von den *Dynabeads* getrennt, die Oberphase wurde verworfen, anschließend wurde 200 µl des *Antibody (Ab) Binding and Washing Buffer* und 5 µl des ARNT Antikörper zu den *Dynabeads* pipettiert. Zur Ausbildung von *Dynabeads*-Antikörper-Komplexen folgte eine zehnmütige Inkubation bei Raumtemperatur. Mithilfe des magnetischen *rack* wurde die flüssige Oberphase entfernt, die Suspension wurde in 200 µl des *Antibody (Ab) Binding and Washing Buffer* resuspendiert und der Überstand erneut verworfen. Jeweils 250 µl des Proteinlysate wurden dazugegeben und über Nacht bei 4 °C auf dem Probenrotator inkubiert. Am Folgetag schlossen sich drei weitere Waschschritte mittels *Washing Buffer* an, der Überstand wurde entfernt und 20 µl *Elution Buffer* sowie 10 µl NuPAGE LDS-Probenpuffer wurden dazugegeben. Die Präzipitation von ARNT wurde durch ein SDS-PAGE und Western Blot vor der massenspektrometrischen Analyse evaluiert.

3.10 Identifizierung der LB-100-präservierten Peptid-Phosphorylierungsstellen von ARNT durch massenspektrometrische Analyse

Die mittels *Dynabeads* präzipitierten Proben wurden in einer *Speed*-Vakuumentrifuge getrocknet. Das eluierte Protein wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Brilliantblau (G-250) angefärbt. Die visualisierten Proteinbanden wurden ausgeschnitten und mittels In-Gel-Verdau (IGV) für die geplante massenspektrometrische Analyse aufbereitet. Der In-Gel-Verdau umfasste dabei die Entfärbung des Gels, den enzymatische Verdau

mittels Trypsin (bei 37 °C / über Nacht) und die Extraktion der fraktionierten Proteine aus der Gelmatrix (Rosenfeld et al. 1992). Die aufgereinigten Proteine wurden anschließend durch C18 Pipettenspitzen entsalzt und weiter purifiziert. Vor der massenspektrometrischen Analyse der Peptid-Sequenzen von ARNT wurden die Peptid-Phosphorylierungsstellen selektiv angereichert. Für die Anreicherung von Phosphopeptiden wurden die hoch aufgereinigten Proben unter Verwendung des High-Select™ TiO₂ Phosphopeptide Enrichment Kit vorbereitet. Nach Herstellerprotokoll folgte die Anreicherung der Proben. Die Peptidsequenz wurde mittels Massenspektrometer, Q Exactive™ Plus Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ analysiert und manuell mithilfe von Datenbank geprüft und ausgewertet. Die Durchführung von In-Gel-Verdau, der Massenspektrometrie und der Auswertung erfolgten durch Herrn Prof. Dr. rer. nat. Hassan Dihazi (Klinik für Nephrologie und Rheumatologie, Universitätsmedizin Göttingen).

3.11 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

3.11.1 RNA-Isolation

Die RNA-Extraktion erfolgte durch die sog. *single-step*-Methode (Säure-Guanidinium-Thiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion) nach Chomczynski und Sacchi (1987), unter Verwendung von TRIzol Lösung und Chloroform. Hierfür wurden die stimulierten Zellen mit kaltem PBS von der Zellkulturplatte gelöst, abzentrifugiert, das entstandene Zellpellet für zehn Minuten in 200 µl TRIzol Lösung lysiert und anschließend mit 200 µl Chloroform versetzt. Murine Gewebeproben wurde mit dem TissueLyser LT aufgeschlossen. Nach einfachem Schütteln der Proben wurden diese bei 15 Minuten und 12.000 U/min bei 4 °C erneut zentrifugiert, 500 µl der obersten Phase in ein neues Reaktionsröhrchen gegeben und mit 500 µl 70%igen gekühltem Ethanol versetzt. Die weitere Aufreinigung der RNA wurde mit dem Kitsystem PureLink RNA Mini Kit der Firma Roche Thermo Fisher Scientific durchgeführt. Das Kitsystem basiert auf dem Verfahren der selektiven Adsorption von Nukleinsäuren an einer Matrix aus Silikagel. Hierfür wurde das Zellisolat in eine Spinsäule auf eine Silikamatrix gegeben. Nach Herstellerprotokoll schließen sich, unter Verwendung absteigender chaotrop wirkender Puffer mehrfache Waschschrte an. Abschließend wird die RNA durch Zugabe von 50 µl nukleasefreiem Wasser von der Matrix gelöst. Die spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung der gewonnen RNA erfolgte bei einem Absorptionsmaximum mit einer Wellenlänge von 260 nm, als auch bei mit einer Wellenlänge von 280 nm. Ein Verhältnis der optischen Dichte (OD) OD_{260}/OD_{280} um 2,0 spricht hierbei für reine RNA. Die Messung wurde mittels des Spektralphotometers NanoDrop 200 durchgeführt. Die Proben wurden bis zur Weiterverwendung bei -80 °C gelagert.

3.11.2 cDNA-Synthese

Da die in der qRT-PCR verwendete Taq-Polymerase, eine thermostabile DNA-Polymerase ist, muss die isolierte RNA (s. Kapitel 3.11.1) zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Die reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, synthetisiert die mRNA zu komplementärer cDNA (Heller et al. 2019).

Für die Reverse Transkription folgt zuerst die Anlagerung von Oligo(dT)-Primer an das 3'-Ende am Poly-A-Schwanz der mRNA. Hierfür wurden pro Probe 10 µl der RNA (50 ng/µl) mit je 1 µl dNTP und Oligo(dt) 12-18 Primer im Thermocycler für fünf Minuten bei 65 °C inkubiert. Zur Vermeidung einer möglichen RNA-Degradation durch endogene Ribonukleasen schloss sich pro Probe ein weiterer Ansatz mit je 1 µl RNaseOUT, 2 µl DTT und 4 µl 5x First Strand Buffer für zwei Minuten bei 42 °C im Thermocycler an. Anschließend folgte durch die Zugabe von je 1 µl SuperScript II (Reverse Transkriptase) pro Probenansatz und Inkubation bei 42 °C für 50 Minuten die eigentliche cDNA-Synthese. Die Reverse Transkriptase wurde bei 70 °C über 15 Minuten inaktiviert. Zur Verdünnung wurde wurden 20 µl der Probe mit 180 µl nukleasefreiem Wasser versetzt; die Lagerung folgte bei -20 °C.

Tabelle 11: Arbeitsschritte der cDNA-Synthese

Schritt	Reagenz	Volumen (µl)	Temperatur (°C)	Dauer (min)
Anlagerung der Primer	RNA	10	65	5
	dNTP	1		
	Oligo(dt) 12-18 Primer	1		
RNaseOUT Ansatz	RNaseOUT	1	42	2
	DTT	2		
	5x First Strand Buffer	4		
cDNA-Synthese	SuperScript II	1	42	50
Inaktivierung			70	15

3.11.3 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR basiert auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis et al. 1986) und besteht aus der Kombination aus vorangegangener Reversen Transkription (s. Kapitel 3.11.2) und quantitativen Echtzeitmessung der amplifizierten DNA. Eine Quantifizierung der Genexpression auf mRNA-Ebene ist durch dieses Verfahren möglich. Technische Voraussetzung hierfür ist ein Thermocycler mit integriertem

Fluoreszenzphotometer. Dem Verfahren der PCR folgend, besteht jeder Amplifikationszyklus auch hier aus einer thermischen Denaturierung der dsDNA, der anschließenden Anlagerung der Primerpaare (*Annealing*) an die komplementäre Sequenz der ssDNA und der nach folgenden Elongation durch eine thermostabile DNA-Polymerase. Bei der Elongation synthetisiert eine thermostabile DNA-Polymerase (*Taq-Polymerase*), ausgehend vom 3'-OH-Ende des angelagerten Primer und in Beteiligung von dNTP, einen komplementären dsDNA-Abschnitt. Durch die Interkalation eines Fluoreszenzfarbstoffs (*SYBR-Green*) mit der entstehenden dsDNA kann in Echtzeit, durch die Messung der Intensität der Fluoreszenz, proportional die quantitative Menge der gebildeten DNA-Abschnitts bestimmt werden (Higuchi et al. 1992). Der Amplifikationszyklus, bei dem hierbei erstmalig der Schwellenwert der emittierten Fluoreszenz erreicht wird und damit ein Fluoreszenzsignal detektiert werden kann, wird als C_T Wert (*cycle threshold*) angegeben. Über eine Normalisierung von gemessenen ΔC_T -Werten des Ziel-, sowie des Haushaltgens kann die relative Expression der Probe quantitativ über die Formel $2^{-\Delta\Delta C_T}$ berechnet werden (Livak und Schmittgen 2001).

Entsprechend dem Mastermix-Ansatz (Tabelle 12: qRT-PCR-Mastermix-Ansatz) wurde jede Probe pipettiert und auf die MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate überführt. Anschließend wurde die Reaktionsplatte mit einer Folie luftdicht versiegelt und in das StepOnePlus™ Real-Time PCR System gegeben. Das Programm wurde mit nachfolgenden Reaktionsschritten gestartet (Tabelle 13: Reaktionsschritte der qRT-PCR). Nach Beendigung der qRT-PCR wurden die Datensätze aus dem StepOnePlus™ Real-Time PCR System exportiert und nach $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode mittels Microsoft Word Excel berechnet.

Tabelle 12: qRT-PCR-Mastermix-Ansatz

Reagenz	Volumen (μ l)
cDNA (1:10)	3
Fast SYBR™ Green Master Mix	10
Primer Vorwärtsstrang	0,5
Primer Rückwärtsstrang	0,5
ddH ₂ O	6

Tabelle 13: Reaktionsschritte der qRT-PCR

Schritt	Zyklen	Temperatur (°C)	Dauer (s)
Aktivierung DNA-Polymerase	1	95	20
PCR	40		
Denaturierung		95	3

Schritt	Zyklen	Temperatur (°C)	Dauer (s)
Anlagerung/Elongation		60	30
Schmelzkurvenanalyse	1	95	15
		60	60
		95	15

3.12 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und Erstellung der Graphen erfolgte mittels der Software GraphPad Prism 9.2.0. Sofern nicht anders angegeben; werden alle Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung präsentiert. Zur Ermittlung der Signifikanz für Mehrfachvergleiche der Gruppen wurde eine einfaktorische ANOVA verwendet. *Student's t-Test* wurde für die Vergleiche mit einem Parameter gewählt. Statistische Signifikanz wurde definiert als p-Wert kleiner 0,05. Darstellung als * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ns nicht signifikant. Die statistische Auswertung wurde von Dr. rer. nat. Gunsmaa Nyamsuren (Klinik für Nephrologie und Rheumatologie, Universitätsmedizin Göttingen) durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Verstärkte Formierung von ARNT-Homodimeren durch selektive PP2A-Inhibition

4.1.1 PP2A-Inhibition akkumuliert endogenes ARNT

Eine Stimulation mit OA führt zu einer verstärkten Formierung von ARNT-Homodimeren *in vitro* (Levine und Perdew 2002). Zunächst sollte daher differenziert werden, ob die Akkumulation des endogenen Arnt einer Inhibition der PP1 oder der PP2A prädominierend unterliegt. Zur Evaluation wurde neben dem unselektiven PP1/PP2A-Inhibitor OA der selektive PP1-Inhibitor Tautomycetin (TMC) sowie der selektive PP2A-Inhibitor LB-100 gewählt (Mitsuhashi et al. 2001; Sydnos und Isobe 2010). Durch ein MTT-Assay wurden vor der Studie die Stimulationsdauer und die Konzentrationen der Stimulanzen etabliert (s. Kapitel 7). Für den Versuch wurden MCT-Zellen für je drei Stunden mit LB-100 (2,5, 5, 10, 15 μM), OA (10, 25, 50, 100 nM), oder mit TMC (100, 200, 400, 800 nM) in unterschiedlicher Konzentration stimuliert. Als Kontrolle dienten mit DMSO inkubierte MCT-Zellen. Eine Analyse erfolgte mit SDS-PAGE und Western Blot. Während eine Stimulation mit OA bzw. LB-100 eine Zunahme des Proteinlevel von Arnt bewirkten, blieb eine Stimulation mit TMC ohne Effekt (Abb. 7).

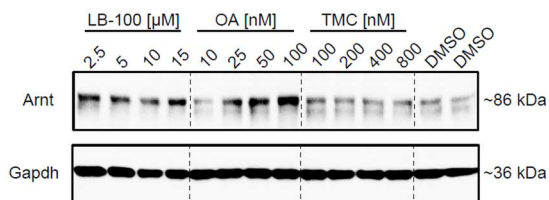


Abbildung 7: Selektiv vermehrte Induktion des Proteinlevel von Arnt in Abhängigkeit einer PP2A-Inhibition. Repräsentativer Western Blot zeigt Proteinlevel von Arnt in MCT-Zellen nach drei-stündiger Stimulation mit OA, LB-100 und TMC in unterschiedlicher Konzentration.

Nachfolgend sollte auf transkriptioneller Ebene der Einfluss einer PP2A-Inhibition auf die *Arnt*-Expression untersucht werden. Hierfür wurden MCT-Zellen über eine variierende Zeitdauer (0, 1, 3, 5, 10, 24 h) mit LB-100 (5 μM) stimuliert (Abb. 8 A). Außerdem wurden MCT-Zellen über einen fest determinierten Zeitraum (4 h) mit LB-100 in unterschiedlicher Konzentration (2,5, 5, 10, 15 μM) inkubiert (Abb. 8 B). Zur Kontrolle dienten mit DMSO inkubierte MCT-Zellen. Anschließend folgte eine Analyse mittels qRT-PCR. Ein signifikanter Einfluss einer PP2A-Inhibition auf die mRNA-Expression von *Arnt* konnte nicht festgestellt werden.

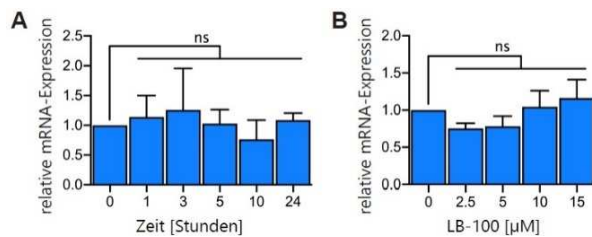


Abbildung 8: PP2A-Inhibition ohne Einfluss auf die transkriptionelle *Arnt*-Expression. (A) Relative *Arnt*-Expression nach Stimulation mit LB-100 (5 µM) zu unterschiedlichen Zeitpunkten. (B) Relative *Arnt*-Expression nach determinierter Stimulationsdauer (4 h) mit LB-100 in unterschiedlicher Konzentration. (A-B) Bestimmung der mRNA-Expression von *Arnt* durch qRT-PCR, anschließende Normalisierung mit *Gapdh*. Analyse in drei unabhängigen Replikaten. Die Graphen zeigen Mittelwert ± Standardabweichung; einfaktorielle ANOVA gegen nicht behandelte Kontrolle; ns nicht signifikant.

Da auf transkriptioneller Ebene eine PP2A-abhängige *Arnt*-Expression ausgeschlossen werden konnte, folgte eine kinetische Untersuchung der Degradation von Arnt mittels *Cycloheximide-chase* und anschließende Analyse durch SDS-PAGE und Western Blot. Hierfür wurden MCT-Zellen mit LB-100 (5 µM) sowie Cycloheximid (12,5 µg) stimuliert und für eine unterschiedliche Simulationsdauer (0, 3, 6, 10 h) inkubiert. Zur Kontrolle dienten mit DMSO behandelte Zellen. Eine PP2A Inhibition reduziert signifikant die Degradation von Arnt, infolgedessen akkumuliert Arnt und ein erhöhter Arnt-Proteinlevel ist nachweisbar (Abb. 9).

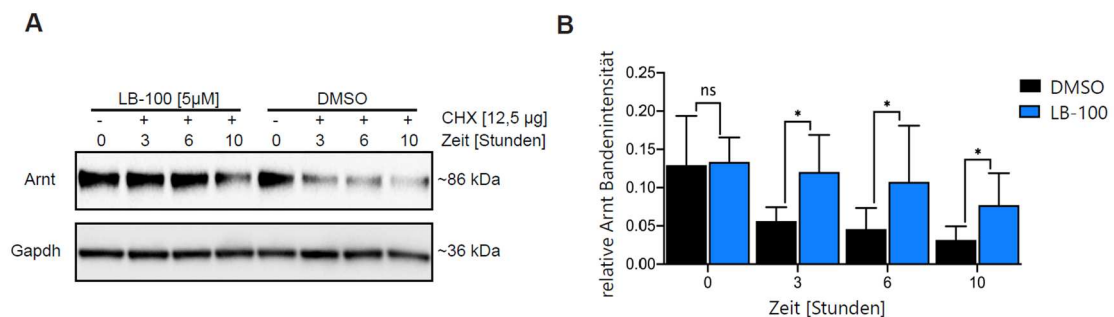


Abbildung 9: Endogene Arnt-Akkumulation durch LB-100-vermittelte Proteininstabilität. (A) Western Blot präsentiert *Cycloheximide-chase*: Arnt-Proteinlevel in LB-100-stimulierten MCT-Zellen. (B) Quantifizierung der relativen Bandenintensität von Arnt nach Normalisierung mit Gapdh. Analyse in drei unabhängigen Replikaten. Die Graphen zeigen Mittelwert ± Standardabweichung; einfaktorielle ANOVA gegen DMSO inkubierte Kontrolle; * $p < 0,05$, ns nicht signifikant.

4.1.2 PP2A-Inhibition induziert ARNT-Homodimer-Formierung

Funktionell kann sich ARNT in Abhängigkeit des Phosphorylierungsstatus zu Homodimeren-Komplexen formieren und infolgedessen eine transkriptionelle Aktivität vermitteln (Levine und Perdew 2002). Während die bisherigen Studien lediglich den Proteinlevel des akkumulierten ARNT untersucht haben, sollte im nächsten Schritt die Homodimerisierung von ARNT im Kontext einer PP1- bzw. PP2A-Inhibition analysiert werden. Für den Versuch wurden zwei unterschiedliche Expressionsvektoren (ARNT-

EGFP und ARNT-myc) mittels liposomaler Transfektion in HEK293-Zellen eingebracht. Anschließend wurden die transfizierten HEK293-Zellen für vier Stunden mit LB-100 (5 μ M), OA (50 nM) oder mit TMC (200 nM) stimuliert. Die Dimerisierung von transgenem ARNT wurde durch eine Ko-Immunpräzipitation mit SDS-PAGE und Western Blot untersucht (Abb. 10 A, B). Eine Stimulation mit OA und LB-100 induzierte eine verstärkte Formierung von transgenen ARNT-Homodimeren. Eine Stimulation mit dem PP1-Inhibitor TMC hatte keinen signifikanten Einfluss auf die ARNT-Homodimerisierung (Abb. 10 C). Eine PP2A-Inhibition führt zur verstärkten Formatierung transgener ARNT-Homodimere (Abb. 10 C).

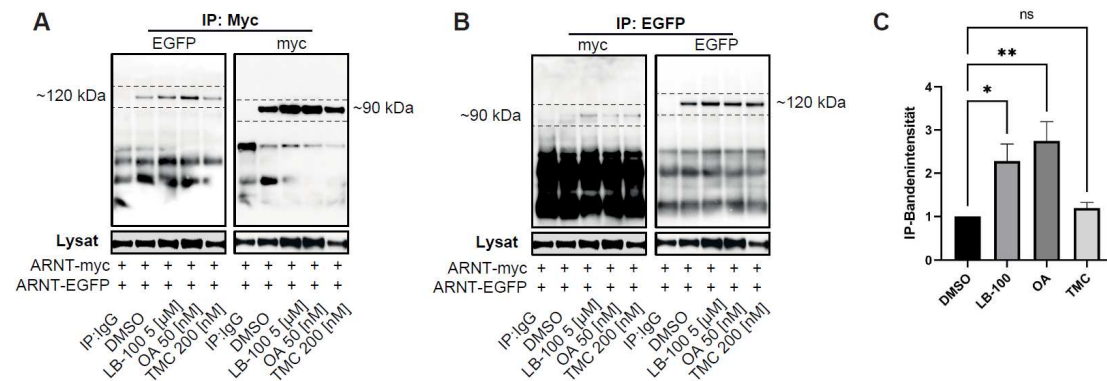


Abbildung 10: Verstärkte Formierung von transgenen ARNT-Homodimeren durch PP2A-Inhibition.

(A-B) Western Blot präsentiert Ko-Immunpräzipitation von ARNT-myc und ARNT-EGFP. Die transfizierten HEK293-Zellen wurden mit LB-100, OA, oder TMC stimuliert. IP: immunpräzipitiert.

(A) Membran inkubiert mit Antikörper gegen myc. **(B)** Membran inkubiert mit Antikörper gegen EGFP

(C) Quantifizierung der relativen Bandenintensität der Ko-Immunpräzipitation nach Normalisierung mit DMSO-Kontrollgruppe. Ausgewertet wurde die Bandenintensität der Ko-Immunpräzipitation, d.h. IP Myc inkubiert gegen EGFP-Antikörper und IP EGFP inkubiert gegen Myc-Antikörper. Analyse in drei unabhängigen Replikaten. Die Graphen zeigen Mittelwert \pm Standardabweichung; einfaktorielles ANOVA gegen DMSO inkubierte Kontrolle; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ns nicht signifikant.

Da zunächst mittels Überexpressionsmodell und Ko-Immunpräzipitation eine transgene ARNT-Homodimerisierung nachgewiesen werden konnte, sollten im nachfolgenden Schritt endogene ARNT-Homodimere identifiziert werden. Hierfür wurden MCT-Zellen für vier Stunden mit LB-100 (5 μ M) stimuliert, die Kontrollgruppe wurde mit DMSO versetzt. Es folgte eine Analyse der Protein-Konformation anhand eines Blue Native-PAGE und anschließenden Western Blot (Abb. 11). Eine PP2A-Inhibition mit LB-100 verstärkt die Formierung endogener ARNT-Homodimere, ohne eine Dimerisierung mit anderen bHLH-PAS-Transkriptionsfaktoren; Ahr, HIF-1 α und HIF-2 α zu bewirken.

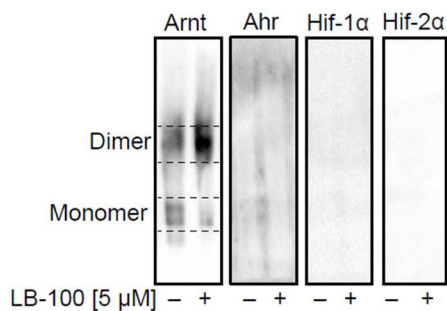


Abbildung 11: PP2A-Inhibition induziert selektiv endogene ARNT-Homodimer-Formierung.

Repräsentativer Western Blot nach Blue Native-PAGE zeigt native Protein-Konformation. MCT-Zellen wurden unter normoxischen Bedingungen mit LB-100 stimuliert. LB-100-induzierte ARNT-Homodimer-Formierung in Bereich von 180 kDa. Eine Stimulation mit LB-100 bleibt ohne Einfluss auf eine Dimerisierung mit Ahr, HIF-1 α und HIF-2 α .

Eine weitaus genauere Möglichkeit zur Detektion von PP2A-induzierten endogenen ARNT-Homodimeren bietet die massenspektrometrische Analyse. Hierfür wurden MCT-Zellen für vier Stunden mit LB-100 (5 μ M) stimuliert, die Kontrollgruppe wurde mit DMSO versetzt. Durch eine Immunpräzipitation wurde endogenes Arnt angereichert. Es folgte eine Analyse des molekularen Proteingewicht von ARNT mittels MALDI-TOF MS. Durch die massenspektrometrische Analyse konnte eine PP2A-induzierte Bildung endogener ARNT-Homodimere detektiert werden (Abb. 12).

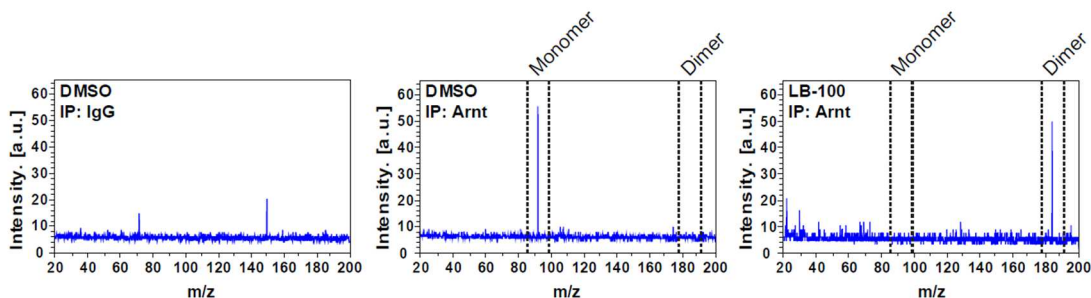


Abbildung 12: Verstärkte Bildung von endogenen ARNT-Homodimeren durch selektive PP2A-

Inhibition. Massenspektrometrische Analyse des molekularen Gewicht von Arnt. Die MCT-Zellen wurden mit LB-100 bzw. DMSO stimuliert. Anreicherung von Arnt mittels Immunpräzipitation (IP). Das Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z) wurde mit einem MALDI-TOF MS und Smartbeam 3D-Laser ermittelt. In den DMSO-Kontrollproben zeigen die Massenspektren einen *peak* mit m/z 90 kDa, der dem ARNT-Monomer entspricht. LB-100-induzierte Proben zeigen einen *peak* mit m/z 190 kDa, dies entspricht dem ARNT-Homodimer; $n = 3$.

4.1.3 Einfluss der PP2A-Inhibition auf die *ALK3*-Expression

ARNT-Homodimere binden an die palindromische E-box 5'-CACGTG-3' im proximalen *ALK3*-Promoter und aktivieren die Expression des renoprotektiven ALK3 (Tampe et al. 2018). Um den Einfluss der LB-100-modulierten ARNT Homodimerisierung auf die mRNA-Expression von *Alk3* zu untersuchen, folgte eine Analyse mittels qRT-PCR.

Zusätzlich wurde der Proteinlevel von Alk3 und Arnt durch SDS-PAGE und Western Blot evaluiert. Für den Versuch wurden MCT-Zellen mit LB-100, in variierender Konzentration (2,5, 5, 10, 15 μM), für vier Stunden stimuliert. Dosisabhängig ist der Proteinlevel von Arnt mit dem Proteinlevel von Alk3 assoziiert (Abb. 13 A). Die Akkumulation von Alk3 auf Proteinebene ist durch die gesteigerte *Alk3*-Expression zu erklären. Eine Stimulation mit LB-100 mediiert eine verstärkte *Alk3*-Expression (Abb. 13 B).

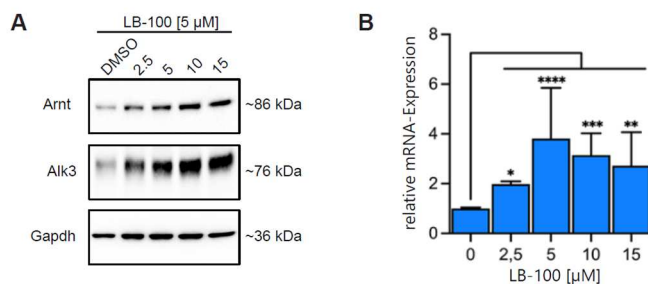


Abbildung 13: LB-100-modulierte ARNT-Homodimerisierung induziert *Alk3*-Expression.

(A) Repräsentativer Western Blot zeigt Proteinlevel von Arnt und Alk3 in MCT-Zellen nach vier-stündiger Stimulation mit LB-100 in unterschiedlicher Konzentration. (B) Relative *Alk3*-Expression nach dosisabhängiger Stimulation mit LB-100 über vier Stunden. Bestimmung der mRNA-Expression von *Alk3* durch qRT-PCR, anschließende Normalisierung mit *Gapdh*. Analyse in drei unabhängigen Replikaten. Die Graphen zeigen Mittelwert \pm Standardabweichung; einfaktorische ANOVA gegen nicht behandelte Kontrolle; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

4.2 Relevanz der Serin-77-Phosphorylierung für die ARNT-Homodimerisierung

Da der Phosphorylierungsstatus von ARNT bedeutend für die Formierung von ARNT-Homodimeren ist, wurde anschließend die Phosphorylierungsstelle von ARNT untersucht (Levine und Perdew 2002). Hierfür wurden HEK293-Zellen mit LB-100 (5 μM) bzw. DMSO stimuliert und ARNT durch eine anschließende Immunpräzipitation mit *Dynabeads* präzipitiert. Die Phosphorylierungsstellen des präzipitierten ARNT wurden zusätzlich angereichert und die Peptidsequenzen mit dem Q Exactive™ Plus Hybrid Quadrupole-Orbitrap-Massenspektrometer untersucht. Die Analyse erfolgte in drei unabhängigen Replikaten. Nach LB-100-Stimulation konnte differentiell ein Phosphopeptid mit der Aminosäuresequenz FARpSDDEQSSADKER identifiziert werden. Dies entspricht der ARNT-Sequenz an den Positionen 74 – 88; Serin an vierter Position innerhalb des Phosphopeptid (Serin-77), siehe hierfür die schematische Darstellung (Abb. 14).

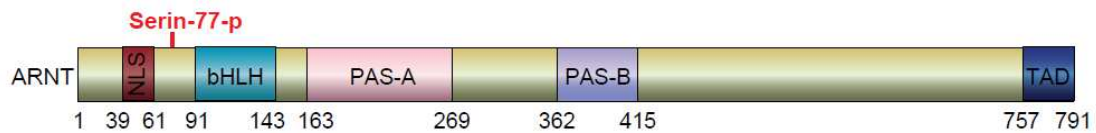


Abbildung 14: Phosphorylierungsstelle von ARNT ist lokalisiert an Serin-77. Schematische Darstellung von ARNT. Lokalisierung der Phosphorylierungsstelle Serin-77 zwischen NLS und bHLH-Motiv bzw. an den Positionen 74 – 88 der ARNT-Sequenz. Modifiziert nach (Crews 1998; Lindebro et al. 1995).

Auf diesem Ergebnis basierend, sollte nachfolgend die funktionelle Bedeutung der Phosphorylierungsstelle Serin-77 für die Formierung von ARNT-Homodimeren untersucht werden. Hierfür wurden zwei Expressionsvektoren Ser77/Asp-mut-ARNT-EGFP und Ser77/Asp-mut-ARNT-myc konstruiert, anschließend wurde diese in HEK293-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden mit LB-100 (5 μ M) über vier Stunden stimuliert. Als Kontrolle folgte der selbige Versuchsansatz, jedoch wurde anstelle der Mutanten, die bereits verwendeten Wildtyp-Expressionsvektoren ARNT-myc und ARNT-EGFP transfiziert. Die Dimerisierung von mutiertem transgenem ARNT wurde durch eine Ko-Immunpräzipitation mit SDS-PAGE und Western Blot untersucht. Ein *pull-down* von Ser77/Asp-mut-ARNT konnte trotz LB-100-Stimulation nicht festgestellt werden, hingegen formierte sich Wildtyp-ARNT unter Stimulation zu Homodimeren (Abb. 15).

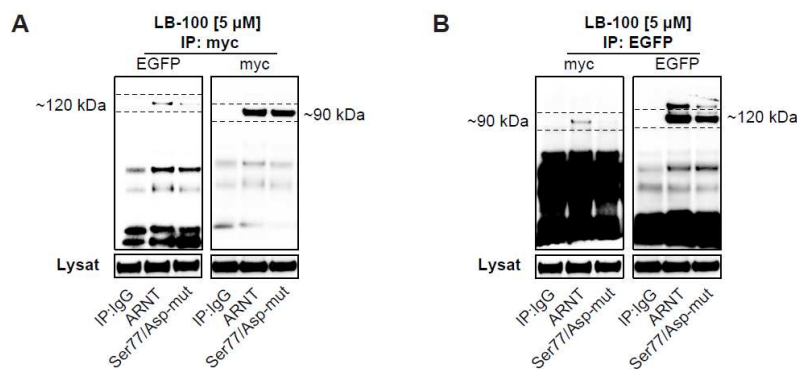


Abbildung 15: ARNT-Homodimerisierung ist abhängig von der Phosphorylierungsstelle Serin-77. (A-B) Repräsentativer Western Blot zeigt Ko-Immunpräzipitation von Ser77/Asp-mut-ARNT-EGFP und Ser77/Asp-mut-ARNT-myc. Als Kontrolle diente Wildtyp-ARNT-myc und Wildtyp-ARNT-EGFP. Die transfizierten HEK293-Zellen wurden mit LB-100 stimuliert. IP: immunpräzipitiert. *Pull-down* von Ser77/Asp-mut-ARNT nicht nachweisbar. (A) Membran inkubiert mit Antikörper gegen myc. (B) Membran inkubiert mit Antikörper gegen EGFP.

Durch den Austausch von Serin-77 mit der negativ geladenen Aminosäure Asparaginsäure ist eine LB-100-induzierte Homodimerisierung von ARNT nicht mehr möglich. Die Formierung von ARNT-Homodimeren ist folglich mit der Phosphorylierung der Aminosäure Serin-77 in ARNT assoziiert.

4.3 LB-100 induziert ARNT-Homodimere und verstärkt die Renoprotektion von FK506 und GPI-1046 *in vivo*

4.3.1 LB-100 induziert ARNT-Homodimerisierung in der murinen UUO-Niere

Während FK506 und GPI-1046 die Expression von *ARNT* induzieren, führt eine Stimulation mit dem PP2A-Inhibitor LB-100 zu einer verstärkten Formierung von ARNT-Homodimeren in Abhängigkeit der Phosphorylierung von Serin-77. Basierend auf den Vorarbeiten wurde im Folgenden der Synergismus von LB-100 und FK506 bzw. GPI-1046 auf die ARNT-vermittelte Renoprotektion *in vivo* untersucht. Für die Studie wurden sechs Behandlungsgruppen ($n = 6$) im zehntägigen UUO-Mausmodell untersucht: LB-100, FK506, GPI-1046, FK506 + LB-100 sowie GPI-1046 + LB-100. Zunächst sollten murine ARNT-Homodimere in UUO-Nieren nachgewiesen werden. Für die Massenspektrometrie erfolgte initial eine Immunpräzipitation mit *Dynabeads* zur Anreicherung von murinem Arnt. In der massenspektrometrische Analyse konnten endogener ARNT-Homodimere der murinen UUO-Niere nach LB-100-Applikation detektiert werden. In der Kontrollgruppe konnte keine ARNT-Homodimerisierung identifiziert werden (Abb. 16).

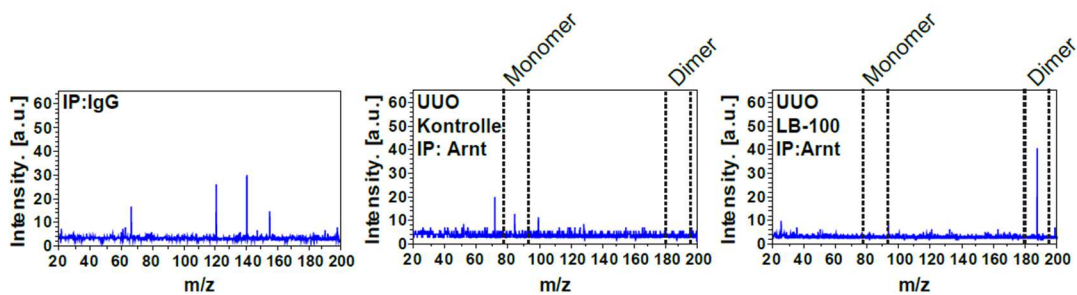


Abbildung 16: LB-100 induziert endogene ARNT-Homodimerisierung in der murinen UUO-Niere.

Vergleichende massenspektrometrische Analyse der murinen UUO-Nieren von LB-100-behandelten Mäusen und der unbehandelten Kontrollgruppe. Die Analyse erfolgte mittels Spektrometer rapifleX MALDI-Tissuetype und Smartbeam 3D-Laser. In der Kontrollgruppe zeigen die Massenspektren einen *peak* zwischen m/z 75 und 85 kDa, der dem ARNT-Monomer entspricht. LB-100-behandelte murine UUO-Nieren zeigen einen *peak* mit m/z 190 kDa, dies entspricht dem ARNT-Homodimer; $n = 3$.

Inwiefern eine simultane Applikation von LB-100 und FK506 bzw. GPI-1046 additive Effekte auf die Homodimerisierung von ARNT vermittelt, wurde durch einen Blue Native-PAGE und anschließenden Western Blot überprüft. Das murine Arnt wurde vor der Analyse durch eine Immunpräzipitation angereichert. Die Kombination von LB-100 und FK506 (Abb. 17 A) bzw. LB-100 und GPI-1046 (Abb. 17 B) zeigt eine verstärkte Protein-Konformation, entsprechend einer Formierung von ARNT-Homodimeren.

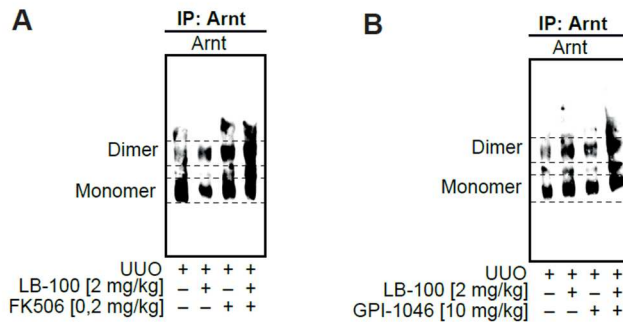


Abbildung 17: LB-100 und FK506 bzw. GPI-1046 induziert additiv vermehrt ARNT-Homodimere. (A-B) Repräsentativer Western Blot nach Blue Native-PAGE zeigt native Protein-Konformation von Arnt nach Immunpräzipitation (IP) in murinen UUO-Nieren.

Die Formierung von ARNT-Homodimeren ist mit der Akkumulation des endogenen ARNT assoziiert. Um den Einfluss der verschiedenen Pharmaka auf die ARNT-Induktion *in vivo* zu bestimmen, schloss sich eine Quantifizierung Arnt-positiver fluoreszenzmarkierter Zellkerne des tubulären Epithel an (Abb. 18 A). Die simultane Applikation von LB-100 und FK506 bzw. GPI-1046 verstärkt additiv die Arnt-Akkumulation (Abb. 18 B).

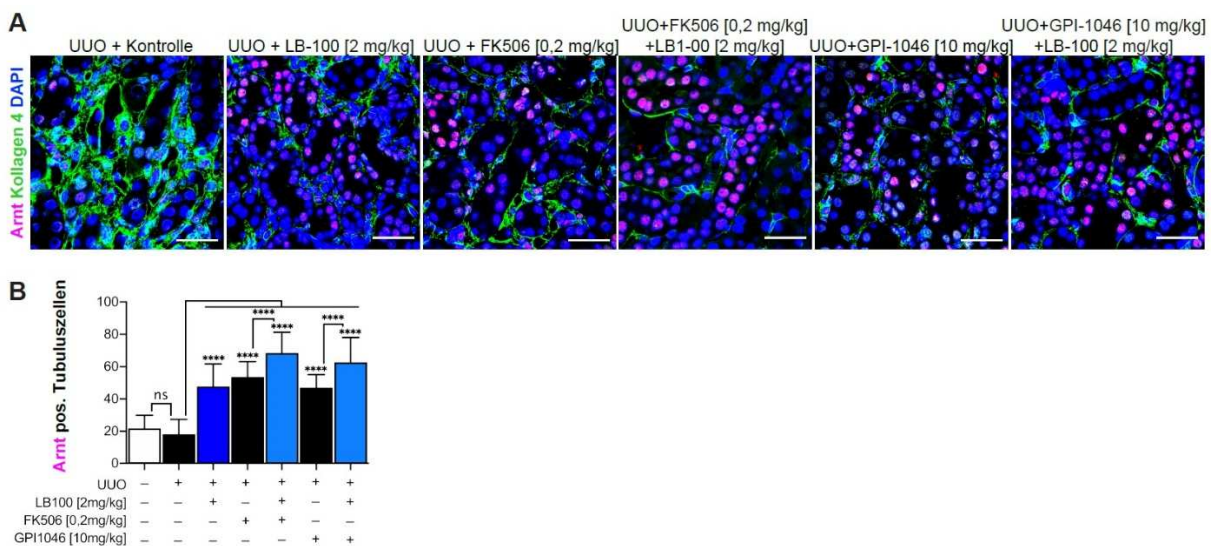


Abbildung 18: LB-100 und FK506 bzw. GPI-1046 verstärken additive Arnt-Induktion *in vivo*.

(A) Repräsentative Immunfluoreszenzmarkierung gegen Arnt-positive Zellkerne des tubulären Epithels (Messbalken: 15 µm). Histologische Photographien zeigen Gewebeschnitte muriner UUO-Nieren nachfolgender Kohorten: Kontrolle, LB-100, FK506, GPI-1046, LB-100 + FK506, LB-100 + GPI-1046.

(B) Quantifizierung Arnt-positiver Zellkerne. Die Graphen zeigen Mittelwert ± Standardabweichung; n = 6; einfaktorielle ANOVA gegen unbehandelte Kontrollgruppe; **** p < 0,0001, ns nicht signifikant.

4.3.2 LB-100 verstärkt additiv die Renoprotektion von FK506 bzw. GPI-1046 *in vivo*

Im Hinblick auf die Vorarbeiten wurde außerdem der additive Synergismus von LB-100 und FK506 bzw. GPI-1046 auf die ALK3-vermittelte Renoprotektion *in vivo* evaluiert. Hierfür wurde der Proteinlevel von Arnt, Alk3 und pSmad1/5/8 durch SDS-PAGE und Western

Blot bestimmt (Abb. 19-20). Die kombinierte Applikation von LB-100 und FK506 bzw. GPI-1046 erhöht durch Induktion von Arnt signifikant die Alk3-Expression auf Proteinebene (Abb. 19 B und Abb. 20 B). Der verstärkten Alk3-Akkumulation folgt konsekutiv eine Aktivierung der pSmad1/5/8-Singalkaskade (Abb. 19 A und Abb. 20 A). Die Monotherapie von LB-100 erwies sich hinsichtlich des Alk3-Proteinlevel als indifferent gegenüber der Supplementierung mit FK506 bzw. GPI-1046 (Abb. 19 B und Abb. 20 B).

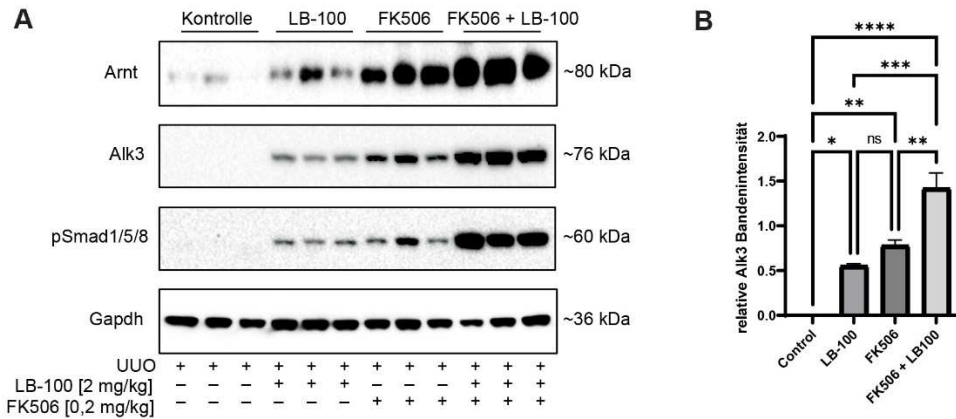


Abbildung 19: Vermehrte Alk3-Expression *in vivo* durch additiven LB-100- und FK506-Synergismus.

(A) Repräsentativer Western Blot zeigt Proteinlevel von Arnt, Alk3 und pSmad1/5/8 in murinen UUO-Nieren der Gruppen LB-100, FK506, FK506 + LB-100. **(B)** Quantifizierung der relativen Bandenintensität von Alk3 nach Normalisierung mit Gapdh. Die Graphen zeigen Mittelwert \pm Standardabweichung; einfaktorielle ANOVA; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ns nicht signifikant.

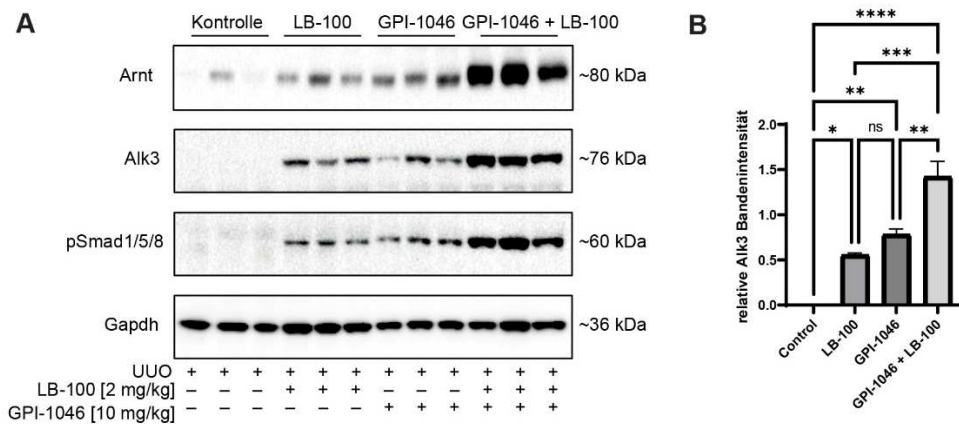


Abbildung 20: Vermehrte Alk3-Expression *in vivo* durch additiven LB-100- und GPI-1046-Synergismus.

(A) Repräsentativer Western Blot zeigt Proteinlevel von Arnt, Alk3 und pSmad1/5/8 in murinen UUO-Nieren der Gruppen LB-100, GPI-1046, GPI-1046 + LB-100. **(B)** Quantifizierung der relativen Bandenintensität von Alk3 nach Normalisierung mit Gapdh. Die Graphen zeigen Mittelwert \pm Standardabweichung; einfaktorielle ANOVA; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ns nicht signifikant.

Um den Einfluss von LB-100, FK506 und GPI-1046 auf die Repression der UUO-induzierten Fibrogenese zu bestimmen, wurde anhand histologischer Gewebeschnitte muriner UUO-Nieren der Fibrosegrad anteilig der Fläche morphometrisch quantifiziert (Abb. 21 C-F).

Für die Auswertungen wurden einerseits die histochemische Färbungen MTS (Abb. 21 C) und PSR (Abb. 21 D) verwendet, andererseits wurde die Fibroblasten-abhängige Disposition von Kollagen 1 (Abb. 21 F) und α -SMA (Abb. 21 E) durch Immunfluoreszenzmarkierungen nachgewiesen. Die Ergebnisse der histochemischen Färbungen (Abb. 21 C, D) konnten durch die Ergebnisse der Immunfluoreszenzmarkierungen (Abb. 21 E, F) validiert werden. Während die Monotherapien mit FK506 bzw. GPI-1046 eine vergleichbare signifikante Repression der renalen Fibrogenese induzierten, bewirkte die Monotherapie mit LB-100 eine schwächere Repression der Fibrogenese als die Monotherapien mit FK506 bzw. GPI-1046. Die simultane Applikation von LB-100 und FK506 bzw. von LB-100 und GPI-1046 konnte die renale Fibrogenese signifikant mildern und eine additive Renoprotektion erzielen (Abb. 21 C-F).

Durch Färbung mittels PAS-Reaktion folgte zudem eine semiquantitative Klassifizierung des tubulären Schadens. Der tubuläre Schaden unbehandelter UUO-Nieren konnte als *moderat* bis *schwer* klassifiziert werden. Durch die Monotherapien mit LB-100, FK506 oder GPI-1046 konnte eine tubuläre Protektion beobachtet werden, so dass der tubuläre Schaden als *mild* bis *moderat* semiquantitativ klassifiziert werden konnte. Die kombinierte Applikation von LB-100 und FK506 blieb ohne zusätzlichen protektiven Effekt, allerdings bot die kombinierte Applikation von LB-100 und GPI-1046 im Vergleich zur Monotherapie mit GPI-1046 eine verstärkte tubuläre Protektion (Abb. 21 B).

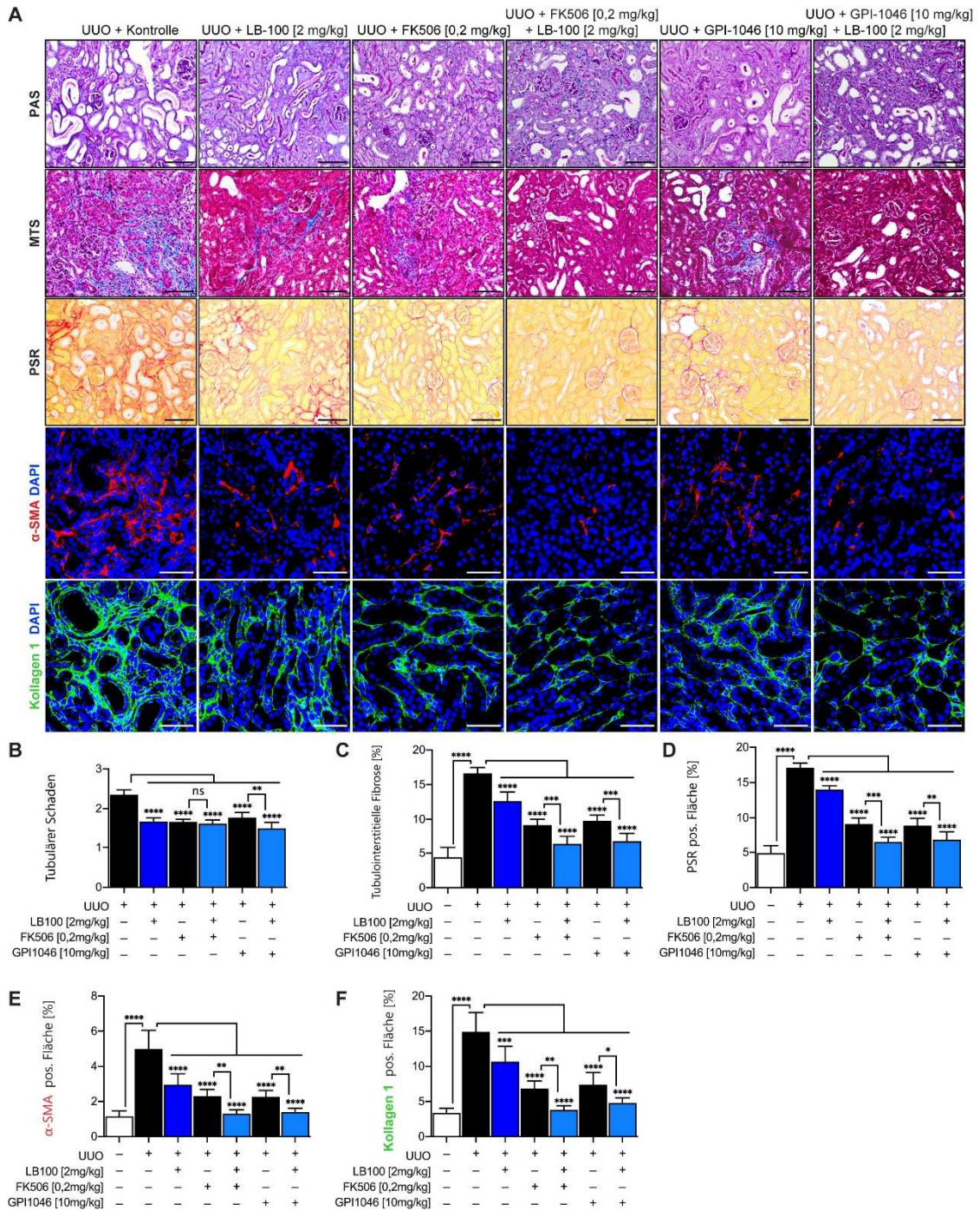


Abbildung 21: Milderung der UOO-induzierte Fibrogenese durch simultane Applikation von LB-100 und FK506 bzw. GPI-1046. (A) Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der PAS-, MTS- und PSR-Färbungen (Messbalken: 25 μ m). Immunfluoreszenzmarkierung gegen α -SMA und Kollagen 1 indizieren Fibroblasten-Aktivität (Messbalken: 15 μ m). Abbildungen zeigen Gewebeschnitte muriner UOO-Nieren nachfolgender Kohorten: Kontrolle, LB-100, FK506, GPI-1046, LB-100 + FK506, LB-100 + GPI-1046 **(B)** Semiquantitative Klassifizierung des tubulären Schadens. **(C-D)** Morphometrische Quantifizierung der IF-Fläche. **(E-F)** Morphometrische Quantifizierung der Expression von α -SMA und Kollagen 1 anteilig der

Standardabweichung; einfaktorielle ANOVA; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ns nicht signifikant.

Nachfolgend sollte eine mögliche additive Wirkung von LB-100 in Kombination mit FK506 bzw. GPI-1046 auf die Hemmung der CCl_4 -induzierten Fibrose untersucht werden (Abb. 23). Der Fibrosegrad muriner Leberschnitte wurde hierfür anhand von Färbungen mit Fast Green FCF und MTS morphometrisch quantifiziert (Abb. 23 B, C). Immunfluoreszenzmarkierungen gegen α -SMA und Kollagen 1 dienten als Marker der Fibroblasten-Aktivität (Abb. 23 D, E).

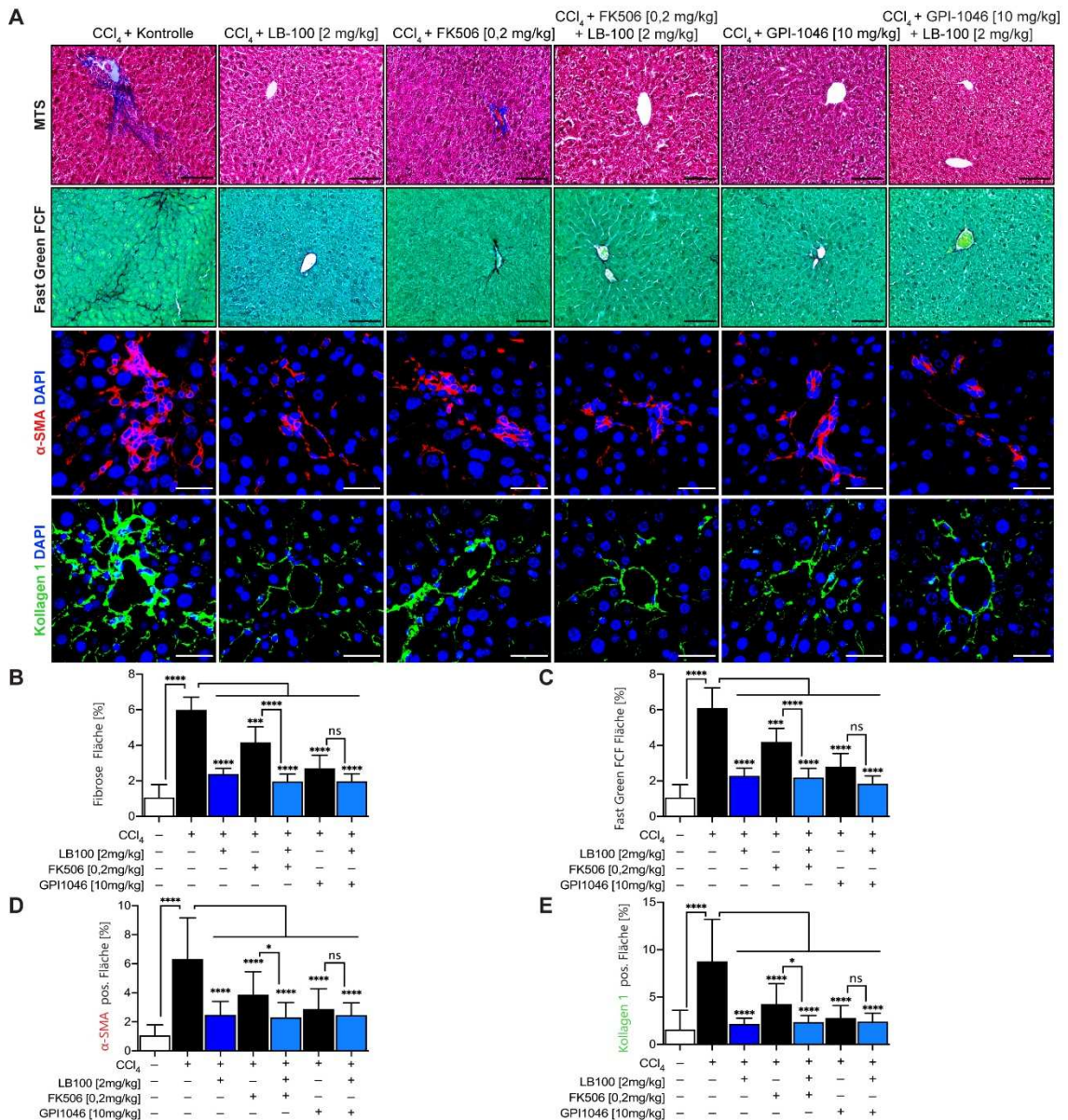


Abbildung 23: LB-100 mildert die experimentelle hepatische Fibrose. (A) Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der MTS- und Fast Green FCF-Färbungen (Messbalken: 25 μ m). Immunfluoreszenzmarkierung gegen α -SMA und Kollagen 1 indizieren Fibroblasten-Aktivität (Messbalken: 15 μ m). Abbildungen zeigen Gewebeschnitte muriner CCl_4 -Lebern nachfolgender Kohorten: Kontrolle, LB-100, FK506, GPI-1046, LB-100/FK506, LB-100/ GPI-1046. **(B-C)** Morphometrische Quantifizierung der Fibrosefläche. **(D-E)** Morphometrische Quantifizierung der Expression von α -SMA und Kollagen 1, anteilig

der Fläche. Die Graphen zeigen Mittelwert \pm Standardabweichung; n = 6; einfaktorielle ANOVA; * p < 0,05, *** p < 0,001, **** p < 0,0001, ns nicht signifikant.

Die Monotherapie mit LB-100 zeigte sich hinsichtlich der Repression der hepatischen Fibrogenese im Vergleich zur Monotherapie mit FK506 als deutlich überlegen; im Vergleich zur der Monotherapie mit GPI-1046 bot die Monotherapie mit LB-100 einen etwas stärkeren Effekt auf die Repression der hepatischen Fibrogenese. Die Monotherapien mit LB-100 bzw. GPI-1046 boten eine vergleichbare Minderung der hepatischen Fibrose wie die Kombinationstherapien LB-100 mit FK506 bzw. LB-100 mit GPI-1046. Die Kombinationstherapie von LB-100 und GPI-1046 blieb im Vergleich zur Monotherapie mit GPI-1046 allerdings ohne additive Effekte auf die Repression der hepatischen Fibrogenese. Hingegen konnte durch die Kombinationstherapie von LB-100 und FK506 eine etwas stärkere Repression der hepatischen Fibrogenese erzielt werden als unter Monotherapie mit FK506, allerdings weniger stark als unter Monotherapien mit GPI-1046 bzw. LB-100 (Abb. 23 B-E).

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die durch PP2A-Inhibition induzierte Formierung von ARNT-Homodimeren *in vitro* und *in vivo* untersucht. Eine pharmakologische Hemmung der PP2A-Aktivität führte hierbei zu einer vermehrten Stabilisierung und Akkumulation von ARNT-Homodimeren. Die Phosphorylierungsstelle an Serin 77 von ARNT ist für die Bildung von ARNT-Homodimeren von zentraler Relevanz. Im Kontext der FKBP12/YY1/ARNT/ALK3-Signalachse wurden die renoprotektiven Effekte einer pharmakologischen Modulation von ARNT-Homodimeren im UUO-Mausmodell nachgewiesen. Die Kombination des PP2A-Inhibitor LB-100 mit FK506 bzw. GPI-1046 zeigte hierbei eine additive Hemmung der experimentellen Fibrogenese. Im CCL₄-Mausmodell konnte eine PP2A-Inhibition mit LB-100 die hepatische Fibrose mildern.

5.1 Methodischer Nachweis von endogenen ARNT-Homodimeren

Die Evidenz von ARNT-Homodimeren wurden in Vergangenheit anhand von transgenem ARNT methodisch durch Ko-Immünpräzipitation und *gel mobility shift assay* beschrieben (Sogawa et al. 1995; Swanson et al. 1995; Antonsson et al. 1995; Levine und Perdew 2002; Arpiainen et al. 2007). Innerhalb der vorangegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe konnten erstmals endogene ARNT-Homodimere sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden. Methodisch gelang initial der proteomische Nachweis durch Blue Native-PAGE nach Schägger (Tampe et al. 2018). Auch im Kontext dieser Arbeit erfolgte der Nachweis endogener ARNT-Homodimere *in vitro* und *in vivo* mittels Blue Native-PAGE. Zwar können mit dieser Methode physiologische Protein-Protein-Interaktionen identifiziert werden, doch ist der Blue Native-PAGE durch mögliche Protein-Interferenz mit Coomassie-Brilliantblau und der Protein-Auftrennung des Gelgradienten limitiert (Wittig und Schägger 2005; Wittig et al. 2006). Das in dieser Arbeit durchgeführte MALDI-TOF-Verfahren ermöglichte bislang den erstmaligen massenspektrometrischen Nachweis von endogenen ARNT-Homodimeren sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Sogawa et al. 1995; Swanson et al. 1995; Antonsson et al. 1995; Levine und Perdew 2002; Arpiainen et al. 2007; Tampe et al. 2018). Die MALDI-TOF-Analyse bietet innerhalb der Proteomik die Möglichkeit, über die Proteinidentifikation hinaus Protein-Protein-Interaktionen zu identifizieren (Heck und van den Heuvel 2004). Aus methodischer Kombination von MALDI-TOF-Analyse und Blue Native-PAGE ergibt sich im Kontext dieser Arbeit somit eine robuste Evidenz für endogene ARNT-Homodimere. Der analytische Nachweis homodimerer Proteine-Protein-Interaktionen kann jedoch durch *Crosslinking*-Massenspektrometrie (XL-MS) noch spezifischer erfolgen. Dieses Verfahren ermöglicht nicht nur die Identifikation des Dimerisierungspartners, sondern auch die spezifische Charakterisierung interagierender Proteinabschnitte zwischen den beiden Dimerisierungspartnern (Lima et al. 2018). Im Zuge dieser Arbeit wäre jedoch ein solches Verfahren technisch und zeitlich zu aufwendig gewesen. Das MALDI-TOF-Verfahren ist für den alleinigen Nachweis der Homodimerisierung von ARNT ausreichend.

5.2 Formierung von ARNT-Homodimeren

Levine und Perdew (2002) demonstrierten *in vitro*, dass eine Stimulation mit dem unselektiven PP1/PP2A-Inhibitor OA zu einer verstärkten Formierung von ARNT-Homodimeren führt. Initiales Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher mittels transgenem ARNT und Ko-Immunpräzipitation zu differenzieren, welche Proteinphosphatase-Aktivität für die Homodimerisierung von ARNT relevant ist. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die Homodimerisierung von ARNT prädominant einer PP2A-Inhibition unterliegt. Mit dem PP2A-Inhibitor LB-100 lässt sich die Bildung von ARNT-Homodimeren spezifisch induzieren. Dies stellt einen neuartigen Aspekt hinsichtlich einer pharmakologischen Modulation ARNT-Homodimerer dar (Levine und Perdew 2002; Hong et al. 2015). Die verstärkte Formierung von ARNT-Homodimeren ist hierbei nicht von einer vermehrten transkriptionellen *Arnt*-Expression abhängig. Ergebnisse dieser Arbeit sind hierzu konsistent mit denen von Levine und Perdew (2002), die durch OA-Stimulation ebenfalls keinen Effekt auf die *ARNT*-Expression feststellen konnten.

In der Degradationsanalyse mittels *Cycloheximide-chase* zeigte sich nach LB-100-Stimulation eine verminderte Degradation von Arnt; die Halbwertszeit hatte sich nahezu verdoppelt. Allgemein wird die Halbwertszeit von ARNT mit 4,84 h angegeben (Lee et al. 2004; Choi et al. 2006). Eine LB-100-Stimulation führte zu einer Akkumulation des Proteinlevel von Arnt. Die erhöhte Proteinstabilität von ARNT ist infolge der präservierten Phosphorylierung und/oder der Homodimerisierung als wahrscheinlich anzunehmen (Mei et al. 2005; Nishi et al. 2014). Aufbauende Studien zur Untersuchung der erhöhten Proteinstabilität von dimerisierenden ARNT mittels *pulse-chase-analysis* könnten künftig genauere Erkenntnisse hierzu liefern (Jansens und Braakman 2003). In diesem Zusammenhang sind auch Degradationsmechanismen von ARNT näher zu untersuchen, da die physiologische Regulation der Degradation von ARNT weitestgehend unbekannt ist (Choi et al. 2006). Eine durch Polyubiquitinierung vermittelte Degradation von ARNT in Assoziation mit *DDB1-and-CULA-associated-factor-15* (DCAF15) ist beschrieben, allerdings ist die Regulation hierzu unter physiologischen Konditionen noch unklar (Kim et al. 2020).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch massenspektrometrische Analyse Serin-77 als Phosphorylierungsstelle von ARNT identifiziert werden. Die Aminosäure Serin-77 wurde experimentell anhand von ortsspezifischer Mutagenese durch Asparaginsäure ausgetauscht; eine Homodimerisierung von mutiertem ARNT konnte trotz LB-100-Stimulation mittels Ko-Immunpräzipitation nicht mehr nachgewiesen werden. Zur funktionellen Untersuchung von Serin wird häufig eine nicht-phosphorylierbare Alanin-Punktmutante verwendet (Sieracki und Komarova 2013; Chen und Cole 2015). Eine aufbauende Studie unter Verwendung einer Alanin-Punktmutante im Sinne einer nicht-phosphorylierbaren Kontrolle könnte beispielsweise die Bedeutung von Serin-77 auf die transkriptionelle Aktivität homodimerer ARNT-Komplexe im Hinblick auf die *ALK3*-Expression untermauern (Tampe et al. 2018). Das Ziel des Versuchs war es, die Wirkung der Phosphorylierung an

Serin-77 auf die ARNT-Homodimerisierung zu untersuchen. Eine denkbare ausbleibende Homodimerisierung von ARNT im Kontext einer Alanin-Punktmutante könnte auch auf einen Funktionsverlust zurückzuführen sein, der nicht allein in der fehlenden Phosphorylierung begründet sein muss. Serin- zu Alanin-Mutationen führen beispielsweise zu einem Verlust der Fähigkeit, Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden/anzunehmen. Zudem unterliegen Serinreste in Proteinen alternativen posttranslationalen Modifikationen. Letztlich führen die genannten phänotypischen Veränderungen im Kontext einer Alanin-Punktmutante – unabhängig einer Phosphorylierung selbst – zu biochemischen Funktionsveränderungen, so dass Rückschlüsse auf das Verhalten bzgl. der Dimerisierung von ARNT nicht mit letzter Sicherheit gezogen werden könnten (Chen und Cole 2015). Der Vorteil einer Asparaginsäure-Punktmutante im Kontext dieses Versuchs besteht in der Tatsache, dass einerseits Asparaginsäure eine negative Ladung besitzt wie phosphoryliertes Serin und dass sich andererseits phosphoryliertes Serin und Asparaginsäure strukturell sehr ähnlich sind (Sieracki und Komarova 2013; Chen und Cole 2015; Pérez-Mejías et al. 2020). Aufgrund der phosphomimetischen Eigenschaften der hier verwendeten Asparaginsäure-Punktmutante kann im Unterschied zu einer Alanin-Punktmutante insbesondere auf die spezifische Relevanz der Phosphorylierung von Serin-77 auf die ARNT-Homodimerisierung rückgeschlossen werden. Allerdings weist auch die verwendete Asparaginsäure-Punktmutante Limitationen auf; so ist beispielsweise die negative Ladung der Carboxylgruppe einer Asparaginsäure-Punktmutante nicht gleich der negativen Ladung der Phosphatgruppe. Auch unterscheidet sich die molekulare Größe einer Asparaginsäure-Punktmutante von der eines phosphorylierten Serins (Chen und Cole 2015). Die ausbleibende Homodimerisierung der Asparaginsäure-Punktmutante von ARNT könnte daher auch auf diese Ursachen zurückzuführen sein. Aufbauende Studien beispielweise unter Verwendung von *In-silico*-Modellen oder nicht-kanonische Aminosäuren könnten künftig ein weiterer Ansatz zur Untersuchung von Serin-77 als Phosphorylierungsstelle liefern (Pérez-Mejías et al. 2020). Letztlich zeigt allerdings der durchgeführte Versuch die spezifische Relevanz der Phosphorylierung an Serin-77 auf die Formierung von ARNT-Homodimeren.

Serin-77 ist zwischen dem N-Terminus nahen NLS und dem bHLH-Motiv lokalisiert (Lindebro et al. 1995; Crews 1998; Kewley und Whitelaw 2005). Damit liegt Serin-77 außerhalb des bHLH-Motivs und der beiden PAS-Domänen. Die genannten ARNT-Strukturabschnitte sind bekannterweise von Relevanz für DNA-Bindung und Protein- bzw. Transkriptionsfaktor-Dimerisierung (Sogawa et al. 1995; Kewley et al. 2004).

Durch den Nachweis von Serin-77 als bedeutende Aminosäure für die Homodimerisierung von ARNT ergibt sich weiterhin die Fragestellung, inwiefern Serin-77 Teil einer funktionellen Proteinstruktur ist. Mögliche Evidenzen hierfür kann eine Datenbank-basierte Proteinstrukturvorsage mit dem Programm AlphaFold liefern (Jumper et al. 2021; Varadi et al. 2022).

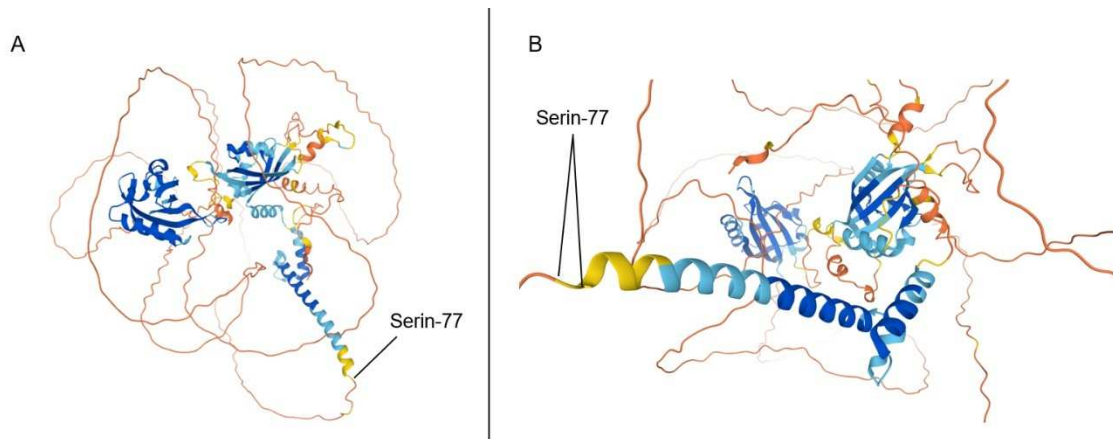


Abbildung 24: Dreidimensionale Proteinstrukturvorhersage von ARNT und Lokalisation von Serin-77. (A-B) Vereinfachte Legende: Blau: hohe Modell-Konfidenz; Gelb-Orange: niedrige Modell-Konfidenz (Abbildung modifiziert nach Jumper et al. 2021; Varadi et al. 2022). Lizenziert unter CC-BY 4.0; <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>; <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>

Die Proteinstrukturvorsage mit AlphaFold zeigt für Serin-77 eine geringe Modell-Konfidenz; eine Proteinstruktur ist nur unzureichend modelliert. Strukturell kann allerdings für das identifizierte Phosphopeptid eine α -Helix angenommen werden (Jumper et al. 2021; Varadi et al. 2022). Um die detaillierte Proteinstruktur von ARNT zu erfassen und funktionelle Proteinabschnitte für die Homodimerisierung oder DNA-Bindung zu bestimmen, könnte methodisch eine röntgenkristallographische Untersuchung nähere Erkenntnisse liefern (Christen 2016).

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit identifizierten Kewley und Whitelaw (2005) ebenfalls die Aminosäure Serin-77 als Phosphorylierungsstelle von ARNT. Die Proteinkinase *casein kinase-2* (CK2) phosphoryliert ARNT an Serin-77. Die für die Homodimerisierung essentielle Phosphorylierungsstelle an Serin-77 liegt innerhalb eines Phosphopeptid mit der Aminosäuresequenz FARpSDDEQSSADKER. Das in dieser Arbeit identifizierte Phosphopeptid ist hierbei sequentiell nahezu übereinstimmend mit der Aminosäuresequenz der 15 Aminosäuren längeren Transkriptvariante von ARNT. Allgemein sind beim Menschen und der Maus zwei Spleißvarianten bzw. Isoformen von ARNT bekannt, die sich um 15 Aminosäuren unterscheiden. Die hier vorliegende 15 Aminosäuren längere Transkriptvariante von ARNT besitzt eine höhere Affinität zu ihrer E-box 5'-CACGTG-3'. Der relevante Protein-kodierende Bereich dieser längeren Transkriptvariante von ARNT liegt im Exon-5. Während die 15 Aminosäuren längere Transkriptvariante von ARNT das Exon-5 aufweist und damit funktionell homodimerisieren kann, ist Exon-5 bei der kürzeren Transkriptvariante nicht vorliegend (Hoffman et al. 1991; Kewley und Whitelaw 2005).

Aminosäuresequenz des identifizierten Phosphopeptides:

FARp SDDEQSSADKER

Aminosäuresequenz des kodierenden Exon-5 der längeren Spleißvariante:

SDDEQSSADKER LAR

Abbildung 25: Identische Aminosäuresequenzen des identifizierten Phosphopeptides und des kodierenden Exon-5 der alternativen Spleißvariante von ARNT. Die Phosphorylierungsstelle von Serin-77 ist durch ein „p“ und einen Unterstrich gekennzeichnet (Hoffman et al. 1991; Kewley und Whitelaw 2005).

Alternatives Spleißen der bHLH-Transkriptionsfaktoren ist zwar grundsätzlich bekannt, doch ist die Regulation des Spleißens von ARNT bisher nicht geklärt (Kewley und Whitelaw 2005; Arpiainen et al. 2007). Eine mögliche Spleißregulation des Exon-5 von ARNT wurde durch Gardella (2016) beschrieben; eine Exon-5-assoziierte Histonmodifikation (H3K27ac, H3K4me1) konnte in Leukozyten konstatiert werden. Analog der in dieser Arbeit durchgeführten *In-vitro*-Studie mit den ARNT-Expressionsvektoren und anschließender Ko-Immünpräzipitation könnte sich durch die Verwendung von ARNT-Expressionsvektoren, die jeweils die Isoformen von ARNT enthalten der Versuch reproduzieren lassen. In diesem Versuchsaufbau könnte sich allerdings die Bedeutung des Exon-5 für die ARNT-Homodimerisierung nachweisen lassen. Anhand einer aufbauenden Knockdown-Studie (*in vitro*), beispielsweise unter Verwendung von *small interfering* RNA (siRNA) der beiden Isoformen von ARNT und Stimulation mit LB-100 könnte zudem der Isoform-abhängige Einfluss von ARNT auf die ALK3-Expression untersucht werden. Eine Expressionsanalyse der Arnt-Isoformen in murinen UUO-Nieren als auch in *sham*-Nieren könnte Hinweise über das Vorliegen eines alternativen Spleißens von ARNT in der geschädigten Niere geben. Ausweiten ließe sich diese Studie auf eine Expressionsanalyse des Exon-5 in ARNT von renalen Gewebeproben chronisch Nierenkranker.

5.3 Modulation von ARNT-Homodimeren durch PP2A-Inhibition im Kontext der FKBP12/YY1/ARNT/ALK3-Signalachse

Während die physiologische Funktion von ARNT als heterodimerer Bindungspartner von AHR und HIF- α bekannt ist, blieb die Funktion von ARNT-Homodimeren lange Zeit ungeklärt (Sogawa et al. 1995; Antonsson et al. 1995; Bacsı und Hankinson 1996; Huffman et al. 2001; Levine und Perdew 2002; Kewley et al. 2004; Rankin und Giaccia 2008). Arpiainen (2007) konnte erstmals die funktionelle Relevanz von ARNT-Homodimeren als transkriptioneller Regulator des murinen Cytochrom P450 2A5 demonstrieren. Tampe (2018) konnte in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe die therapeutischen Funktion von ARNT-Homodimeren innerhalb der organprotektiven FKBP12/YY1/ARNT/ALK3-Signalachse nachweisen. Eine FK506- bzw. GPI-1046-Stimulation aktiviert durch Dissoziation des FKBP12/YY1-Repressorkomplex die transkriptionelle ARNT-Expression. Infolgedessen bindet ARNT vermehrt an sein Homodimer-Motiv 5'-CACGTG-3' im proximalen ALK3-Promotor und transaktiviert die ALK3-Expression.

Experimentell konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine PP2A-Inhibition mit LB-100 zwar ebenfalls die *Alk3*-Expression induziert, jedoch ohne eine transkriptionelle Aktivierung der *Arnt*-Expression zu bewirken. Die durch PP2A-Inhibition präservierte Phosphorylierung von Serin-77 in ARNT induziert über Stabilisierung eine verstärkte Akkumulation und Homodimerisierung von ARNT. Die vermehrte Bildung von ARNT-Homodimere ist mit einer gesteigerten Transaktivierungsaktivität von *ALK3* assoziiert. Die Hochregulation der Transaktivierungsaktivität von homodimerisierten ARNT konnten ebenfalls Levine und Perdew (2002) nach OA-Stimulation beobachten. Da über die Phosphorylierung von ARNT die Transaktivierungsaktivität reguliert wird, ergibt sich folglich die Fragestellung, welcher physiologischen Regulation der Phosphorylierungsstatus von ARNT unterliegt. In der Literatur konnte diese Frage bisher nicht abschließend geklärt werden (Levine und Perdew 2002; Kewley und Whitelaw 2005). Wie bereits erwähnt beschrieben Kewley und Whitelaw (2005) allerdings eine CK2-assoziierte Phosphorylierung von Serin-77 in ARNT. Im Hinblick auf die präservierte Phosphorylierung von Serin-77 in ARNT durch die PP2A-Inhibition stellt sich daher die Frage, inwiefern eine CK2-Überexpression oder die Applikation von rekombinanter CK2 eine ARNT-Homodimerisierung induzieren würde. Dieser Überlegung folgend würde ein Knockdown der CK2 oder eine spezifische pharmakologische CK2-Inhibition mit CX-4945 keine Phosphorylierung von Serin-77 in ARNT bedingen, sodass eine PP2A-Inhibition keine ARNT-Homodimerisierung induzieren würde. Dieser Versuchsansatz würde allerdings eine vorherige Identifizierung der CK2-Isoform, die ARNT spezifisch phosphoryliert voraussetzen (Kalousi et al. 2010; Siddiqui-Jain et al. 2010; Turowec et al. 2010). Eine Assoziation der CK2(-Aktivität) und ARNT könnte zudem auch ursächlich der verstärkten ARNT-Homodimerisierung sein, welche infolge der FK506- bzw. GPI-1046-induzierten ARNT-Expression entsteht (Kewley und Whitelaw 2005; Tampe et al. 2018).

Die kombinierte Applikation von FK506 + LB-100 bzw. GPI-1046 + LB-100 im UO-Mausmodell führte innerhalb dieser Mauskohorten zu einer stärkeren Formierung von ARNT-Homodimeren als unter Monotherapie. Methodisch konnte dies mittels Blue Native-PAGE nachgewiesen werden. Jedoch ist diese Methode aus den bereits erwähnten Gründen und fehlender Quantifizierungsmöglichkeit limitiert (Wittig und Schägger 2005; Wittig et al. 2006). Die Sinnhaftigkeit einer quantifizierenden Massenspektrometrie aller Kohorten bleibt in Anbetracht des erheblichen Zeitaufwands und der hohen Kosten zu evaluieren. Anhand der Kohorten-spezifischen *Alk3*-Expression auf Proteinebene lässt sich jedoch die gesteigerte Transaktivierungsaktivität von ARNT-Homodimeren indirekt quantifizieren (Tampe et al. 2018). So führte die kombinierte Applikation von FK506 + LB-100 bzw. GPI-1046 + LB-100 zu einer signifikanten Steigerung der *Alk3*-Expression. Die verstärkte *Alk3*-Aktivität war hierbei mit einer vermehrten Aktivierung der renoprotektiven pSmad1/5/8-Singalkaskade assoziiert (Spickerkoetter et al. 2013; Tampe et al. 2018).

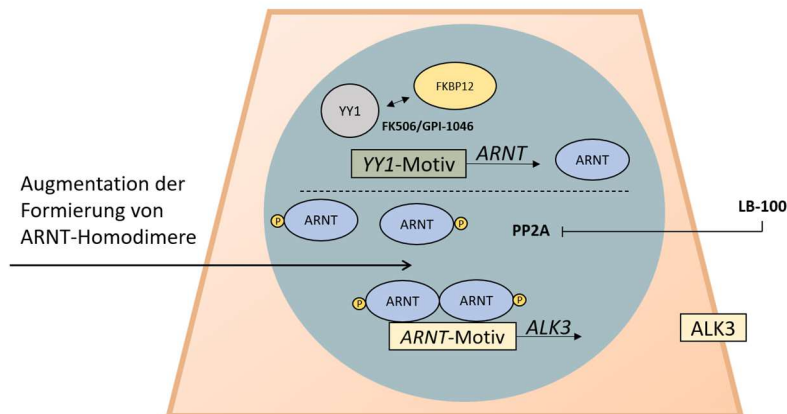


Abbildung 26: Schematische Darstellung der additiven Wirkungsweise von FK506 bzw. GPI-1046 und LB-100. Repressive FKBP12/YY1-Komplexe hemmen die *ARNT*-Transkription im Tubulusepithel. Infolge einer Supplementation mit FK506 bzw. GPI-1046 dissoziieren die FKBP12/YY1-Komplexe und *ARNT* wird vermehrt transkribiert. Eine PP2A-Inhibition mit LB-100 induziert eine *ARNT*-Homodimerisierung und Stabilisierung. Die simultane Stimulation von LB-100 und FK506 bzw. GPI-1046 führt zu einer augmentierten *ARNT*-Homodimer-Bildung. Konsekutiv induzieren *ARNT*-Homodimere eine verstärkte *ALK3*-Expression (Abbildung modifiziert nach Tampe et al. 2018).

Der additive Synergismus von FK506 und LB-100 ist insbesondere unter dem Aspekt relevant, dass eine Steigerung der organprotektiven Wirkung des niederdosierten FK506 durch weitere Dosisanpassungen ausgeschlossen ist. Bei Ausdosierung hätte FK506 die unerwünschte immunsuppressive Wirkung, während bei Dosisreduktion FK506 ohne Effekt auf die Organprotektion blieb (Hüser et al. 2009; Spiekerkoetter et al. 2013; Tampe et al. 2018). Allerdings bleibt in dieser Arbeit die Fragestellung offen, inwieweit eine FK506- bzw. GPI-1046-Stimulation die Expression einer der bereits angeführten Transkriptvarianten von *ARNT* differentiell begünstigen kann und damit zu einer vermehrten Formierung von *ARNT*-Homodimeren beiträgt (Hoffman et al. 1991; Kewley und Whitelaw 2005; Tampe et al. 2018).

5.4 Einfluss der PP2A-Inhibition auf die renale Fibrogenese

Die pharmakologische Modulation der *ARNT*-Homodimere hemmt über Aktivierung der renoprotektiven BMP-pSMAD1/5/8-Singalkaskade die Progression der Nierenfibrose (Zeisberg et al. 2003; Bechtel und Zeisberg 2009; Sugimoto et al. 2012; Tampe et al. 2018). Das in der vorliegenden Studie angewandte UUO-Mausmodell ist hierbei für die Untersuchung der Wirkung von Therapeutika auf die progrediente renale Fibrogenese eine etablierte Methode. Pathophysiologische Charakteristika der zellulären und molekularen Fibrogenese lassen sich durch dieses Modell experimentell abbilden; eine Aktivierung der Fibroblasten durch TGF- β 1 folgt einer exzessiven EZM-Disposition und α -SMA-Expression (Chevalier et al. 2009). So konnte in der vorliegenden Arbeit eine ausgeprägte Nierenfibrose der unbehandelten Kontrollgruppe beobachtet werden. Analog zu den Vorarbeiten milderte die Applikation von FK506 bzw. GPI-1046 die Progredienz der renale

Fibrosierung (Tampe et al. 2018). Der renoprotektive Effekt der beiden Pharmaka konnte durch die simultane Gabe von LB-100 deutlich verstärkt werden. Die Kohorten LB-100 + FK506 und LB-100 + GPI-1046 boten gegenüber der Monotherapie eine signifikante Reduktion der interstitielle Fibrose und des Fibrosemarkers α -SMA (Ina et al. 2011). Die Milderung der Fibrose erwies sich dabei als mit der nativen Formierung von ARNT-Homodimeren, der Alk3-Expression sowie der konsekutiven Aktivierung der pSmad1/5/8-Singalkaskade assoziiert. Eine PP2A-Inhibition mit LB-100 kann durch verstärkte Formierung von ARNT-Homodimeren die renoprotektive Wirkung von FK506 und GPI-1046 additiv steigern.

In dieser Arbeit wurde die PP2A-Inhibition im Kontext der FKBP12/YY1/ARNT/ALK3-Signalachse untersucht. Da die PP2A ubiquitär exprimiert wird und eine Vielzahl zellulärer Prozesse reguliert, sind Interferenzen durch eine PP2A-Inhibition mit anderen Signalwegen gegeben (Sontag und Sontag 2014; Wlodarchak und Xing 2016). In renalem Gewebe chronisch Nierenkranker und muriner UUO-Nieren konnte eine gesteigerte Expression der katalytischen Untereinheit C α der PP2A (PP2Ac α) konstatiert werden (Lu et al. 2022). Eine makrophagozytäre PP2Ac α -Induktion führt über Aktivierung von *Ras-related-protein-1* (Rap1) zu einer Zunahme der Makrophagen-Migration in das Nierengewebe. Dort vermittelt die PP2Ac α -Aktivität proinflammatorische Effekte durch eine gesteigerte Tumornekrosefaktor- α -Produktion (Liang et al. 2021). Die hochregulierte Expression der fibroblastären PP2Ac α begünstigt durch Suppression des *extracellular-signal regulated kinases*(ERK)-Signalwegs die TGF- β 1-mediierte Fibroblastenaktivierung (Lu et al. 2022). Die Dysregulation der PP2Ac-Aktivität führt zu einer aberranten Phosphorylierung von SMAD3 mit einer konsekutiven Transkription profibrotischer EZM-Zielgene (Meng et al. 2015; Luo et al. 2021).

In der Vergangenheit wurde bereits eine PP2A-Inhibition als möglicher Therapieansatz der renalen Fibrosierung experimentell evaluiert (Deng et al. 2016). Der PP2A-Inhibitor Norcantharidin, ein synthetisches Derivat von Cantharidin, hemmt das EMT-Programm und die EZM-Disposition *in vitro* (Li et al. 2011; Li et al. 2013). Durch die Applikation von Norcantharidin konnte in UUO-Mausmodellen und im *Protein-Overload*-Modell der Ratte eine Reduktion der renalen Fibrose demonstriert werden (Liu et al. 2008; Li et al. 2013; Luo et al. 2021). Der antifibrotische Effekt von Norcantharidin beruht auf einer Abnahme der Phosphorylierung von SMAD2/3 und konsekutiver Expressionsreduktion des transkriptionellen EMT-Aktivators *snail-family-transcriptional-repressor-1* (Snail-1) (Li et al. 2013). Auch inhibiert Norcantharidin den proinflammatorischen Transkriptionsfaktor *nuclear factor kappa-light-chain-enhance* (NF- κ B) und verringert dadurch sowohl tubulointerstitielle Inflammation und Fibrose als auch die Zunahme von Proteinurie (Liu et al. 2008).

In Anbetracht der umfassenden Bedeutung der PP2A für die Progredienz der renalen Fibrose gilt es zukünftig, die therapeutische Wirkungsweise von LB-100 in weiteren Fibrose-assoziierten Signalwegen zu eruieren. Weitere Studien hierzu sollten jedoch nicht ausschließlich im UUO-Modell erfolgen. Eddy (2012) postulierte plausiblerweise,

grundlegende Ergebnisse aus UUO-Experimenten in mindestens einem weiteren Tiermodellen der CKD zu validieren. Um den Schweregrad der interstitiellen Fibrose quantitativ zu bewerten, ist zudem eine zusätzliche Bestimmung der Kreatinin-Clearance und der Proteinurie empfohlen (Eddy et al. 2012). Die Folgen der PP2A-Inhibition auf die renale Funktion blieben in der hier durchgeführten UUO-Studie unklar. Der PP2A-Inhibitor Fostriecin gilt beispielsweise als nephrotoxisch und verursacht eine tubuläre Schädigung (Jong et al. 1998).

5.5 Relevanz und Limitation der CCL₄-Studie

Die Leberzirrhose stellt unabhängig von ihrer Ätiologie weltweit die 14 häufigste Todesursache dar. Eine heterogene Gruppe von Erkrankungen führt zur Inflammation, Fibrosierung und Verlust des funktionellen Leberparenchyms (Tsochatzis et al. 2014). Grundlegende Pathomechanismen der Fibrogenese werden von der Leber und Niere geteilt (Zeisberg und Kalluri 2013; Rockey et al. 2015). Ein wichtiger Effektor der hepatischen Fibrogenese sind transdifferenzierte Ito-Zellen (Friedman 2010; Tsuchida und Friedman 2017). Aktuelle Therapieregime umfassen insbesondere die Prävention eines weiteren Krankheitsprogresses und die Behandlung viraler Hepatitiden (Tsochatzis et al. 2014). Im CCL₄-Mausmodell konnte durch die Gabe von rhBMP7 die Progredienz der hepatischen Fibrosierung experimentell gehemmt werden (Zeisberg et al. 2007). In Mausstudien der Partiellen-Lobulären-Hepatektomie vermittelte rhBMP7 eine ALK3-assoziierte Regeneration der Leber (Sugimoto et al. 2007). Im Kontext der Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte der hepatoprotektive Effekt von FK506 und GPI-1046 über die FKBP12/YY1/ARNT/ALK3-Signalachse bereits dargelegt werden (Tampe et al. 2018). Unabhängige Studien konnten zudem YY1 als möglichen Therapieansatz der Leberfibrose identifizieren. Ein Knockout von *Yy1*^{-/-} in Myofibroblasten attenuiert die Fibrogenese im CCL₄-Modell (Liu et al. 2019). Eine pharmakologische Disruption mit FK506 bzw. GPI-1046 vermittelt über die Dissoziation von FKBP12 und YY1 ebenfalls eine Minderung der Fibrogenese (Tampe et al. 2018).

Ausgehend von der Beobachtung, dass die simultane Gabe von LB-100 und FK506 bzw. GPI-1046 eine verstärkte Renoprotektion im UUO-Mausmodell bewirkt, wurde im Rahmen dieser Arbeit analog dazu eine CCL₄-Studie initiiert. Eine Monotherapie mit LB-100 konnte die Fibrose in gleichem Maße mildern wie in Kombination mit FK506 bzw. GPI-1046. Additive Effekte, ähnlich zu der UUO-Studie, waren allerdings nicht zu beobachten. So zeigte sich zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der funktionellen Aktivierung von pSmad1/5/8. Statistisch könnte die geringe Effektstärke durch eine zu kleine Anzahl von Tieren der jeweiligen Behandlungskohorten begründet sein. Auch könnte ARNT trotz der simultanen Gabe von LB-100 und FK506 bzw. GPI-1046 der limitierende Faktor der angenommenen Wirkungsverstärkung gewesen sein. Zwar ist die Expression von ARNT in allen mammalischen Geweben ubiquitär und

abundant; eine Supplementierung mit FK506 bzw. GPI-1046 führt sowohl in der Niere als auch in der Leber zu einer ARNT-Expression, doch besitzt ARNT im Kontext des xenobiotischen Metabolismus die Funktion mit AHR zu dimerisieren (Hoffman et al. 1991; Carver et al. 1994; Bacsı und Hankinson 1996; Kewley et al. 2004; Tampe et al. 2018). Im CCL₄-Mausmodell ist allerdings die funktionelle Aktivität von AHR nicht hinreichend geklärt, sodass eine mögliche Interferenz von ARNT und AHR den angenommenen Effekt einer verstärkten ARNT-Homodimerisierung limitiert haben könnte (Bacsı und Hankinson 1996; Carambia und Schuran 2021). Für weiterführende Untersuchungen der Relevanz von ARNT im Zusammenhang der Leberzirrhose könnten künftig chirurgisch-basierte Mausmodelle zur Induktion der hepatischen Fibrose nähere Erkenntnisse liefern (Yanguas et al. 2016). Die antifibrotische Wirkung von LB-100 im CCL₄-Modell erklärt sich zudem auch durch die Hemmung der PP2Ac α in Hepatozyten. Eine Deletion der *Pp2ca*^{-/-} muriner Hepatozyten verringert die CCL₄-induzierte Leberfibrose durch Suppression der TGF- β 1-Sekretion und Reduktion von pSmad2/3 (Lu et al. 2015).

5.6 Therapeutische Modulation von ARNT-Homodimeren

5.6.1 Theoretische Limitation

Aufgrund der ubiquitären Expression von ARNT, drängt sich die Frage auf, welche Nebeneffekte eine pharmakologische Modulation von ARNT-Homodimeren in Geweben außerhalb der Niere vermittelt (Carver et al. 1994; Kewley et al. 2004). Insbesondere steht dabei die Überlegung im Fokus, dass ARNT als Dimerisierungspartner von AHR und HIF- α eine zentrale Funktion für die Bindung an das *xenobiotic response element* bzw. *hypoxia responsive element* besitzt (Hoffman et al. 1991; Bacsı und Hankinson 1996; Rankin und Giaccia 2008). Beide Signalwege sind unmittelbar von der nukleären Präsenz von ARNT abhängig. Eine pharmakologische Modulation von ARNT-Homodimeren könnte zu einer Konkurrenz um die Bindung von ARNT führen, infolgedessen könnten disruptive Interferenzen der Signalwege entstehen (Haase 2019). Zwar ergaben sich im Blue Native-PAGE keine Hinweise auf eine Dimerisierung von ARNT mit anderen bHLH-PAS-Transkriptionsfaktoren, doch erfolgte dieser Versuchsansatz unter Normoxie. Aufbauende Studien sowohl unter hypoxischen Bedingungen als auch unter xenobiotischen Stress könnten Ergebnisse zum Dimerisierungsverhalten von modulierten ARNT-Homodimeren liefern. Darüber hinaus ist bekannt, dass eine Fehlregulation von bHLH-PAS-Transkriptionsfaktoren das Tumorwachstum fördern kann (Shi et al. 2009; Mandl und Depping 2014). Die Heterodimerisierung von HIF-2 α und ARNT gilt z. B. als ein experimentelles *therapeutic-target* zur Behandlung des klarzelligen Nierenzellkarzinoms (Cho et al. 2016; Motta et al. 2018). Inwiefern eine Modulation von ARNT-Homodimere onkogene Effekte begünstigt oder gar verhindert bleibt zu prüfen.

5.6.2 Potentielle klinische Translation und Ausblick

Die zunehmende Krankheitslast der CKD ist sowohl in gesellschaftlicher als auch in gesundheitsökonomischer Hinsicht von globaler Relevanz (Foreman et al. 2018; Bikbov et al. 2020; Gandjour et al. 2020). Mit der Gruppe der SGLT-2-Inhibitoren steht erstmals neben der RAAS-Blockade ein weiterer pharmakologischer Therapieansatz zur Progressionsverhinderung der CKD zur Verfügung. Eine kausale Heilung der CKD ist jedoch ausgeschlossen (Fischer von Weikersthal 2021; Kalantar-Zadeh et al. 2021). Obwohl die CKD eine heterogene Gruppe von Erkrankungen umfasst, liegt diesen der gemeinsame Pathomechanismus der progredienten interstitiellen Fibrosierung zugrunde (Zeisberg und Neilson 2010; Farris und Colvin 2012; Bülow und Boor 2019; Djudjaj und Boor 2019).

Aus dem Verständnis des Mechanismus der renalen Fibrogenese sowie aus der antifibrotischen und organregenerativen Wirkung des endogenen BMP7 resultierte die Entwicklung von rhBMP7. Die pharmakologische Komplexität von rhBMP7 verhinderte jedoch im Kontext der CKD eine klinische Anwendung (Zeisberg et al. 2003; Zeisberg und Kalluri 2004; Bechtel und Zeisberg 2009). Die Regenerationsfähigkeit einer geschädigten Niere unterliegt jedoch auch der Expression des ALK3-Rezeptors – diese Erkenntnis bietet somit einen weiteren potentiellen Therapieansatz (Sugimoto et al. 2012). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte pharmakologische Induktion von ARNT-Homodimeren mit einer simultanen Applikation von LB-100 und FK506 bzw. GPI-1046 macht sich die protektive Wirkung von ALK3 zu Nutzen. So führte die augmentierte ARNT-Homodimerbildung zu einer verstärkten ALK3-Expression und konsekutiver Renoprotektion.

Tatsächlich erwies sich in humanen Nierentransplantaten eines mit FK506-behandelten Patientenkollektivs eine signifikante *ARNT*- sowie *ALK3*-Expression (Tampe et al. 2018). Trotz hoher Evidenz für mammalische ARNT-Homodimere, stehen bislang Studien zum Nachweis von endogenen ARNT-Homodimeren in humanen Nieren aus (Carver et al. 1994; Antonsson et al. 1995; Sogawa et al. 1995; Huffman et al. 2001; Levine und Perdew 2002; Kewley et al. 2004; Kewley und Whitelaw 2005; Arpiainen et al. 2007; Tampe et al. 2018). Für eine potentielle klinische Translation einer therapeutischen Modulation von ARNT-Homodimere sollte daher der Nachweis humaner ARNT-Homodimere als vorausgesetzt gelten. Zudem sollte die protektive Rolle von ARNT im klinischen Kontext der CKD verstanden sein. Innerhalb des humanen *ARNT*-Gens wurden fünf Einzelnukleotid-Polymorphismen (*single-nucleotide polymorphisms*; SNPs) einer Studiengruppe von 101 Personen beschrieben. Mit einer geringen Häufigkeit konnte im Exon-5 von *ARNT* Sequenzvarianten (*synonymous SNPs*) identifiziert werden (Urban et al. 2011). Angesichts der für die ARNT-Homodimerisierung relevanten Phosphorylierungsstelle an Serin-77 im Protein-kodierenden Exon-5 darf spekuliert werden, in welcher Weise eine phänotypische Diversität im Exon-5 zu einer Krankheitsprogression der CKD beiträgt. In diesem Zusammenhang gilt es auch die Regulation des Spleißens von ARNT zu klären, da bisher keine Studien hierzu existieren (Gardella et al. 2016).

Aufgrund der konstitutiven und abundanten Expression von ARNT, erweist sich eine pharmakologische Modulation von ARNT als plausibler Therapieansatz (Mandl und Depping 2014; Tampe et al. 2018). Diesen Aspekt gilt es insbesondere vor dem Hintergrund des protrahierten Verlaufs der CKD zu berücksichtigen. Zwar können durch die Applikation von LB-100 und FK506 renoprotektive ARNT-Homodimere induziert werden, allerdings ist nicht ausgeschlossen, dass der therapeutische Effekt durch die Nephrotoxizität einer PP2A-Inhibitor und FK506 limitiert wird (Randhawa et al. 1997; Jong et al. 1998). Mithilfe von Ergebnissen röntgenkristallographischer Analysen heterodimerer HIF-2 α -ARNT-Komplexe konnten hochspezifische Liganden zur Dissoziation der Komplexe entwickelt werden (Cho et al. 2016; Motta et al. 2018). Zum Verständnis der funktionellen Homodimerisierung von ARNT könnten künftig röntgenkristallographische Untersuchungen und/oder eine *Crosslinking*-Massenspektrometrie beitragen (Christen 2016; Lima et al. 2018). Resultierende Erkenntnisse über die funktionellen Proteinabschnitte von ARNT könnten als Ansatz für die Entwicklung eines homodimerisierenden *artificial-transcription-factor* (ATF) dienen (Mapp et al. 2000).

In dieser Arbeit erfolgte der Nachweis endogener ARNT-Homodimere. Der PP2A-Inhibitor LB-100 induzierte die Formierung von ARNT-Homodimeren. Eine additive Wirkungssteigerung von FK506 und GPI-1045 führte im Kontext der FKBP12/YY1/ARNT/ALK3-Signalachse zu einer verstärkten Minderung der renalen Fibrogenese. Zudem konnte die funktionelle Relevanz von Serin-77 in Exon-5 von ARNT für die Formierung von ARNT-Homodimeren nachgewiesen werden. Weitere proteomische Studien zur Homodimerisierung von ARNT sind notwendig um ARNT-Homodimere spezifisch induzieren zu können. Künftig könnten ARNT-Homodimere für die Behandlung chronisch Nierenkranker nutzbar gemacht werden.

6 Zusammenfassung

Eine chronische Schädigung der Niere führt zu einer progredienten Fibrosierung, einem konsekutiven Funktionsverlust und schließlich zu einer terminalen Niereninsuffizienz. Eine spezifische Therapie zum Erhalt des funktionellen Parenchyms und zur Verhinderung einer progressiven Fibrosierung existieren nicht.

Der bHLH-PAS-Transkriptionsfaktor ARNT kann sich zu Homodimeren-Komplexen formieren und über die Bindung an die an die palindromische E-box 5'-CACGTG-3' im *ALK3*-Promoter die Expression des renoprotektiven *ALK3* im tubulären Epithel induzieren. Allerdings unterliegt die ARNT-Expression dem YY1-FKBP12-Repressorkomplex. Infolge einer pharmakologischen Disruption mit FK506 (*low-dose*) oder mit dem *small molecule* GPI-1046 dissoziiert der YY1-FKBP12-Repressorkomplex und die *ARNT*-Expression wird aktiviert. Durch die Formierung zu ARNT-Homodimeren und der Induktion von *ALK3* trägt ARNT bedeutend zur Remission der Fibrosierung bei. In präklinischen Studien konnte mit niederdosiertem FK506 bzw. GPI-1046 eine progrediente Fibrosierung der Organsysteme Nieren, Leber und Herz therapeutisch verhindert werden.

Während die Mechanismen der Heterodimerisierung von ARNT mit anderen bHLH-PAS-Transkriptionsfaktoren bekannt sind, ist ein Mechanismus der Homodimerisierung von ARNT unklar. Der unspezifische Proteinphosphatase-Inhibitor Okadasäure gilt als ein pharmakologischer Induktor der Formierung von ARNT-Homodimeren. Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, einen Mechanismus der Formierung von ARNT-Homodimeren zu identifizieren und therapeutische Effekte durch eine pharmakologische Modulation von ARNT-Homodimere im chronischen Nierenversagen nachzuweisen.

Für den Nachweis, welche Proteinphosphatase-Aktivität prädominierend zur Homodimerisierung von ARNT beiträgt, wurden für den Versuchsansatz HEK293-Zellen mit den Expressionsvektoren ARNT-EGFP und ARNT-myc transfiziert, mit den Proteinphosphatase-Inhibitoren Okadasäure, Tautomycetin und LB-100 stimuliert und durch eine Ko-Immunpräzipitation und SDS-Page untersucht. Hierbei induzierte der spezifische PP2A-Inhibitor LB-100 eine verstärkte Formierung von ARNT-Homodimeren. Neben dem Nachweis von transgenen ARNT-Homodimeren wurden endogene ARNT-Homodimere nach LB-100-Stimulation in MCT-Zellen nachgewiesen. Methodisch erfolgte dies mittels Blue Native-PAGE und MALDI-TOF-Analyse. Im *Cycloheximide-chase* konnte nach LB-100-Stimulation eine erhöhte Proteinstabilität von Arnt festgestellt werden. Ein transkriptioneller Einfluss von LB-100 auf die *Arnt*-Expression konnte durch eine qRT-PCR ausgeschlossen werden. Da der Phosphorylierungsstatus von ARNT entscheidend für die Formierung von ARNT-Homodimeren ist, wurde anschließend die Phosphorylierungsstelle von ARNT untersucht. Massenspektrometrisch konnte hierbei Serin-77 identifiziert werden. Die funktionelle Bedeutung der Phosphorylierungsstelle Serin-77 für die Formierung von ARNT-Homodimere wurde anhand zweier Expressionsvektoren Ser77/Asp-mut-ARNT-EGFP und Ser77/Asp-mut-ARNT-myc evaluiert. Hierbei wurde Serin-77 durch

Asparaginsäure ausgetauscht, anschließend wurden HEK293-Zellen mit den Konstrukten transfiziert und mit LB-100 stimuliert. Nach Mutation von Serin-77 konnte, trotz Stimulation mit LB-100, keine Homodimerisierung von ARNT beobachtet werden. Serin-77 ist essentiell für die ARNT-Homodimerisierung. Nachfolgend wurde der renoprotektive Effekt einer PP2A-Inhibitor-induzierten Formierung von ARNT-Homodimeren *in vivo* untersucht. Zur Induktion einer renalen Fibrogenese wurden C57BL/6J Wildtyp-Mäuse einer unilateralen Ureterobstruktion unterzogen. Die Mäuse wurden in sechs Behandlungsgruppen eingeteilt: LB-100, FK506, GPI-1046, FK506 + LB-100 sowie GPI-1046 + LB-100. Durch MALDI-TOF-Analyse konnten ARNT-Homodimere in der operierten Niere LB-100-behandelter Mäuse detektiert werden. Dies stellt den erstmaligen massenspektrometrischen Nachweis von endogenen ARNT-Homodimeren *in vivo* dar. Eine simultane Behandlung mit FK506 + LB-100 sowie GPI-1046 + LB-100 führte zu einer verstärkten Protein-Konformation im Blue Native-PAGE, entsprechend einer Homodimerisierung von ARNT. Die simultane Behandlung mit FK506 + LB-100 sowie GPI-1046 + LB-100 konnte gegenüber einer Monotherapie eine verstärkte Expression des protektiven Alk3 induzieren. Auch konnten additive Effekte hinsichtlich der Remission der experimentellen Fibrogenese festgestellt werden. Eine aufbauende Studie dazu im CCL₄-Mausmodell blieb hingegen ohne einen additiven Effekt einer kombinierten Behandlung mit FK506 + LB-100 sowie GPI-1046 + LB-100.

Die durch PP2A-Inhibition präservierte Phosphorylierung von Serin-77 in ARNT induziert über eine erhöhte Proteinstabilität eine verstärkte Akkumulation und Homodimerisierung von ARNT. Eine Datenbank-basierte Proteinstrukturvorsage zeigt für Serin-77 eine geringe Modell-Konfidenz; eine funktionelle Proteinstruktur ist nur unzureichend modelliert. Methodisch könnten künftig eine *Crosslinking*-Massenspektrometrie und eine röntgenkristallographische Untersuchung nähere Erkenntnisse zu funktionellen Proteinabschnitten von ARNT(-Homodimeren) liefern. Die für die Homodimerisierung essentielle Phosphorylierungsstelle an Serin-77 liegt innerhalb eines Phosphopeptid mit der Aminosäuresequenz FARpSDDEQSSADKER. Das in dieser Arbeit identifizierte Phosphopeptid ist hierbei sequentiell übereinstimmend mit dem Exon-5 der 15 Aminosäuren längeren Spleißvariante von ARNT. Eine Regulation des Spleißens von ARNT ist bisher unbekannt, dies stellt einen möglichen Anhaltspunkt weiterer Studien dar.

7 Anhang

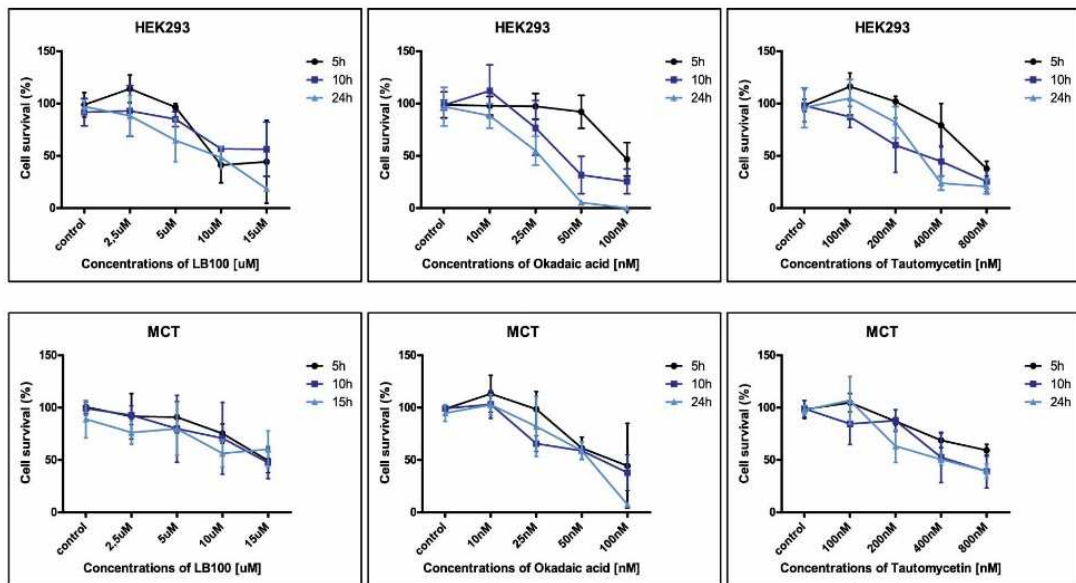


Abbildung 27: Etablierung von Konzentration und Wirkdauer der Stimulanzen durch MTT-Testung.

8 Literaturverzeichnis

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P: Untersuchung von Zellen, Molekülen und Systemen. In: Schäfer U (Hrsg.): Molekularbiologie der Zelle. 6. Auflage; Wiley-VCH Verlag, Weinheim 2017, 491–593

Antonsson C, Arulampalam V, Whitelaw ML, Pettersson S, Poellinger L (1995): Constitutive Function of the Basic Helix-Loop-Helix/PAS Factor Arnt. *J Biol Chem* 270, 13968–13972

Arpiainen S, Lämsä V, Pelkonen O, Yim SH, Gonzalez FJ, Hakkola J (2007): Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator and upstream stimulatory factor regulate Cytochrome P450 2a5 transcription through a common E-box site. *J Mol Biol* 369, 640–652

Bacsi SG, Hankinson O (1996): Functional characterization of DNA-binding domains of the subunits of the heterodimeric aryl hydrocarbon receptor complex imputing novel and canonical basic helix-loop-helix protein-DNA interactions. *J Biol Chem* 271, 8843–8850

Badid C, Desmouliere A, Babici D, Hadj-Aissa A, McGregor B, Lefrancois N, Touraine JL, Laville M (2002): Interstitial expression of alpha-SMA: an early marker of chronic renal allograft dysfunction. *Nephrol Dial Transplant* 17, 1993–1998

Bai X, Zhi X, Zhang Q, Liang F, Chen W, Liang C, Hu Q, Sun X, Zhuang Z, Liang T (2014): Inhibition of protein phosphatase 2A sensitizes pancreatic cancer to chemotherapy by increasing drug perfusion via HIF-1 α -VEGF mediated angiogenesis. *Cancer Lett* 355, 281–287

Bechtel W, Zeisberg M (2009): Bone Morphogenic Protein-7 (BMP7) und die Niere: Einblicke in die Zukunft der Therapiechronischer Nierenerkrankungen. *Dtsch Med Wochenschr* 134, 1688–1691

Berk AJ (2005): Recent lessons in gene expression, cell cycle control, and cell biology from adenovirus. *Oncogene* 24, 7673–7685

Bikbov B, Purcell CA, Levey AS, Smith M, Abdoli A, Abebe M, Adebayo OM, Afarideh M, Agarwal SK, Agudelo-Botero M et al. (2020): Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 395, 709–733

Böttinger EP, Bitzer M (2002): TGF-beta signaling in renal disease. *J Am Soc Nephrol* 13, 2600–2610

Bramlage CP, Müller GA (2010): Bone Morphogenic Protein-7 (BMP-7). *Der Nephrologe* 5, 528–530

- Bryant JP, Levy A, Heiss J, Banasavadi-Siddegowda YK (2021): Review of PP2A Tumor Biology and Antitumor Effects of PP2A Inhibitor LB100 in the Nervous System. *Cancers* 13, 3087
- Bugnicourt JM, Godefroy O, Chillon JMarc, Choukroun G, Massy ZA (2013): Cognitive disorders and dementia in CKD: the neglected kidney-brain axis. *J Am Soc Nephrol* 24, 353–363
- Bülow RD, Boor P (2019): Extracellular Matrix in Kidney Fibrosis: More Than Just a Scaffold. *J Histochem Cytochem* 67, 643–661
- Carambia A, Schuran FA(2021): The aryl hydrocarbon receptor in liver inflammation. *Semin Immunopathol* 43, 563–575
- Carver LA, Hogenesch JB, Bradfield CA (1994): Tissue specific expression of the rat Ah-receptor and ARNT mRNAs. *Nucleic Acids Res* 22, 3038–3044
- Chen Z, Cole PA (2015): Synthetic approaches to protein phosphorylation. *Curr Opin Chem Biol* 28, 115–122
- Chevalier RL, Forbes MS, Thornhill BA (2009): Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney Int* 75, 1145–1152
- Cho H, Du X, Rizzi JP, Liberzon E, Chakraborty AA, Gao W, Carvo I, Signoretti S, Bruick RK, Josey JA et al. (2016): On-target efficacy of a HIF-2 α antagonist in preclinical kidney cancer models. *Nature* 539, 107–111
- Choi H, Chun YS, Kim SW, Kim MS, Park JW (2006): Curcumin inhibits hypoxia-inducible factor-1 by degrading aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator: a mechanism of tumor growth inhibition. *Mol Pharmacol* 70,1664–1671
- Chomczynski P, Sacchi N (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156–159
- Christen P, Jaussi R, Benoit R: *Biochemie und Molekularbiologie. Eine Einführung in 40 Lerneinheiten*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2016
- ClinicalTrials.gov, National Institutes of Health (NIH), Bethesda (MD), USA.
<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=LB100&term=&cntry=&state=&city=&dist=>; zuletzt geprüft am 16.02.2022
- Cohen P, Holmes CFB, Tsukitani Y (1990): Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trends Biochem Sci* 15, 98–102
- Conlon N, McDermott M, Browne B, Roche S, O'Neill F, Meiller J, Eustace AJ, Collins D, O'Donovan N et al. (2018): Pre-clinical evaluation of the PP2A inhibitor LB-100 for the treatment of lapatinib resistant HER2-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 36, e13021
- Constandinou C, Henderson N, Iredale JP (2005): Modeling liver fibrosis in rodents. *Methods Mol Med* 117, 237–250

- Crews ST (1998): Control of cell lineage-specific development and transcription by bHLH-PAS proteins. *Genes Dev* 12, 607–620
- D'Arcy BM, Swingle MR, Papke CM, Abney KA, Bouska ES, Prakash A, Honkanen RE (2019): The Antitumor Drug LB-100 Is a Catalytic Inhibitor of Protein Phosphatase 2A (PPP2CA) and 5 (PPP5C) Coordinating with the Active-Site Catalytic Metals in PPP5C. *Mol Cancer Ther* 18, 556–566
- Deng Y, Guo Y, Liu P, Zeng R, Ning Y, Pei G, Li Y, Chen M, Guo S, Li X et al. (2016): Blocking protein phosphatase 2A signaling prevents endothelial-to-mesenchymal transition and renal fibrosis: a peptide-based drug therapy. *Sci Rep* 6, 19821
- Denic A, Glasscock RJ, Rule AD (2016): Structural and Functional Changes With the Aging Kidney. *Adv Chronic Kidney Dis* 23, 19–28
- Denic A, Lieske JC, Chakkera HA, Poggio ED, Alexander MP, Singh P, Kremers WK, Lerman OL, Rule AD (2017): The Substantial Loss of Nephrons in Healthy Human Kidneys with Aging. *J Am Soc Nephrol* 28, 313–320
- Depping R, Steinhoff A, Schindler SG, Friedrich B, Fagerlund R, Metzen E, Hartmann E, Köhler M (2008): Nuclear translocation of hypoxia-inducible factors (HIFs): involvement of the classical importin alpha/beta pathway. *Biochim Biophys Acta* 1783, 394–404
- Djudjaj S, Boor P (2019): Cellular and molecular mechanisms of kidney fibrosis. *Mol Aspects Med* 65, 16–36
- Ducy P, Karsenty G (2000): The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney Int* 57, 2207–2214
- Eddy AA, López-Guisa JM, Okamura DM, Yamaguchi I (2012): Investigating mechanisms of chronic kidney disease in mouse models. *Pediatr Nephrol* 27, 1233–1247
- Eguchi H, Ikuta T, Tachibana T, Yoneda Y, Kawajiri K (1997): A nuclear localization signal of human aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator/hypoxia-inducible factor 1beta is a novel bipartite type recognized by the two components of nuclear pore-targeting complex. *J Biol Chem* 272, 17640–17647
- Eichhorn PJA, Creighton MP, Bernards R (2009): Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1795, 1–15
- Farris AB, Alpers CE. (2014): What is the best way to measure renal fibrosis?: A pathologist's perspective. *Kidney Int Suppl* 4, 9–15
- Farris AB, Colvin RB (2012): Renal interstitial fibrosis: mechanisms and evaluation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 21, 289–300
- 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 U S A* 84, 7413–7417

- Feng X, Li J, Liu J, Jin M, Liu X, Du H, Zhang L, Sun Z, Li X (2011): Protective effect of FK506 on myocardial ischemia/reperfusion injury by suppression of CaN and ASK1 signaling circuitry. *Cardiovasc Toxicol* 11, 18–27
- Fischer von Weikersthal, G (2021): SGLT-2-Inhibition bei chronischer Niereninsuffizienz: Nicht nur beim Diabetes effektiv. *Dtsch Arztebl* 118, 1940
- Foreman KJ, Marquez N, Dolgert A, Fukutaki K, Fullman N, McGaughey M, Pletcher MA, Smith AE, Tang K, Yuan CW et al. (2018): Forecasting life expectancy, years of life lost, and all-cause and cause-specific mortality for 250 causes of death: reference and alternative scenarios for 2016–40 for 195 countries and territories. *Lancet* 392, 2052–2090
- Friedman SL (2010): Evolving challenges in hepatic fibrosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 7, 425–436
- Gandjour A, Armsen W, Wehmeyer W, Multmeier J, Tschulena U (2020): Costs of patients with chronic kidney disease in Germany. *PLoS One* 15, e0231375
- Gardella KA, Muro I, Fang G, Sarkar K, Mendez O, Wright CW (2016): Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) isoforms control lymphoid cancer cell proliferation through differentially regulating tumor suppressor p53 activity. *Oncotarget* 7, 10710–10722
- Gewin LS (2018): Renal fibrosis: Primacy of the proximal tubule. *Matrix Biol* 68–69, 248–262
- Girndt M, Trocchi P, Scheidt-Nave C, Markau S, Stang A (2016): The Prevalence of Renal Failure. Results from the German Health Interview and Examination Survey for Adults, 2008-2011 (DEGS1). *Dtsch Arztebl Int* 113, 85–91
- Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY (2004): Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* 351, 1296–1305
- Gordon KJ, Blobel GC (2008): Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease. *Biochim Biophys Acta* 1782, 197–228
- Gordon S, Akopyan G, Garban H, Bonavida B (2006): Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology. *Oncogene* 25, 1125–1142
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59–74
- Graziani F, Aldegheri L, Terstappen GC (1999): High Throughput Scintillation Proximity Assay for the Identification of FKBP-12 Ligands. *J Biomol Screen* 4, 3–7
- Haase VH (2019): ARNT as a Novel Antifibrotic Target in CKD. *Am J Kidney Dis* 73, 281–284
- Haverty TP, Kelly CJ, Hines WH, Amenta PS, Watanabe M, Harper RA, Kefalides NA, Neilson EG (1988): Characterization of a renal tubular epithelial cell line which secretes the

autologous target antigen of autoimmune experimental interstitial nephritis. *J Cell Biol* **107**, 1359–1368

Heck AJR, van den Heuvel RHH (2004): Investigation of intact protein complexes by mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* **23**, 368–389

Hecken J: Jahresbericht 2019 zur Qualität in der Dialyse. Beschluss des Gemeinsamen Bundesausschusses über die Veröffentlichung des Jahresberichts 2019 zur Qualität in der Dialyse. Institut für Qualitätssicherung und Transparenz im Gesundheitswesen, Berlin 2020

Heller RC, Chung S, Crissy K, Dumas K, Schuster D, Schoenfeld TW (2019): Engineering of a thermostable viral polymerase using metagenome-derived diversity for highly sensitive and specific RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **47**, 3619–3630

Hermey G: Analyse von Proteinen. In: Hermey G, Mahlke C, Schwake M, Sommer T: *Der Experimentator: Neurowissenschaften*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2010, 35–67

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R (1992): Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* **10**, 413–417

Himmelfarb J, Chertow GM, McCullough, PA, Mesana, T, Shaw AD, Sundt TM, Brown C, Cortville D, Dagenais F, De Varennes B, et al. (2018): Perioperative THR-184 and AKI after Cardiac Surgery. *J Am Soc Nephrol* **29**, 670–679

Ho WS, Wang H, Maggio D, Kovach JS, Zhang Q, Song Q, Marincola FM, Heiss JD, Gilbert MR, Lu R et al. (2018): Pharmacologic inhibition of protein phosphatase-2A achieves durable immune-mediated antitumor activity when combined with PD-1 blockade. *Nat Commun* **9**, 2126

Hoffman EC, Reyes H, Chu FF, Sander F, Conley LH, Brooks BA, Hankinson O (1991): Cloning of a Factor Required for Activity of the Ah (Dioxin) Receptor. *Science* **252**, 954–958

Holmes CFB, Luu HA, Carrier F, Schmitz FJ (1990): Inhibition of protein phosphatases-1 and -2A with acanthifolicin. *FEBS Lett* **270**, 216–218

Hong CS, Ho W, Zhang C, Yang C, Elder JB, Zhuang Z (2015): LB100, a small molecule inhibitor of PP2A with potent chemo- and radio-sensitizing potential. *Cancer Biol Ther* **16**, 821–833

Hovers J, Potschies M, Polidori A, Pucci B, Raynal S, Bonneté F, Serrano-Vega MJ, Tate CG, Picot D, Pierre Y et al. (2011): A class of mild surfactants that keep integral membrane proteins water-soluble for functional studies and crystallization. *Mol Membr Biol* **28**, 171–181

- Hu C, Yu M, Ren Y, Li K, Maggio DM, Mei C, Ye L, Wei J, Jin J, Zhuang Z et al. (2017): PP2A inhibition from LB100 therapy enhances daunorubicin cytotoxicity in secondary acute myeloid leukemia via miR-181b-1 upregulation. *Sci Rep* 7, 2894
- Huang ZJ, Edery I, Rosbash M (1993): PAS is a dimerization domain common to *Drosophila* period and several transcription factors. *Nature* 364, 259–262
- Huffman JL, Mokashi A, Bächinger HPeter, Brennan RG (2001): The Basic Helix-Loop-Helix Domain of the Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Transporter (ARNT) Can Oligomerize and Bind E-box DNA Specifically. *J Biol Chem* 276, 40537–40544
- Humphreys BD (2018): Mechanisms of Renal Fibrosis. *Annu Rev Physiol* 80, 309–326
- Hüser N, Doll D, Altomonte J, Werner M, Kriner M, Preissel A, Thorban S, Matevossian E (2009): Graft preconditioning with low-dose tacrolimus (FK506) and nitric oxide inhibitor aminoguanidine (AGH) reduces ischemia/reperfusion injury after liver transplantation in the rat. *Arch Pharm Res* 32, 215–220
- Ina K, Kitamura H, Tatsukawa S, Fujikura Y (2011): Significance of α -SMA in myofibroblasts emerging in renal tubulointerstitial fibrosis. *Histol Histopathol* 26, 855–866
- Inker LA, Eneanya ND, Coresh J, Tighiouart H, Wang D, Sang Y, Crews DC, Alessandro D, Estrella MM, Froissart M et al. (2021): New Creatinine- and Cystatin C-Based Equations to Estimate GFR without Race. *N Engl J Med* 385, 1737–1749
- Jansens A, Braakman I (2003): Pulse-chase labeling techniques for the analysis of protein maturation and degradation. *Methods Mol Biol* 232, 133–145
- De Jong RS, De Vries EG, Meijer S, De Jong PE, Mulder NH (1998): Renal toxicity of the anticancer drug fostriecin. *Cancer Chemother Pharmacol* 42, 160–164
- Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Žídek A, Potapenko A et al. (2021): Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596, 583–589
- Kalantar-Zadeh K, Jafar TH, Nitsch D, Neuen BL, Perkovic V (2021): Chronic kidney disease. *Lancet* 398, 786–802
- Kalousi A, Mylonis I, Politou AS, Chachami G, Paraskeva E, Simos G (2010): Casein kinase 1 regulates human hypoxia-inducible factor HIF-1. *J Cell Sci* 123, 2976–2986
- Karas M, Hillenkamp F (1988): Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 60, 2299–2301
- Kazancıoğlu R (2013): Risk factors for chronic kidney disease: an update. *Kidney Int Suppl* 3, 368–371
- KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease (2013). *Kidney Int Suppl* 3, 1–150

- KDIGO 2017 Clinical Practice Guideline Update for the Diagnosis, Evaluation, Prevention, and Treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD) (2017). *Kidney Int Suppl* 7 (1), 1–59
- KDIGO 2020 Clinical Practice Guideline for Diabetes Management in Chronic Kidney Disease (2020). *Kidney Int* 98, 1–115
- KDIGO 2021 Clinical Practice Guideline for the Management of Blood Pressure in Chronic Kidney Disease (2021). *Kidney Int* 99, 1–87
- Kewley RJ, Whitelaw ML (2005): Phosphorylation inhibits DNA-binding of alternatively spliced aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator. *Biochem Biophys Res Commun* 338, 660–667
- Kewley RJ, Whitelaw ML, Chapman-Smith A (2004): The mammalian basic helix–loop–helix/PAS family of transcriptional regulators. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 189–204
- Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010): Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *PLoS Biol* 8, e1000412
- Kim SA, Jo SH, Cho JH, Yu MY, Shin HC, Kim JA, Park SG, Park BC, Kim S, Kim JH (2020): Aryl Sulfonamides Induce Degradation of Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator through CRL4DCAF15 E3 Ligase. *Mol Cells* 43, 935–944
- Kolos JM, Voll AM, Bauder M, Hausch F (2018): FKBP Ligands-Where We Are and Where to Go? *Front Pharmacol* 9, 1425
- Kozak KR, Abbott B, Hankinson O (1997): ARNT-deficient mice and placental differentiation. *Dev Biol* 191, 297–305
- Kuppe C, Ibrahim MM, Kranz J, Zhang X, Ziegler S, Perales-Patón J, Jansen J, Reimer KC, Smith JR, Dobie R et al. (2021): Decoding myofibroblast origins in human kidney fibrosis. *Nature* 589, 281–286
- Kyhse-Andersen J (1984): Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 10, 203–209
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685
- Lee KH, Park JW, Chun YS (2004): Non-hypoxic transcriptional activation of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator in concert with a novel hypoxia-inducible factor-1alpha isoform. *Nucleic Acids Res* 32, 5499–5511
- Levine SL, Perdew GH (2002): Okadaic acid increases ARNT homodimer transactivation potential. *Cell Biol Toxicol* 18, 109–120

- Li YM, Casida JE (1992): Cantharidin-binding protein: identification as protein phosphatase 2A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 11867–11870
- Li Y, Chen Q, Liu FY, Peng YM, Wang S, Li J, Li J, Duan SB, Sun L, Ling GH et al. (2011): Norcantharidin inhibits the expression of extracellular matrix and TGF- β 1 in HK-2 cells induced by high glucose independent of calcineurin signal pathway. *Lab Invest* 91, 1706–1716
- Li Y, Sun Y, Liu F, Sun L, Li J, Duan S, Liu H, Peng Y, Xiao L, Liu Y et al. (2013): Norcantharidin inhibits renal interstitial fibrosis by blocking the tubular epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* 8, e66356
- Liang Y, Sun X, Wang M, Lu Q, Gu M, Zhou L, Hou Q, Tan M, Wang S, Xue X et al. (2021): PP2A α promotes macrophage accumulation and activation to exacerbate tubular cell death and kidney fibrosis through activating Rap1 and TNF α production. *Cell Death Differ* 28, 2728–2744
- Lima DB, Melchior JT, Morris J, Barbosa VC, Chamot-Rooke J, Fioramonte M, Souza TACB, Fischer JSG, Gozzo FC, Carvalho PC et al. (2018): Characterization of homodimer interfaces with cross-linking mass spectrometry and isotopically labeled proteins. *Nat Protoc* 13, 431–458
- Lindebro MC, Poellinger L, Whitelaw ML (1995): Protein-protein interaction via PAS domains: role of the PAS domain in positive and negative regulation of the bHLH/PAS dioxin receptor-Arnt transcription factor complex. *EMBO J* 14, 3528–3539
- Liu FY, Li Y, Peng YM, Ye K, Li J, Liu YH, Duan SB, Ling GH, Xu XQ, Zhou LT (2008): Norcantharidin ameliorates proteinuria, associated tubulointerstitial inflammation and fibrosis in protein overload nephropathy. *Am J Nephrol* 28, 465–477
- Liu H, Zhang S, Xu S, Koroleva M, Small EM, Jin ZG (2019): Myofibroblast-specific YY1 promotes liver fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 514, 913–918
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–408
- Loubresse De NG; Prokhorova I, Holtkamp W, Rodnina MV, Yusupova G, Yusupov M (2014): Structural basis for the inhibition of the eukaryotic ribosome. *Nature* 513, 517–522
- Lovisa S (2021): Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Fibrosis: Concepts and Targeting Strategies. *Front Pharmacol* 12, 737570
- Lovisa S, LeBleu VS, Tampe B, Sugimoto H, Vadrnagara K, Carstens JL, Wu CC, Hagos Y, Burckhardt BC, Pentcheva-Hoang T et al. (2015): Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis. *Nat Med* 21, 998–1009

- Lu J, Kovach JS, Johnson F, Chiang J, Hodes R, Lonser R, Zhuang Z (2009): Inhibition of serine/threonine phosphatase PP2A enhances cancer chemotherapy by blocking DNA damage induced defense mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 11697–11702
- Lu N, Liu Y, Tang A, Chen L, Miao D, Yuan X (2015): Hepatocyte-specific ablation of PP2A catalytic subunit α attenuates liver fibrosis progression via TGF- β 1/Smad signaling. *Biomed Res Int* 2015, 794862
- Lu Q, Tan M, Hou Q, Wang M, Dai C (2022): PP2A Catalytic Subunit α promotes fibroblast activation and kidney fibrosis via ERK pathway. *Cell Signal* 90, 110187
- Lüllmann-Rauch R: Taschenlehrbuch Histologie. 2. Auflage; Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart 2006
- Luo G, Hofmann C, Bronckers AL, Sohocki M, Bradley A, Karsenty G (1995): BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes Dev* 9, 2808–2820
- Luo HW, Yin DD, Xiao Z, Wen L, Liao YJ, Tang CY, Zeng D, Xiao HT, Li Y (2021): Anti-renal interstitial fibrosis effect of norcantharidin is exerted through inhibition of PP2Ac-mediated C-terminal phosphorylation of Smad3. *Chem Biol Drug Des* 97, 293–304
- Maltepe E, Schmidt JV, Baunoch D, Bradfield CA, Simon MC (1997): Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT. *Nature* 386, 403–407
- Mandl M, Depping R (2014): Hypoxia-inducible aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) (HIF-1 β): is it a rare exception? *Mol Med* 20, 215–220
- Mapp AK, Ansari AZ, Ptashne M, Dervan PB (2000): Activation of gene expression by small molecule transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3930–3935
- Massagué J (1998): TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67, 753–791
- Massagué J (2000): How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 169–178
- Mayer-Jaekel RE, Hemmings BA (1994): Protein phosphatase 2A — a ‘ménage à trois’. *Trends Cell Biol* 4, 287–291
- McIntosh BE, Hogenesch JB, Bradfield CA (2010): Mammalian Per-Arnt-Sim Proteins in Environmental Adaptation. *Annu Rev Physiol* 72, 625–645
- McVicker BL, Bennett RG (2017): Novel Anti-fibrotic Therapies. *Front pharmacol* 8, 318
- Mei G, Di Venere A, Rosato N, Finazzi-Agrò A (2005): The importance of being dimeric. *FEBS J* 272, 16–27
- Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY (2016): TGF- β : the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol* 12, 325–338

- Meng XM, Tang PMK, Li J, Lan HY (2015): TGF- β /Smad signaling in renal fibrosis. *Front Physiol* 6, 82
- Mitsuhashi S, Matsuura N, Ubukata M, Oikawa H, Shima H, Kikuchi K (2001): Tautomycetin is a novel and specific inhibitor of serine/threonine protein phosphatase type 1, PP1. *Biochem Biophys Res Commun* 287, 328–331
- Mosmann T (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55–63
- Motta S, Minici C, Corrada D, Bonati L, Pandini A (2018): Ligand-induced perturbation of the HIF-2 α :ARNT dimer dynamics. *PLoS Comput Biol* 14, e1006021
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51, 263–273
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 3578572. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/lb-100>; zuletzt geprüft am 16.02.2022
- Neurauter AA, Bonyhadi M, Lien E, Nøkleby L, Ruud E, Camacho S, Aarvak T (2007): Cell isolation and expansion using Dynabeads. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 106, 41–73
- Nishi H, Shaytan A, Panchenko AR (2014): Physicochemical mechanisms of protein regulation by phosphorylation. *Front Genet* 5, 270
- Nugent RA, Fathima SF, Feigl AB, Chyung D (2011): The burden of chronic kidney disease on developing nations: a 21st century challenge in global health. *Nephron Clin Pract* 118, 269–277
- Nygren PJ, Scott JD (2016): Regulation of the phosphatase PP2B by protein-protein interactions. *Biochem Soc Trans* 44, 1313–1319
- Ozkaynak E, Rueger DC, Drier EA, Corbett C, Ridge RJ, Sampath TK, Oppermann, H (1990): OP-1 cDNA encodes an osteogenic protein in the TGF-beta family. *EMBO J* 9, 2085–2093
- Pérez-Mejías G, Velázquez-Cruz A, Guerra-Castellano A, Baños-Jaime B, Díaz-Quintana A, González-Arzola K, De la Rosa MA, Díaz-Moreno I (2020): Exploring protein phosphorylation by combining computational approaches and biochemical methods. *Comput Struct Biotechnol J* 18, 1852–1863
- Randhawa PS, Starzl TE, Demetris AJ (1997): Tacrolimus (FK506)-Associated Renal Pathology. *Adv Anat Pathol* 4, 265–276
- Rankin EB, Giaccia AJ (2008): The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ* 15, 678–685

- Rehm H, Letzel T: *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. 7. Auflage; Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2016
- Reichel H (2012): Klinisch relevante Faktoren der Progressionshemmung. *Nephrologe* 7, 40–45
- Reinard T: *Molekularbiologische Methoden 2.0*. 2. Auflage; Verlag Eugen Ulmer (UTB), Stuttgart 2018
- Roach PJ (1991): Multisite and hierarchal protein phosphorylation. *J Biol Chem* 266, 14139–14142
- Roberts AB, Kim SJ, Noma T, Glick AB, Lafyatis R, Lechleider R, Jakowlew SB, Geiser A, O'Reilly MA, Danielpour D et al. (1991): Multiple forms of TGF-beta: distinct promoters and differential expression. *Ciba Found Symp* 157, 15–28
- Rockey DC, Bell PD, Hill JA (2015): Fibrosis--a common pathway to organ injury and failure. *N Engl J Med* 372, 1138–1149
- Rodrigues-Prestes TR, Rocha NP, Miranda AS, Teixeira AL, Simoes-E-Silva, AC (2017): The Anti-Inflammatory Potential of ACE2/Angiotensin-(1-7)/Mas Receptor Axis: Evidence from Basic and Clinical Research. *Curr Drug Targets* 18, 1301–1313
- Rosenfeld J, Capdevielle J, Guillemot JC, Ferrara P (1992): In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Anal Biochem* 203, 173–179
- Rosner MH, Jhaveri KD, McMahon BA, Perazella MA (2021): Onconephrology: The intersections between the kidney and cancer. *CA Cancer J Clin* 71, 47–77
- Rucker D, Tonelli M (2009): Cardiovascular risk and management in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 5, 287–296
- Sakr M, Zetti G, McClain C, Gavaler J, Nalesnik M, Todo S, Starzl T, Van Thiel D (1992): The protective effect of FK506 pretreatment against renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Transplantation* 53, 987–991
- Scholten D, Trebicka J, Liedtke C, Weiskirchen R (2015): The carbon tetrachloride model in mice. *Lab Anim* 49, 4–11
- Semenza GL, Agani F, Booth G, Forsythe J, Iyer N, Jiang BH, Leung S, Roe R, Wiener C, Yu A (1997): Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor 1. *Kidney Int* 51, 553–555
- Sharkey J, Butcher SP (1994): Immunophilins mediate the neuroprotective effects of FK506 in focal cerebral ischaemia. *Nature* 371, 336–339
- Shi S, Yoon DY, Hodge-Bell KC, Bebenek IG, Whitekus MJ, Zhang R, Cochran AJ, Huerta-Yepez S, Yim SH, Gonzalez FJ et al. (2009): The aryl hydrocarbon receptor nuclear

translocator (Arnt) is required for tumor initiation by benzo[a]pyrene. *Carcinogenesis* 30, 1957–1961

Shi Y, Seto E, Chang LS, Shenk T (1991): Transcriptional repression by YY1, a human GLI-Krüppel-related protein, and relief of repression by adenovirus E1A protein. *Cell* 67, 377–388

Siddiqui-Jain A, Drygin D, Streiner N, Chua P, Pierre F, O'Brien SE, Bliesath J, Omori M, Huser N, Ho C et al. (2010): CX-4945, an orally bioavailable selective inhibitor of protein kinase CK2, inhibits prosurvival and angiogenic signaling and exhibits antitumor efficacy. *Cancer Res* 70, 10288–10298

Sieracki NA, Komarova: Studying Cell Signal Transduction with Biomimetic Point Mutations. In: Figurski D (Hrsg.): Genetic Manipulation of DNA and Protein - Examples from Current Research. Intech Rijeka 2013, 381–392

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76–85

Sogawa K, Nakano R, Kobayashi A, Kikuchi Y, Ohe N, Matsushita N, Fujii-Kuriyama Y (1995): Possible function of Ah receptor nuclear translocator (Arnt) homodimer in transcriptional regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1936–1940

Sontag JM, Sontag E (2014): Protein phosphatase 2A dysfunction in Alzheimer's disease. *Front Mol Neurosci* 7, 16

Spiekerkoetter E, Tian X, Cai J, Hopper RK, Sudheendra D, Li CG, El-Bizri N, Sawada H, Haghighat R, Chan R et al. (2013): FK506 activates BMPR2, rescues endothelial dysfunction, and reverses pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 123, 3600–3613

Steiner JP, Hamilton GS, Ross DT, Valentine HL, Guo H, Connolly MA, Liang S, Ramsey C, Li JH, Huang W et al. (1997): Neurotrophic immunophilin ligands stimulate structural and functional recovery in neurodegenerative animal models. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2019–2024

Stevens PE, Levin A (2013): Evaluation and management of chronic kidney disease: synopsis of the kidney disease: improving global outcomes 2012 clinical practice guideline. *Ann Intern Med* 158, 825–830

Strutz F, Neilson EG (2003): New insights into mechanisms of fibrosis in immune renal injury. *Springer Semin Immunopathol* 24, 459–476

Sugimoto H, LeBleu VS, Bosukonda D, Keck P, Taduri G, Bechtel W, Okada H, Carlson W Jr, Bey P, Rusckowski M et al. (2012): Activin-like kinase 3 is important for kidney regeneration and reversal of fibrosis. *Nat Med* 18, 396–404

- Sugimoto H, Yang C, LeBleu VS, Soubasakos MA, Giraldo M, Zeisberg M, Kalluri R (2007): BMP-7 functions as a novel hormone to facilitate liver regeneration. *FASEB J* 21, 256–264
- Swanson HI, Chan WK, Bradfield CA (1995): DNA Binding Specificities and Pairing Rules of the Ah Receptor, ARNT, and SIM Proteins. *J Biol Chem* 270, 26292–26302
- Sydnies MO, Isobe M (2010): Tautomycin's interactions with protein phosphatase 1. *Chem Asian J* 5, 410–420
- Tampe B, Tampe D, Nyamsuren G, Klöpffer F, Rapp G, Kauffels A, Lorf T, Zeisberg EM, Müller GA, Kalluri R et al. (2018): Pharmacological induction of hypoxia-inducible transcription factor ARNT attenuates chronic kidney failure. *J Clin Invest* 128, 3053–3070
- Thomson AW, Bonham CA, Zeevi A (1995): Mode of action of tacrolimus (FK506): molecular and cellular mechanisms. *Ther Drug Monit* 17, 584–591
- Thorpe GH, Kricka LJ (1986): Enhanced chemiluminescent reactions catalyzed by horseradish peroxidase. *Methods Enzymol* 133, 331–353
- Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK (2014): Liver cirrhosis. *Lancet* 383, 1749–1761
- Tsuchida T, Friedman SL (2017): Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14, 397–411
- Turowec JP, Duncan JS, French AC, Gyenis L, St Denis NA, Vilc Greg, Litchfield DW (2010): Protein kinase CK2 is a constitutively active enzyme that promotes cell survival: strategies to identify CK2 substrates and manipulate its activity in mammalian cells. *Methods Enzymol* 484, 471–493.
- Urban JD, Budinsky RA, Rowlands JC (2011): Single nucleotide polymorphisms in the human aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) gene. *Drug Metab Pharmacokinet* 26, 637–645
- Varadi M, Anyango S, Deshpande M, Nair S, Natassia C, Yordanova G, Yuan D, Stroe O, Wood G, Laydon A et al. (2022): AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res* 50, 439–444
- Vaughan MB, Howard EW, Tomasek JJ (2000): Transforming growth factor-beta1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast. *Exp Cell Res* 257, 180–189
- Waas T, Schulz A, Lotz J, Rossmann H, Pfeiffer N, Beutel ME, Schmidtman I, Münzel T, Wild PS, Lackner KJ (2021): Distribution of estimated glomerular filtration rate and determinants of its age dependent loss in a German population-based study. *Sci Rep* 11, 10165

- Wang S, Hirschberg R (2003): BMP7 antagonizes TGF-beta -dependent fibrogenesis in mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 284, 1006–1013
- Wang T, Li BY, Danielson PD, Shah PC, Rockwell S, Lechleider RJ, Martin J, Manganaro T, Donahoe PK (1996): The Immunophilin FKBP12 Functions as a Common Inhibitor of the TGFβ Family Type I Receptors. *Cell* 86, 435–444
- Webster AC, Nagler EV, Morton RL, Masson P (2017): Chronic Kidney Disease. *Lancet* 389, 1238–1252
- Wittig I, Braun HP, Schägger H (2006): Blue native PAGE. *Nat Protoc* 1, 418–428
- Wittig I, Schägger H (2005): Advantages and limitations of clear-native PAGE. *Proteomics* 5, 4338–4346
- Wlodarchak N, Xing Y (2016): PP2A as a master regulator of the cell cycle. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 51, 162–184
- Wynn TA (2008): Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 214, 199–210
- Yang WM, Inouye CJ, Seto E (1995): Cyclophilin A and FKBP12 interact with YY1 and alter its transcriptional activity. *J Biol Chem* 270, 15187–15193
- Yanguas SC, Cogliati B, Willebrords J, Maes M, Colle I, van den Bossche B, de Oliveira CPMS, Andraus W, Alves VAF, Leclercq I, Vinken M (2016): Experimental models of liver fibrosis. *Arch Toxicol* 90, 1025–1048
- Yasumoto T, Oshima, Y, Yamaguchi, M (1978): Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district. *Nippon Suisan Gakkaishi* 44, 1249–1255
- Zeisberg EM, Zeisberg M (2013): The role of promoter hypermethylation in fibroblast activation and fibrogenesis. *J Pathol* 229, 264–273
- Zeisberg M, Strutz F, Müller GA (2000): Role of fibroblast activation in inducing interstitial fibrosis. *J Nephrol* 13, 111–120
- Zeisberg M (2006): Bone morphogenic protein-7 and the kidney: current concepts and open questions. *Nephrol Dial Transplant* 21, 568–573
- Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, Mammoto T, Charytan D, Strutz F, Kalluri R (2003): BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med* 9, 964–968
- Zeisberg M, Kalluri R (2004): Experimental strategies to reverse chronic renal disease. *Blood Purif* 22, 440–445
- Zeisberg M, Kalluri R (2013): Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 1. Common and organ-specific mechanisms associated with tissue fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 304, 216–225

Zeisberg M, Neilson EG (2010): Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 21, 1819–1834

Zeisberg M, Yang C, Martino M, Duncan MB, Rieder F, Tanjore H, Kalluri R (2007): Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem* 282, 23337–23347

Zhang C, Peng Y, Wang F, Tan X, Liu N, Fan S, Wang D, Zhang L, Liu D, Wang T et al. (2010): A synthetic cantharidin analog for the enhancement of doxorubicin suppression of stem cell-derived aggressive sarcoma. *Biomaterials* 31, 9535–9543

Zhong J, Yang HC, Fogo AB (2017): A perspective on chronic kidney disease progression. *Am J Physiol Renal Physiol* 312, 375–384

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Durchführung und Fertigstellung meiner Dissertation unterstützt haben.

Zuallererst möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Michael Zeisberg für das entgegengebrachte Vertrauen und die Überlassung des Dissertationsthemas danken. Seine großzügige Förderung und die kontinuierliche Betreuung ermöglichten den Abschluss meines Promotionsvorhabens.

Herrn PD Dr. Björn Tampe möchte ich nicht nur für die Planung und Konzeption der Experimente, sondern auch für die Durchführung der tierexperimentellen Studien danken. Seine pragmatische Herangehensweise und sein wissenschaftliches Arbeiten sind mir vorbildhaft.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Gunsmaa Nyamsuren. Sie arbeitete mich geduldig und immer mit einem Blick auf relevante Details in die molekularbiologische Methodik ein. Ihre Unterstützung hat maßgeblich zum Gelingen des Projekts in diesem Umfang beigetragen. Die gemeinsame Laborarbeit war für mich stets eine wertvolle und schöne Erfahrung.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei Frau Annika Erdmann, Frau Anika Krüger und Frau Sarah Rinkleff bedanken. Ihre Hilfsbereitschaft in allen technischen und organisatorischen Belangen haben die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht.

Lebenslauf