

# **Annexin A1 im chronischen Nierenversagen**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

in der Wissenschaftsdisziplin: Experimentelle Ernährungsmedizin

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Potsdam

vorgelegt von

Hanna Neymeyer

aus Freiburg im Breisgau

September 2013

Bearbeitungszeitraum: Januar 2011- September 2013

Leitung: Prof. Dr. Sebastian Bachmann

am Institut für Ernährungswissenschaft, Universität Potsdam

am Institut für Vegetative Anatomie, Charité Universitätsmedizin Berlin

1. Gutachter: Prof. Dr. Berthold Hoher

2. Gutachter: Prof. Dr. Sebastian Bachmann

3. Gutachter: PD. Dr. Jens Raila

Datum der Disputation: 13.12.2013

Online veröffentlicht auf dem  
Publikationsserver der Universität Potsdam:  
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2014/6967/>  
URN [urn:nbn:de:kobv:517-opus-69670](http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-69670)  
<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus-69670>

## Abstract

Expansion of the renal tubulointerstitium due to an accumulation of cellular constituents and extracellular matrix is a characteristic feature of chronic kidney disease (CKD) and leads to the progression towards renal failure. Fibroblast proliferation and transformation to the secretory myofibroblast phenotype present key events herein. The signaling process which leads to the generation of myofibroblasts is actively investigated to identify targets for antifibrotic therapeutic strategies. The antiinflammatory protein annexin A1 and its receptor formyl peptide receptor 2 (FPR2) have been implicated in the regulation of fibroblasts from various organs but the expression and function of the two products in renal fibrotic disease have not been elucidated so far. Aim of the present study was therefore to investigate the renal expression of annexin A1 and FPR2 in an animal model of chronic kidney disease and to characterize the role of annexin A1 in the regulation of fibroblast phenotype and synthetic activity.

To this end, newborn Sprague-Dawley rats were treated either with vehicle or with an angiotensin II type I receptor antagonist during the first two weeks of their life and kept without further intervention until the age of 11 month (CKD rats). Regulation and localization of annexin A1 and FPR2 were studied using real-time PCR and immunohistochemistry. Annexin A1 and FPR2 expressing cells were further characterized by double labeling immunofluorescence with markers for endothelial cells (rat endothelial cell antigen), macrophages (CD68), fibroblasts (CD73), and myofibroblasts (alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ -sma)). Cell culture studies were conducted in immortalized renal cortical fibroblast derived from wildtype and from annexin A1-deficient mice as well as in established cell lines of human and murine renal fibroblasts. Overexpression of annexin A1 was achieved by stable transfection. Expression of annexin A1,  $\alpha$ -sma and collagen 1 $\alpha$ 1 was determined using real-time PCR, Western blotting and immunohistochemistry. Secretion of annexin A1 was studied using trichloroacetic acid protein precipitation of cell culture supernatants and Western blotting.

As expected, CKD rats had an overall lower number of nephrons with a marked glomerular hypertrophy. The tubulointerstitial space was expanded due to an accumulation of fibrillar collagens, activated fibroblasts and inflammatory cells. In parallel, mRNA expression for Annexin A1 and transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) was significantly increased. Double labeling immunofluorescence localization of annexin A1 demonstrated a high abundance in CD73 positive cortical interstitial fibroblasts and in a subset of CD68 immunoreactive macrophages. The abundance in myofibroblasts and renal endothelia was low. FPR2 was found in the majority of renal fibroblasts, myofibroblasts, a subset of macrophages, and in

renal endothelial cells. Treatment of cultured murine fibroblasts with the profibrotic cytokine TGF- $\beta$  resulted in a parallel induction of  $\alpha$ -sma-, collagen 1 $\alpha$ 1- and annexin A1 biosynthesis. In addition, annexin A1 secretion was markedly increased. Overexpression of annexin A1 in murine fibroblasts reduced TGF  $\beta$ -induced  $\alpha$ -sma- and collagen 1 $\alpha$ 1-biosynthesis. Fibroblasts derived from annexin A1-deficient mice showed a strong myofibroblast phenotype with increased expression of both,  $\alpha$ -sma-, and collagen 1 $\alpha$ 1. Application of a peptide antagonist of FPR2 receptor (WRW4) caused a stimulation of  $\alpha$ -sma biosynthesis thus suggesting a role of FPR2 in the antifibrotic effects of annexin A1.

In conclusion, these results identify renal cortical interstitial fibroblasts as major source and as a target for annexin A1 signalling in the kidney. The annexin A1/FPR2 signalling system may therefore play an important role in the control of fibroblast phenotype and activity and may therefore provide a novel target for antifibrotic pharmacological strategies in the treatment of CKD.

Die Expansion des renalen Tubulointerstitiums aufgrund einer Akkumulation zellulärer Bestandteile und extrazellulärer Matrix ist eine charakteristische Eigenschaft der chronischen Nierenerkrankung (CKD) und führt zu einer Progression der Erkrankung in Richtung eines terminalen Nierenversagens. Die Fibroblasten Proliferation und ihre Transformation hin zum sekretorischen Myofibroblasten-Phänotyp stellen hierbei Schlüsselereignisse dar. Signalprozesse, die zur Induktion der Myofibroblasten führen, werden aktiv beforscht um anti-fibrotische Therapieansätze zu identifizieren. Das anti-inflammatorische Protein Annexin A1 und sein Rezeptor Formyl-Peptid Rezeptor 2 (FPR2) wurden in verschiedenen Organsystemen mit der Regulation von Fibroblastenaktivität in Verbindung gebracht, jedoch wurden ihre Expression und Funktion bei renalen fibrotischen Erkrankungen bisher nicht untersucht. Ziel der aktuellen Studie war daher die Untersuchung der renalen Annexin A1- und FPR2-Expression in einem Tiermodell des chronischen Nierenversagens, sowie die Charakterisierung der funktionellen Rolle von Annexin A1 in der Regulation des Fibroblasten Phänotyps und ihrer Syntheseleistung.

Dazu wurden neugeborene Sprague-Dawley Ratten in den ersten zwei Wochen ihres Lebens entweder mit Vehikel oder mit einem Angiotensin II Typ I Rezeptor Antagonisten behandelt und ohne weitere Intervention bis zu einem Alter von 11 Monaten (CKD Ratten) gehalten. Die Regulation und Lokalisation von Annexin A1 und FPR2 wurden mit Hilfe von Real-Time PCR und Immunhistochemie erfasst. Annexin A1- und FPR2-exprimierende Zellen wurden weiter durch Doppelimmunfluoreszenzfärbungen charakterisiert. Gefärbt wurde mit Antikörpern gegen endotheliale Zellen (*rat endothelial cell antigen*), Makrophagen (CD 68), Fibroblasten (CD73) und Myofibroblasten (*alpha-smooth muscle actin* ( $\alpha$ -sma)).

Zellkulturstudien wurden an immortalisierten renalen kortikalen Fibroblasten aus Wildtyp- und Annexin A1-defizienten Mäusen, sowie an etablierten humanen und murinen renalen Fibroblasten durchgeführt. Eine Überexpression von Annexin A1 wurde durch eine stabile Transfektion erreicht. Die Expression von Annexin A1,  $\alpha$ -sma und Kollagen 1 $\alpha$ 1 wurde durch Real-Time PCR, Western Blot und Immunhistochemie erfasst. Die Sekretion des Annexin A1 Proteins wurde nach TCA-Fällung des Zellkulturüberstandes im Western Blot untersucht.

Wie zu erwarten zeigten die CKD Ratten eine geringere Anzahl an Nephronen mit deutlicher glomerulären Hypertrophie. Der tubulointerstitielle Raum war durch fibrilläres Kollagen, aktivierte Fibroblasten und inflammatorische Zellen expandiert. Parallel dazu war die mRNA Expression von Annexin A1 und *Transforming growth factor beta* (TGF- $\beta$ ) signifikant erhöht. Die Annexin A1-Lokalisation mittels Doppelimmunfluoreszenz identifizierte eine große Anzahl von CD73-positiven kortikalen Fibroblasten und eine Subpopulation von Makrophagen als Annexin A1-positiv. Die Annexin A1-Menge in Myofibroblasten und renalen Endothelien war gering. FPR2 konnte in der Mehrzahl der renalen Fibroblasten, in Myofibroblasten, in einer Subpopulation von Makrophagen und in renalen Epithelzellen nachgewiesen werden.

Eine Behandlung der murinen Fibroblasten mit dem pro-fibrotischen Zytokin TGF- $\beta$  führte zu einem parallelen Anstieg der  $\alpha$ -sma-, Kollagen 1 $\alpha$ 1- und Annexin A1-Biosynthese und zu einer gesteigerten Sekretion von Annexin A1. Eine Überexpression von Annexin A1 in murinen Fibroblasten reduzierte das Ausmaß der TGF- $\beta$  induzierten  $\alpha$ -sma- und Kollagen 1 $\alpha$ 1-Biosynthese. Fibroblasten aus Annexin A1-defizienten Mäusen zeigten einen starken Myofibroblasten-Phänotyp mit einer gesteigerten Expression an  $\alpha$ -sma und Kollagen 1 $\alpha$ 1. Der Einsatz eines Peptidantagonisten des FPR2 (WRW4) resultierte in einer Stimulation der  $\alpha$ -sma-Biosynthese, was die Vermutung nahe legte, dass Annexin A1 FPR2-vermittelt anti-fibrotische Effekte hat.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass renale kortikale Fibroblasten eine Hauptquelle des Annexin A1 im renalen Interstitium und einen Ansatzpunkt für Annexin A1-Signalwege in der Niere darstellen. Das Annexin A1/FPR2-System könnte daher eine wichtige Rolle in der Kontrolle des Fibroblasten Phänotyp und der Fibroblasten Aktivität spielen und daher einen neuen Ansatz für die anti-fibrotischen pharmakologischen Strategien in der Behandlung des CKD darstellen.

## Abkürzungsverzeichnis

A.dest.	Aqua dest.
ARA	Angiotensin II Rezeptor Antagonist
$\alpha$ -sma	<i><math>\alpha</math>-smooth muscle actin</i>
AMP	Adenosinmonophosphat
ANG-II	Angiotensin II
Anxa1	Annexin A1
Arg	Arginin
BCA	Bicinchoninsäure
Boc <sub>1</sub>	N-butoxycarbonyl-Met-Leu-Phe
Boc <sub>2</sub>	N-butyloxycarbonyl-Phe-Leu-Phe-Leu-Phe
C43	<i>Compound 43</i>
Ca <sup>2+</sup>	Kalziumion
CKD	<i>Chronic Kidney Disease</i>
Col1 $\alpha$ 1	Kollagen 1 $\alpha$ 1
COX-2	Cyclooxygenase-2
cPLA	Zytosolische Phospholipase
CsH	Cyclosporin H
CTGF	<i>Connective tissue growth factor</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrachlorid-Dihydrat
DAPI	4,6-Diamino-2-Phenylindol
DMEM	<i>Dulbeccos Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF-R	<i>Epidermal Growth factor-Rezeptor</i>
EndMT/ EMT	Endotheliale/Epitheliale Mesenchymal Transition

## Abkürzungsverzeichnis

---

EPO	Erythropoetin
ERK	<i>Extracellular signal regulated Kinase</i>
E.coli	Escherichia coli
ET-1	Endothelin 1
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FKS	Fötales Kälber Serum
fMLP	formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin
FPR	Formyl-Peptid-Rezeptor
FPRL1	Formyl-Peptid-Rezeptor like 1
FPRL2	Formyl-Peptid-Rezeptor like 2
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Elektronen-Transfer
FSP-1	<i>fibroblast specific protein-1</i>
fwd	<i>forward</i>
g	Erdbeschleunigung
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
h	Stunde
iDC	<i>imature dendritic cells</i>
IL-10	Interleukin 10
IL-12	Interleukin 12
kDa	Kilo Dalton
KG	Körpergewicht
Leu	Leucin
LXA <sub>4</sub>	Lipoxin A4
MAP-Kinasen	<i>mitogen activated protein</i> -Kinasen
mDC	<i>mature dendritic cells</i>
min	Minute
mM	Millimolar
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase

NTC	<i>Non Template Control</i> (Negativkontrolle)
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
Phe	Phenylalanin
PIP2	Phosphatidylinositoldiphosphat
PIP3K	Phosphatidylinositoltriphosphat-Kinase
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
qPCR	quantitative Real-Time PCR
rev	<i>reverse</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i>
Thr	Threonin
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
s	Sekunden
SAA	Serum Amyloid A
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
Ser	Serin
Smad-Proteine	<i>Small mothers against decapentaplegic</i> -Proteine
TCA	Trichloressigsäure
V	Volt
Vgl.	Vergleich
YFP	<i>Yellow Fluorescent Protein</i>
WRW4	Trp-Arg-(Trp) <sub>4</sub>

## Inhaltsverzeichnis

Abstract .....	I
Abkürzungsverzeichnis .....	IV
Inhaltsverzeichnis .....	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Chronische Nierenerkrankung .....	1
1.2 Anatomie und Funktion der Niere .....	3
1.3 Rattenmodell des chronischen Nierenversagen (mit ARA behandelten Ratten) .....	4
1.4 <i>Transforming Growth Factor-<math>\beta</math></i> und interstitielle Fibrose.....	5
1.5 Renale interstitielle Fibroblasten und Myofibroblasten .....	7
1.6 Interstitielle Nierenfibroblasten in der Zellkultur .....	10
1.7 Annexin A1 .....	11
1.7.1 Funktionen des Annexin A1 .....	13
1.7.2 Annexin A1 Rezeptoren – die Formyl-Peptid-Rezeptor Familie.....	15
1.7.3 Lokalisation von Annexin A1 in der Niere .....	18
1.7.4 Annexin A1 in Fibroblasten und bei Fibrose .....	18
2 Zielsetzung .....	20
3 Material und Methoden.....	22
3.1 Material .....	22
3.2 Methoden.....	28
3.2.1 Tierexperimentelle Arbeiten .....	28
3.2.1.1 Mit ARA behandelte Ratten .....	28
3.2.1.2 Annexin A1-defiziente Mäuse .....	28
3.2.2 Aorta abdominalis Perfusion .....	28
3.2.3 Gewebprozessierung .....	29
3.2.3.1 Gewebeverarbeitung zur histologischen- und immunhistochemischen Analyse .....	29
3.2.3.1.1. Herstellung von Gewebsschnitten .....	30
3.2.3.2 Gewebeverarbeitung zur biochemischen Analyse .....	30
3.2.4 Histologische Methoden.....	30
3.2.4.1. Histologische Färbungen .....	30

3.2.4.2 Elektronenmikroskopie .....	31
3.2.5 Proteinbiochemische Methoden .....	31
3.2.5.1 Verwendete Antikörper .....	31
3.2.5.2 Immunhistochemie und Immunzytologie .....	32
3.2.5.3 Herstellung von Zelllysaten für SDS-PAGE.....	33
3.2.5.4 Trichloressigsäurepräzipitation von Annexin A1 im Zellkulturmedium .....	34
3.2.5.5 SDS-PAGE (Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) .....	34
3.2.5.6 Immunoblotting/ Western Blotting.....	35
3.2.6 Molekularbiologische Methoden.....	36
3.2.6.1 RNA Isolation mittels Trizol .....	36
3.2.6.2 Qualitäts-und Quantitätsbestimmung isolierter RNA .....	36
3.2.6.3 cDNA Synthese .....	36
3.2.6.4 Endpunkt Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	37
3.2.6.5 Agarosegel-Elektrophorese .....	38
3.2.6.6 Quantitative Real-Time PCR .....	38
3.2.6.7 Klonierung .....	41
3.2.7 Mikrobiologische Methoden .....	43
3.2.7.1 Herstellung kompetenter Bakterienstämme .....	43
3.2.7.2 Transformation kompetenter Bakterien mit Annexin A1-pEYFP-N1 Plasmid ..	44
3.2.7.3 Plasmidpräparation.....	44
3.2.7.4 Glycerinstock zur Lagerung von Bakterien.....	44
3.2.8 Methoden der Zellkultur .....	44
3.2.8.1 Erzeugung primärer renaler kortikaler Fibroblasten .....	44
3.2.8.2 Passagieren von Zelllinien.....	45
3.2.8.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	45
3.2.8.4 Immortalisierung der etablierten Primärzellkulturen durch SV40 Transfektion	46
3.2.8.5 Stabile Überexpression von rAnxa1-YFP in Fibroblasten .....	46
3.2.8.6 Behandlung mit Transforming Growth Faktor $\beta$ 1.....	46
3.2.8.7 Behandlung mit Formyl-Peptid-Rezeptor -Antagonisten .....	47
3.2.8.8 Zelllinien .....	47

3.2.9 Statistik.....	47
4. Ergebnisse .....	48
4.1 Morphologie der mit ARA behandelten Ratten .....	48
4.2 Renale Annexin A1-Expression .....	51
4.2.1 Renale Annexin A1-Expression in jungen Kontrolltieren.....	51
4.2.2 Renale Annexin A1-Expression in mit ARA behandelten Ratten .....	53
4.2.3 Interstitielle Annexin A1-Expression in mit ARA behandelten Ratten .....	55
4.3 Renale Expression des Annexin A1-Rezeptors FPR2 in mit ARA behandelten Ratten.....	62
4.4 Isolation und Charakterisierung renaler kortikaler Mausfibroblasten .....	66
4.5 Regulation von Annexin A1 unter pro-fibrotischen Konditionen .....	70
4.5.1 Regulation von Annexin A1 in mRCF Fibroblasten.....	70
4.5.2 Annexin A1 in fibrotischen Nierenfibroblasten .....	73
4.6 Funktionelle Rolle von Annexin A1 in renalen Fibroblasten .....	75
4.6.1 Annexin A1-überexprimierende Fibroblasten.....	75
4.6.2 Annexin A1-defiziente Fibroblasten .....	78
4.6.3 Behandlung mit Antagonisten der Formyl-Peptid-Rezeptoren.....	80
5 Diskussion .....	82
5.1 Tiermodell des chronischen Nierenversagen .....	83
5.2 Renale Annexin A1- und FPR2-Expression.....	84
5.2.1 Lokalisation von Annexin A1 und seinem Rezeptor FPR2 in der gesunden Niere .....	84
5.2.2 Lokalisation von Annexin A1 und seinem Rezeptor FPR2 in mit ARA behandelten Ratten.....	85
5.3 Isolierung und Charakterisierung der Zellkulturfibroblasten .....	87
5.4 Funktionelle Charakterisierung der Wirkung des Annexin A1/FPR2 Systems in renalen Fibroblasten.....	89
5.4.1 Regulation von Annexin A1 unter pro-fibrotischen Konditionen.....	89
5.4.2 Funktionelle Rolle des Annexin A1 in renalen Fibroblasten.....	90
5.5 Die potentielle protektive Rolle des Annexin A1 im chronischen Nierenversagen .....	92
6 Zusammenfassung.....	97
Abbildungsverzeichnis.....	XI
Tabellenverzeichnis.....	XIV

## Inhaltsverzeichnis

---

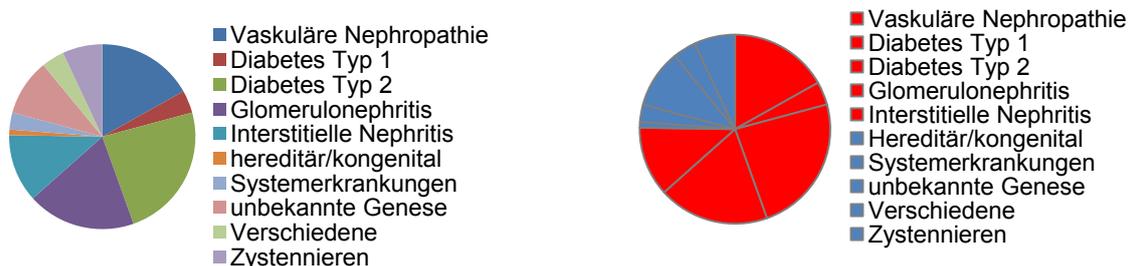
Literaturverzeichnis .....	XV
Danksagung .....	XXIX
Selbstständigkeitserklärung .....	XXX

# 1 Einleitung

## 1.1 Chronische Nierenerkrankung

Die chronische Nierenerkrankung (*Chronic Kidney Disease* CKD) bzw. chronische Niereninsuffizienz wird definiert durch eine fortschreitende Schädigung des renalen Funktionsgewebes und eine Persistenz der Erkrankung über drei Monate hinweg, einhergehend mit einer Reduktion der glomerulären Filtrationsrate (GFR)  $<60\text{ml/min/1,73m}^2$  und Proteinurie (National Kidney Foundation 2002).

Zu den quantitativ wichtigsten Ursachen zählen der Diabetes mellitus Typ II und die arterielle Hypertonie. Jedoch können auch erbliche Veranlagung oder Autoimmunerkrankungen Schäden am Nierengewebe induzieren. Zu den häufigsten Nephropathien zählen in Deutschland die diabetische Nephropathie (27%), die Glomerulonephritiden (20%), die vaskuläre Nephropathie (15%), die interstitielle Nephritis (13%), Zystennieren (7%) sowie Systemerkrankungen (7%), wie die Bindegewebserkrankung Lupus erythematodes (QuaSiNiere 2005). Wie in Abbildung 1 in rot dargestellt, ist die große Mehrzahl dieser Erkrankungen mit entzündlichen Reaktionen assoziiert.



**Abbildung 1:** Diagnoseverteilung bei Dialysepatienten, eigene Darstellung nach QuaSiNiere (2005)

Die chronische Nierenerkrankung stellt die häufigste Ursache der Entwicklung einer terminalen Niereninsuffizienz (*end stage renal disease*) dar. Therapeutische Optionen für chronische Nierenerkrankungen sind begrenzt, sodass als letzte Interventionsmöglichkeit häufig nur aufwendige und kostspielige Organersatzverfahren wie Dialyse oder die Nierentransplantation verbleiben. Im Jahr 2010 wurden zwei Million Menschen weltweit durch eine Nierenersatztherapie am Leben gehalten. Aktuelle Untersuchungen zeigen auch, dass in Industrienationen bereits 2-3% der jährlichen Ausgaben des Gesundheitssystems auf die Behandlung der terminalen Niereninsuffizienz zurückzuführen sind. Zudem sterben jährlich mehr als eine Million Menschen an Nierenversagen und dies vor allem in Entwicklungsländern (Couser et al. 2011). Weiterhin ist die chronische Niereninsuffizienz ein bedeutender Risikofaktor für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen wie der

arteriellen Hypertonie, der koronaren Herzerkrankung, der Herzinsuffizienz und dem Schlaganfall.

Chronische Nierenerkrankungen stellen damit auch einen beträchtlichen Kostenfaktor für das Gesundheitssystem dar und werden zunehmend als globales Gesundheitsproblem erachtet (Schieppati und Remuzzi 2005).

Die Aufklärung der zell- und molekularbiologischen Mechanismen, welche chronischen Nierenerkrankungen zugrunde liegen, und die Entwicklung neuer Mechanismus-basierter Therapiemöglichkeiten ist daher ein primäres Ziel nephrologischer Forschung.

Das pathologische Bild chronischer Nierenerkrankungen unterschiedlichster Genese ist gekennzeichnet durch die parallele Existenz von entzündlichen Infiltraten und fibrotischen Veränderungen des Nierengewebes. Entsprechend den aktuellen Konzepten zur Pathophysiologie des chronischen Nierenversagens kommt es als Reaktion auf verschiedene Noxen zunächst zu einer Infiltration von Entzündungszellen in das renale Parenchym und zu einer lokalen Zerstörung von Nierengewebe (Vielhauer, Schlöndorff, und Anders 2004; Kriz und LeHir 2005). Durch das geschädigte Nierengewebe und die eingewanderten inflammatorischen Zellen werden Mediatoren sezerniert, welche eine Proliferation und Aktivierung von Fibroblasten hervorrufen. Pro-inflammatorische Zytokine wie beispielsweise Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) führen zu Freisetzung weiterer pro-inflammatorischer Mediatoren, die die Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten aktivieren. Die Funktion der Myofibroblasten ist durch die Produktion von extrazellulären Matrixbestandteilen, vor allem Kollagen, gekennzeichnet (Müller et al. 1992). Durch den Anstieg der Kollagensynthese kommt es zu einer Expansion des renalen Interstitiums. Geschädigtes Gewebe wird in diesem Prozess abgeräumt und durch eine bindegewebige Narbe ersetzt. Bleiben weitere Schädigungen aus, kommt es zu einer Ausheilung der Entzündungsreaktion, und die Nierenschädigung bleibt lokal begrenzt. Bei Persistenz der Noxe oder durch eine unkontrollierte Produktion von Bindegewebe kann es jedoch zu der progredienten Fibrosierung kommen, welche letztendlich zur vollständigen Zerstörung des Organs führt (Eddy 2000). Die Expansion des renalen Interstitiums erhöht die Diffusionsstrecke zwischen den Tubulus Segmenten und dem Blut und führt zu Fehlfunktionen der Niere. Das stete Fortschreiten der chronischen Nierenerkrankung basiert demnach auf einem Teufelskreis der Fibrosierung ausgelöst durch eine persistierende Entzündungsreaktion (Fogo 2007).

## 1.2 Anatomie und Funktion der Niere

Die Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen ist eine überlebenswichtige metabolische Funktion der Niere. Die Niere ist verantwortlich für die Regulation des Elektrolyt-, Wasser- sowie des Säure-Basen-Haushaltes. Somit ist die Niere das entscheidende Organ zur Blutdruckregulation und zur Aufrechterhaltung des Blut-pH-Wertes. Außerdem besitzt die Niere endokrine Funktionen durch die Produktion von Hormonen wie Renin, Erythropoetin (EPO) und Kalzitriol sowie Gewebshormone, wie die Eicosanoide.

Die Niere besteht aus einer Rinden- und Markzone, deren Grenze durch die unterschiedlichen Tubulusabschnitte der funktionellen Einheiten, der Nephrone, definiert ist. Jedes Nephron besteht aus einer Filtrationseinheit, dem Glomerulus, und einem Tubulussystem, der Henle'schen Schleife, die in einem Sammelrohr mündet. Das Glomerulus ist aufgebaut aus einem Kapillarschlingenkonvolut, umgeben von der Bowman'schen Kapsel, und enthält als Schlingenkonvolut spezialisierte Epithelzellen: die Podozyten, das Porenendothel und das Mesangium. Der im Glomerulus gebildete Primärharn wird durch Resorption und Exkretion entlang des Nephrons in Endharn umgewandelt. Dabei folgen dem Glomerulus der proximale Tubulus, die dünne ab- und aufsteigende Schleife, der dicke aufsteigende Schenkel, die Macula densa, der Verbindungstubulus und schließlich das kortikale und medulläre Sammelrohr.

Der renale Blutfluss von 1100 ml/min entspricht ca. 22% des Herzminutenvolumens. Die Filtrationsleistung der Niere, beschrieben durch die GFR, liegt bei durchschnittlich 180 l/d, was einer Filtration von 125 ml/min entspricht (Briggs, Kriz, und Schnermann 2001; Jia et al. 2012).

Der peritubuläre- und extravaskuläre Raum der Niere wird als renales Interstitium bezeichnet. Im Bereich des Kortex macht das renale Interstitium ca. 0,6-3,4% des Nierenvolumens aus. Es besteht aus zellulären und extrazellulären Anteilen und stützt skelettähnlich die parenchymatösen und vaskulären Bestandteile des Organs. Fibroblasten machen dabei den Großteil des zellulären Anteils aus. Außerdem finden sich Zellen des Immunsystems, allen voran antigenpräsentierende dendritische Zellen, sowie Makrophagen und Lymphozyten. Der extrazelluläre Anteil wird von Fibroblasten produziert und besteht aus einer komplexen Struktur von fibrillärem Kollagen der Typen I, III und VI, die in einer gelartigen Matrix aus Glykoproteinen und Proteoglykanen eingebettet sind (Lemley und Kriz 1991). Das renale Interstitium ist keineswegs nur ein Füllraum zwischen den funktionell wichtigen Tubulusstrukturen und den Gefäßen, sondern besitzt dezidierte Funktionen. Der Stoffaustausch zwischen den Tubulus Segmenten und dem Blut, der im Allgemeinen als Diffusion beschrieben wird, ist im Wesentlichen von der Beschaffenheit der interstitiellen extrazellulären Matrix abhängig. Zudem ist die osmotische Aufladung des medullären

Interstitiums von entscheidender Bedeutung für den Mechanismus der Urinkonzentration. Die Beschaffenheit des renalen Interstitiums ist verantwortlich für die Effizienz des Stofftransports der Niere, da die Diffusionsstrecke von den Tubuli zu den Gefäßen maßgeblich von der Weite des renalen Interstitiums definiert wird.

Des Weiteren besitzen die interstitiellen Zellen des Kortex vor allem die Fibroblasten endokrine Funktion durch die Synthese von EPO (Bachmann, Le Hir, und Eckardt 1993). Kortikale Fibroblasten exprimieren ein Enzym des Adenosin-Stoffwechsels, die 5'Ektonukleotidase (Kaissling et al. 1996). Durch dieses Enzym wird Adenosinmonophosphats (AMP) durch hydrolytische Spaltung zu Adenosin abgebaut (Lemley und Kriz 1991). Neben ihrer Fähigkeit EPO zu synthetisieren und AMP abzubauen, haben Fibroblasten auch potentiell immunmodulatorische Funktion durch die Reduktion der Lymphozytenproliferation (Cappellesso-Fleury et al. 2010). Kortikale Fibroblasten in Mäusenieren zeigen zudem eine Expression der Enzyme Cyclooxygenase-1 (COX-1) und Prostaglandin Synthase, die Schlüsselenzyme der Eicosanoidsynthese sind (Campean et al. 2003).

### **1.3 Rattenmodell des chronischen Nierenversagen (mit ARA behandelten Ratten)**

Das in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Tiermodell zur Untersuchung des chronischen Nierenversagens ist ein *low nephron number* Modell, d.h. ein Tiermodell, das durch eine Störung in der nephrogenen Entwicklung eine geringere Anzahl an funktionsfähigen Nephronen aufweist.

Die Hyperfiltrations-Hypothese von Brenner et al. (1996) besagt, dass eine reduzierte Anzahl an Nephronen zunächst zu einem kompensatorischen Anstieg der GFR führt, der einen glomerulären Hochdruck nach sich zieht und schließlich zur Entwicklung einer systemischen arteriellen Hypertonie führt. Dadurch ausgelöst kommt es zu glomerulärer Schädigung mit Proteinurie, was einen Teufelskreis induziert, der zu einem terminalen Nierenversagen führt (Brenner, Lawler, und Mackenzie 1996). Eine Studie von Keller et al. (2003) beweist, dass Patienten, die an einer primärer Hypertonie leiden eine signifikant geringere Anzahl an Glomeruli und Nephronen aufweisen. Zudem zeigt sich, dass die Glomeruli dieser Individuen hypertrophiert sind. Eine reduzierte Anzahl an Nephronen führt zur Entwicklung eines primären Bluthochdrucks und einem höheren Risiko ein progredientes Nierenversagen zu entwickeln (Keller et al. 2003). Auch das Altern führt zu einem Verlust an Glomeruli (Goyal 1982) und resultiert ebenso in der Entwicklung eines erhöhten Blutdrucks.

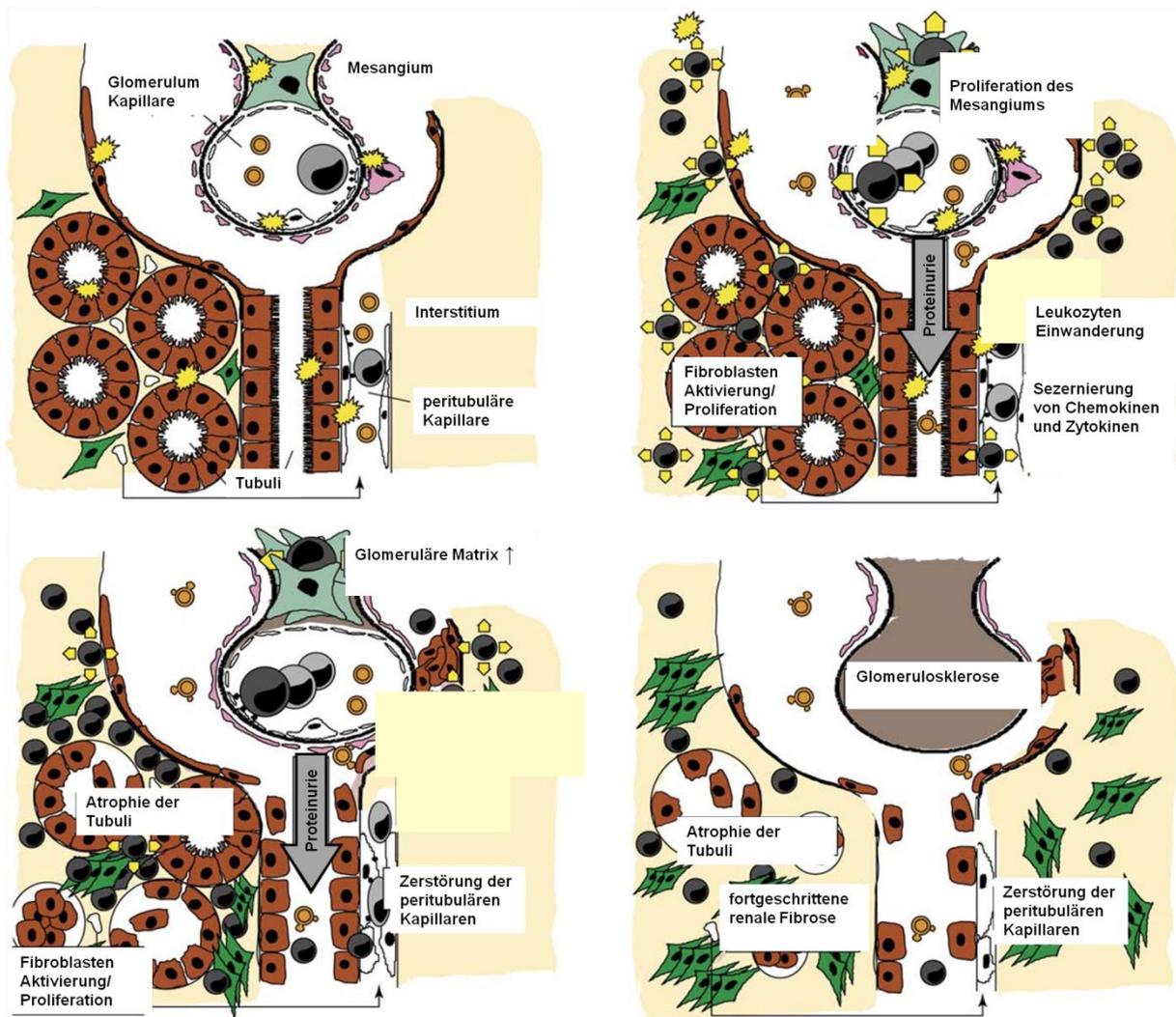
Bei Nagern ist die Nephrogenese im Gegensatz zum Menschen mit der Geburt noch nicht abgeschlossen. So können in den ersten zwei Wochen postnatal Störfaktoren die

Nephrogenese verändern. Die in dieser Arbeit untersuchten Ratten wurden die ersten 14 Tage postnatal mit einem **Angiotension II Typ I Rezeptor Antagonisten** (im Weiteren als ARA bezeichnet) behandelt. Das führte zu Störungen der Nephrogenese, d.h. zu einer reduzierten Anzahl an Nephronen. Bereits im Alter von drei Monaten führte das bei den mit ARA behandelten Ratten zu einem Anstieg des arteriellen Blutdrucks, einer Hypertrophie der Glomeruli, Proteinurie, Glomerulosklerose, einem reduzierten Volumen der Papille und interstitiellen Schäden (Saez et al. 2007). Nach elf Monaten zeigte sich bei diesen Ratten zudem eine Reduktion der GFR und ein starker erhöhter Blutdruck (Loria et al. 2007).

Die Pathogenese, der protrahierte Verlauf und das pathologische Bild entsprechen dabei der Situation im Patienten mit chronischem Nierenversagen. Dieses Tiermodell eignet sich daher in idealer Weise zur Untersuchung der Pathomechanismen des chronischen Nierenversagens.

#### **1.4 Transforming Growth Factor- $\beta$ und interstitielle Fibrose**

Gewebsverletzungen unterschiedlichster Genese führen zur Freisetzung von verschiedenen pro-inflammatorischen Chemokinen, welche eine Einwanderung von Leukozyten in das geschädigte Areal induzieren. Im Rahmen der daraus resultierenden Entzündungsreaktion werden von den Leukozyten Zytokine freigesetzt, die das Einwandern weiterer Lymphozyten begünstigt. Makrophagen und neutrophile Granulozyten sezernieren reaktive Sauerstoffspezies, Stickstoffmonoxid (NO), Arachidonsäureprodukte und zelltoxische Substanzen, die das Gewebe weiter zerstören und einen positiven *Feedback*-Mechanismus induzieren (Vielhauer, Schlöndorff, und Anders 2004). Zellen des Immunsystems und Zellen des geschädigten Tubulusepithels setzen pro-fibrotische Substanzen und Wachstumsfaktoren wie *Transforming Growth Factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ), *Connective Tissue Growth Factor* (CTGF), *Endothelin* (ET-1) oder *Angiotensin II* (ANG-II) frei (Eddy 2000). Die fortwährende Stimulierung des renalen Parenchyms und die Freisetzung von Chemokinen und pro-fibrotischer Faktoren führen zu einer Infiltration von Leukozyten sowie zu einer vermehrten Synthese von extrazellulärer Matrix und damit zu einer Aufweitung des renalen Interstitiums. Die Folge ist eine verringerte Sauerstoffdiffusion, die letztendlich in einer Hypoxie resultiert und weitere Zytokinfreisetzung und extrazelluläre Matrixsynthese provoziert. Der Transport von Salzen und Wasser wird durch das expandierte Interstitium ebenfalls gestört und endet in einer Fehlfunktion des Nierenareals. Durch die interstitielle Fibrose wird die Nierenfunktion chronisch geschädigt (Anders, Vielhauer, und Schlöndorff 2003). Es kommt zur Entstehung eines chronischen Nierenversagens. In Abbildung 2 wird der oben beschriebene Prozess schematisch dargestellt.



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der Entstehung eines chronischen Nierenversagens und der Entwicklung einer interstitiellen Fibrose, veränderte Darstellung nach Vielhauer, Schlöndorff und Anders (2004)

Die Abbildung oben links zeigt mit gelben Sternen angedeutet eine initiale Gewebsschädigung. Im Bild rechts daneben ist dargestellt, dass diese Schäden zur Einwanderung von Leukozyten (dunkel grau) führen und diese Zytokine (gelbe Pfeile) freisetzen. Das resultiert in einer Aktivierung von Fibroblasten, einer vermehrten Einwanderung von Leukozyten, die ebenfalls Zytokine freisetzen, und Proteinurie. In der darunterliegenden Bildreihe ist links zu erkennen, dass das zur Atrophie des Tubulusepithels, zur Zerstörung der peritubulären Kapillaren sowie zur weiteren Proliferation der Fibroblasten führt. In der Abbildung rechts ist eine Glomerulosklerose mit fortgeschrittener interstitieller Fibrose dargestellt. Das Tubulusepithel ist in diesem Nierenareal zerstört und das Interstitium expandiert.

Das Zytokin TGF- $\beta$  spielt eine zentrale Rolle in der Entstehung einer Fibrose, indem es die Aktivierung residenter Fibroblasten der Niere induziert und die Extrazellulärmatrixsynthese aktiviert (Koesters et al. 2010). Es ist der wichtigste Fibrose-induzierende Wachstumsfaktor (Liu 2006). Eine Überexpression von TGF- $\beta$  per Transfektion oder in transgenen Tieren führt zu renaler Fibrose (Isaka et al. 1993; Liu 2006).

Die Proteine der TGF- $\beta$ -Superfamilie haben ein Molekulargewicht von 25 kDa. In Säugern werden drei verschiedene TGF- $\beta$  Isoformen exprimiert: TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3.

Mengenmäßig überwiegt TGF- $\beta$ 1 im Säugergewebe. Durch proteolytische Spaltung wird die aktive Form des Zytokins aus der inaktiven Pro-Peptid Form (latentes TGF- $\beta$ ) freigesetzt. Wahrscheinlich ist die Serin-Protease Plasmin stark an diesem Prozess beteiligt. Nahezu alle Zellen tragen TGF- $\beta$ -Rezeptoren (I und II), jedoch ist die Wirkung des TGF- $\beta$  von Zelle zu Zelle sehr unterschiedlich. Die durch TGF- $\beta$  induzierten intrazellulären Kaskaden umfassen die Regulation der Proteine der Smad-Familie (*small mothers against decapentaplegic*) und die MAP-Kinasen (*mitogen activated protein*) (Hills und Squires 2011). Meist werden Smad2 und Smad3 vom TGF- $\beta$  II Rezeptor phosphoryliert und bilden ein Heterodimer mit Smad4, welches im Nukleus auf Transkriptionsebene entsprechende Zielgene reguliert (Meng et al. 2012; Lan 2011; Schnaper et al. 2003).

Sowohl in experimentell induzierter CKD in Tiermodellen als auch in humanen Individuen mit CKD sind erhöhte TGF- $\beta$  Expressionsniveaus festzustellen (Border und Noble 1997). Die Aktivierung der Synthese von Extrazellulärmatrix durch Fibroblasten erfolgt über verschiedene parallele Effekte. Die Synthese der Matrixbestandteile wie Kollagen, Fibronectin und Proteoglykane wird induziert. Zeitgleich erfolgen eine Hemmung der matrixabbauenden Proteasen sowie eine Induktion der Proteaseinhibitoren. Zudem wird vermehrt Integrin produziert, um die Zell-Matrix-Kontakte zu erhöhen. Die autokrine Stimulation des TGF- $\beta$  führt außerdem zu einer Vervielfachung seiner biologischen Funktionen (Border und Noble 1997).

Neben der Steigerung der Extrazellulärmatrix-Synthese hemmt TGF- $\beta$  außerdem das Zellwachstum. Aus diesem Grund hat TGF- $\beta$  eine pro-fibrotische Wirkung (Kitamura und Suto 1997). Stimuliertes und überexprimiertes TGF- $\beta$  wird allgemein als Schlüsselfaktor im chronischen Nierenversagen angesehen (Liu 2006).

Neben seiner pro-fibrotischen Wirkung hat TGF- $\beta$  jedoch auch anti-inflammatorische Wirkung, indem es die Proliferation und Extravasation von Makrophagen und Lymphozyten drosselt und deren Zytokinantwort maßgeblich reduziert (Kehrl et al. 1986a; Kehrl et al. 1986b). Zudem kann es die Mitoserate verringern und Apoptose auslösen (Kitamura und Suto 1997). Für den Einsatz von Therapeutika bedeutet dies, dass eine reine Hemmung des freigesetzten TGF- $\beta$  auch negative Folgen haben kann.

### **1.5 Renale interstitielle Fibroblasten und Myofibroblasten**

Interstitielle spindelförmige Fibroblasten haften an den Basalmembranen der Tubuli und der Gefäße und machen neben den antigenpräsentierenden dendritischen Zellen den Hauptanteil des zellulären Anteils des renalen Interstitiums aus. Kortikale Fibroblasten exprimieren in ihrer Plasmamembran das Enzym 5'Ektonukleotidase (CD73) und lassen sich auf diese Weise von den MHC2-positiven dendritischen Zellen diskriminieren (Kaissling et al.

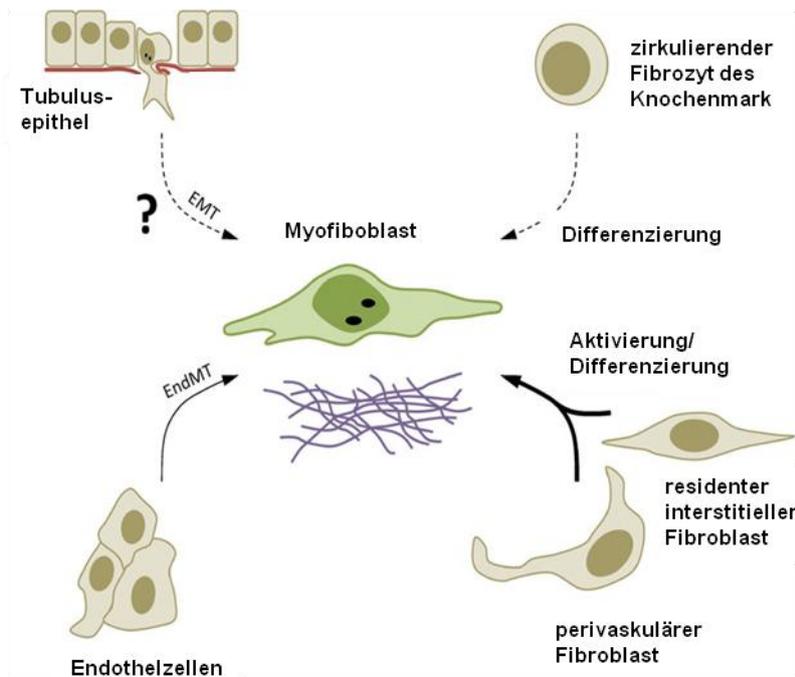
1996). Neben der 5'Ektonukleotidase (CD73) werden unter anderem die Proteine *platelet-derived growth factor* (PDGF), *fibroblast-specific protein-1* (FSP-1) sowie *heat shock protein 47* (HSP47) als Marker für interstitielle Fibroblasten eingesetzt (Qi et al. 2006; Strutz und Zeisberg 2006). Allerdings sind diese Marker nicht fibroblasten-spezifisch und sind zudem vom Phänotyp kortikaler und medullärer Fibroblasten abhängig. Da in der vorliegenden Arbeit an kortikalen Fibroblasten gearbeitet wurde, wurde der von Kaissling et al. (1996) für kortikale Fibroblasten gut etablierte Marker 5'Ektonukleotidase eingesetzt.

Fibroblasten produzieren auf definierte Signale hin den extrazellulären Anteil des Interstitiums die extrazelluläre Matrix. Stimuliert durch Gewebsschädigung oder inflammatorische Signale beginnen Fibroblasten verstärkt zu proliferieren und Kollagen sowie Matrix produzieren. Dabei ändert sich der Phänotyp von ruhenden Fibroblasten hin zu stark proliferierenden und synthetisierenden Myofibroblasten. Der Wandel des Phänotyps zu Myofibroblasten ist durch die Expression des zytoplasmatischen Proteins *alpha smooth muscle actin* ( $\alpha$ -sma) zu erkennen (Kaissling und Le Hir 2008; Desmouliere et al. 1993; Rodemann und Müller 1991). Aufgrund dessen haben Myofibroblasten kontraktile Eigenschaften und können geschädigte Areale zusammenziehen. Myofibroblasten ähneln phänotypisch nicht nur den Fibroblasten sondern auch den glatten Muskelzellen, da diese ebenfalls  $\alpha$ -sma exprimieren. Morphologisch unterscheiden sich die Myofibroblasten von den eher spindelförmigen Fibroblasten durch einen rundlicheren Nukleus und eine sternförmige Zellform (Kaissling und Le Hir 2008).

Da Myofibroblasten die entscheidenden Zellen für fibrotische Erkrankungen darstellen, sind Hinweise zu ihrer zellulären Herkunft und die ihrer Aktivierung zugrunde liegenden Mechanismen von besonderer Bedeutung für die Wissenschaft im Hinblick auf die Entwicklung potentieller anti-fibrotischer Pharmaka. Zur Herkunft der Myofibroblasten kann derzeit jedoch keine allgemeingültige Aussage getroffen werden. Einige Autoren legen der Myofibroblasten-Herkunft die Hypothese der Endothelialen/Epithelialen-Mesenchymalen-Transition (EndMT/EMT) zugrunde, da beispielsweise einige Fibroblasten bzw. Myofibroblasten CD31, einen Marker für endotheliale Zellen, exprimieren (Zeisberg et al. 2008; Zeisberg und Neilson 2010; Qi et al. 2006; Boor und Floege 2012). Dabei sollen sich Zellen des Gefäßendothels oder Tubulusepithelzellen aus dem Zellverband lösen und durch die stellenweise aufgelöste Basalmembran frei beweglich in das Interstitium gelangen (Liu 2004). Andere Arbeitsgruppen legen die Annahme dar, dass sich Myofibroblasten aus zirkulierenden Fibrozyten des Knochenmarks entwickeln (Hashimoto et al. 2004; Direkze et al. 2003; Strutz und Zeisberg 2006). Ansonsten wird davon ausgegangen, dass originär interstitielle Fibroblasten oder Perizyten durch bestimmte Signale zu Myofibroblasten differenzieren (Grgic, Duffield, und Humphreys 2012; Gabbiani 1992; Desmouliere, Chaponnier, und Gabbiani 2005; Barnes und Glass 2011; Duffield 2013). Die Hypothese der

EndMT/EMT scheint aktuell nicht haltbar zu sein gegenüber den vielen Belegen für die Herkunft der Myofibroblasten aus residenten renalen Fibroblasten (Kriz, Kaissling, und Le Hir 2011).

Die oben genannten Hypothesen zur Herkunft von Myofibroblasten werden in Abbildung 3 schematisch dargestellt.



**Abbildung 3:** Übersicht über die Herkunft renaler Myofibroblasten, veränderte Darstellung nach Gric, Duffield und Humphreys (2012)

Oben links ist die EMT aus Zellen des Tubulusepithels dargestellt. Unten links wird die Herkunft der Myofibroblasten aus Endothelzellen beschrieben. Oben rechts wird die Differenzierung von zirkulierenden Zellen des Knochenmarkes zu Myofibroblasten veranschaulicht. Unten rechts wird die Aktivierung und Differenzierung der lokalen Fibroblasten und Perizyten zu Myofibroblasten gezeigt.

Ein zentraler Faktor für die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten ist TGF- $\beta$  (Desmouliere et al. 1993). Daneben spielen auch andere pro-fibrotische Wachstumsfaktoren wie CTGF, PDGF und *fibroblast growth factor* (FGF) eine Rolle bei der Differenzierung des Myofibroblasten-Phänotyps (Qi et al. 2006). Dabei sind diese Wachstumsfaktoren häufig Mediatoren der TGF- $\beta$  Wirkung. D.h. die anderen Wachstumsfaktoren vermitteln häufig die Effekte des TGF- $\beta$  oder führen zu einer Erhöhung der TGF- $\beta$  Expression (Kanemoto et al. 2003; Strutz et al. 2001b; Yamabe et al. 2000).

Nach Beendigung der Gewebsreparatur begehen Myofibroblasten Apoptose und verhindern damit eine überschießende Produktion von extrazellulärer Matrix (Hinz et al. 2007). Dieser Prozess ist im chronischen Nierenversagen gestört, sodass es zu einer weiteren Proliferation von Myofibroblasten und einer persistierenden Matrixsynthese kommt. Ausgelöst werden diese Prozesse zum einen durch die Persistenz der Entzündung und die daraus resultierende fortgesetzte Freisetzung von pro-fibrotischen Mediatoren und zum anderen

durch die Hypoxie, welche ebenfalls eine Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine aus dem Tubulusepithel fördert. So entsteht ein Teufelskreis und es kommt zu einer extensiven Bildung von Narbengewebe und somit zu einem progredienten Funktionsverlust des Nierenparenchyms (Anders, Vielhauer, und Schlöndorff 2003).

Ein Großteil der aktuellen Forschungsansätze zur therapeutischen anti-fibrotischen Wirkung bestimmter Moleküle basiert auf einer Reduktion der  $\alpha$ -sma-positiven Myofibroblasten. Wobei sich die meisten Ansätze auf die Inhibition der TGF- $\beta$  Signalwege und seiner nachgelagerten Mediatoren konzentrieren. Zu den aktuell untersuchten Mediatoren zählen Decorin (Neill, Schaefer, und Iozzo 2012),  $\beta$ -Catenin (Hao et al. 2011), der PDGF-Rezeptor (LeBleu und Kalluri 2011) und Lipoxin A4 (Wu et al. 2006). Bisher konnte jedoch noch keiner dieser anti-fibrotischen Ansatzpunkte mit nennenswertem Erfolg in der Therapie eingesetzt werden.

## **1.6 Interstitielle Nierenfibroblasten in der Zellkultur**

Das renale Interstitium besteht aus einer heterogenen Zellpopulation, in der die Fibroblasten den größten Anteil ausmachen (Lemley und Kriz 1991). Bei der Untersuchung von Fragestellungen im Zusammenhang mit fibrotischen Veränderungen, wie im Falle eines chronischen Nierenversagens, können Zellkulturstudien mit interstitiellen Fibroblasten einen großen Beitrag dazu leisten die molekularen Mechanismen zu verstehen.

Die Zellkultur für primäre renale Fibroblasten stellt sich dabei jedoch als nicht trivial dar. Es muss genau zwischen kortikalen und medullären interstitiellen Fibroblasten unterschieden werden. Die Arbeitsgruppe um G. Müller zeigt (1991), dass Fibroblasten der Papille einen doppelt so langen mitotischen Teilungszyklus haben wie die Fibroblasten des Kortex (Rodemann et al. 1991). Auch morphologisch weisen die medullären Fibroblasten Unterschiede auf. Im Zytoplasma haben sie Lipidtropfen eingelagert (Grupp und Müller 1999). Außerdem zeigen Fibroblasten abhängig vom Ort ihrer Isolation, von ihrer Differenzierung und von den Zellkulturbedingungen Unterschiede in ihrer Morphologie und ihrer Proteinexpression zeigen (Grupp und Müller 1999). Hinzu kommt, dass Fibroblasten unterschiedliche Differenzierungsstufen aufweisen, drei mitotischen Phasen und vier post-mitotischen Phasen (Rodemann et al. 1991).

Um eine Zellkultur aus kortikalen Fibroblasten zu etablieren, wird vorwiegend der Mechanismus der Überwucherung eingesetzt. Die kortikalen Fibroblasten proliferieren schneller als die Epithelzellen des proximalen- und distalen Tubulus und die Endothelzellen der Gefäße. Für medulläre Fibroblasten jedoch lässt sich diese Technik nicht einsetzen. Medulläre Fibroblasten müssen zunächst durch verschiedene Techniken von den Tubulusepithelzellen separiert werden (Grupp und Müller 1999). Kortikale Fibroblasten, die *in*

*vivo* EPO exprimieren (Bachmann, Le Hir, und Eckardt 1993) verlieren diese Kompetenz in der Zellkultur rasch (Grupp und Müller 1999).

Die vermeintlich größte Komplikation ist jedoch, dass es keinen Fibroblasten spezifischen Marker gibt mit dem alle interstitiellen Fibroblasten identifiziert werden können. Kaissling et al. (1996) klassifizieren die renalen interstitiellen Zellen nach ihrer Immunreaktivität. Kortikale Fibroblasten exprimieren das Enzym 5'Ektonukleotidase. Die 5'Ektonukleotidase wird in der Niere ansonsten nur von einigen wenigen Lymphozyten, Zellen des proximalen Tubulus und Schaltzellen des Sammelrohrs exprimiert, die jedoch schon alleine aufgrund ihrer Morphologie von den Fibroblasten unterschieden werden können (Kaissling et al. 1996; Kaissling, Le Hir, und Kriz 2013). Andere Autoren schlagen zudem Marker wie den PDGF-Rezeptor (Grupp und Müller 1999), das Fibroblasten-spezifische Protein 1 (FSP-1) (Strutz et al. 1995) oder CD90 (Strutz et al. 2001a) vor. Jedoch sind alle diese Marker nicht spezifisch für Fibroblasten und somit auch nicht dienlich zur Etablierung einer reinen Fibroblasten Zellkultur.

Es ist daher vom Untersuchungsziel abhängig, welche Fibroblasten isoliert werden und mit welchen unterschiedlichen Markern diese anschließend identifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit war es ein primäres Ziel renale kortikale Fibroblasten aus Annexin A1-defizienten Mäusen und den dazu gehörigen Wildtyp-Kontrollen zu extrahieren und zu kultivieren. Daher wurde zunächst eine Zellkultur eigenständig etabliert. Um sicherzustellen, dass die damit erzielten Ergebnisse verallgemeinert werden können, wurde zusätzlich an bereits etablierten humanen und murinen Fibroblastenlinien gearbeitet. Diese etablierten Zellkulturlinien wurden freundlicherweise von G. Müller und M. Zeisberg aus Göttingen bereitgestellt.

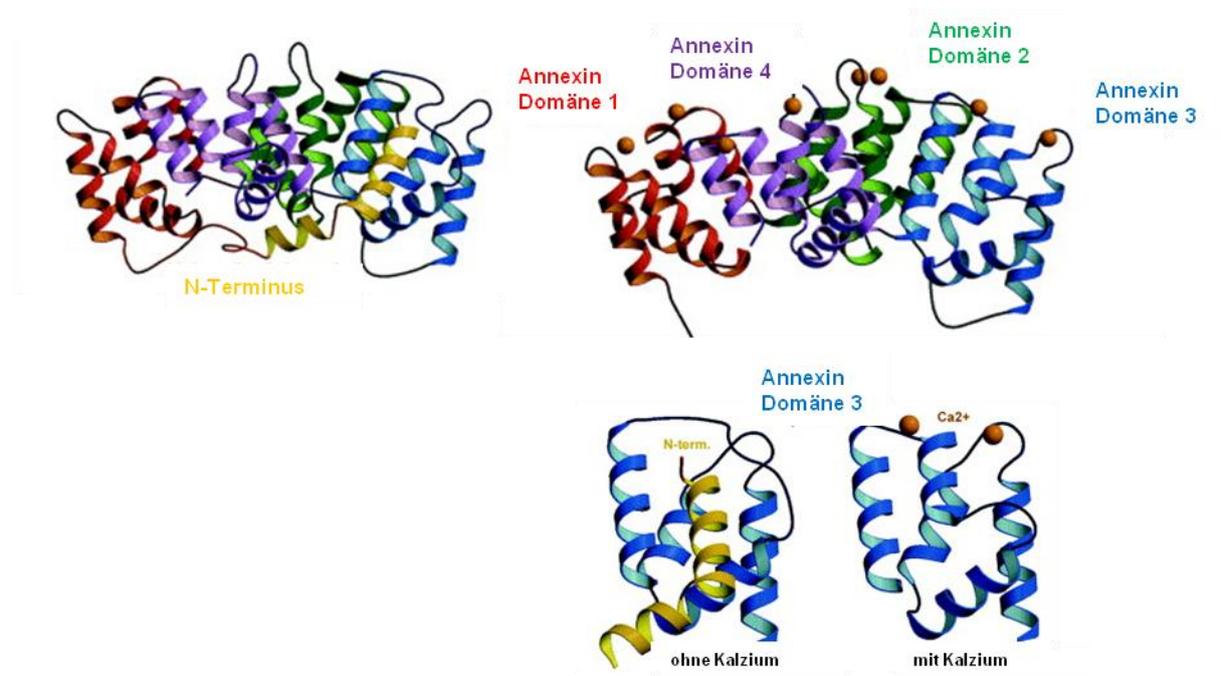
### **1.7 Annexin A1**

Annexin A1, ein 37 kDa Protein, ist das erste identifizierte Mitglied der Annexin-Superfamilie mit aktuell zwölf Mitgliedern. Im Jahr 1980 wurde das Protein, damals Macrocortin als glukokortikoid-vermittelten Inhibitor der Phospholipase identifiziert (Blackwell et al. 1980). Das heute als Annexin A1 (Crumpton und Dedman 1990) bezeichnete Protein ist auch unter den Namen Renocortin (Rothhut et al. 1983), Lipomodulin (Hirata und Iwata 1983; Hirata et al. 1982) oder Lipocortin 1 (Di Rosa et al. 1984; Cirino und Flower 1987) bekannt.

Eine Gemeinsamkeit aller Annexine liegt in ihrer Eigenschaft kalziumabhängig an Phospholipide, Zellmembranen, zu binden. Das typische Strukturmerkmal aller Annexine ist der konstante 34 kDa schwere hydrophile C-terminale Anteil, welcher aus vier oder acht (nur bei Annexin VI) sogenannten Annexin-Domänen besteht. Diese Domänen bestehen aus Helices von etwa 70 Aminosäuren. Aufgrund dieses C-Terminus weisen die

unterschiedlichen Annexine eine hohe Homologie von 40-60% auf (Raynal und Pollard 1994; Smith und Moss 1994).

Im Gegensatz dazu ist der N-Terminus variabel und verantwortlich für die spezifischen Kalziumaffinitäten und Bindungseigenschaften sowie die Phosphorylierungen der einzelnen Annexine (Hannon et al. 2003; Raynal und Pollard 1994; Liemann und Huber 1997). Annexin A1 gehört dabei zu den Annexinen mit hoher Kalziumaffinität. So wird der für die Annexin A1-Wirkung verantwortliche, 49 Aminosäuren große N-Terminus bei  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentrationen  $>1\text{mM}$  durch eine Konformationsänderung frei und steht für Protein-Protein-Wechselwirkungen zur Verfügung (Rosengarth und Luecke 2003; Rosengarth et al. 2001). In Abbildung 4 sind die Kalziumbindungsdomänen und die Konformationsänderung des Annexin A1 dargestellt.



**Abbildung 4:** Dreidimensionale Struktur des Annexin A1, veränderte Darstellung nach Rosengarth und Luecke (2003)

Die Darstellung links oben zeigt Annexin A1 in Abwesenheit von Kalzium mit verborgenem N-Terminus. Die Graphiken rechts beschreiben die Konformationsänderung des Annexin A1 unter Anwesenheit von Kalzium. Unten rechts ist dargestellt, wie der N-Terminus frei wird und wie Kalzium an die Annexin-Domäne 3 oszillieren kann.

Annexin A1 ist ein Substrat der Protein Kinase C (PKC), der Protein Kinase A (PKA) sowie von Rezeptor Tyrosin Kinasen wie des *Epidermal Growth Factors*-Rezeptors (EGF-R), des PDGF-Rezeptors und des Insulin-Rezeptors. Es wird von diesen Kinasen am N-Terminus phosphoryliert (Wang und Creutz 1994). Eine Phosphorylierung an Tyr-21 durch die EGF-Rezeptor Tyrosinkinase senkt die zur Phospholipidbindung benötigte Kalziummenge. Die PKC phosphoryliert Annexin A1 an Thr-24, Ser-27, Ser-28 und Thr-41. Eine Phosphorylierung durch PKA erfolgt im C-terminalen Anteil an Thr-216 (Rothhut 1997). Die

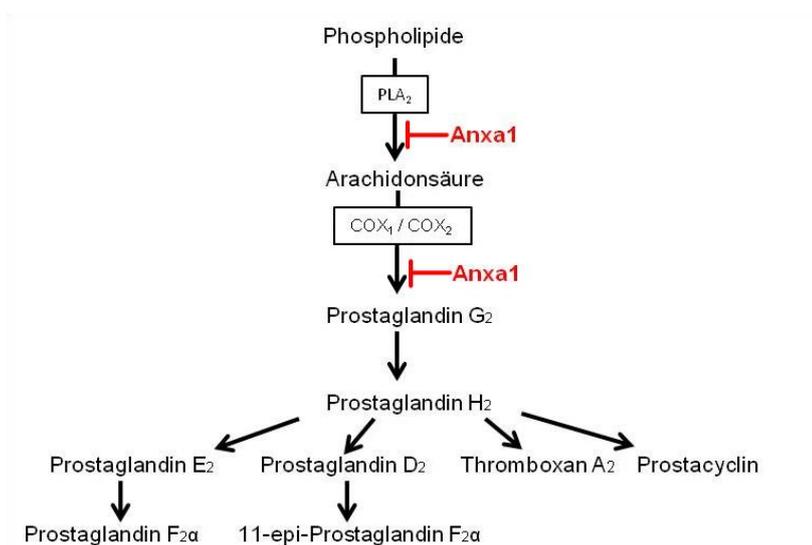
post-translationale Modifikation durch Phosphorylierung spielt eine wichtige Rolle für die Bindungseigenschaften von Annexin A1 an Proteine und Plasmamembranphospholipide (Solito et al. 2006). Die verschiedenen Phosphorylierungsstellen des Annexin A1 und die dafür verantwortlichen Kinasen sind in Abbildung 5 dargestellt.



**Abbildung 5:** Darstellung der Phosphorylierungsstellen von Annexin A1, Darstellung nach Rothut (1997)

### 1.7.1 Funktionen des Annexin A1

Das zytosmatische Protein Annexin A1 hat eine Vielzahl von verschiedenen Funktionen. Intrazellulär vermittelt Annexin A1 die nicht-genomische Wirkung von Glukokortikoiden. Durch die Bindung von Glukokortikoiden an ihren Rezeptor und deren regulatorisches Potential auf transkriptioneller Ebene wird die Synthese von Annexin A1 induziert (Errasfa und Russo-Marie 1989; Perretti und D'Acquisto 2009). Annexin A1 inhibiert seinerseits die Enzymaktivität des pro-inflammatorischen Enzymes zytosolische Phospholipase A2 (cPLA<sub>2</sub>) und reduziert die Expression der Cyclooxygenase-2 (COX-2) und der cPLA<sub>2</sub> (Hannon et al. 2003). Somit greift Annexin A1, wie in Abbildung 6 dargestellt, direkt in die Eicosanoidsynthese ein und verringert die Produktion pro-inflammatorischer Eicosanoide aus der Arachidonsäure. Abgesehen von der Induktion der Annexin A1-Synthese führen Glukokortikoide zu einer raschen Phosphorylierung des zytosolischen Annexin A1 und somit zu dessen Transport zur Plasmamembran und damit auch zur Sekretion von Annexin A1 in den extrazellulären Raum.



**Abbildung 6:** Darstellung der Eicosanoidsynthese und deren Hemmung durch Annexin A1, eigene Darstellung

Neben der Hemmung der Eicosanoidsynthese weist Annexin A1 anti-migratorische Effekte auf Zellen der Immunantwort, wie neutrophile Granulozyten und Monozyten auf.

Erhöhte Annexin A1-Spiegel führen bei Leukozyten zu einer verringerten Extravasation und Transmigration im Gewebe. Die anti-migratorische Wirkung des extrazellulären Annexin A1 beruht auf der Wechselwirkung des Annexin A1 mit den G-Protein gekoppelten Formyl-Peptid-Rezeptoren (FPR) auf den polymorphonukleären Leukozyten (Perretti und Flower 1994; Gastardelo et al. 2009; Hayhoe et al. 2006).

Eine Vielzahl unterschiedlichster Zellen sekretieren Annexin A1. Jedoch ist der Mechanismus der Sekretion von Annexin A1 bisher noch unvollständig verstanden (Comera und Russo-Marie 1995; Christmas et al. 1991). Da Annexin A1 keine typische hydrophobe Signalsequenz besitzt, kann es nicht klassisch vesikulär in Golgi-Vesikel durch Exozytose externalisiert werden (Philip, Flower, und Buckingham 1998). Wahrscheinlich ist die proteolytische Spaltung eines N-terminalen Peptides aus dem *full-length* Annexin A1 verantwortlich für die Sekretion, ähnlich der Interleukin-1 $\beta$  Sekretion (Castro-Caldas et al. 2002; Christmas et al. 1991). Der genaue Mechanismus der Externalisierung ist jedoch derzeit noch unklar. Es gilt als bewiesen, dass intrazelluläre Kalziumkonzentrationen von Bedeutung für den Transport und die proteolytische Spaltung des Proteins sind (Philip, Flower, and Buckingham 1998). Vermutet wird außerdem, dass eine ATP-Bindungskassette (ABC-Transporter) an der Sekretion beteiligt ist (Wein et al. 2004).

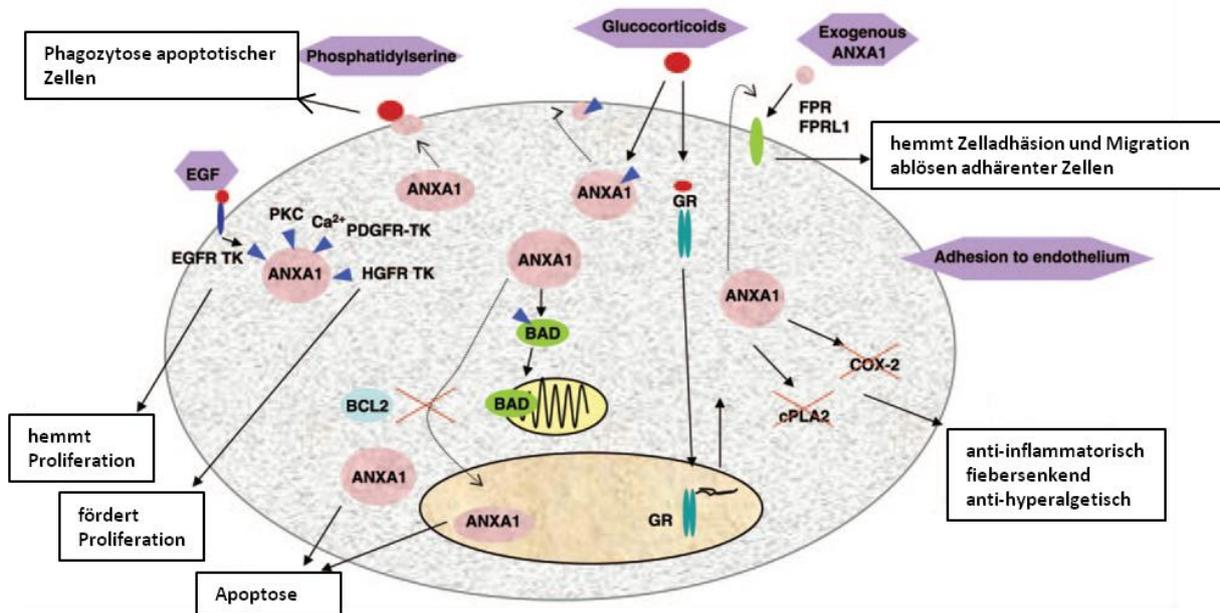
Eine weitere Wirkung des Annexin A1 ist die Freisetzung des anti-inflammatorischen Interleukin-10 (IL-10) und die Hemmung der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) unter anderem von Makrophagen. Der erhöhte Spiegel an IL-10 vermag zudem die Aktivität des pro-inflammatorischen IL-12 zu drosseln (Ferlazzo et al. 2003).

Annexin A1 hat außerdem pro-apoptotische Effekte auf inflammatorische Zellen. Die Transfektion von Annexin A1 in Monozyten stimulierte die durch TNF- $\alpha$  induzierte Apoptose durch eine Erhöhung der Caspase-3-Spiegel oder der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Spiegel (Solito et al. 2001). Annexin A1 ist als Ligand des Phosphatidylserins, einem *Eat-Me* Signal apoptotischer Zellen, aktiv an der Rückbildung von Entzündungen und dem Abräumen der apoptotischer Zellen beteiligt (Arur et al. 2003).

Alle oben genannten Effekte ergeben zusammengenommen eine sehr potente anti-inflammatorische Wirkung des Annexin A1. Annexin A1 gilt daher als endogener anti-inflammatorischer Mediator. Die anti-inflammatorischen Effekte konnten neben dem *full-length* Annexin A1 auch mit dem kurzen pharmakologisch-aktiven Annexin A1 N-terminalen Peptiden, allen voran Ac2-26, gezeit werden.

Andere Arbeiten zeigen, dass Annexin A1 eine bedeutsame Rolle für die Proliferation bestimmter Zellen spielt. Dabei soll es die Proliferation von Monozyten und Tumorzellen maßgeblich reduzieren. Diese proliferations-hemmende Wirkung scheint durch eine Annexin A1 abhängige Aktivierung der MAP-Kinasen und der *extracellular signal regulated* Kinase (ERK) induziert zu sein (Alldridge et al. 1999). Dies kann Folge der EGF-Rezeptor abhängigen Phosphorylierung des Annexin A1 sein.

Alle genannten Funktionen des Annexin A1 werden in der Abbildung 7 graphisch am Beispiel eines Leukozyten dargestellt.



**Abbildung 7:** Schematische Darstellung der vielfältigen Funktionen von intra- und extrazellulärem Annexin A1, veränderte Darstellung nach Lim und Pervaiz (2007)

Glukokortikoide induzieren eine Stimulation der Annexin A1-Synthese oder seine Phosphorylierung. Die blauen Pfeile stellen jeweils die Phosphorylierung dar. Annexin A1 hemmt seinerseits die Expression von COX2 und cPLA, wodurch anti-inflammatorische, fiebersenkende und anti-hyperalgetische Effekte ausgelöst werden. Oder Annexin A1 wird sekretiert und bindet an die Formyl-Peptid-Rezeptoren und hemmt dadurch die Leukozytenadhäsion und deren Migration. Phosphorylierungen durch verschiedene Kinasen sind je nach Ort der Phosphorylierung förderlich oder hemmend auf die Leukozytenproliferation. Über die Bindung an Phosphatidylserin ist Annexin A1 ein Eat-Me Signal apoptotischer Zellen.

### 1.7.2 Annexin A1 Rezeptoren – die Formyl-Peptid-Rezeptor Familie

Schon 1990 wurde von Goulding et al. postuliert, dass es spezifische Rezeptoren für Annexin A1 auf der Zelloberfläche von Leukozyten gibt, die durch einen monoklonalen anti-Annexin A1 Antikörper blockiert werden können (Goulding, Luying, und Guyre 1990). Die Annexin A1-Rezeptoren wurden von Walther et al. identifiziert, indem sie die Inhibition der Chemotaxis der neutrophilen Granulozyten genauer untersuchten. Dabei wurden neutrophile Granulozyten mit Annexin A1 oder seinen bioaktiven N-terminalen Peptiden sowie weiteren Faktoren, welche die Neutrophilen Aktivität beeinflussen, behandelt. Neben Annexin A1 und

Ac2-26 hat N-formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin (fMLP) anti-migratorische Effekte auf die neutrophilen Granulozyten ausgelöst. fMLP ist ein chemotaktisches Peptid, das eine pro-inflammatorische Rolle spielt, da es durch Degradation bakterieller Proteine oder bei Gewebsschäden durch mitochondriale Proteine freigesetzt wird. Eine zusätzliche Behandlung mit den fMLP Antagonisten N-butoxycarbonyl-Met-Leu-Phe (Boc<sub>1</sub>) und N-butyloxycarbonyl-Phe-Leu-Phe-Leu-Phe (Boc<sub>2</sub>) hob die anti-migratorische Wirkung des Annexin A1 und seiner Peptide auf (Walther, Riehemann, und Gerke 2000). Somit wurde der Formyl-Peptid-Rezeptor (FPR) als potentieller Annexin A1-Rezeptor identifiziert.

Die Formyl-Peptid-Rezeptoren sind G<sub>i</sub>-Protein gekoppelt und verfügen über sieben Transmembrandomänen. Durch die Bindung von FPR-Agonisten wird das Transmembranprotein CD38, die zyklische ADP-Ribose-Hydrolase, direkt aktiviert. Diese regeneriert aus NAD<sup>+</sup> ADP-Ribose, welches direkt zur Freisetzung von intrazellulärem Ca<sup>2+</sup> führt. Des Weiteren stimulieren die G-Protein-Untereinheiten Phospholipase C (PLC) und Phosphatidylinositoltriphosphat Kinase (PIP3K). Durch die PIP3K wird die Signalkaskade über die MAP-Kinasen, p38-MAPK und ERK, induziert. PLC führt über Phosphatidolinositoldiphosphat (PIP2) einerseits zur Aktivierung der Protein Kinase C (PKC) und andererseits zu Freisetzung von intrazellulärem Ca<sup>2+</sup>. Über diesen Signalweg werden letztendlich die Chemokin-Rezeptoren desensibilisiert (Rane et al. 1997; Le, Murphy, und Wang 2002).

Bei Menschen existieren neben dem FPR zwei weitere Rezeptoren, die dem FPR ähneln: der Formyl-Peptid-Rezeptor *like 1* (FPRL1) und der Formyl-Peptide Rezeptor *like 2* (FPRL2) (Durstin et al. 1994). Bei Nagern gibt es weit mehr Mitglieder der FPR-Superfamilie. Bei Mäusen sind derzeit neun verschiedene Rezeptoren bekannt: Fpr1, Fpr-rs1, Fpr-rs-2, Fpr-s3, Fpr-rs4, Fpr-rs5, Fpr-rs6, Fpr-rs7, Fpr-rs8 (Gao et al. 1998; John et al. 2007; Dufton und Perretti 2010). Hinsichtlich ihrer Nomenklatur werden FPRL1 und FPR2 sowie FPRL2 und FPR3 synonym verwendet. Auch die Nomenklatur der murinen FPR kann, wie in der unten stehenden Tabelle erläutert, abweichend sein.

Der humane FPR sowie sein murines Homolog Fpr1 können durch eine Vielzahl an endogenen aber auch synthetischen Agonisten aktiviert werden. Zu den Agonisten zählt neben den N-Formyl Peptiden und Annexin A1 auch Cathepsin G. Als synthetische Agonisten können fMLP und das Annexin A1 Peptid Ac2-26 eingesetzt werden. Eine spezifische Hemmung erfolgt beispielsweise durch Cyclosporin H (CsH). Der FPR wurde bereits auf Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten in der Milz, der Lunge und der Leber nachgewiesen.

Im Unterschied zum FPR aktiviert zusätzlich auch anti-inflammatorisches Lipoxin A4 den FPRL1 und sein murines Analog Fpr-rs2. Eine antagonistische Wirkung hat neben den Boc-

Derivat ein Peptid Trp-Arg-(Trp)<sub>4</sub> (WRW<sub>4</sub>). Auch dieser Rezeptor konnte in Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten von Milz, Lunge, Leber und Herzen lokalisiert werden.

Der FPRL2 und der murine Fpr-rs1 konnten bisher nicht auf neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden, jedoch findet sich der Rezeptor auf reifen dendritischen Zellen, Makrophagen und Monozyten in Milz, Lunge und Leber. Auch dieser Rezeptor wird durch fMLP und Annexin A1 Peptid Ac2-26 stimuliert und durch das WRW<sub>4</sub> Peptid gehemmt (Ye et al. 2009; Dufton und Perretti 2010). Die oben genannten Eigenschaften der humanen und murinen Formyl-Peptid-Rezeptoren werden in Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tabelle 1:** Übersicht über die Formyl-Peptid-Rezeptoren.

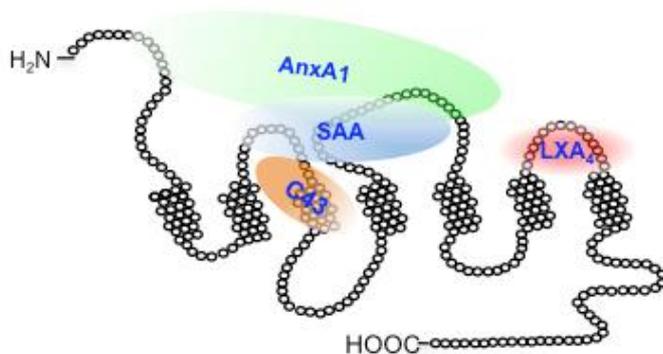
Ihre Nomenklatur, Agonisten und Antagonisten sowie deren Vorkommen im Organismus, eigene Darstellung nach Ye (2009) und Dufton und Perretti (2010)

Human	Maus	Agonist	Antagonist	Zellen	Gewebe
FPR = FPR1	Fpr1	fMLP Anxa1 Ac2-26	Boc1/Boc2 CyH	Neutrophile Granulozyten Monozyten Makrophagen undifferenzierte Dendritische Zellen	Milz Lunge Leber
FPRL1 =FPRL2	Fpr-rs2 =Fpr2	fMLP Anxa1 Ac2-26 LXA4	Boc1/Boc2 WRW4	Neutrophile Granulozyten Monozyten Makrophagen	Milz Lunge Leber Herz
FPRL2 =FPRL3	Fpr-rs1 =Fpr3	fMLP Ac2-26	WRW4	Monozyten Makrophagen Dendritische Zellen	Milz Lunge Leber
	Fpr-rs3				
	Fpr-rs4				
keine humanen Äquivalente	Fpr-rs5				
	Fpr-rs6				
	Fpr-rs7				
	Fpr-rs8				

Durch die Identifikation der Formyl-Peptid-Rezeptoren als Rezeptoren von Annexin A1 kam die Frage auf, wie genau diese Rezeptoren des unspezifischen Immunsystems anti-inflammatorische Effekte vermitteln können. Da die Formyl-Peptid-Rezeptoren eine Vielzahl pro- und anti-inflammatorischer Liganden binden, wurde von Bena et al. (2012) der Versuch unternommen die Rezeptordomänen der Annexin A1-abhängigen Rezeptoraktivierung von FPR und FPRL1 zu untersuchen. So wurde festgestellt, dass unterschiedliche Liganden auch unterschiedliche Rezeptorbereiche aktivieren und sich dadurch auch die intrazellulären Signalkaskaden unterscheiden können. Es konnte gezeigt werden, dass die extrazellulären Schleifen 1 und 2 des FPRL1 für die ERK-Phosphorylierung und die intrazellulären Ca<sup>2+</sup> Ströme verantwortlich sind. Annexin A1 interagiert mit dem N-Terminus und der 2. extrazellulären Schleife (Bena et al. 2012). In der nachfolgenden Abbildung werden die

unterschiedlichen Bindungsdomänen der FPRL1 Agonisten Annexin A1(AnxA1), Lipoxin A<sub>4</sub> (LXA<sub>4</sub>), Serum Amyloid A (SAA) und des kleinen Molekül *compound* 43 (C43) dargestellt. Vermutet wird, dass die extrazellulären Schleifen 1 und 3 an der Bindung des pro-inflammatorischen fMLP beteiligt sind (Quehenberger et al. 1993; Radel, Genco, und De Nardin 1994).

Durch die Hinweise von Bena et al. (2012) auf eine Anbindung unterschiedlicher Liganden an unterschiedlichen Rezeptordomänen kann der Widerspruch aufgelöst werden, dass die Formyl-Peptid-Rezeptoren als Rezeptoren der unspezifischen Immunabwehr pro-inflammatorische bakterielle Peptide binden aber auch die anti-inflammatorischen Effekte des Annexin A1 und seinen N-terminalen Peptiden vermittelt. Die unterschiedlichen Rezeptorbindungsdomänen des FPRL1 sind in Abbildung 8 dargestellt.



**Abbildung 8:** Spezifische Ligandenbindungsstellen des FPRL1, Darstellung nach Bena et al. (2012)

### 1.7.3 Lokalisation von Annexin A1 in der Niere

McKanna et al. haben 1992 die Lokalisation von Annexin A1 mittels Immunhistochemie an Rattennieren beschrieben. Sie haben herausgefunden, dass Annexin A1 im Kortex vor allem von den Glomeruli und der Macula densa exprimiert wird. Der dicke aufsteigende Schenkel zeigte nur eine geringe Immunreaktivität. In der Medulla waren nur die medullären Sammelrohre stark positiv für Annexin A1. Im Glomerulus selbst zeigten sich nur die Zellen des viszeralen und parietalen Blattes der Bowmann'schen Kapsel und die Podozyten Annexin A1-immunreaktiv (McKanna et al. 1992). Innerhalb der Zellen lokalisiert Annexin A1 im Zytoplasma und im Nukleus. Obwohl die immunhistochemischen Färbungen des Annexin A1 in dieser Publikation auch interstitielle Signale zeigen, wurden diese bisher nicht beschrieben und charakterisiert.

### 1.7.4 Annexin A1 in Fibroblasten und bei Fibrose

Annexin A1 wurde in einer Vielzahl von Fibroblasten unterschiedlichster Gewebe nachgewiesen unter anderem im Zytoplasma von humanen Vorhautfibroblasten (Barwise und Walker 1995), in Lungenfibroblasten von Ratten (Ts'ao et al. 1997), humanen

Hautfibroblasten von Patienten mit systemischer Sklerose (Hsu, Lee, und Tsay 1997) und in Fibroblasten der Adventitia großer Gefäße (Guo et al. 2010).

Derzeitige Forschungsansätze bezüglich der Funktionen des Annexin A1 in Fibroblasten beschäftigen sich vor allem mit Lungenfibroblasten während der Lungenfibrose (Yang et al. 2006; Jia et al. 2012). Bizzaro et al. arbeiten an der Annexin A1-abhängigen Migration von humanen Hautfibroblasten unter Hochglukose-Bedingungen (Bizzarro et al. 2012). Andere Arbeitsgruppen stellen fest, dass Annexin A1 eine fundamentale Rolle in der Aktivität von Fibroblasten spielt. Die durch TNF- $\alpha$  induzierte Proliferation der Fibroblasten ist maßgeblich von der Höhe der Annexin A1-Expression abhängig (Jia et al. 2012). Die sich schneller teilenden adventitiellen Fibroblasten der spontan hypertensiven Ratten (SHR) weisen eine signifikant niedrigere Annexin A1-Expression auf als die Fibroblasten von Wistar Kyoto Kontroll-Ratten (Guo et al. 2010).

Arbeiten von Araujo et al. geben Hinweise darauf, dass Annexin A1 eine potentiell renoprotektive Wirkung hat. Die Gabe der Immunsuppressiva Cyclosporin A oder Tacrolimus hat bei Transplantationspatienten oft nephrotoxische Folgen. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass eine Gabe von Annexin A1 die Folgen der Nierenschädigung, insbesondere die Infiltration von Makrophagen signifikant verringern kann (Araujo et al. 2010; Araujo et al. 2012). Die Arbeitsgruppe von Damazo et al. deutet eine potentiell anti-fibrotische und anti-inflammatorische Wirkung des Annexin A1 an. Bei einer durch Bleomycin-induzierten Lungenfibrose zeigen Annexin A1 *-/-* Mäuse einen schwerwiegenden Verlauf und sterben verglichen mit Kontrollmäusen früher. Die *Knock-out* Mäuse zeigen erhöhte TGF- $\beta$  Spiegel und eine vermehrte Fibrosierung des Lungengewebes im Vergleich zu den Kontrollen. Die Gabe des bioaktiven Annexin A1 Peptids Ac2-26 kann die Fibrose deutlich reduzieren und die Überlebenschance der Tiere steigern (Damazo et al. 2011).

Aktuell liegen keine Forschungsergebnisse bezüglich der Funktion des Annexin A1 in Nierenfibroblasten oder seiner Rolle in der chronischen Nierenerkrankung vor.

## 2 Zielsetzung

Die chronische Niereninsuffizienz ist mit beträchtlicher Morbidität und Mortalität assoziiert und stellt die Hauptursache der Entwicklung eines terminalen Nierenversagens dar. Eine Gemeinsamkeit der chronischen Nierenerkrankungen verschiedenster Genese ist das parallele Auftreten einer chronischen Inflammation und fibrotischer Gewebsveränderungen. Derzeit sind die Mechanismen, die der Entstehung und Progredienz von Entzündungen und Fibrose bei chronischen Nierenerkrankungen zugrunde liegen, kaum verstanden. Fibroblasten sind als der zentrale Zelltypus in der Pathogenese des chronischen Nierenversagens zu betrachten. Sie sind verantwortlich für die Synthese von Extrazellulärmatrix und Kollagen und sezernieren pro-inflammatorische Zytokine. Es bestehen Hinweise darauf, dass das kalzium- und phospholipidbindende Protein Annexin A1 die Fibroblastenaktivität beeinflusst (Jia et al. 2012) und bei fibrotischen Erkrankungen eine Rolle spielen könnte (Damazo et al. 2011).

Aus diesen Rahmenbedingungen leiten sich die dieser Arbeit zugrunde liegenden Hypothesen ab:

- 1) Annexin A1 und sein Rezeptor FPR2 werden im renalen Interstitium exprimiert und entfalten parakrine Wirkung
- 2) Die Expression von Annexin A1 ist bei chronischem Nierenversagen stimuliert
- 3) Annexin A1 beeinflusst den Phänotyp der Fibroblasten
- 4) Dieser Effekt auf renale interstitielle Fibroblasten ist FPR2 vermittelt

Aus diesen Arbeitshypothesen ergibt sich das Hauptziel der vorliegenden Arbeit, die Expression und funktionelle Rolle des Annexin A1 im chronischen Nierenversagen zu charakterisieren. In dieser Arbeit wird vorrangig der Frage nachgegangen werden, welche interstitiellen Zellen Annexin A1 exprimieren. Zunächst soll die Annexin A1- und FPR2-Expression im renalen Interstitium besonders in interstitiellen Fibroblasten *in vivo* und *in vitro* untersucht werden. Anschließend wird analysiert, ob Annexin A1 unter pro-fibrotischen Konditionen reguliert ist. Abschließend soll die Bedeutung der Regulation von Annexin A1 unter pro-fibrotischen Bedingungen für Phänotyp der Fibroblasten identifiziert werden.

Ein etabliertes Tiermodell für chronisches Nierenversagen wird eingesetzt, um die interstitielle Lokalisation von Annexin A1 und seinem Rezeptor FPR2 im chronischen Nierenversagen zu untersuchen. Die Annexin A1-Expression wird mittels semiquantitativer Immunhistochemie analysiert. Eine Identifizierung der Annexin A1- und FPR2-exprimierenden Zellen soll durch Doppelimmunfluoreszenzfärbungen erfolgen. Histologische Färbungen sollen Aufschluss über die Intensität und die Lokalisation der fibrotischen

Veränderungen bei Ratten mit chronischem Nierenversagen geben. Des Weiteren wird die Annexin A1-Expression auch auf RNA-Ebene untersucht. Die Etablierung von kortikalen Nierenfibroblastenlinien aus Annexin A1-defizienten Mäusen und Kontrolltieren soll dazu dienen die Annexin A1-Regulation unter pro-fibrotischen Konditionen zu analysieren. Die durch eine Behandlung mit pro-fibrotischem TGF- $\beta$  ausgelösten Veränderungen der Annexin A1-,  $\alpha$ -sma- und Kollagen-Expression werden an Zellkulturfibroblasten untersucht.

Mit der vorliegenden Arbeit soll die Expression von Annexin A1 und FPR2 in der Niere charakterisiert werden. Genauer sollen die Effekte des Annexin A1/FPR2 Systems an interstitiellen Fibroblasten analysiert werden. Damit soll diese Arbeit einen ersten Beitrag in Bezug auf die Wirksamkeit von Annexin A1 im renalen Interstitium bei chronischem Nierenversagen darstellen. Es soll ein potentieller Fibroblasten-spezifischer pharmakologischer Ansatzpunkt zur Therapie des chronischen Nierenversagens sowie Nierenfibrose identifiziert werden.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### *Verbrauchsmaterial*

Die in dieser Arbeit eingesetzten Verbrauchsmaterialien werden in Tabelle 2 aufgeführt.

**Tabelle 2:** Auflistung des Verbrauchsmaterials

Material	Bezeichnung/Firma	Ort
cell strainer	40 µm Nylon, Becton Dickson Labware	New Jersey, USA
	12 mm, Marienfeld GmbH & Co KG	Lauda Königshofen, Deutschland
Deckgläser Zellkultur		
Eppendorf Reaktionsgefäße	0,5 ml/1,5 ml/2 ml, Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Falcon Gefäße	15 ml/50 ml, Falcon Becton Dickson Labware	New Jersey, USA
Folie für qPCR Platten	MicroAmp® optical adhesive film, Applied Biosystems	Darmstadt, Deutschland
Kryogefäße	2ml, Simport	Beloelil, Kanada
Nitrocellulose-membran	porablot NCP, 0,4 5µm MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG,	Düren, Deutschland
Objektträger	Super Frost®Plus, R. Langenbrinck GmbH	Emmendingen, Deutschland
PCR Tubes	Kisker Biotech	Steinfurt, Deutschland
Phase lock tubes	2 ml, 5 PRIME	Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	10 µl/200 µl/100 µl, Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
qPCR 96Well-Platten	MicroAmp® Fast optical 96Well Plate, Applied Biosystems	Darmstadt, Deutschland
radiographischer Film	Fujifilm Medical X-Ray Film, FUJIFILM Europe GmbH,	Düsseldorf, Deutschland
Schlitznetze	Plano	Marburg, Deutschland
Sterilfilter	Minisart® 0,2 µm, Sartorius	Göttingen, Deutschland
Whatman-Papier	Gel Blotting Paper, Whatman GmbH	Dassel, Deutschland
Zellkultur 12 Well	Cellstar, greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
Zellkultur 6Well	Falcon Becton Dickson Labware	New Jersey, USA
Zellkultur Flasche 75 cm <sup>2</sup>	Falcon Becton Dickson Labware	New Jersey, USA
Zellkultur Petrischalen	22 mm, Falcon Becton Dickson Labware	New Jersey, USA
Zellkulturflasche 25 cm <sup>2</sup>	greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
Zellschaber	greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland

### Chemikalien/Reagenzien

Die in dieser Arbeit eingesetzten Chemikalien und Reagenzien werden in Tabelle 3 aufgeführt.

**Tabelle 3:** Liste aller Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien	Bezeichnung/Firma	Ort
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie	Taufkirchen, Deutschland
2-Methylbutan	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
2-Propanol	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Acrylamidgel Rotiphorese® Gel	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
APS Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Bacto Agar	Becton Dickson	New Jersey, USA
Bacto Hefe	Becton Dickson	New Jersey, USA
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Bleicitrat	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Bromphenol Blau	SERVA GmbH	Heidelberg, Deutschland
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie	Taufkirchen, Deutschland
Chloraldehyd	Fluka, Sigma Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Chloroform	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
complete, proteinase inhibitor cocktail tablets	Roche Diagnostics Deutschland GmbH	Mannheim, Deutschland
DAB (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride)	Kem-En-Tec Diagnostics	Conneticut, USA
DAPI (4,6-Diamino-2-Phenylindol)	Sigma-Aldrich Chemie	Schnelldorf, Deutschland
Direct Red 80	Sigma-Aldrich Chemie	Taufkirchen, Deutschland
dNTP	Bioline GmbH	Luckenwalde, Deutschland
DTT (Dithiothreitol)	Biomol	Hamburg, Deutschland
ECL-Lösung	Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagents RPN 2209 GE Healthcare GmbH	München, Deutschland
Eisessig 100%	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Eosin	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Epon	Fluka, Sigma Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Ethanol absolut	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Eukitt	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland

## Material und Methoden

Formvar	Sigma Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
GelRed™ Nucleic Acid Stain	VWR International GmbH	Darmstadt, Deutschland
Gene Ruler™ DNA Ladder	Mix 0,5µg/µl #SM0331, Fermentas GmbH	St. Leon-Rot, Deutschland
Glutaraldehyd	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Glycerol Rotipuran®	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Glycin Pufferan®	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Hämatoxilin	Fluka, Sigma Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
HCl 37% rauchend	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Heparin	ratiopharm	Ulm, Deutschland
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich Chemie	Taufkirchen, Deutschland
Isofluoren	Carl Roth GmbH & Co. KG	Wiesbaden, Deutschland
Kalilaun	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdisulfit	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Kanamycin	ratiopharm	Ulm, Deutschland
Magermilchpulver	Difco TM Skim Milk, Becton Dickson	New Jersey, USA
Methanol	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Natriumjodat	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Natriumzitrat (tri-Natriumcitrat-Dihydrat)	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Nembutal (Pentobarbital Natrium)	Fagron	Barsbüttel, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	PAN-Biotech GmbH	Aidenbach, Deutschland
Perjodsäure	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Picrinsäure gesättigt	Sigma-Aldrich Chemie	Taufkirchen, Deutschland
Ponceau S	Sigma-Aldrich Chemie	Taufkirchen, Deutschland
Procain HCl	Fluka, Sigma Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Pryoppylenoxid	Fluka, Sigma Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Proteinmarker	Precision Plus Protein™ Standards, Dual Colour #161-0374, Bio-Rad Laboratories GmbH	München, Deutschland

Schiffsches Reagenz	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
SDS (Natriumlaurylsulfat)	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Sukrose	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Temed (N'N'N'N' tetramethylethylenediamine)	Bio-Rad Laboratories GmbH	München, Deutschland
Tris Base (Tris(hydroxymethyl)aminomet hane)	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Tris Hcl (Tris(hydroxymethyl)aminomet hanhydrochlorid)	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Triton® X-100	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Trizol peqGOLD TriFast™	PEQLAB Biotechnologie GmbH	Erlangen, Deutschland
Tween® 20	SERVA GmbH	Heidelberg, Deutschland
Uranylacetat	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Xylol	J.T. Baker	Griesheim, Deutschland
Zitronensäure	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland

### **Enzyme und Puffer**

Die in dieser Arbeit eingesetzten Enzyme und Puffer werden in Tabelle 4 aufgeführt.

**Tabelle 4:** Auflistung aller Enzyme und dazugehöriger Puffer

Enzyme/Puffer	Bezeichnung/Firma	Ort
10x NH <sub>4</sub> Reaction Buffer (Invitek)	Invitek, Stratec	Berlin, Deutschland
10x NH <sub>4</sub> Reaction Buffer (Phusion)	Finnzymes	Vantaa, Finnland
10x Tangopuffer	Fermentas GmbH	St. Leon-Rot, Deutschland
5x Reaction Buffer BioScript	Bioline GmbH	Luckenwalde, Deutschland
BamHI	Fermentas GmbH	St. Leon-Rot, Deutschland
BioScript	Bioline GmbH	Luckenwalde, Deutschland
Collagenase IV	Sigma-Aldrich Chemie	Taufkirchen, Deutschland
EcoRI	Fermentas GmbH	St. Leon-Rot, Deutschland
HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX)	Solis BioDyne	Tartu, Estland
InviTek Taq DNA Polymerase	Invitek, Stratec	Berlin, Deutschland
Phusion® F530S DNA Pol	Finnzymes	Vantaa, Finnland
RiboLock Rnase Inhibitor	Thermo Scientific	Schwerte, Deutschland
T4 Ligase	New Endland Biolabs	Frankfurt am Main, Deutschland
T4 Ligase Puffer	New Endland Biolabs	Frankfurt am Main, Deutschland

### Reagenzien der Zellkultur

Die in dieser Arbeit eingesetzten Reagenzien der Zellkultur werden in Tabelle 5 aufgeführt.

**Tabelle 5:** Liste der Reagenzien der Zellkultur

Reagenzien	Bezeichnung/Firma	Ort
Ac 2-26	Tocris	Bristol, UK
Aminosilan	Sigma-Aldrich Chemie	Taufkirchen, Deutschland
Cyclosporin H	ENZO Life Science	Lörrach, Deutschland
DMEM	PAN-Biotech GmbH	Aidenbach, Deutschland
DMSO Dimethylsulphoxide	Sigma-Aldrich Chemie	Taufkirchen, Deutschland
Dulbecco's PBS (1x) ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	PAA Laboratories GmbH	Cölbe, Deutschland
EDTA	SERVA GmbH	Heidelberg, Deutschland
FKS fetal bovine serum	PAN-Biotech GmbH	Aidenbach, Deutschland
G418 Sulfat	Calbiochem	Bad Soden, Deutschland
N-Formyl-Met-Leu-Phe fMLP	Sigma-Aldrich Chemie	Taufkirchen, Deutschland
TGF β1	Promokine	Heidelberg, Deutschland
Trypsin 2,5% 10x	Gibco, Invitrogen, Life Technologies	Darmstadt, Deutschland
WRW4	Anaspec	Fremont, USA

### 3.1.5 Kits

Die in dieser Arbeit eingesetzten Kits werden in Tabelle 6 aufgeführt.

**Tabelle 6:** Liste der angewendeten Kits

Anwendung	Name	Hersteller	Ort
Plasmidpräparation - Mini	Invisorb® spin Plasmid Mini Two	strattec molecular	Berlin, Deutschland
Plasmidpräparation - Maxi	Nucleobond® AX 100	Machery Nagel	Düren, Deutschland
Agarosegelextraktion	Invisorb® spin DNA Extraction Kit	strattec molecular	Berlin, Deutschland
BCA	Micro BCA™ Protein Assay Kit	Thermo scientific	Henningsdorf, Deutschland

### Geräte

Die in dieser Arbeit eingesetzten Geräte werden in Tabelle 7 aufgeführt.

**Tabelle 7:** Eingesetzte Geräte

Gerät	Bezeichnung/Firma	Ort
Brutschrank Zellkultur	Hera Cell 150, Heraeus	Hanau, Deutschland
Cryo Safe™ Cooler	Bel-Art	Wayne, USA
Cryomikrotom	Leika CM 3050S, Leika	Wetzlar, Deutschland
Elektronenmikroskop	EM 900, Carl Zeiss	Jena, Deutschland
Elektrophoresegerät (Agarose-Gel)	Pharmacia LKB GPS 200/400, Amersham Pharmacia	Freiburg, Deutschland
Elektrophoresegerät (SDS Gel)	EPS 600, Pharmacia Biotech, Amersham Pharmacia	Freiburg, Deutschland

Elektrophoresegerät (SDS Gel)	Bio-Rad Power Pac 2.1, Bio-Rad Laboratories GmbH,	München, Deutschland
Elektrophoresekammer	Mini Protean® Tetra Cell 30W, Bio-Rad Laboratories GmbH,	München, Deutschland
Filmentwickler	Agfa Curix 60, PMA Bode	Hamburg, Deutschland
Gefrierschrank -20°C	Philipp Kirsch GmbH	Offenburg, Deutschland
Gefrierschrank -85°C	Nuaire, Zapf Instrument	Sarstedt, Deutschland
Geldokumentationseinheit	Alphamager® EC, Biozym	Hessisch Odendorf, Deutschland
Gelkammer	AgageITM Standard, Biometra GmbH	Göttingen, Deutschland
Glasplatten	Bio-Rad Laboratories GmbH	München, Deutschland
Heizblock	Thermomixer comfort Eppendorf 1,5 ml 90 W Eppendorf AG,	Hamburg, Deutschland
Kühlschrank 4°C	Philipp Kirsch GmbH	Offenburg, Deutschland
Lichtmikroskop	Leika DMRB	Wetzlar, Deutschland
LSM 5 Exiter	Carl Zeiss MicroImaging GmbH	Jena, Deutschland
Mikroskop Zellkultur	Leika DMIL, Leika	Wetzlar, Deutschland
NanoPhotometer	Implen GmbH	München, Deutschland
Paraffinmikrotom	Leika RM2125RT, Leika	Wetzlar, Deutschland
PCR Cycler	Primus 96 plus, MWG Biotech AG	Ebersberg, Deutschland
pH-Meter	Knick 766 Calimatic, Knick	Berlin, Deutschland
Real-time Cycler	7900 Fast, Applied Biosystems	Darmstadt, Deutschland
SDS-Gelgießvorrichtung	Bio-Rad Laboratories GmbH	München, Deutschland
Semi-dry Blotter	Transblot® SD Cell 50W, Bio-Rad Laboratories GmbH,	München, Deutschland
steriler Arbeitsplatz Zellkultur	Hera Safe HS 12/2, Heraeus	Hanau, Deutschland
Streckbad	Gesellschaft für Labortechnik 1052	Burgwedel, Deutschland
Tischzentrifuge	Micro 200R Typ 2405, Hettich Zentrifugen	Tuttlingen, Deutschland
Ultracut-Mikrotom	Reichert-Jung, Leika	Wetzlar, Deutschland
Ultramikrotom	LKB Ultratom 8800	Bromma, Schweden
Ultraschall	MS72	Wetzlar, Deutschland
Waage	BP210S, Sartorius	Göttingen, Deutschland
Wasserbad Zellkultur	Typ 1083, Gesellschaft für Labortechnik	Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge Zellkultur	Function Line 400e, Heraeus	Hanau, Deutschland
Kamera Lichtmikroskop	Axio Cam McR, Zeiss	Jena, Deutschland
EIPorator 1000	Thorsten Stoh, Charité	Berlin, Deutschland
Epson Scanner	Epson Perfection 4990, Photo	Meerbusch, Deutschland

## Software

Die in dieser Arbeit eingesetzte Software wird in Tabelle 8 aufgeführt.

**Tabelle 8:** Aufstellung der benutzten Software

Anwendung	Name	Hersteller
Auswertung von qPCR	Sequence Detection Systems SDS 2.1	Applied Biosystems
Auswertung von Sequenzierungen	Chromas 2.1	Technelysium Pty Ltd
Auswertung von Sequenzierungen	BLAST	NCBI
Bildanalyse Software	AxioVision	Carl Zeiss
Dichtedensitometrie von Western Blots	Alphamager	Biozym
Geldokumentation	Alphamager	Biozym
Konfokalmikroskopie	Zen Version 8	Zeiss
Primerdesign	Primer-Blast	NCBI

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Tierexperimentelle Arbeiten**

#### **3.2.1.1 Mit ARA behandelte Ratten**

Die Behandlung der Ratten wurde im Institut für Physiologie der Universität Murcia, Spanien, von Mitarbeitern von J. Salazar durchgeführt. Die Perfusionsfixierung wurde von A. Paliege (Institut für vegetative Anatomie, Charité Berlin) durchgeführt.

Sprague-Dawley Ratten des Animal Research Laboratory der Universität Murcia wurden miteinander verpaart. Den neugeborenen Ratten wurde vom Tag der Geburt an 14 Tage Vehikel (isotone Kochsalzlösung) oder L-158.809 Merck (7 mg/kg Körpergewicht KG), ein Angiotensin II-Rezeptor Typ I-Antagonist (ARA), oral verabreicht. Nach elf Monaten wurden die Tiere getötet. Die Nieren wurden entweder für biochemische Untersuchung entnommen, entkapselt, schockgefroren und bei -80°C gelagert oder sie wurden im narkotisierten Tier durch eine Aorta abdominalis Perfusion für immunhistologische Analysen fixiert. Aufgrund eines potentiellen Sexdimorphismus wurden nur die männlichen Tiere untersucht. Für die morphologischen immunhistochemischen Untersuchungen wurden je vier Tiere pro Gruppe untersucht. Für die biochemischen Versuche lag die Anzahl der Tiere je Gruppe bei n=6.

#### **3.2.1.2 Annexin A1-defiziente Mäuse**

Die Anxa1-defiziente Mauslinie wurde ursprünglich von der Arbeitsgruppe um R. Flower (Hannon et al. 2003) generiert und zur Verfügung gestellt. Diese Mauslinie wurde in einer lokalen Zucht von A. Paliege an der Versuchstiereinrichtung der Charité (FEM) gehalten. Die Versuchstierhaltung erfolgte gemäß der Richtlinien des Landesamtes für Gesundheit und Soziales (LAGeSo, Berlin), wobei die Versuchstiere mit freiem Zugang zu Wasser und einer Standarddiät in geschlossenen, klimatisierten Räumen mit einem 12 Stunden Tag-Nachtrhythmus gehalten wurden. Die Tiere wurden auf der Tötungsanzeige T0234/11 gemeldet.

Der genetische Hintergrund der Anxa1-defizienten Tiere ist C57Bl/6. Nach erfolgreicher Genotypisierung per Endpunkt PCR wurde je ein *Knock-out* Tier und ein Wildtyp zur Gewinnung primärer Zellen durch zervikale Dislokation getötet. Die Nieren wurden im Anschluss direkt entfernt und weiter verarbeitet.

### **3.2.2 Aorta abdominalis Perfusion**

Für eine gute morphologische Darstellung des Nierengewebes wurden die Versuchstiere einer Aorta abdominalis Perfusion unterzogen. Zunächst wurden die Versuchstiere mit Isofluran narkotisiert und erhielten intraperitoneal das Anästhetikum Nembutal (0,06 mg/g KG). Nach dem Eröffnen des Bauchraumes wurde die Aorta abdominalis freipräpariert und

abgeklemmt, woraufhin diese distal der Arteriae renales eröffnet wurde. Ein ausgezogener Schlauch gefüllt mit einer Heparin-haltigen Schlauchlösung wurde in das Gefäß eingeführt und mit Hilfe eines Fadens fixiert. Dieser Schlauch war mit dem Perfusionssystem verbunden, was einen konstanten Druck ermöglichte (2,3 m Wassersäule). Durch das Eröffnen der Vena cava caudalis und das Öffnen der Aortenklemme begann die Perfusion. Zunächst wurde für ca. 30 s eine Vorspüllösung eingeleitet, um das Blut aus dem Gefäßsystem zu entfernen. Darauf wurde für 5 min mit 3%iger Paraformaldehyd (PFA)/PBS-Lösung fixiert. Die Reagenzien sind in Tabelle 9 aufgeführt.

**Tabelle 9:** Zur Aorta abdominalis eingesetzte Reagenzien und Lösungen

Narkotikum	Isofluran
Anästhetikum	Nembutal (0,06 mg/g KG)
Schlauchlösung	2 ml physiol. NaCl 1 ml ProcainHCl 1% 1 ml CaCl <sub>2</sub> 16% 1 ml Heparin
Vorspüllösung (330mosmol)	23,94 g Sukrose 100 ml 10x PBS A.dest. auf 1 l pH 7,3-7,4
Perfusionslösung (3%PFA/PBS)	15 g PFA 50 ml 10x PBS A.dest. auf 0,5 l

### 3.2.3 Gewebprozessierung

#### 3.2.3.1 Gewebeverarbeitung zur histologischen- und immunhistochemischen Analyse

Perfusionsfixierte Nieren wurden für die Herstellung von Kryogewebe zum Schutz vor Gefrierartefakten über Nacht bei 4°C in einer 800 mosmol Sukroselösung/PBS eingelegt oder für die Paraffineinbettung über Nacht in 300 mosmol Sukrose/PBS/0,02% Natriumazid bei 4°C nachfixiert. Kryogewebe wurde am Folgetag mit 2-Methylbutan in Stickstoff schockgefroren, auf Styroporplättchen fixiert und anschließend bei -80°C gelagert. Das Paraffingewebe wurde in 330 mosmol 0,02% Natriumazid/PBS in Paraffinkassetten bis zur Einbettung gelagert. Gewebe, welches elektronenmikroskopisch untersucht werden sollte, wurde über Nacht bei 4°C in einer Immersionslösung aus Glutaraldehyd (1,5%)/PFA (1,5%)/PBS nachfixiert. Die Einbettung in Epon, ein Routineverfahren in der elektronenmikroskopischen Abteilung des Instituts für vegetative Anatomie (Charité, Berlin), wurde von P. Schrade durchgeführt. Das Gewebe wurde zunächst durch eine aufsteigende Ethanolreihe (50%,70%,90%,96% für je 15 min, 3x100% für je 20 min) entwässert und über Nacht in einer Lösung aus 1:1 Propylenoxid/Epon gelagert. Am Folgetag wurde das Gewebe eingekapselt und mit Epon ausgegossen. Das Epon wurde drei Tage lang bei 60°C ausgehärtet.

### **3.2.3.1.1. Herstellung von Gewebsschnitten**

Kryogewebe wurde von dem Styroporplättchen entfernt und mit Tissue Tek auf einer Halterung fixiert. Mit Hilfe eines Gefriermikrotoms wurden 7 µm dünne Gefrierschnitte des Nierengewebes angefertigt, auf vorbeschichteten Objektträgern fixiert und bei -20°C gelagert. Die Paraffineinbettung des Gewebes erfolgte automatisiert in der Kinderpathologie der Charité Berlin. Das Paraffingewebe wurde vor dem Schneiden für mindestens zwei Stunden bei -20°C gelagert. Mit einem Rotationsmikrotom wurden 4 µm dünne Paraffinschnitte hergestellt, die nach dem Strecken in einem 37°C warmen Bad ebenfalls auf vorbeschichteten Objektträgern fixiert wurden. Aus dem in Epon eingebetteten Gewebe wurden mit einem Ultramikrotom 1 µm dünne Semidünnschnitte angefertigt und auf alkoholgereinigten Objektträgern fixiert. Für elektronenmikroskopische Analysen wurde von in Epon eingebettetem Gewebe mit einem Ultracut-Mikrotom 60 nm dünne Ultradünnschnitte angefertigt.

### **3.2.3.2 Gewebeverarbeitung zur biochemischen Analyse**

Für biochemische Untersuchungen wurde den Tieren nach Tötung durch zervikale Dislokation die Nieren entnommen, entkapselt und schockgefroren. Die Nieren wurden mit Mörser und Pistill in flüssigem Stickstoff fein gemahlen.

## **3.2.4 Histologische Methoden**

### **3.2.4.1. Histologische Färbungen**

In Paraffin eingebettetes Nierengewebe wurde in Xylol entparaffiniert und durch eine absteigende Ethanolreihe (100% bis 70%) rehydratiert.

#### *SFOG Trichrom-Färbung*

Die SFOG Trichrom-Färbung ist eine der Standardfärbungen in der Pathologie, durch die kollagenhaltige Strukturen blau und Proteine rot dargestellt werden. Die SFOG Trichrom-Färbungen wurden in der Pathologie der Charité Berlin angefertigt.

#### *Sirius Rot-Färbung*

Die Sirius Rot-Färbung dient dazu fibrilläres Kollagen anzufärben. Dabei werden kollagenhaltige Strukturen rot angefärbt. Entparaffinierte und rehydratierte Nierenschnitte wurden für eine Stunde in Picro-Sirius Rot Lösung inkubiert. Anschließend wurde zweimalig mit angesäuertem Wasser gewaschen und schließlich dehydratiert und mit Eukit eingedeckelt. In Tabelle 10 sind die zur Sirius Rot-Färbung eingesetzten Lösungen aufgelistet.

**Tabelle 10:** Zur Sirius Rot-Färbung eingesetzte Lösungen

Picro-Sirius Rot Lösung	0,5 g Direct Red 80 500 ml gesättigte wässrige Pikrinsäurelösung (1,3%)
angesäuertes Wasser	5 ml Eisessig 1 l A.dest.

### *Semindünnschnitte*

Semindünnschnitte wurden in Methylenblau-Azur (Protokoll nach Richardson) gefärbt und mit Eukit eingedeckelt.

Alle oben genannten histologischen Färbungen wurden mit dem Mikroskop Leica DMRB mit Interferenzkontrast ausgewertet. Fotos wurden mit der Lichtmikroskop-Kamera Axio Cam (Carl Zeiss) und mit der Axio Vision Software (Carl Zeiss) aufgenommen.

### **3.2.4.2 Elektronenmikroskopie**

Ultradünnschnitte wurden auf mit Formvar vorbeschichtete Schlitznetze aufgezogen und für 15 min mit 5% Uranylacetat kontrastiert. Mit Bleicitrat wurde für 2 min nachkontrastiert. Die Auswertung erfolgte am Elektronenmikroskop Zeiss EM 900.

Alle oben genannten Schritte wurden in der elektronenmikroskopischen Abteilung des Instituts für vegetative Anatomie (Charité, Berlin) von P. Schrade durchgeführt.

### **3.2.5 Proteinbiochemische Methoden**

#### **3.2.5.1 Verwendete Antikörper**

Alle für immunhistochemischen Färbungen oder Western Blotting eingesetzten Antikörperkonzentrationen wurden austitriert und hinsichtlich ihrer Spezifität validiert. In Tabelle 11 sind die in dieser Arbeit eingesetzten Primärantikörper aufgeführt.

**Tabelle 11:** Liste der eingesetzten Primärantikörper

<b>Antigen</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Nummer</b>	<b>Western Blotting</b>	<b>Immun-histochemie</b>
Annexin1	Kaninchen	Lifespan Bioscience	LS-C20640	1:1000	1:1000
Annexin1	Maus	BD Bioscience	610067	1:500	
CD68 (ED1)	Maus	AbD Serotec	MCA 341R		1:100
CD73/ 5'NT	Maus	BD Bioscience	551123		1:50
FPR2 (M-73)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology	sc-66901		1:100
GFP	Huhn	Aves Biolabs	GFP-1020		1:1000
	Maus		MCA970G		1:100
Reca 1		AbD Serotec	A		
$\alpha$ -smooth muscle actin	Maus	Dako	M0851	1:500	1:50
$\alpha$ -tubulin	Maus	Sigma Aldrich	T5168	1:1000	

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Sekundärantikörper werden in der Tabelle 12 aufgelistet.

**Tabelle 12:** Liste der eingesetzten Sekundärantikörper

Isotyp	Herkunft	Nummer	Western Blotting	Immun-histochemie
DyLight™488 donkey anti rabbit IgG	Jackson Immuno Research Laboratories	711-485-152		1:500
Cy™2 donkey anti chicken IgG	Jackson Immuno Research Laboratories	730-22-155		1:250
DyLight™488 donkey anti mouse IgG	Jackson Immuno Research Laboratories	714-486-151		1:500
Cy™3 donkey anti rabbit IgG	Jackson Immuno Research Laboratories	711-165-152		1:350
Cy™3 donkey anti mouse IgG	Jackson Immuno Research Laboratories	715-165-150		1:350
Cy™3 donkey anti goat IgG	Jackson Immuno Research Laboratories	705-154-147		1:350
polyclonal swine anti rabbit HRP	Dako	P0399	1:2000	
goat anti mouse HRP	Dako	P0447	1:2000	

### 3.2.5.2 Immunhistochemie und Immunzytologie

In Paraffin eingebettetes Nierengewebe wurde in Xylol entparaffiniert, durch eine absteigende Ethanolreihe (100% bis 70%) rehydratiert und anschließend für 6 min in Zitratpuffer gekocht, um Antigene zu demaskieren.

Perfusionsfixiertes Kryogewebe oder Zellen auf Deckgläschen, die durch 3%iges PFA/PBS für 10 min bei 4°C fixiert wurden, wurden für 30 min in 0,5% Triton® X-100 in PBS inkubiert, um Lipide zu entfernen und dadurch die Antikörperpenetration zu erleichtern. Anschließend wurde dreimalig mit PBS gewaschen.

Alle Schnitte bzw. fixierte Deckgläschen wurden für 30 min mit Blockiermedium (5% Milchpulver/PBS) inkubiert, um unspezifische Antigene zu blockieren und somit Hintergrundsignale zu minimieren. Darauf folgte die Inkubation mit dem entsprechenden Primärantikörper. Die optimale Konzentration wurde in Vorversuchen austitriert. Der Primärantikörper wurde in Blockiermedium verdünnt und über Nacht bei 4°C auf den Schnitt gegeben bzw. für 2 h bei RT auf Deckgläschen inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde der Sekundärantikörper, ebenfalls in Blockiermedium verdünnt, für 1 h bei RT aufgetragen. Die Sekundärantikörper sind entweder fluoreszenzmarkiert mit Cy3, Cy2, 488 oder an Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt. Nach wiederholtem dreimaligen Waschen mit PBS erfolgte eine Blaufärbung der Zellkerne durch eine 10-minütigen Inkubation mit 4,6-Diamino-2-Phenylindol (DAPI). Anschließend wurde erneut mit PBS gewaschen. Die Schnitte bzw. Deckgläschen wurden mit PBS/Glycerin eingedeckelt. Die Auswertung der Fluoreszenzmarkierungen erfolgte mit dem Konfokalmikroskop Zeiss LSM 5 Exiter.

Immunhistochemische Färbungen durch einen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper bedurften eines Extraschrittes. Nach dem Kochen in Zitratpuffer bzw. nach der Inkubation in Triton® X-100 wurde ein Peroxidase-Block durchgeführt, um endogene Peroxidasen zu blockieren. Dabei wurden die Schnitte 15 min in 30%igem Wasserstoffperoxid/PBS inkubiert. Die Signalentwicklung des HRP-gekoppelten Antikörpers wurde durch 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrachlorid-Dihydrat (DAB) und 0,01% Wasserstoffperoxid induziert. Ein durch die Meeretichperoxidase induzierter enzymatische Abbau des Wasserstoffperoxids setzt Protonen frei, die das Chromogen DAB zu einem braunen Endprodukt oxidieren. Abgestoppt wurde diese Reaktion durch Waschen in PBS. Die Auswertung der Braunfärbungen erfolgte mit dem Mikroskop Leica DMRB mit Interferenzkontrast. Fotos wurden mit der Lichtmikroskop-Kamera Axio Cam (Carl Zeiss) und mit der Axio Vision Software (Carl Zeiss) aufgenommen. Die zur Immunhistochemie eingesetzten Puffer sind in Tabelle 13 aufgeführt.

**Tabelle 13:** Zur Immunhistochemie eingesetzte Puffer

Triton X- Puffer	0,5% Triton® X-100 1x PBS
Zitratpuffer (10x)	7,56 g Zitronensäure 48,2 g Natriumzitat
PBS/Glycerin	50% Glycerin 1x PBS

### 3.2.5.3 Herstellung von Zelllysaten für SDS-PAGE

Zellen in Zellkulturpetrischalen (Ø10 cm) wurden nach zweimaligem Waschen mit PBS in 150 µl PI-Puffer abgekratzt. Nach dem Zellaufschluss der Proben durch Ultraschall und durch das Detergenz Igepal wurden die Proben bei 4°C und 1000 g für 10 min zentrifugiert anschließend wurde der Überstand abgenommen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration im Überstand erfolgte mit dem Micro BCA™ Protein Assay Kit exakt nach Herstellerangaben basierend auf der Biuret-Reaktion. Diese Reaktion beruht auf der Reduktion von Kupferionen von Cu<sup>2+</sup> zu Cu<sup>1+</sup> in Anwesenheit von Proteinen im alkalischen Milieu. Durch die Reduktion kommt es zu einer blauvioletten Färbung der Bicinchoninsäure (BCA), die mit der Menge an Protein positiv korreliert. Die Extinktion wurde bei 560 nm im Photometer gemessen und diente mit Hilfe einer Eichkurve aus bovinem Serumalbumin der Quantifizierung der Proteinmenge. Die Proben wurden im Anschluss mittels SDS-PAGE analysiert. In Tabelle 14 ist die Zusammensetzung des PI-Puffers dargestellt.

**Tabelle 14:** Zur Herstellung von Zelllysaten eingesetzter PI-Puffer

PI-Puffer	50 µl Igepal 200 µl Proteinaseinhibitor (25x, 1 Complete proteinase inhibitorTablette auf 2 ml) 4750 µl PBS (1x)
-----------	--

### 3.2.5.4 Trichloressigsäurepräzipitation von Annexin A1 im Zellkulturmedium

Um die Annexin A1-Menge zu analysieren, welche von Zellen in Kultur in der Extrazellularraum sekretiert wurde, wurde 1 ml des Zellkulturüberstands entnommen und mit 250 µl Trichloressigsäure (TCA) versetzt und für 10 min bei 4°C inkubiert. Durch Zentrifugieren mit 14000 rpm bei 4°C für 10 min wurden die Proteine pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet mit eiskaltem (-20°C) Aceton gewaschen und wiederholt, zu oben genannten Konditionen, zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde ein weiteres Mal wiederholt, um das Pellet im Anschluss bei 95°C für 10 min im Thermoschüttler zu trocknen. Das getrocknete Pellet wurde mit 20 µl 4x Laemmli-Puffer versetzt. Die Proben wurden im Anschluss mittels SDS-PAGE analysiert.

### 3.2.5.5 SDS-PAGE (Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli 1970) wurden die in verschiedenen Proben enthaltenen Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt. Hierfür wurden standardmäßig 40 µg Proteinlysate mit 4x Laemmli-Puffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Das anionische Detergenz SDS führt unter hohen Temperaturen zum Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen und unterbindet so die Quartär- und Tertiärstruktur der Proteine. SDS führt zur Negativ-Ladung aller Proteine, wodurch eine reine Trennung nach Proteingröße und nicht durch unterschiedliche Ladung stattfindet. Durch Reduktionsmittel wie β-Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT) werden zudem auch Disulfidbrücken reduziert.

Für die SDS-Page wurden 10%ige Polyacrylamidgele als Trenngele eingesetzt. Nach dem Gießen des Trenngels wurde ein 3,7%iges Sammelgel darüber gegossen in dessen Taschen die Proben gegeben wurden. Die elektrophoretische Trennung der Proben mit Elektrophoresepuffer erfolgte bis zu Auftrennung des Proteinstandards (Precision Plus Protein™ Dual Color Standard) bei 100 V und danach bei 115 V für ca. 1,5 h bei RT. In Tabelle 15 sind die zur SDS-PAGE eingesetzten Lösungen aufgeführt

**Tabelle 15:** Zur SDS-PAGE eingesetzte Lösungen

Laemmli-Puffer (4x)	252 mM Tris HCl (3,97g) 40% Glycerin (40ml) 8% SDS 0,04% Bromphenolblau (40mg) 20% β-Mercaptoethanol (20ml) pH 6,8 mit A.dest auf 100ml
Gelpuffer-Puffer	3 M Tris-Base (181,65g) 0,3% SDS (1,5g) 37% HCl mit A.dest auf 1 l

Trenngel (10%) 4 Gele	7 ml Acrylamid 7 ml Gelpuffer 2,5 ml Glycerol 4 ml A.dest 200 µl APS (100mg/ml mit A.dest) 10 µl Temed
Sammelgel 4 Gele	1 ml Acrylamid 2 ml Gelpuffer 5 ml A.dest 100 µl APS (100mg/ml mit A.dest) 10 µl Bromphenolblau 10 µl Temed
Elektrophorese-Puffer (10x)	0,25 M Tris-Base (30g) 1,92 M Glycin (144g) 1% SDS (10g) mit A.dest auf 1 l (pH 8,3)

### 3.2.5.6 Immunoblotting/ Western Blotting

Das Western Blotting dient der qualitativen bzw. quantitativen Analyse der durch SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennten Proteine. Hierfür wurden die Proteine aus dem Trenngel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und dadurch mittels spezifischer Antikörper nachweisbar gemacht. Diese Übertragung der Proteine, das Blotting, erfolgte entweder *semi-dry* oder nass. Dabei wurden das Trenngel und die Nitrozellulosemembran als Sandwich zwischen Whatmanpapieren im Transferpuffer gepackt und in die *Semi-dry Blotting* Kammer eingelegt oder zusätzlich zwischen Schwämme gelegt und mit einer Halterung in einer mit Transferpuffer gefüllten gekühlten Kammer eingebracht. Bei dem *semi-dry Blotting* wurde für 115 min eine Spannung von 90 mA pro Gel angelegt. Das Nassblotten erfolgte bei 100 mV für 90 min. Um die geladene Proteinmenge zu beurteilen wurden, die Nitrozellulosemembranen nach dem *Blotting* in 0,5% Ponceau-Rot gefärbt und durch A. dest. wieder entfärbt. Um unspezifische Antikörperreaktionen zu vermeiden, wurden die Nitrozellulosemembranen für 30 min bei RT mit Blockiermedium (5% Magermilch/PBS) inkubiert. Der Nachweis der immobilisierten Proteine erfolgte indirekt. Zunächst erfolgte die Bindung eines spezifischen Primärantikörpers, der in Blockiermedium aufgenommen wurde über Nacht bei 4°C. Ein HRP-gekoppelter Sekundärantikörper wurde nach dreimaligem Waschen der Membran mit 5% Tween/PBS für 1 h bei RT auf die Membran gegeben. Ungebundene Antikörper wurden erneut durch dreimaliges Waschen mit 5% Tween/PBS und PBS entfernt. Die Detektion erfolgte nach einminütiger Inkubation der Membran mit ECL-Lösung, einem Luminolreagenz. In dieser Zeit führte die Meerrettichperoxidase zu einer durch Wasserstoffperoxid induzierten Oxidation von Luminol. Die dabei emittierte Chemilumineszenz belichtete einen radiographischen Film, der anschließend in der Dunkelkammer entwickelt wurde. Die Quantifizierung von eigescannten Filmen erfolgte

densitometrisch mittels Alphamager Software. Alle Proteine wurden zur Auswertung auf  $\alpha$ -tubulin normalisiert. In Tabelle 16 ist die Zusammensetzung des Transfer-Puffers aufgeführt.

**Tabelle 16:** Zum Western Blotting eingesetzter Transfer-Puffer

Transfer-Puffer (10x)	0,25 M Tris-Base (30 g) 1,92 M Glycin (144 g) mit A.dest. auf 1 l
-----------------------	---

### 3.2.6 Molekularbiologische Methoden

#### 3.2.6.1 RNA Isolation mittels Trizol

Die Isolation von mRNA erfolgte durch die Trizolmethode aus Zellen oder Gewebe. Homogenisiertes Gewebe wurde mit 500  $\mu$ l Trizol versehen. Zu untersuchende Zellen wurden mit 500  $\mu$ l Trizol abgekratzt und in einem 2 ml *Phase lock tube* aufgenommen. Nach der Zugabe von 100  $\mu$ l Chloroform wurden die Phasen für 15 s durch Schütteln gut gemischt und durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 16000 g getrennt. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt mit 250  $\mu$ l Isopropanol versetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Durch einen Zentrifugationsschritt von 16000 g für 20 min bei 4°C wurde die gefällte RNA pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500  $\mu$ l 70%igem Ethanol gewaschen und erneut bei 4°C für 5 min und 7500 g zentrifugiert. Nachdem der Überstand abermals verworfen wurde, wurde mit 250  $\mu$ l 100%igem Ethanol gewaschen und bei 4°C für 5 min und 7500 g abzentrifugiert. Nachdem der Überstand abgenommen wurde, wurde das Pellet im Thermoblock bei 65°C für 10 min getrocknet und dann in 20  $\mu$ l RNase freiem Wasser suspendiert. Zum Lösen des Pellet wurde für 10 min bei 65°C inkubiert. Die gelöste RNA wurde anschließend auf Eis platziert, schockgefroren und bei -80°C gelagert.

#### 3.2.6.2 Qualitäts-und Quantitätsbestimmung isolierter RNA

Isolierte RNA wurde auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Durch die Diskriminierung der 16s und 18s rRNA Banden konnten Rückschlüsse auf die Qualität der isolierten RNA gezogen werden. Waren die Banden klar abgegrenzt, konnte davon ausgegangen werden, dass die RNA von guter Qualität ist und keine Degradationen oder Verunreinigungen vorliegen. Zudem wurde mittels eines Nanophotometers die Extinktion der RNA bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Ein aus diesen Werten gebildeter Quotient gibt Hinweise über die Qualität der RNA. Lag dieser Wert bei 2 wurde von einer guten Qualität der RNA ausgegangen.

#### 3.2.6.3 cDNA Synthese

Die Transkription der instabilen mRNA in stabilere cDNA erfolgte durch eine reverse Transkriptase, eine RNA abhängige DNA-Polymerase. Um unterschiedliche Proben besser miteinander vergleichen zu können, wurden jeweils 1  $\mu$ g RNA zur cDNA Synthese

eingesetzt. Diese wurden mit 0,5 µl Oligo(dT)<sub>18</sub> Primer (Bioline, Luckenwalde, Deutschland) versetzt und mit RNase freiem Wasser auf 12 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde für 10 min bei 70°C inkubiert, damit die Oligo dT<sub>18</sub> Primer am 3' Poly A-Schwanz der mRNA hybridisierten. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurde jede Probe mit 7,5 µl eines Mastermixes bestehend aus je 0,25 µl RNase Inhibitor RiboLock und BioScript Polymerase und je 1 µl RNase freies Wasser, dNTPs und DTT sowie 4 µl BioScript-Pufferlösung versetzt. Die Proben wurden für 1 h bei 37°C im Thermoblock inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch 10-minütiges Erhitzen bei 70°C abgestoppt. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

### 3.2.6.4 Endpunkt Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die klassische PCR dient der *in vitro*-Vervielfältigung einer spezifischen DNA-Zielsequenz. Durch einen initialen Erhitzungsschritt für 5 min bei 95°C wurde die DNA-Polymerase aktiviert. Ein Denaturierungsschritt für 1 min bei 95°C führte zur Auftrennung der DNA in Einzelstränge. Das Absenken der Temperatur in der darauffolgenden Phase auf eine den jeweiligen Primern entsprechende Schmelztemperatur dient der Hybridisierung der Primer (*Annealing*) am Matrizenstrang. Diese Temperatur ist jeweils von den eingesetzten Primern abhängig und lag meist bei 60°C. In der Elongationsphase für 1 min bei 72°C beginnt die DNA-Polymerase am freien 3'OH Ende der Primer einen neuen Strang komplementär zur Einzelstrangmatrize zu synthetisieren. Durch die Wiederholung dieser Schritte war eine exponentielle Amplifikation der Zielsequenz auf das 10<sup>6</sup>-10<sup>8</sup>fache in kürzester Zeit möglich. In Tabelle 17 das in der Endpunkt-PCR angewendete Pipettierschema und Temperatur-Zeitprogramm dargestellt.

**Tabelle 17:** Pipettierschema und Temperatur-Zeitprogramm einer Endpunkt-PCR

Mastermix 25µl	Ausgangskonzentration	µl/Ansatz
Primer fwd	10 pmol/µl	1,25
Primer rev	10 pmol/µl	1,25
dNTPs	10 mM	2,5
AmpliTaq Polymerase	3 u/µl	0,2
Puffer 10x mit Mg <sup>2+</sup>	10x	2,5
A.dest.		24-Summe
cDNA	(<100 ng/well)	1 µl

#### Temperatur-Zeitprogramm

Initiation	94°C	5 min	
Denaturation	94°C	1 min	bis zu 40 Zyklen
Annealingtemperatur	entsprechend der Primer	1 min	
Elongation	72°C	1 min	
finale Elongation	72°C	7 min	

Alle in dieser Arbeit eingesetzten Primer sind in Tabelle 18 zusammengestellt.

**Tabelle 18:** Liste der zur Endpunkt-PCR eingesetzten Primer

Spezies	Gen	Sequenz	Amplifikatgröße
Maus	mFpr1 553 fwd	ACAGCCTGTACTTTTCGAC	563 bp
	mFpr1 1116 rev	CTGGAAGTTAGAGCCCGTTC	
Maus	mFpr-rs1 538 fwd	GGCAACTCTGTTGAGGAAAG	422 bp
	mFpr-rs1 960 rev	GGCTCTCGGTAGACGAGA	
Maus	mFpr-rs2 676 fwd	GTCAAGATCAACAGAAGAAACC	297 bp
	mFpr-rs2 973 rev	GGGCTCTCTCAAGACTATAAGG	
Maus	mFpr-rs6 557 fwd	CCCCTGAGGAGCAAGTAAAAGTAT	421 bp
	mFpr-rs6 978 rev	CAGGGCTGAGTCCCTCCTTA	
Maus	mFpr-rs7 559 fwd	CCTGAGGAGCAGGTAAACATGT	417 bp
	mFpr-rs7 976 rev	GGGCTGAATCCTCCCTCA	
Maus	mAnxa1_fwd	GCCTTGACACAAAGCTATCATGG	700 bp
	mAnxa1_rev	GCATTGGTCTCTTGGTAAGAATG	
Maus	mLacZ_fwd	TACTGTCGTCGTCCCCTCAAACCTG	200 bp
	mLacZ_rev	GTTGCACCACAGATGAAACGC	
Maus	Actin fwd	AGGTGGACAGTGAGGCCA	252 bp
	Actin rev	GTATGGAATCCTGTGGCATG	
Maus	AQP2 fwd	GCTGTCAATGCTCTCCACAA	310 bp
	AQP2 rev	TGTAGAGGAGGGAACCGATG	
Maus	AQP1 fwd	ACCTGCTGGCGATTGACTAC	429 bp
	AQP1 rev	ATTACTGCCCCAGACAAGGC	
Maus	NHE3 fwd	CAGTGCTGTATGCCTGGACA	128 bp
	NHE3 rev	GATGCTTGACTCCTGCCGA	

### 3.2.6.5 Agarosegel-Elektrophorese

Die Auswertung einer klassischen PCR erfolgte durch eine Agarosegel-Elektrophorese. Dabei wurden die aufgetragenen DNA-Fragmente ihrer Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt. Durch das Mitführen eines DNA-Standards (5 µl, GeneRuler) konnte die exakte Amplifikatgröße der Proben determiniert werden. Dazu wurde ein 1%iges Agarosegel mit TAE-Puffer gegossen. Nach dem Auftragen der Proben und des Standards in die dafür vorgesehenen Taschen wurden die Proben im Gel zunächst für 10 min bei 80 V dann für weitere 30 min bei 100 V getrennt. In Tabelle 19 ist die Zusammensetzung des TAE-Puffers aufgeführt.

**Tabelle 19:** Zur Agarosegel-Elektrophorese eingesetzter TAE-Puffer

TAE-Puffer (20x)	242 g Tris Base 57,1 ml Eisessig 100 ml 0,5 M EDTA
------------------	--

### 3.2.6.6 Quantitative Real-Time PCR

Bei einer quantitative Real-Time PCR (qPCR) kann die Amplifikation der durch die Primer definierten DNA-Zielsequenz in Echtzeit erfasst werden. Dabei wird die Emission eines Farbstoffes, welcher mit der Konzentration an Amplifikaten pro Zyklus positiv korreliert ist, durch einen *Real-Time Cycler* photometrisch gemessen.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Methoden angewandt. Die qPCR wurde entweder mit speziell hergestellten Primern und dem Fluoreszenzfarbstoff EvaGreen® oder mit TaqMan® Genexpressions-Systemen durchgeführt.

*qPCR mit EVAGreen®*

Bei dieser Methode interkaliert der Farbstoff EvaGreen® in doppelsträngiger DNA (dsDNA), d.h. der Farbstoff bindet während der PCR in der Elongations Phase an dsDNA. Dabei nimmt die Fluoreszenz bei steigender Zyklenzahl ebenso exponentiell zu wie die Anzahl der gebildeten Amplifikate.

Zunächst wurde die cDNA 1:10 verdünnt und jede Probe im Triplikat mit 10 µl vorgelegt. Ein Mix bestehend aus den spezifischen verdünnten Primern und dem Farbstoff-Mastermix (5xHOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX)) wurde mit ebenfalls 10 µl in die Reaktionsgefäße gegeben. Je Primeransatz wurde eine Negativkontrolle (*Non Template Control* NTC) mit Wasser statt cDNA ebenfalls im Triplikat mitgeführt. Neben den zu untersuchenden Genen wurde zusätzlich jede Probe im Triplikat mit einer endogenen Kontrolle, hier GAPDH, angesetzt. Die 96-Well Platten wurden im Fast 7900 Cycler (Applied Biosystems) gemessen und mit der SDS 2.1 Software analysiert. Um unspezifische Amplifikationen auszuschließen wurde dann ein Dissoziationslauf angeschlossen, um die Schmelztemperatur der Produkte analysiert. Die Daten wurden mit der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode ausgewertet und die Expressionsniveaus als x-faches der Kontrolle (*x-fold of control*) angegeben (Livak und Schmittgen 2001). In Tabelle 20 das in der qPCR mit *EVAGreen®* angewendete Pipettierschema und Temperatur-Zeitprogramm dargestellt.

**Tabelle 20:** Pipettierschema und Temperatur-Zeitprogramm einer qPCR mit *EVAGreen®*

<b>Mastermix 20µl</b>	Ausgangskonzentration	µl/Ansatz
HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix		2
Primer fwd/rev	je 5 pmol/µl	2
A.dest.		6
cDNA	1:10, 1 µl auf 9 µl A.dest.	10

**Temperatur-Zeitprogramm**

50°C	2 min	
95°C	10 min	
95°C	15 s	40 Zyklen
60°C	1 min	

Zur qPCR eingesetzte Primer sind in Tabelle 21 aufgeführt.

**Tabelle 21:** Liste der qPCR Primer

Spezies	Gen	Sequenz	Amplifikatgröße
Mensch	hACTA2 429-449 fwd	ACCCTGCTCACGGAGGCACCC	150 bp
	hACTA2 578-557 fwd	CACGATGCCAGTTGTGCGTCCA	
Maus	mActa2 25-45 fwd	AAGCCCAGCCAGTCGCTGTCA	99 bp
	mActa2 123-104 rev	AGCCCAGAGCCATTGTGCGCA	
Mensch	hANXA1 860-883 fwd	ATGCCTCACAGCTATCGTGAAGTG	101 bp
	hANXA1 960-938 rev	ATGCCTTATGGCGAGTTCCAACACC	
Maus	mAnxa1 866-888 fwd	CACAACCATCGTGAAGTGTGCCA	130 bp
	mAnxa1995-972 rev	GTCAATTTCCGAACGGGAGACCAT	
Mensch	GAPDH fwd	TGCACCACCAACTGCTTAGC	87 bp
	GAPDH rev	GGCATGGACTGTGGTCATGAG	
Ratte	TGFb1 fwd (488-507)	GACCGCAACAACGCAATCTA	160 bp
	TGFb1 rev (647-628)	CGTGTTGCTCCACAGTTGAC	
Ratte	GAPDH fwd (721-744)	GGGCAAGGTCATCCCTGAGCTGAA	331 bp
	GAPDH rev (909-886)	GAGGTCCACCACCCTGTTGCTGTA	

#### *qPCR mit TaqMan®-Sonden*

Neben den spezifischen Primern kommt bei dieser Methode ein weiteres Oligonukleotid, die Sonde, zur Anwendung. Diese ist mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen markiert, dem *Quencher* (3'OH Ende) und dem *Reporter* (5'OH Ende), und liegt zwischen den Primern in dem zu amplifizierenden Bereich. Durch einen Fluoreszenz-Resonanz-Elektronen-Transfer (FRET) unterbindet der Quencher die Fluoreszenz des Reporters solange dieser sich in räumlicher Nähe befinden. Durch die 5'-3' Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase wird die Sonde während des Ablesens des Matrizenstranges enzymatisch abgebaut. Dabei wird das FRET unterbrochen und der Reporter emittiert Fluoreszenz. Je mehr Amplifikate entstehen, desto mehr Fluoreszenz wird frei. So kann die exponentielle Vervielfältigung in Echtzeit erfasst werden.

Zunächst wurde ein Mastermix aus dem spezifischen TaqMan® Genexpressions-Ansatz und einer endogenen Kontrolle, hier GAPDH, angesetzt und 10 µl je Reaktionsgefäß vorgelegt. Die cDNA wurde 1:2 verdünnt und je 5 µl auf den Mastermix gegeben. Neben den zu untersuchenden Proben wurde je Gen eine NTC eingesetzt. Die 96-Well Platten wurden im Fast 7900 Cyler (Applied Biosystems) gemessen und mit der SDS 2.1 Software analysiert. Die Daten wurden mit der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode ausgewertet und die Expressionsniveaus als *x*-faches der Kontrolle (*x-fold of control*) angegeben (Livak und Schmittgen 2001). In Tabelle 22 das in der qPCR mit *Taqman®-Sonden* angewendete Pipettierschema und Temperatur-Zeitprogramm dargestellt.

**Tabelle 22:** Pipettierschema und Temperatur-Zeitprogramm einer qPCR mit *Taqman*®-Sonden

<b>Mastermix 15µl</b>		µl/Ansatz
TaqMan® Sonde/Primer-Ansatz zu untersuchendes Gen		0,75
GAPDH TaqMan® Sonde/Primer-Ansatz		0,75
A.dest		1
TaqMan® Fast Universal PCR Mastermix (2X)		7,5
cDNA (1:2 verdünnt)		5

<b>Temperatur-Zeitprogramm</b>		
95°C	20 s	40 Zyklen
95°C	3 s	
60°C	30 s	

Alle TaqMan® Genexpressions Systeme wurden bei der Firma *Applied Biosystems* gekauft. In Tabelle 23 sind die eingesetzten Taqman® Genexpressions Systeme aufgeführt.

**Tabelle 23:** Liste der Taqman® Genexpressions Systeme

Spezies	Gen	Nummer	Farbstoff
Maus	Acta2	Mm01546133_m1	FAM/TAMRA
Maus	Col1A1	Mm00801666_g1	FAM/TAMRA
Maus	GAPDH	4352339E-1108037	VIC-MGB
Mensch	Anxa1	Hs00167549_m1	FAM/TAMRA
Mensch	Acta2	Hs00426835_g1	FAM/TAMRA
Mensch	Col1A1	Hs00164004_m1	FAM/TAMRA
Mensch	GAPDH	Hs03929097_g1	VIC-MGB
Ratte	Anxa1	Rn01454280_m1	FAM/TAMRA

### 3.2.6.7 Klonierung

Um eine Überexpression von Annexin A1 in kultivierten murinen Wildtypfibroblasten (mRCF) zu induzieren, wurde Annexin A1 in einen pEYFP-N1 Vektor (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) kloniert und in Bakterien transfiziert. Die Klonierung dient der exponentiellen Vervielfältigung von ausgewählten DNA-Fragmenten. Für die Klonierung wurde der pEYFP-N1 Vektor ausgewählt, um die Transfektion durch die Fluoreszenz des *Yellow Fluorescent Protein* (YFP) beurteilen zu können. YFP liegt N-terminal des *Open Reading Frames* und erlaubt somit die Herstellung eines N-terminal getaggten Fusionsproteins aus YFP und Annexin A1. Zudem besitzt dieser Vektor eine Kanamycin/Neomycin-Kassette, welche für die Erzeugung einer stabilen Transfektion mit Hilfe einer Geneticin G418-Selektion notwendig ist.

#### *Primerdesign*

Primer, die zum Ziele der Klonierung hergestellt werden, sind zusammengesetzte Primer. Sie bestehen, wie andere Primer auch, aus einer der Matrize komplementären Sequenz und

sind zusätzlich mit einer Sequenz für eine spezifische Restriktionsstelle und einem Teil der komplementär ist zur Vektorsequenz in 5'Richtung der Restriktionsschnittstelle aufgebaut.

Zunächst wurde die gewünschte *full length* Ratten Annexin A1 Sequenz (NM\_012904.1) ausgewählt, indem die kodierende Sequenz *in frame* komplett eingeschlossen wurde. Für den *forward* (fwd) Primer wurde die Restriktionsschnittstelle für EcoRI in 5'Richtung vor der Annexin A1 spezifischen Sequenz und für den *reverse* (rev) Primer die Schnittstelle für BamHI hinter die Zielsequenz des Annexin A1 eingefügt. Durch zwei zusätzliche Nukleotide wurde die EcoRI Schnittstelle *in frame* gebracht. Und durch ein zusätzliches Nukleotid wurde die Restriktionsschnittstelle BamHI *in frame* gebracht.

Anxa1 YFP fwd: 5' Ctc aag ctt cga att ctg atg gca atg gta tca gaa 3'  
 Vektorteil EcoRI [ ] Annexin A1

Anxa1 YFP rev: 5' Ctc tgt gtg gag gaa acg gga tcc acc ggt C 3'  
 Annexin A1 [ ] BamHI Vektorteil

### Klonierungs-PCR

Die Klonierungs-PCR unterliegt den gleichen Mechanismen wie die Endpunkt PCR (Abschnitt 3.2.6.4). Als Matrize diente ein pCMV-Sport Vektor mit *full length* Ratten Annexin A1 von Imagenes (IRBPp993H041D). Anstelle der AmpliTaq Polymerase wurde eine *proofreading* Polymerase Pfu eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend aus dem Gel isoliert. Die Extraktion von PCR-Produkten aus einem Agarosegel erfolgte nach Herstellerangaben mit einem *DNA Extraction Kit*. Die Elution der gebundenen DNA erfolgte stets mit 30 µl A. dest. In Tabelle 24 das in der Klonierungs-PCR angewendete Pipettierschema und Temperatur-Zeitprogramm dargestellt.

**Tabelle 24:** Pipettierschema und Temperatur-Zeitprogramm einer Klonierungs-PCR

Mastermix 25µl	Ausgangskonzentration	µl/Ansatz
Primer fwd	10 pmol/µl	1,25
Primer rev	10 pmol/µl	1,25
dNTPs	10 mM	2,5
Pfu Polymerase	3 u/µl	0,2
Puffer 10X mit Mg2+	10x	2,5
A.dest		24-Summe
Plasmid-DNA	(<100 ng/well)	1µl

### Temperatur-Zeitprogramm

Initiation	94°C	5 min	
Denaturation	94°C	1 min	30 Zyklen
Annealingtemperatur	60°C	1 min	
Elongation	72°C	1 min	
finale Elongation	72°C	7 min	

### *Restriktionsverdau*

Um eine Zielsequenz in ein Plasmid klonieren zu können, müssen die Zielsequenz sowie auch der Vektor mit Restriktionsenzymen geschnitten werden. Dadurch entstehen Überhänge, sogenannte *sticky ends*, welche die spätere Ligation erleichtern. Zum Restriktionsverdau des Annexin A1 PCR-Produktes bzw. des pEYFP-N1 Vektors wurden je 1 µl EcoRI und BamHI mit 9 µl Tango Puffer und 26 µl des PCR-Produktes/Vektors versetzt und für 5 h bei RT inkubiert. Im Anschluss an den Restriktionsverdau wurden die Proben erneut im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, die geschnittenen Produkte isoliert und für die Ligation aufgereinigt.

### *Ligation*

Zur Ligation des Annexin A1-Produktes mit dem pEYFP-N1 Vektor wurden 1 µl aufgereinigtes und geschnittenes Annexin A1 mit 7 µl des ebenfalls aufgereinigten und geschnittenen Vektors mit 1 µl T4 Ligase und 1 µl T4-Ligase Puffer versetzt. Dieser Ansatz wurde entweder über Nacht bei 16°C oder für 4 h bei RT inkubiert.

### *Sequenzierung*

Die Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmid-DNA wurde bei dem Sequenzierungsservice *SMB Service in Molecular Biology GmbH* (Berlin) in Auftrag gegeben. Dazu wurden entweder 2 µl Plasmid-DNA oder 400 ng des PCR-Produktes in 20 µl A. dest. aufgenommen. Primer wurden auf 10 pmol/µl verdünnt. Die Sequenzen wurden mit Software Chromas Lite Version 2.01 und BLAST ausgewertet.

## **3.2.7 Mikrobiologische Methoden**

### **3.2.7.1 Herstellung kompetenter Bakterienstämme**

Zwei Milliliter LB-Flüssigmedium wurden mit dem Escherichia coli (E.coli) Stamm Top10 angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Übernacht-Kultur wurde auf 100 ml LB-Flüssigmedium gegeben und für 4-5 h bei 37°C inkubiert bis eine optische Dichte von 0,6-0,7 bei einer Wellenlänge von 600 nm erreicht wurde. Zum Pelletieren der Bakterien wurde für 10 min bei 4°C und 800 g zentrifugiert und nach Abnehmen des Überstandes wurde das Pellet in 6 ml eiskaltem 0,1 M CaCl<sub>2</sub> und 1,5 ml Glycerin resuspendiert. Die Bakterien wurden in 100 µl Aliquots schockgefroren und bei -80°C gelagert. In Tabelle 25 wird die Zusammensetzung des LB-Mediums aufgeführt.

**Tabelle 25:** Zusammensetzung des LB-Mediums

LB Medium	10 g Bacto-Trypton 10 g NaCl 5 g Bacto Hefe mit A.dest auf 1 l einstellen
-----------	--

### 3.2.7.2 Transformation kompetenter Bakterien mit Annexin A1-pEYFP-N1 Plasmid

Auf ein 100 µl Aliquot kompetenter Top10F Bakterien wurde der gesamte Ligationsansatz gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Ein einminütiger Hitzeschock bei 42°C verbesserte die Aufnahme des Plasmids. Anschließend wurden 200 µl LB-Flüssigmedium ohne Antibiotika auf den Ansatz gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit wurde das auf dem pEYFP-N1 Plasmid codierte Enzym Neomycin Phosphotransferase gebildet und somit eine Resistenz gegen Kanamycin/Neomycin entwickelt. Daraufhin wurde der komplette Ansatz auf eine LB-Agarplatte mit Kanamycin (100 µg/ml) gegeben und gleichmäßig verteilt. Die Agarplatte wurde über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. In Tabelle 26 wird die Zusammensetzung des LB-Agars aufgeführt.

**Tabelle 26:** Zusammensetzung des LB-Agars

LB-Agar	10 g Bacto-Trypton
	10 g NaCl
	5 g Bacto Hefe
	15 g Agar
	mit A.dest. auf 1 l einstellen

### 3.2.7.3 Plasmidpräparation

Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde je ein Klon von der Agarplatte gepickt und in 2 ml LB-Medium mit Kanamycin (100 µg/ml) gegeben und über Nacht bei 37°C hochgezogen. Die Plasmidpräparation erfolgte mit 1 ml der Übernachtskultur mit Hilfe des *Invisorb® Spin Plasmid Mini Two Kits* genau nach Herstellerangaben. Die Plasmid-DNA wurde in 30 µl A. dest. eluiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA sequenziert.

### 3.2.7.4 Glycerinstock zur Lagerung von Bakterien

Nach Verifizierung der Sequenz wurde aus den rAnxa1-pEYFP-N1 Top10F<sup>+</sup> Bakterien ein Glycerinstock aus 500 µl der Übernachtskultur der Plasmidpräparation mit 500 µl sterilem 50% Glycerin angesetzt, schockgefroren und bei -80°C gelagert.

## 3.2.8 Methoden der Zellkultur

### 3.2.8.1 Erzeugung primärer renaler kortikaler Fibroblasten

Aus frischem Gewebe isolierte Zellen mit begrenztem Teilungsvermögen werden als primäre Zellen bezeichnet. Für die Generierung muriner Primärfibroblasten wurden Annexin A1-defiziente Mäuse und Wildtyp Mäuse per zervikaler Dislokation getötet. Die Nieren wurden sofort entnommen. Der kortikale Teil des Nierengewebes wurde entfernt und unter sterilen Bedingungen feinst zerkleinert. Das Homogenat des Nierengewebes wurde in 5 ml Medium (*Dulbeccos Modified Eagle Medium* (DMEM) mit 10% Fötalem Kälber Serum (FKS), 1% Penicillin/Streptomycin mit 4 units/ml Kollagenase Typ IV) aufgenommen und über Nacht bei RT rotierend gelagert. Am Folgetag wurde der Ansatz durch einen *cell strainer* Filter in

ein neues Gefäß gegeben und mit 5 ml Medium nachgespült. Die Zellen wurden bei 4000 rpm für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde bis auf 1 ml abgenommen. Die Zellen wurden in dem Milliliter resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß transferiert. Die Zellen wurden erneut bei 4000 rpm für 5 min bei 4°C pelletiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und die Zellen in 1 ml frischem Medium gelöst und erneut pelletiert. Nach dem Abnehmen des Überstandes wurde das Zellpellet in 1,5 ml Medium aufgenommen und in einer 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche mit 10 ml Medium ausplattiert. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt. Nach ca. einer Woche war die Zellkulturflasche 100% konfluent.

### **3.2.8.2 Passagieren von Zelllinien**

Erreichten die Zellen eine 100%ige Konfluenz, so wurde zunächst das Medium verworfen und zweimalig mit sterilem PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 1 ml 1x Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) im Brutschrank für 3 min inkubiert und durch Klopfen vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Die gelösten Zellen wurden in 5 ml Medium aufgenommen und durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Die Suspension wurde für 3 min bei 1200 g zentrifugiert. Der Überstand über dem Zellpellet wurde verworfen und das Pellet in 3 ml PBS gewaschen und erneut pelletiert. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend wurden die Zellen in das Medium aufgenommen und auf dem Zielgefäß verteilt.

### **3.2.8.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Zur Lagerung wurden Zellen eingefroren und im Stickstofftank gelagert. Zunächst wurden die Zellen einer 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche, wie unter 3.2.8.2 beschrieben, trypsiniert. Einzig der letzte Schritt unterschied sich, da das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert wurde und auf 1 ml FKS/Dimethylsulfoxid (DMSO) in einem Kryoröhrchen gegeben wurde. Das Kryoröhrchen wurde in einem *Cryo-Safe™ Cooler* bei -80°C über Nacht gelagert. Der *Cryo-Safe™ Cooler* gefüllt mit Methanol führte zu einer schonenden Temperaturreduktion von 1°C/min. Am Folgetag wurde das Kryoröhrchen in Kryoboxen im Stickstofftank gelagert.

Das Auftauen von Zellen musste im Gegensatz zum Einfrieren schnell erfolgen. Ein Kryogefäß wurde im Wasserbad bei 37°C rasch aufgetaut und die Zellsuspension auf 3 ml vorgewärmtes Medium gegeben. Die Zellen wurden bei 1200 g für 3 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimalig mit PBS gewaschen und anschließend in 1 ml Medium resuspendiert und in 10 ml Medium auf einer 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche ausgebracht und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

### 3.2.8.4 Immortalisierung der etablierten Primärzellkulturen durch SV40 Transfektion

In der dritten Passage wurden die renalen kortikalen Fibroblasten (Wildtyp und Anxa1-/-) einer Immortalisierung durch Transfektion mit einem SV40 Plasmid unterzogen. Die Transfektion wurde durch Elektroporation induziert. Zunächst wurden die Fibroblasten trypsiniert in Medium aufgenommen und für 7 min bei 4°C und 1200 g pelletiert. Das Pellet wurde in 3 ml PBS aufgenommen. Pro Elektroporationsansatz wurden  $1 \times 10^6$  Zellen eingesetzt und erneut für 3 min bei 1200 g und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 100 µl Elektroporationspuffer und 4 µg SV40 Plasmid vermischt und in die Elektroporationsküvette gegeben. Die Küvette wurde in dem ELPorator 1000 (Thorsten Stroh, Charité Berlin) platziert und bei 600 V und 400 µs elektroporiert. Anschließend wurden die Zellen auf 5 ml Medium in einer 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche gegeben und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. In Tabelle 27 ist die Zusammensetzung des Elektroporationspuffers aufgeführt.

**Tabelle 27:** Zusammensetzung des Elektroporationspuffers

Elektroporationspuffer	90 mM Natriumphosphat
	10 mM Magnesiumchlorid
	50 mM Glukose
	pH 7,2

### 3.2.8.5 Stabile Überexpression von rAnxa1-YFP in Fibroblasten

Eine Transfektion des rAnxa1-pEYFP-N1 Plasmids in immortalisierte Kontrollfibroblasten (mRCF) erfolgte durch Elektroporation. Die Elektroporation erfolgte, wie unter 3.2.8.4 beschrieben, mit 4 µg des rAnxa1-pEYFP-N1 Plasmids. Der Tag der Elektroporation stellte Tag 0 dar. An Tag 2 wurden die transfizierten Zellen durch Geneticin G418-Gabe, über die Kanamycin/Neomycin-Kassette des pEYFP-N1 Vektors, selektiert. Die Selektion erfolgte mit einer Konzentration von 1,25 mg G418/ml Medium. Diese Konzentration war in der *killing curve* mit Konzentrationen von 0,1-2,0 mg/ml über 14 Tage die niedrigste Konzentration, die zum Absterben aller immortalisierten Kontrollzellen führte. An Tag 3 wurden die Zellen trypsiniert, auf einer kleineren Fläche ausgebracht und erneut mit Selektionsmedium überschichtet. Nach 7 Tagen konnten die selektierten stabil transfizierten Fibroblasten erneut auf 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ausgebracht werden. Der Selektionsdruck mit 1,25 mg/ml G418 wurde stets aufrechterhalten.

### 3.2.8.6 Behandlung mit Transforming Growth Faktor β1

Bevor konfluente Zellkulturfibroblasten mit Transforming Growth Faktor β1 (TGF-β) behandelt wurden, wurden sie für 24 h auf serumfreiem Medium gehalten. Anschließend wurde 22,5 ng/ml TGF-β in serumfreiem Medium für 24 h auf die Zellen gegeben. Sollte die Genexpression untersucht werden, wurden die Zellen auf 6 Wells ausgebracht: sollte die

Proteinexpression analysiert werden, so wurden die Zellen auf Zellkulturpetrischalen (Ø10 cm) ausplattiert. Sollten die Zellen im Anschluss immunhistochemisch untersucht werden, wurden mit Aminosilan beschichtete Deckgläschen mit in die *Wells* gegeben.

### 3.2.8.7 Behandlung mit Formyl-Peptid-Rezeptor -Antagonisten

Um die Auswirkung der FPR-Antagonisten Cyclosporin H (CsH) und WRW4 auf die  $\alpha$ -sma-Biosynthese zu untersuchen, wurden die humanen fibrotischen Fibroblasten (TK188) zunächst für 24 h auf serumfreiem Medium gehalten. Die TK188 Fibroblasten wurden mit dem jeweiligen Antagonisten für 24 h stimuliert. Zum Vergleich wurden Zellen mit Vehikel und serumfreiem Medium versetzt. In Tabelle 28 sind die zur Behandlung eingesetzten Formyl-Peptid-Rezeptor Antagonisten und deren Konzentrationen aufgeführt.

**Tabelle 28:** Behandlung mit Formyl-Peptid-Rezeptor Antagonisten

Behandlung	Konzentration
Cyclosporin H	0,1 $\mu$ M (gelöst in Ethanol)
WRW4	1 $\mu$ M (gelöst in DMSO)

### 3.2.8.8 Zelllinien

Alle Zelllinien, die in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kamen, sind in Tabelle 29 aufgeführt.

**Tabelle 29:** Auflistung aller verwendeten und generierten Zelllinien

Name	Spezies	Bedeutung	Herkunft	immortalisiert
mRCF	Maus	Kontrollefibroblasten aus Bl6/2 Maus	eigene Herstellung	SV40
mRCF+rANXA1-YFP	Maus	mit rANXA1-pEYFP stabil transfizierte mRCF	eigene Herstellung	SV40
Anxa1-/-	Maus	Anxa1-Knock-out	eigene Herstellung	SV40
TK173	Mensch	Kontrollen	Uni Göttingen, G. Müller	SV40
TK188	Mensch	fibrotisch	Uni Göttingen, G. Müller	SV41
mWT	Maus	Kontrollen	Uni Göttingen, M. Zeisberg	
mfF	Maus	fibrotisch	Uni Göttingen, M. Zeisberg	

Die Zelllinien mWT und mfF wurden ebenfalls durch Elektroporation mit SV40 immortalisiert.

### 3.2.9 Statistik

Alle Daten wurden mit dem Student-T-Test auf Signifikanzen überprüft. Dabei wurde von der Normalverteilung aller erzeugten Daten ausgegangen. Bei Tierversuchen lag die Anzahl je Gruppe bei n=6 für biochemische Untersuchungen und bei n=3 für die Morphologie.

Zellkulturexperimente wurden je im Triplikat angesetzt und stets mit einer Mindestanzahl von drei Wiederholungen durchgeführt. Dabei wurden p-Werte <0,05 als signifikant (\*) und p-Werte <0,01 als höchst signifikant (\*\*) erachtet. Daten wurden immer als Mittelwerte  $\pm$  SEM (Standardfehler) angegeben.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Morphologie der mit ARA behandelten Ratten

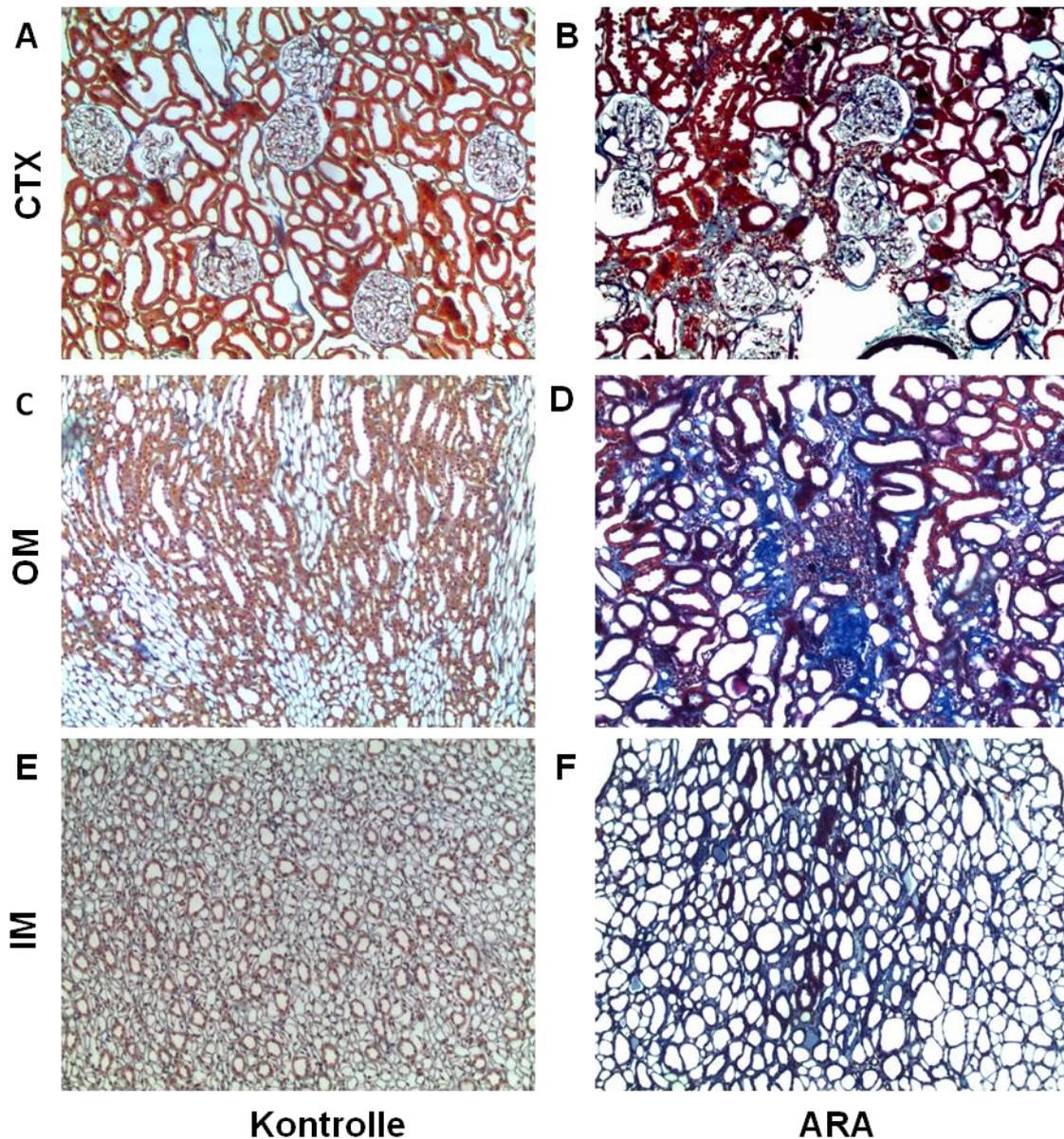
Aufgrund der durch ARA induzierten Veränderungen in der Nephrogenese zeigten die mit ARA behandelten Ratten eine signifikant geringere Anzahl an Nephronen und ein reduziertes Papillenvolumen (Saez et al. 2007). Weitere morphologische Veränderungen wurden durch histochemische Färbungen und Elektronenmikroskopie erfasst.

Mit einer SFOG Trichrom-Färbung wurde das Ausmaß der Fibrosierung der mit ARA behandelten Ratten erfasst. Kollagenhaltige Strukturen wurden blau dargestellt und Proteine rot angefärbt. Die mit ARA behandelten Ratten wiesen im Kortex, der äußeren und inneren Medulla fibrotische Areale auf. Der Grad der Fibrosierung war in der äußeren Medulla am meisten ausgeprägt. Neben den fibrotischen Veränderungen des renalen Parenchyms fanden sich perivaskulär und periglomerulär inflammatorische Infiltrationen. Die Kontrolltiere zeigten ein physiologisches Muster der Kollagenverteilung. Diese Befunde sind in Abbildung 9 dargestellt.

Mit einer Sirius Rot-Färbung wurden Kollagenablagerungen rot angefärbt. Die mit ARA behandelten Ratten zeigten, wie schon in der SFOG Trichrom-Färbung, eine starke Fibrosierung im Bereich des Kortex und der äußeren Medulla. In der inneren Medulla fanden sich nur kleine fibrotische Areale. Die Kontrolltiere zeigten keine pathologischen Veränderungen. Diese Befunde sind in Abbildung 10 dargestellt.

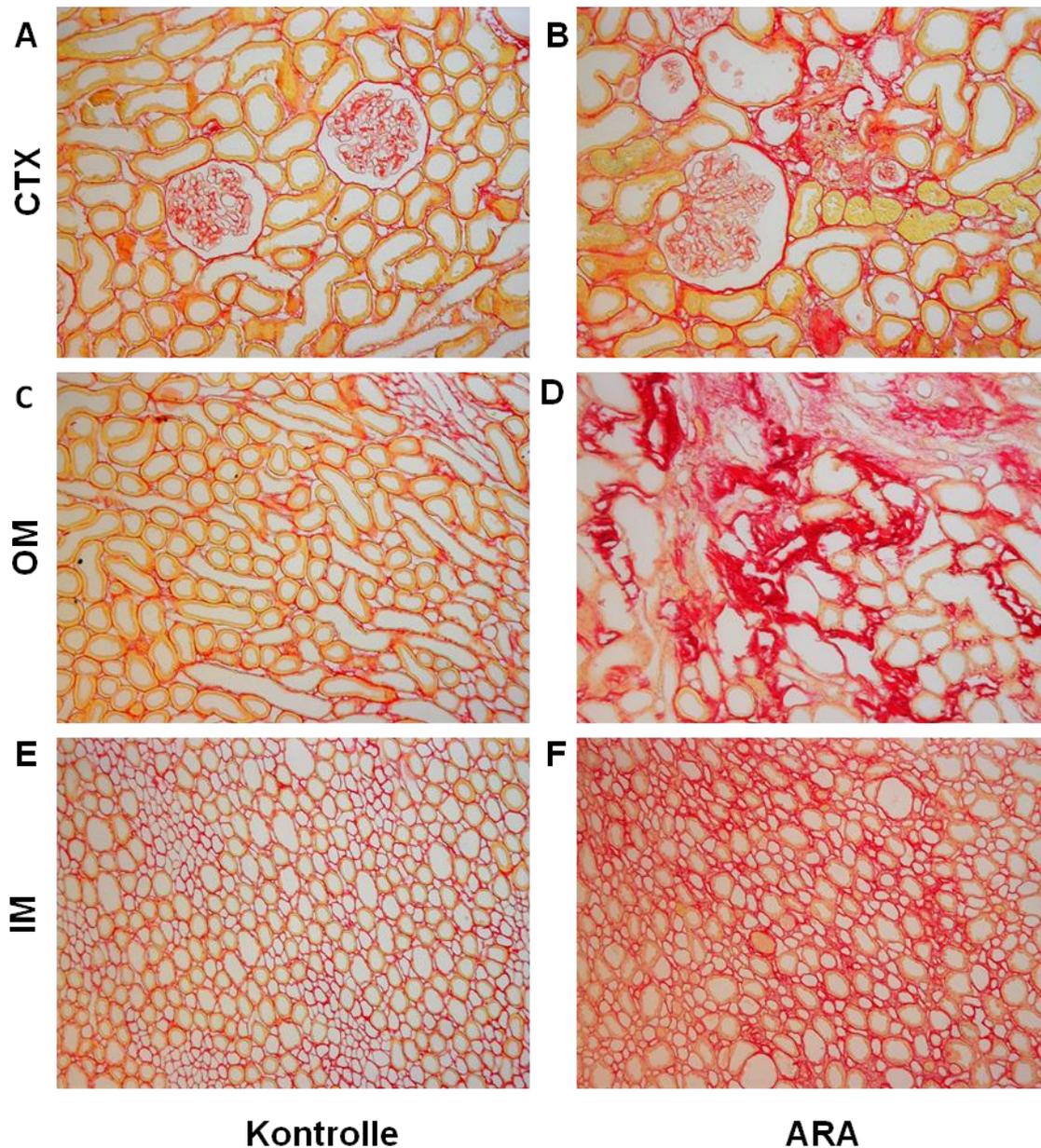
Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren wiesen die mit ARA behandelten Ratten starke Veränderungen der Nierenmorphologie im Sinne glomeruloskleotischer Veränderungen und tubulointerstitieller Schäden, vor allem im Bereich der äußeren Medulla und des Kortex, auf.

Mit Hilfe von Semidünnschnitten und elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden die Veränderungen der Nierenmorphologie des Kortex genauer untersucht. Es zeigten sich sklerosierte Glomeruli mit verdickten glomerulären Basalmembranen, Protein-obstruierte Tubuli, periglomeruläre inflammatorische Infiltrationen sowie ausgedehnte Kollagenablagerungen. Diese Befunde sind in Abbildung 11 dargestellt.



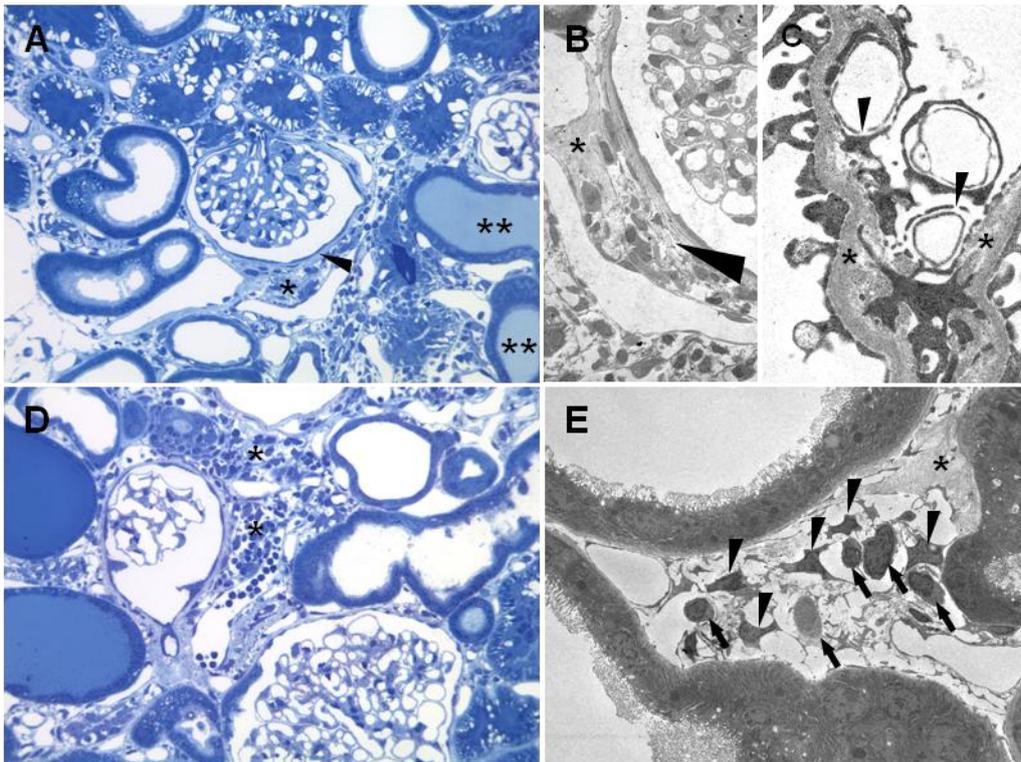
**Abbildung 9:** Vergleichende Darstellung von mit ARA behandelten Ratten und ihren Kontrollen in der SFOG Trichrom-Färbung

Die lichtmikroskopischen Abbildungen zeigen die Nierenbereiche des Kortex (CTX; A/B), der äußeren Medulla (OM; C/D) und der inneren Medulla (IM; E/F) von Kontrolltieren (A/C/E) und mit ARA behandelten Ratten (B/D/F). In B sind Kollagenablagerungen perivaskulär und periglomerulär zu erkennen. A zeigt, dass im gesunden Kontrolltier nur sehr feine Kollagenfasern im renalen Interstitium vorliegen. Die Darstellung aus der äußeren Medulla (D) zeigt bei der mit ARA behandelten Ratte eine starke Fibrosierung und Infiltration inflammatorischer Zellen (hohe Zelldichte) im Vergleich zu den Kontrolltieren. Auch in der inneren Medulla lassen sich fibrotische Kollagendepots bei mit ARA behandelten Ratten (F) erkennen. Die innere Medulla der Kontrolltiere zeigt keine Kollagenablagerung (E). SFOG Trichrom-Färbung x100



**Abbildung 10:** : Vergleichende Darstellung von mit ARA behandelten Ratten und ihren Kontrollen in der Sirius Rot-Färbung

Die lichtmikroskopischen Abbildungen zeigen die Nierenbereiche des Kortex (CTX; A/B), der äußeren Medulla (OM; C/D) und der inneren Medulla (IM; E/F) von Kontrolltieren (A/C/E) und mit ARA behandelten Ratten (B/D/F). Im Kortex des Kontrolltieres (A) sind zwei gesunde Glomeruli zu erkennen. Feine fibrilläre Kollagenfasern sind peritubulär und periglomerulär zu finden. Im Kortex der mit ARA behandelten Ratte (B) sind viele kleine geschädigte Glomeruli und ein hypertrophierter Glomerulus zu erkennen. Dieser Glomerulus zeigt eine Verdickung der Basalmembran. Zwischen degenerierten Tubuli und den geschädigten Glomeruli ist eine große Kollagenablagerung zu erkennen. In der äußeren Medulla der ARA-Ratte (D) ist nahezu die Hälfte des funktionellen Gewebes durch großflächige Kollagenablagerungen ersetzt. In diesem Bereich sind Gewebsschäden durch eine bindegewebige Narbe ersetzt. Die innere Medulla der ARA-Ratte (F) weist stellenweise kleinere fibrotische Areale auf. Sirius Rot-Färbung, x200



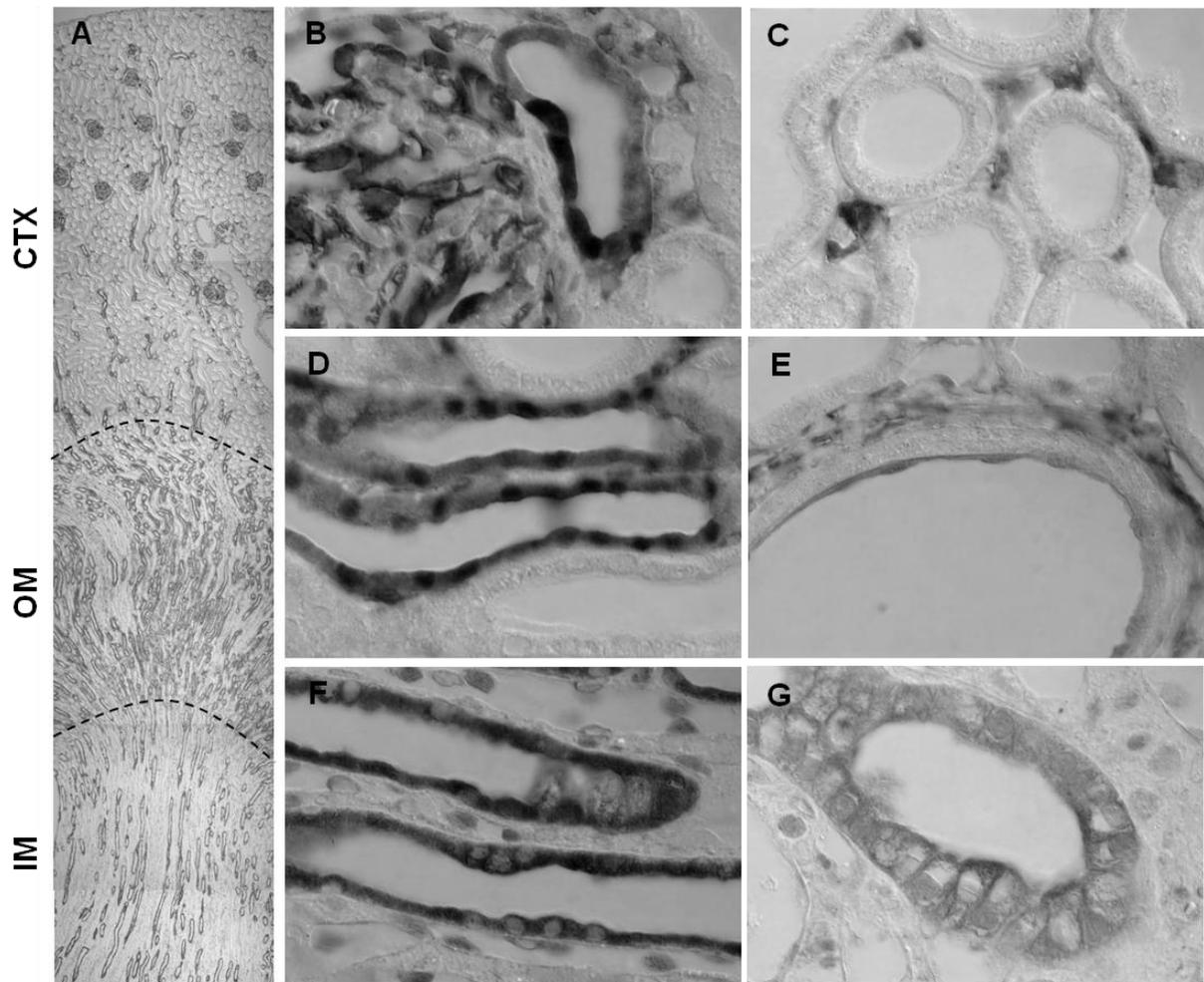
**Abbildung 11:** Exemplarische Darstellung der pathologischen Veränderungen im Kortex von mit ARA behandelten Ratten in Semidünnschnitten und elektronenmikroskopischen Aufnahmen  
Die Semidünnschnitte (A/D) zeigen kortikale Nierenausschnitte von mit ARA behandelten Ratten. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen (B/C/E) zeigen daraus vergrößert die pathologischen Veränderungen. In A ist ein Glomerulus mit pathologisch verdickter Basalmembran zu erkennen (Pfeil). Periglomerulär findet sich eine Aufweitung des renalen Interstitiums (\*). Zudem sind mit Proteinzylindern obstruierte Tubuli deutlich zu erkennen (\*\*). B zeigt deutlich eine periglomeruläre Aufweitung (Pfeil) des renalen Interstitiums und Ablagerungen von Kollagen (\*). In C sind eine Verdickung der glomerulären Basalmembran (\*) und Schäden am Kapillarendothel (Pfeil) zu erkennen. In D sind periglomeruläre inflammatorische Infiltrationen zu erkennen (\*). In E ist eine Vergrößerung eines kortikalen Nierenareals dargestellt. Zwischen den Tubulusanschnitten sind sternförmige Fibroblasten (Pfeil) zu erkennen. Neben den Fibroblasten finden sich rundliche Entzündungszellen (↑) in den Kapillaren und im Gewebe. Außerdem ist eine ausgedehnte Kollagenablagerung (\*) zu erkennen.  
Semidünnschnitte, elektronenmikroskopische Darstellungen

## 4.2 Renale Annexin A1-Expression

### 4.2.1 Renale Annexin A1-Expression in jungen Kontrolltieren

Annexin A1 ist in der Niere weit verbreitet. Die immunhistochemische Färbung für Annexin A1 mit HRP-gekoppeltem Sekundäntikörper zeigte, dass im Kortex junger Kontrolltiere vor allem die Podozyten der Glomeruli stark Annexin A1-positiv waren. Abgesehen davon exprimierten die dicken aufsteigenden Schenkel der Henle'schen Schleifen und besonders die Macula densa Annexin A1. In der äußeren Medulla exprimierten die medullären Sammelrohre und der medulläre Teil der dicken aufsteigenden Schenkel der Henle'schen Schleifen Annexin A1. In der inneren Medulla waren die Sammelrohre ebenfalls positiv für Annexin A1. Mesangialzellen und die Endothelzellen der glomerulären Kapillaren zeigten kein Annexin A1-Signal.

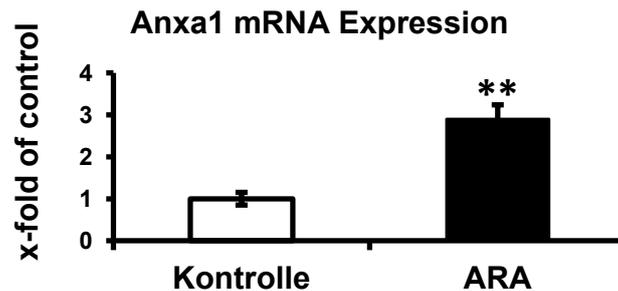
Zwischen den Tubulusanschnitten fanden sich interstitielle Zellen, die eine Annexin A1-Immunreaktivität aufwiesen. Kortikal hatten diese interstitiellen Annexin A1-immunreaktiven Zellen eine dreieckige Zellform. Aufgrund ihrer Morphologie wurde davon ausgegangen, dass es sich bei diesen Zellen um Fibroblasten handelte. In der äußeren Medulla fanden sich deutlich weniger interstitielle Annexin A1-Signale. Diese fanden sich nur periarteriell in Form von spindelförmigen Fibroblasten der Adventitia großer Arterien. In der inneren Medulla waren kaum interstitielle Annexin A1-Signale auszumachen.



**Abbildung 12:** Exemplarische Darstellung der Annexin A1-Expression in Nieren junger Kontrolltiere. Abbildung A ist ein Längsschnitt durch eine Rattenniere und zeigt, dass im kortikalen Bereich (CTX) vor allem Glomeruli angefärbt sind. Im Bereich der äußeren Medulla (OM) fallen besonders die dicken aufsteigenden Henle'schen Schleifen als Annexin A1-positiv auf. In der inneren Medulla (IM) sind vor allem die Sammelnöhre angefärbt. Die umliegenden Vasa recta exprimieren kein Annexin A1. B zeigt eine Vergrößerung aus dem kortikalen Labyrinth. Die Podozyten des Glomerulus und die angrenzende Macula densa sowie der dicke aufsteigende Schenkel der Henle'schen Schleife exprimieren Annexin A1. Auf Abbildung C erkennt man Annexin A1-exprimierende Zellen im renalen kortikalen Interstitium zwischen den angeschnittenen Tubuli. Abbildung D zeigt einen dicken aufsteigenden Schenkel der Henle'schen Schleife, der stark Annexin A1-immunreaktiv ist. Abbildung E stellt eine periarterielle Annexin A1-Immunreaktivität dar. In der inneren Medulla sind die Sammelnöhre (F) und die Bellini'schen Gänge (G) positiv für Annexin A1. Diese Abbildung wurde von A. Paliege zur Verfügung gestellt. Immunhistochemie

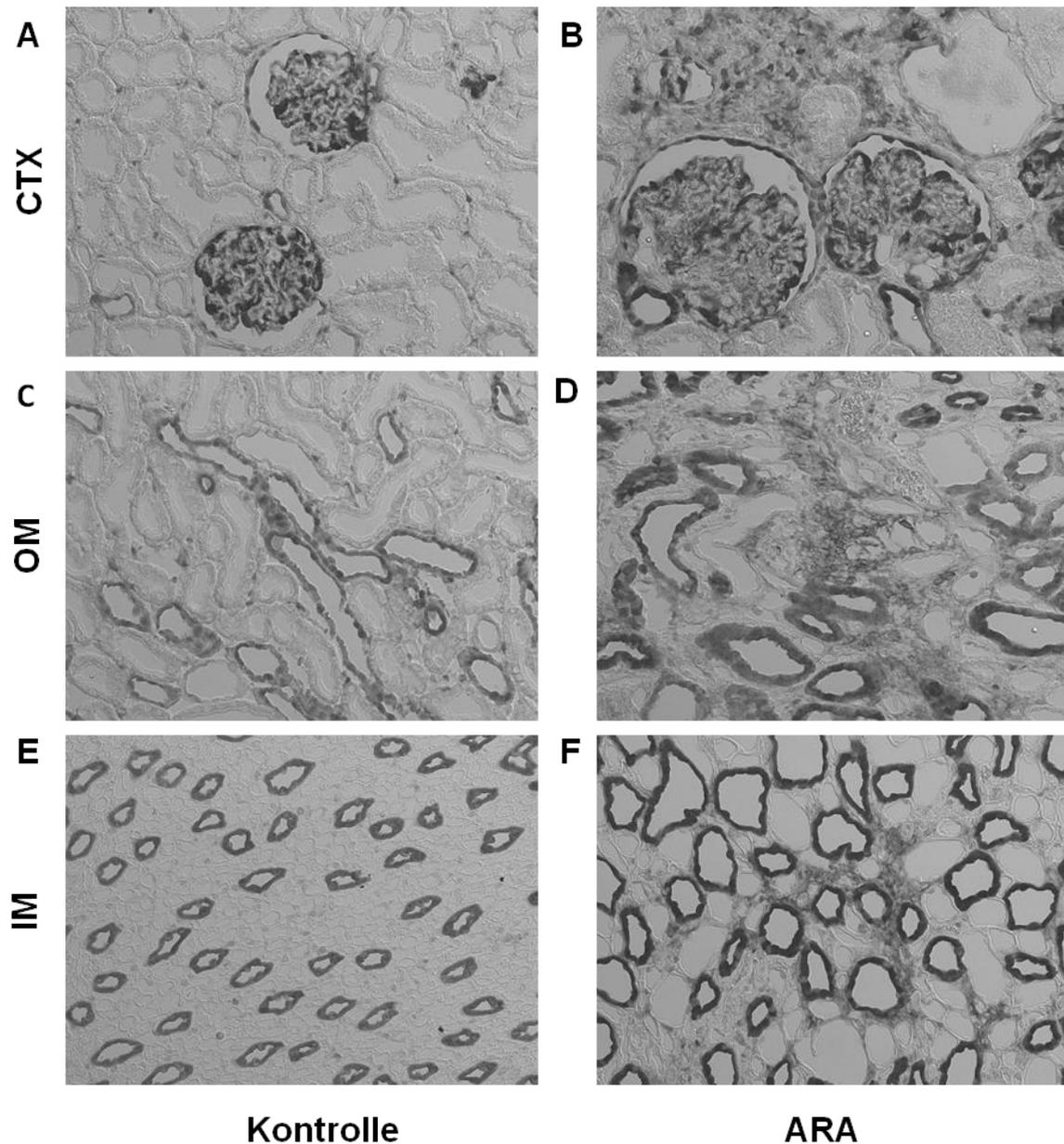
#### 4.2.2 Renale Annexin A1-Expression in mit ARA behandelten Ratten

Eine Untersuchung der Annexin A1 mRNA Expression mittels Taqman®-basierter Real-Time PCR zeigte eine signifikante Erhöhung der Annexin A1 mRNA Menge bei den mit ARA behandelten Ratten im Vergleich zu ihren Kontrollen. Die Annexin A1 mRNA war bei den mit ARA behandelten Ratten um das 2,9-fache ( $\pm 0,335$ ) erhöht. D.h. bei Ratten mit Niereninsuffizienz zeigte sich eine signifikante Hochregulation der Annexin A1 mRNA im Gesamtnierenhomogenat.



**Abbildung 13:** Darstellung der Annexin A1 mRNA Expression im Nierenhomogenat von mit ARA behandelten Ratten und ihren Kontrollen, Die Menge der Annexin A1 mRNA ist bei den mit ARA behandelten Ratten signifikant erhöht (2,9-fach  $\pm 0,335$ ;  $p < 0,01$ ). Die Anzahl der Proben liegt bei  $n=8$ ; Mittelwert  $\pm$  SEM.

Diese Resultate wurden durch immunhistochemische Färbungen mit einem anti-Annexin A1 Antikörper und einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper verifiziert. Die mit ARA behandelten Ratten zeigten im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren eine erhöhte renale Annexin A1-Expression. Auffallend war, dass mit der Expansion des renalen Interstitiums eine vermehrte Annexin A1 Immunreaktivität assoziiert war. In den mit ARA behandelten Ratten fanden sich in allen Bereichen der Niere (Kortex, äußere Medulla, innere Medulla) interstitiell mehr Annexin A1-positive Zellen als in den Kontrolltieren. In Arealen mit zerstörtem funktionellem Parenchym war eine besonders starke Annexin A1-Immunreaktivität zu erkennen. Die gesteigerte Annexin A1-Immunreaktivität war einerseits auf stark geschädigte Tubulusabschnitte, die eine vermehrte Annexin A1-Immunreaktivität aufweisen, und andererseits auf eine deutliche Zunahme von Annexin A1-immunreaktiven interstitiellen Zellen zurückzuführen. Die renale Annexin A1-Expression der alten Kontrolltiere glich dem unter 4.2.1 beschriebenen Annexin A1-Verteilungsmuster in der Niere junger Kontrolltiere. Diese Befunde sind in Abbildung 14 dargestellt.



**Abbildung 14:** Vergleichende Darstellung der Annexin A1-Expression in mit ARA behandelten Ratten und ihren Kontrollen

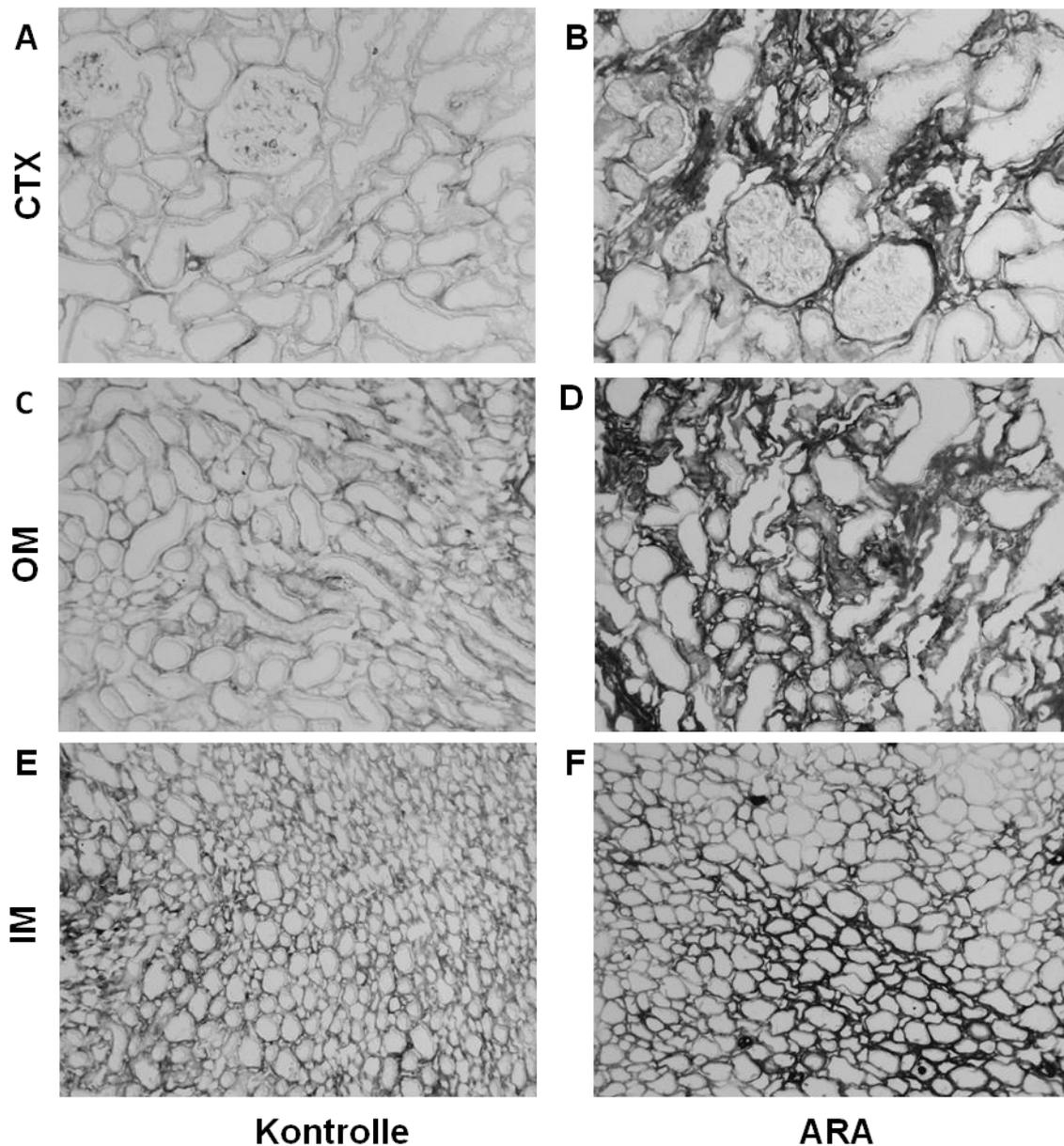
Die lichtmikroskopischen Abbildungen zeigen die Nierenbereiche des Kortex (CTX; A/B), der äußeren Medulla (OM; C/D) und der inneren Medulla (IM; E/F) von Kontrolltieren (A/C/E) und mit ARA behandelten Ratten (B/D/F). In A ist die kortikale Annexin A1-Immunreaktivität gezeigt. Im Kortex der mit ARA behandelten Ratte (B) findet eine verstärkte interstitielle Annexin A1-Immunreaktivität. Die Glomeruli sehen verändert aus. In C ist das physiologische Annexin A1-Verteilungsmuster der äußeren Medulla eines Kontrolltieres gezeigt. In der äußeren Medulla der mit ARA behandelten Ratte (D) ist das funktionelle Gewebe großflächig zerstört. In diesem Bereich wird interstitiell vermehrt Annexin A1 exprimiert. E zeigt die Annexin A1-Expression in der inneren Medulla eines Kontrolltieres. Die innere Medulla der ARA-Ratte (F) weist im Gegensatz zur Kontrolle stellenweise Areale mit interstitieller Annexin A1-Immunreaktivität auf. Immunhistochemie, x200

#### **4.2.3 Interstitielle Annexin A1-Expression in mit ARA behandelten Ratten**

Bei den mit ARA behandelten Ratten traten fibrotische Veränderungen des renalen Parenchyms und chronische inflammatorische Infiltrationen parallel auf. Zudem zeigten die mit ARA behandelten Ratten eine signifikant gesteigerte renale Annexin A1-Expression. Basierend auf der Annexin A1-Lokalisation bestand die Vermutung, dass unter anderem Fibroblasten eine Quelle der gesteigerten Annexin A1-Expression in mit ARA behandelten Ratten sein könnten. Bisher sind die, in mit ARA behandelten Ratten auftretenden, Annexin A1-positiven interstitiellen Zellen nicht identifiziert. Nachfolgend wurden die Annexin A1-reaktiven interstitiellen Zellen charakterisiert.

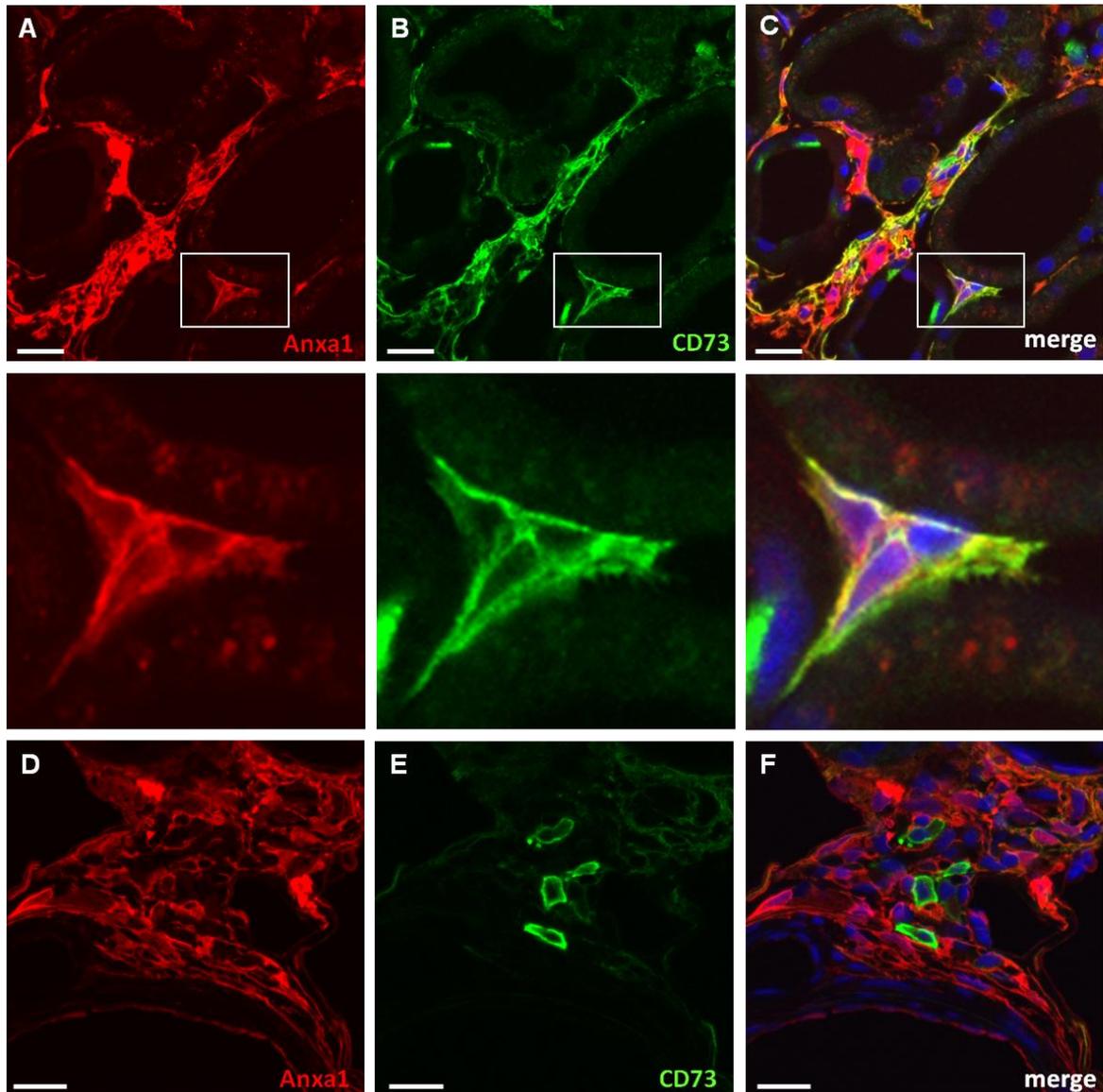
Die immunhistochemische Färbung mit dem gut etablierten Marker für kortikale Fibroblasten CD73 (Kaissling et al. 1996) zeigte, dass die mit ARA behandelten Ratten über die gesamte Niere eine deutlich gesteigerte CD73-Expression interstitieller Fibroblasten aufwiesen. Im Vergleich zu Kontrolltieren zeigten die mit ARA behandelten Ratten eine deutlich gesteigerte Anzahl an CD73-positiven Fibroblasten im renalen Interstitium. Vor allem im Bereich des Kortex und der äußeren Medulla lagen bei mit ARA behandelten Ratten vermehrt CD73-positive Fibroblasten vor. In diesen Nierenarealen fanden sich deutliche fibrotische Veränderungen und inflammatorische Infiltrationen. Diese Befunde sind in Abbildung 15 dargestellt.

Wie immunhistochemisch gezeigt waren bei mit ARA behandelten Ratten im Vergleich zu den Kontrolltieren interstitiell deutlich mehr CD73-positive Fibroblasten zu finden. Mit einer Doppelimmunfluoreszenzfärbung konnten die CD73-positiven Fibroblasten als Quelle interstitieller Annexin A1-Signale identifiziert werden. Nahezu alle CD73-positiven Fibroblasten zeigten eine Annexin A1-Immunreaktivität. CD73-positive Fibroblasten machten den Großteil der Annexin A1-positiven interstitiellen Zellen aus. Allerdings fanden sich auch einige interstitielle CD73-positive Fibroblasten, die kein Annexin A1-Signal zeigten. Diese CD73-positiven und Annexin A1-negativen Fibroblasten fanden sich häufig perivaskulär und periglomerulär. Diese Befunde sind in Abbildung 16 dargestellt. Aufgrund morphologischer Charakteristika handelte es sich dabei vermutlich um Myofibroblasten (Kriz, Kaissling, und Le Hir 2011). Bisher unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe von J. Salazar belegen, dass Myofibroblasten im Interstitium von mit ARA behandelten Ratten vorkommen (Manuskript: Saez et al 2013). Im Gegensatz dazu zeigten alle CD73-positiven Fibroblasten der unbehandelten Kontrolltiere eine Annexin A1-Immunreaktivität (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 15:** Vergleichende Darstellung der CD73-Expression in mit ARA behandelten Ratten und ihren Kontrollen

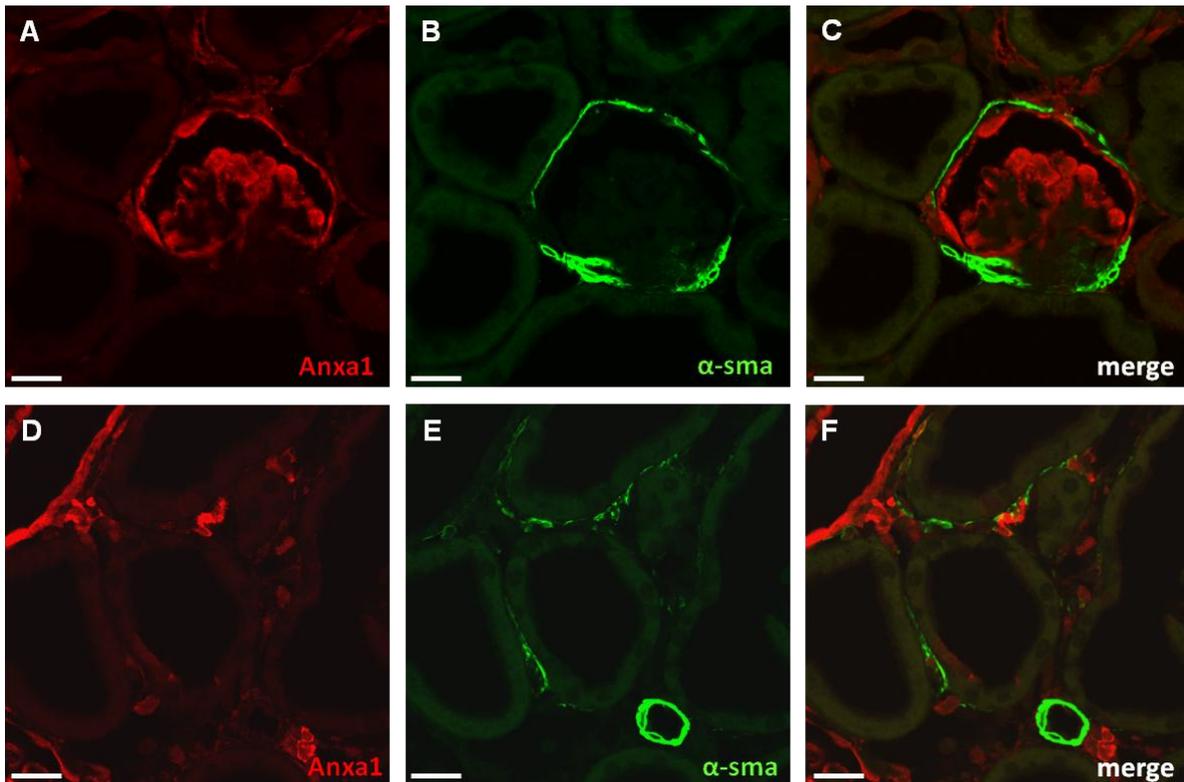
Die lichtmikroskopischen Abbildungen zeigen die Nierenbereiche des Kortex (CTX; A/B), der äußeren Medulla (OM; C/D) und der inneren Medulla (IM; E/F) von Kontrolltieren (A/C/E) und mit ARA behandelten Ratten (B/D/F). Im Kortex des Kontrolltieres (A) sind zwei gesunde Glomeruli zu erkennen. Es findet sich eine peritubuläre und periglomeruläre Verteilung des CD73-Signals. Im Kortex der mit ARA behandelten Ratte (B) sind zwischen degenerierten Tubuli große Areale mit CD73-Immunreaktivität zu erkennen. In diesen Bereichen liegen sehr viele Fibroblasten vor. C zeigt das physiologische Verteilungsmuster von CD73 in der äußeren Medulla. In der äußeren Medulla der mit ARA behandelten Ratte (D) ist nahezu die Hälfte des funktionellen Gewebes durch großflächige Areale mit CD73-Immunreaktivität ersetzt. E stellt dar, dass nur wenige CD73-positive Fibroblasten in der inneren Medulla eines Kontrolltieres zu finden sind. In der inneren Medulla der ARA-Ratte (F) finden sich kaum mehr Fibroblasten als im Kontrolltier. Immunhistochemie, x200



**Abbildung 16:** Exemplarische Darstellung der Doppelimmunfluoreszenz von Annexin A1 und CD73 im Kortex einer mit ARA behandelten Ratte

In der Immunfluoreszenzdoppelfärbung ist Annexin A1 (A/D) in Rot und CD73 (B/E) in Grün dargestellt. A zeigt Annexin A1-positive interstitielle Zellen. In B sind alle kortikalen CD73-positiven Fibroblasten grün gefärbt. C zeigt, dass Annexin A1 und CD73 in hohem Maße kolokalisiert sind. Die Vergrößerung unten lässt die typische dreieckige Zellform der Fibroblasten erkennen. In D ist perivaskuläres Interstium zu sehen. Viele Zellen sind Annexin A1-positiv. B zeigt perivaskulär vier CD73-positive Fibroblasten. Diese Fibroblasten exprimieren, wie in F zu erkennen, kein Annexin A1. Die Skala entspricht 20µm.

Um Myofibroblasten zu identifizieren, wurde mit einem anti- $\alpha$ -sma Antikörper gefärbt.  $\alpha$ -sma ist ein Marker für Myofibroblasten und für glatte Muskelzellen. Bei mit ARA behandelten Ratten fanden sich interstitielle  $\alpha$ -sma-Signale von Myofibroblasten. Die Doppelimmunfluoreszenzfärbung von Annexin A1 und  $\alpha$ -sma zeigte, dass die interstitiellen  $\alpha$ -sma-Signale der Myofibroblasten nicht mit Annexin A1 kolokalisiert waren. Diese Befunde sind in Abbildung 17 dargestellt. Daher kann davon ausgegangen werden, dass Myofibroblasten *in vivo* kein Annexin A1 exprimieren.

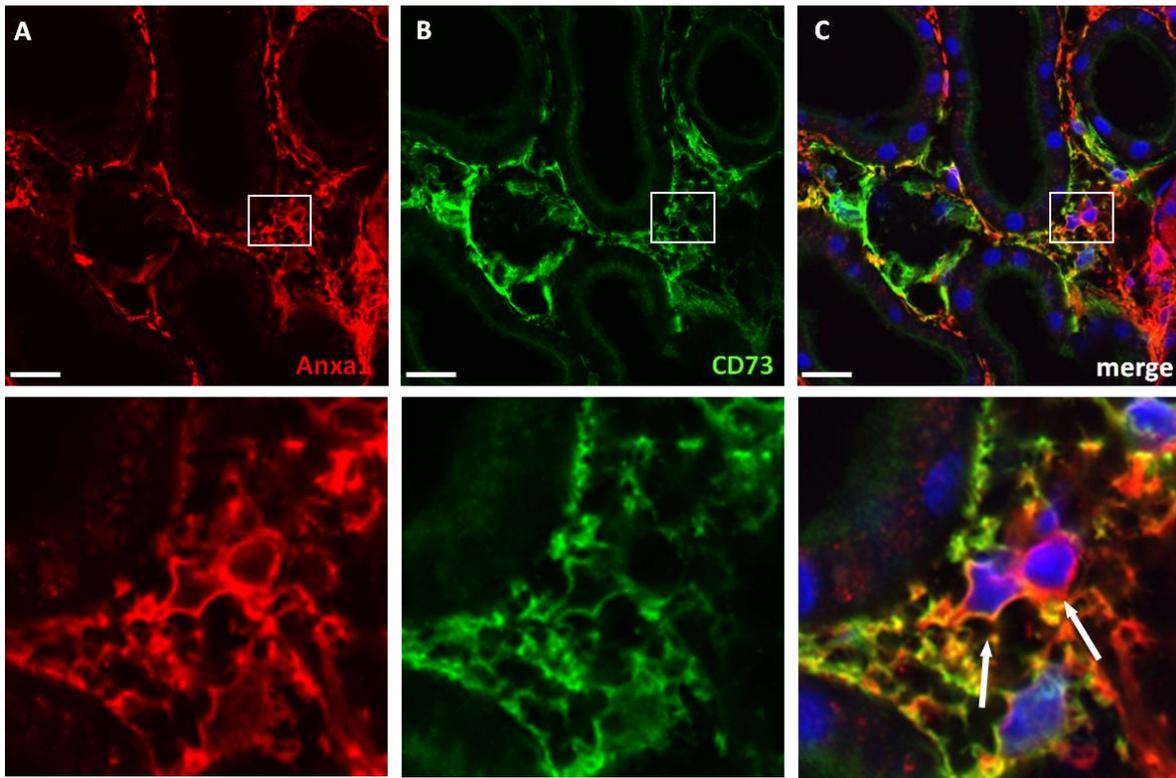


**Abbildung 17:** Exemplarische Darstellung der Doppelimmunfluoreszenz von Annexin A1 und  $\alpha$ -sma im Kortex einer mit ARA behandelten Ratte

In der Immunfluoreszenzdoppelfärbung ist Annexin A1 (A/D) in Rot und  $\alpha$ -sma (B/E) in Grün dargestellt. In A ist zu erkennen, dass die Bowman'sche Kapsel und die Podozyten dieses Glomerulus Annexin A1 exprimieren. B zeigt  $\alpha$ -sma-positive periglomeruläre Myofibroblasten. Periglomeruläre Myofibroblasten weisen auf einen Defekt des Glomerulus hin. C zeigt, dass beide Marker nicht kolokalisiert sind. In D ist die Annexin A1-Färbung abgebildet und zeigt interstitielle Signale. E zeigt interstitielle Myofibroblasten. In F ist keine Kolokalisation beider Antikörper zu erkennen. Die Skala entspricht 20 $\mu$ m.

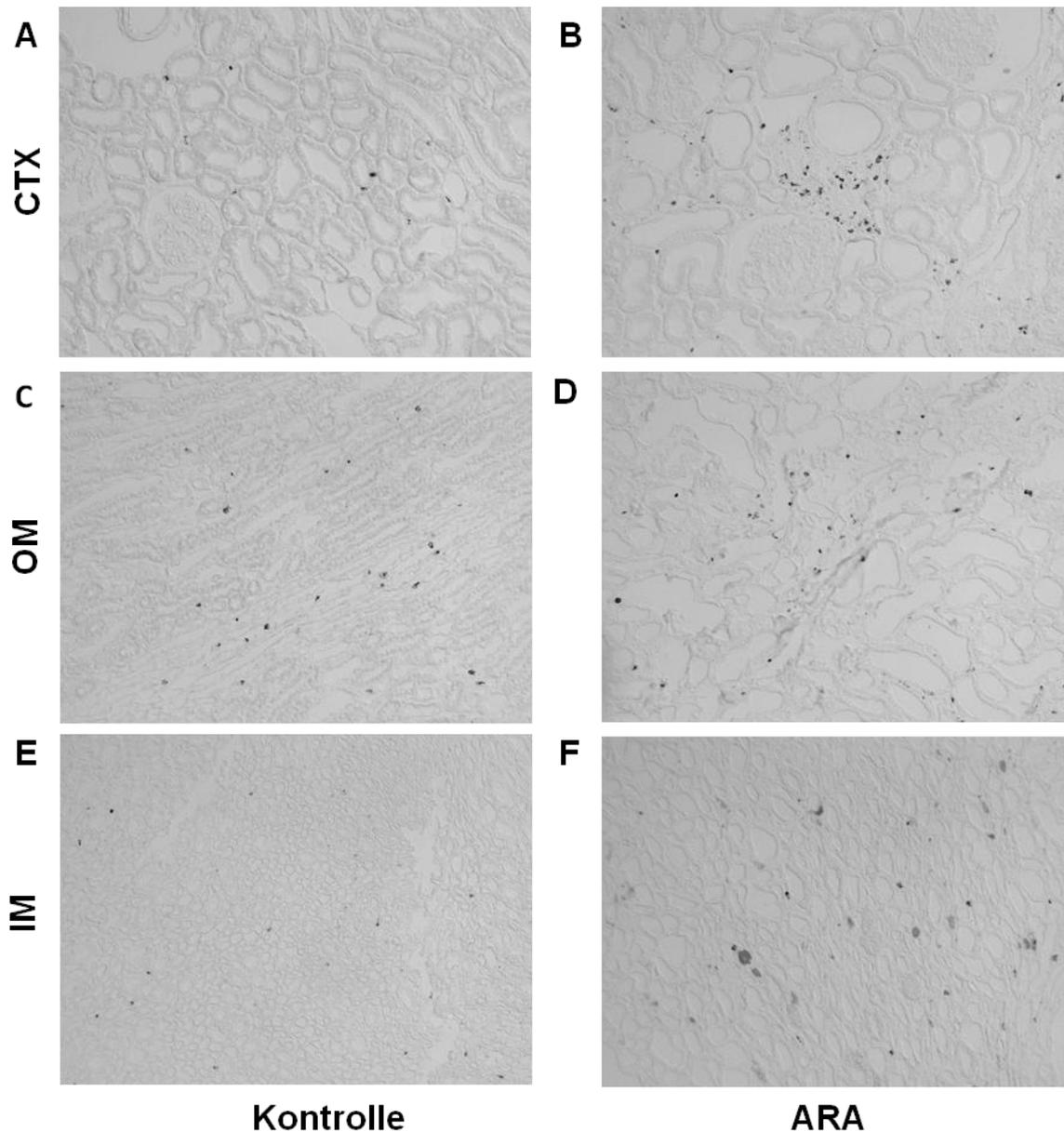
Im Kontrolltier ließen sich nur die glatten Muskelzellen großer Gefäße mit einem anti- $\alpha$ -sma Antikörper anfärben. In den glatten Muskelzellen waren beide Marker nicht kolokalisiert (Daten nicht gezeigt).

Neben den CD73-positiven Fibroblasten exprimierten auch andere interstitielle Zellen Annexin A1. In der Doppelimmunfluoreszenzfärbung aus CD73 und Annexin A1 fanden sich Zellen, die kein CD73-Signal zeigten, jedoch eine Annexin A1-Immunreaktivität aufwiesen. Aufgrund ihrer Morphologie wurde vermutet, dass es sich hierbei um Zellen des Immunsystems im Bereich inflammatorischer Infiltrationen handelte. Diese Befunde sind in Abbildung 18 dargestellt.



**Abbildung 18:** Exemplarische Darstellung der Doppelimmunfluoreszenz von Annexin A1 und CD73 und Identifizierung weiterer Annexin A1-positiver Zellen im Kortex einer mit ARA behandelten Ratte. In der Immunfluoreszenzdoppelfärbung ist Annexin A1 (A) in Rot und CD73 (B) in Grün dargestellt. A zeigt Annexin A1-positiv interstitielle Zellen. In B sind alle kortikalen CD73-positiven Fibroblasten grün gefärbt. C zeigt, dass es Annexin A1-positiv Zellen im Interstitium gibt, die keine Fibroblasten sind. In der Vergrößerung (unten) ist zu erkennen (Pfeile), dass die rechte der beiden Zellen kein Fibroblast ist. Aufgrund der rundlichen Zellform scheint es sich hierbei um eine Zelle des Immunsystems zu handeln. Die Skala entspricht 20µm.

Neben den fibrotischen Veränderungen fielen in mit ARA behandelten Ratten morphologisch vor allem die vielen Areale inflammatorischer Infiltrationen auf. Mit einem Antikörper gegen CD68, als Marker für Makrophagen, wurde die interstitielle Makrophagen-Verteilung in den mit ARA behandelten Ratten untersucht. Mit ARA behandelte Ratten wiesen im Vergleich zu den Kontrolltieren eine deutlich gesteigerte Anzahl von CD68-positiven Makrophagen auf. Beim Kontrolltier fanden sich einige CD68-positiv Makrophagen im Interstitium und im Gefäßsystem. Mit ARA behandelte Ratten zeigten ein vermehrtes Auftreten von CD68-positiven Makrophagen im renalen Interstitium. In Arealen inflammatorischer Infiltration waren besonders viele CD68-positiv Makrophagen nachzuweisen. Am deutlichsten war der Unterschied der Makrophagen-Anzahl im Kortex. Aber auch in der äußeren Medulla fanden sich bei mit ARA behandelten Ratten mehr CD68-positiv Makrophagen als im Kontrolltier. Diese Befunde sind in Abbildung 19 dargestellt.

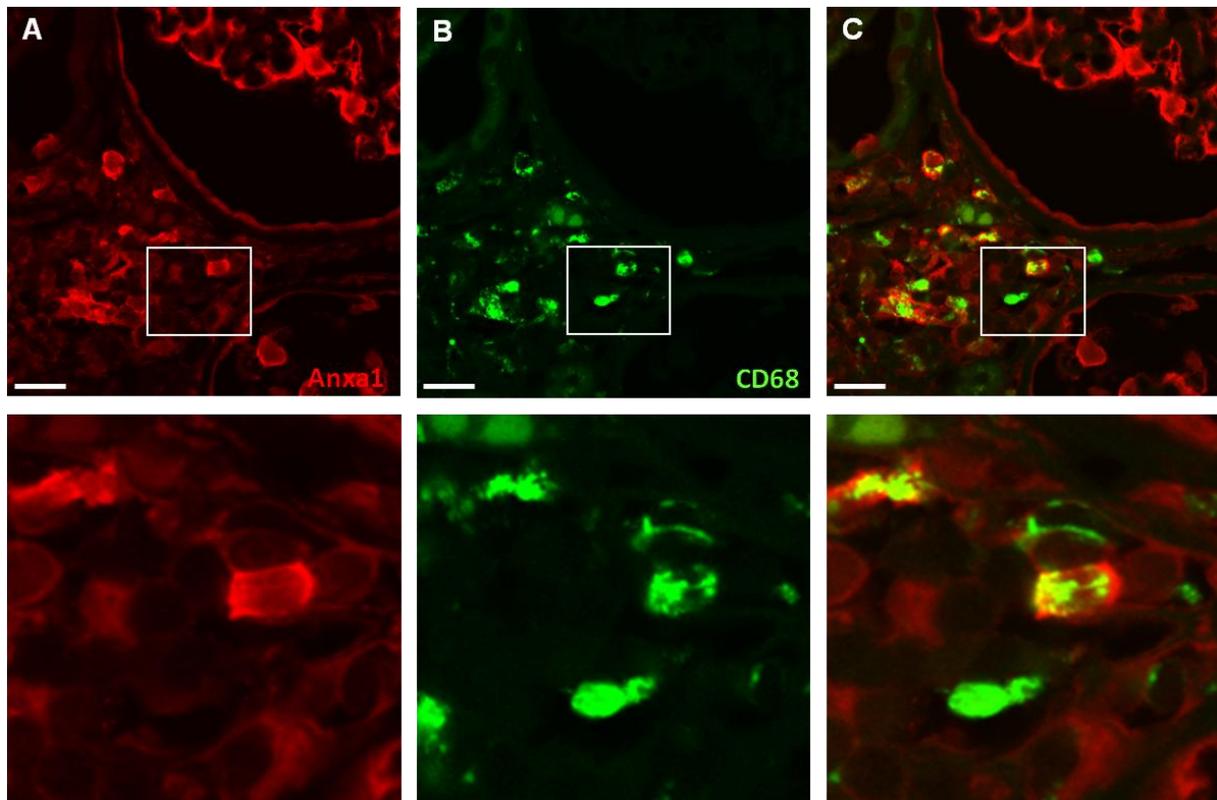


**Abbildung 19:** Vergleichende Darstellung der CD68-Expression in mit ARA behandelten Ratten und ihren Kontrollen

Die lichtmikroskopischen Abbildungen zeigen die Nierenbereiche des Kortex (CTX; A/B), der äußeren Medulla (OM; C/D) und der inneren Medulla (IM; E/F) von Kontrolltieren (A/C/E) und mit ARA behandelten Ratten (B/D/F). Im Kortex des Kontrolltieres (A) sind nur wenige CD68-positive Makrophagen zu erkennen. Im Kortex der mit ARA behandelten Ratte (B) finden sich periglomerulär und perivaskulär Areale inflammatorischer Infiltrationen, in denen sehr viele CD68-positive Makrophagen vorliegen. Der Kortex einer ARA-Ratte weist deutlich mehr CD68-positive Makrophagen auf. C zeigte ein physiologisches CD68-Verteilungsmuster in der äußeren Medulla. In der äußeren Medulla der ARA-Ratte (D) ist das funktionelle Gewebe großflächig zerstört. Auch hier sind bei der ARA-Ratte mehr CD68-positive Makrophagen als im Kontrolltier. Der Unterschied des Makrophagen-Vorkommens ist jedoch im Kortex am deutlichsten. In der inneren Medulla der ARA-Ratte (F) finden sich kaum mehr CD68-positive Makrophagen als im Kontrolltier. Vergrößerung 200x

Die mit ARA behandelten Ratten zeigten eine deutliche Zunahme an CD68-positiven Makrophagen im renalen Interstitium. In der Doppelimmunfluoreszenz zeigten diese CD68-positiven Makrophagen unterschiedliche Annexin A1-Expressionsmuster. Einige CD68-

positive Makrophagen zeigten eine Annexin A1-Immunreaktivität, andere nicht. Makrophagen-Subpopulationen unterschieden sich in ihrem Annexin A1-Expressionsmuster. Wahrscheinlich handelte es sich dabei um unterschiedliche Makrophagen-Phänotypen. Dies zu untersuchen ist Gegenstand eines aktuellen DFG-Antrags der Arbeitsgruppe von S. Bachmann. Diese Befunde sind in Abbildung 20 dargestellt.



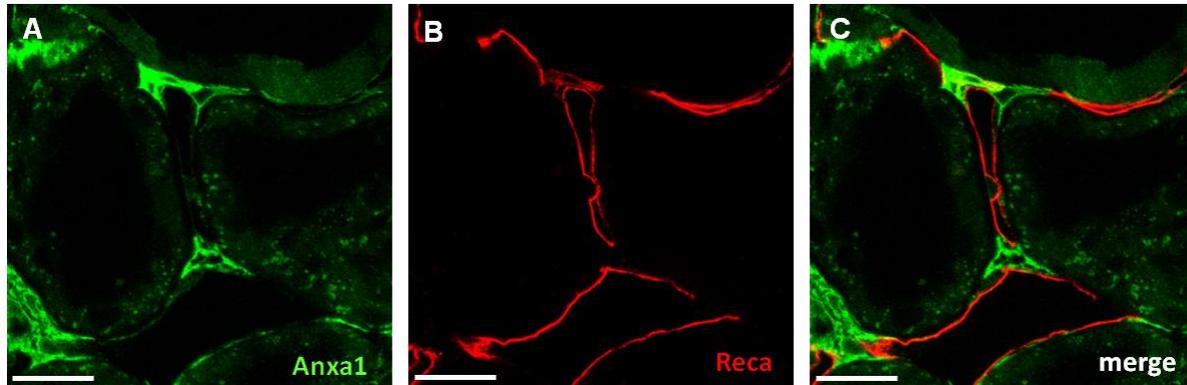
**Abbildung 20:** Exemplarische Darstellung der Doppelimmunfluoreszenz von Annexin A1 und CD68 im Kortex einer mit ARA behandelten Ratte

In der Immunfluoreszenzdoppelfärbung ist Annexin A1 (A) in Rot und CD68 (B) in Grün dargestellt. In A sind Annexin A1-positive Podozyten des Glomerulus und ein inflammatorisches Infiltrat zu erkennen. Einige dieser infiltrierten Zellen sind Annexin A1-positiv. In B ist zu erkennen, dass sich in dem entzündlichen Infiltrat einige Makrophagen befinden. In C erkennt man, dass einige Makrophagen Annexin A1-positiv sind. In der Vergrößerung unten ist zu sehen, dass ein Makrophage kein Annexin A1 exprimiert und zwei andere Makrophagen Annexin A1-positiv sind. Die Skala entspricht 20 µm.

Im gesunden Individuum fanden sich im Interstitium der Niere vereinzelte CD68-positiven Makrophagen, die alle Annexin A1 exprimierten (Daten nicht gezeigt).

Da Endothelien eine wichtige Rolle im Entzündungsgeschehen spielen, wurde weiter untersucht, ob endotheliale Zellen Annexin A1 exprimieren. Eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen Recla (*Rat endothelial cell antigen*) und Annexin A1 zeigte, dass beide Marker im Endothel peritubulärer und glomerulärer Kapillaren in mit ARA behandelten Ratten nicht kolokalisiert waren. Diese Befunde sind in Abbildung 21 dargestellt.

Annexin A1 konnte hingegen in Endothelzellen großer Arterien unregelmäßig nachgewiesen werden. Allerdings war dies kein behandlungsbedingter Unterschied zwischen den mit ARA behandelten Ratten und ihren Kontrollen. Kontrolltiere zeigten ebenfalls keine Annexin A1-Immunreaktivität im peritubulären und glomerulären Kapillarendothel (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 21:** Exemplarische Darstellung der Doppelimmunfluoreszenz von Annexin A1 und Reca im Kortex einer mit ARA behandelten Ratte

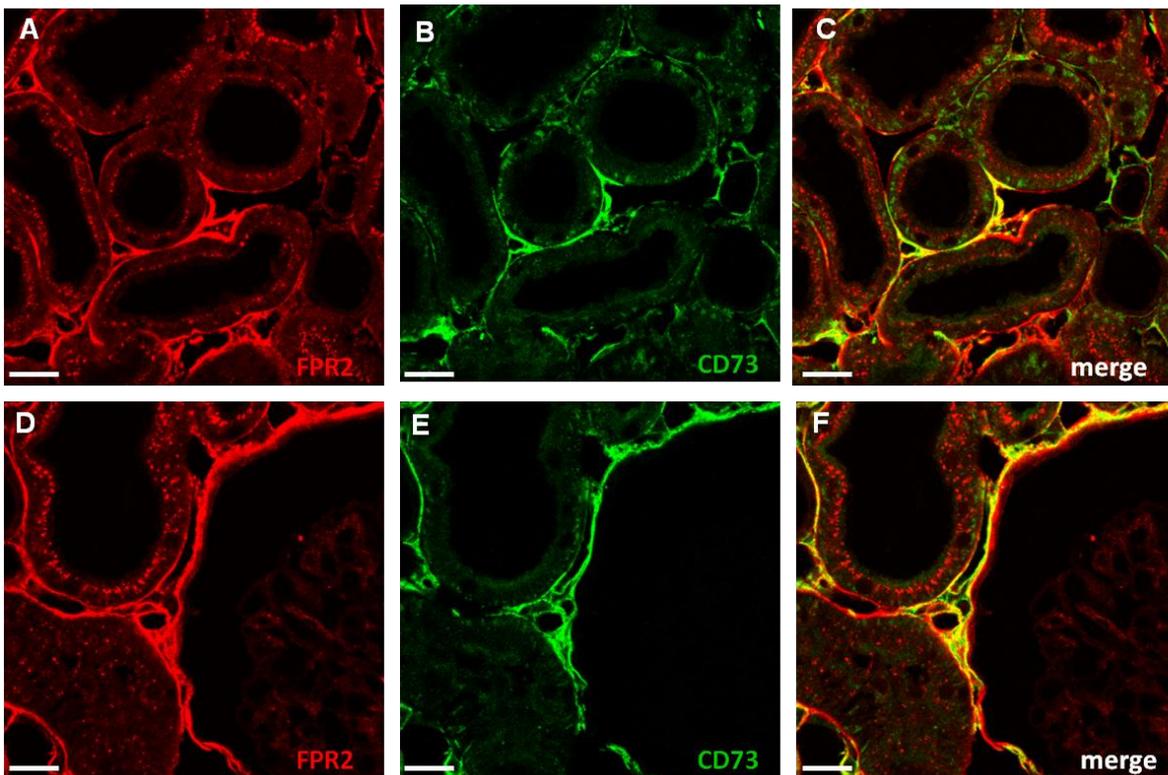
In der Immunfluoreszenzdoppelfärbung ist Annexin A1 (A) in Grün und Reca (B) in Rot dargestellt. In A erkennt man die interstitielle Annexin A1-Färbung. In B sind die peritubulären Kapillarendothelien angefärbt. C zeigt keine Kolo-kalisation beider Marker in der Überlagerung. Kapillarendothelzellen exprimieren kein Annexin A1. Die Skala entspricht 20 µm.

#### 4.3 Renale Expression des Annexin A1-Rezeptors FPR2 in mit ARA behandelten Ratten

Die Lokalisation des Annexin A1-Rezeptors FPR2 wurde durch Immunfluoreszenzdoppelmarkierungen an Kryostatschnitten von Nierengewebe durchgeführt.

CD73-positive Fibroblasten konnten als Hauptquelle der gesteigerten Annexin A1-Immunreaktivität in mit ARA behandelten Ratten identifiziert werden. Mit der Doppelimmunfluoreszenzfärbung aus FPR2 und CD73 wurde untersucht ob CD73-positive Fibroblasten neben Annexin A1 auch den FPR2 exprimieren. Der FPR2 zeigte bei den mit ARA behandelten Ratten ein rein interstitielles Verteilungsmuster. Alle CD73-positiven Fibroblasten exprimierten den Annexin A1-Rezeptor FPR2. Diese Befunde sind in Abbildung 22 dargestellt.

In gesunden Kontrolltieren exprimierten ebenfalls alle CD73-positiven Fibroblasten den FPR2. FPR2 war nur interstitiell lokalisiert (Daten nicht gezeigt).

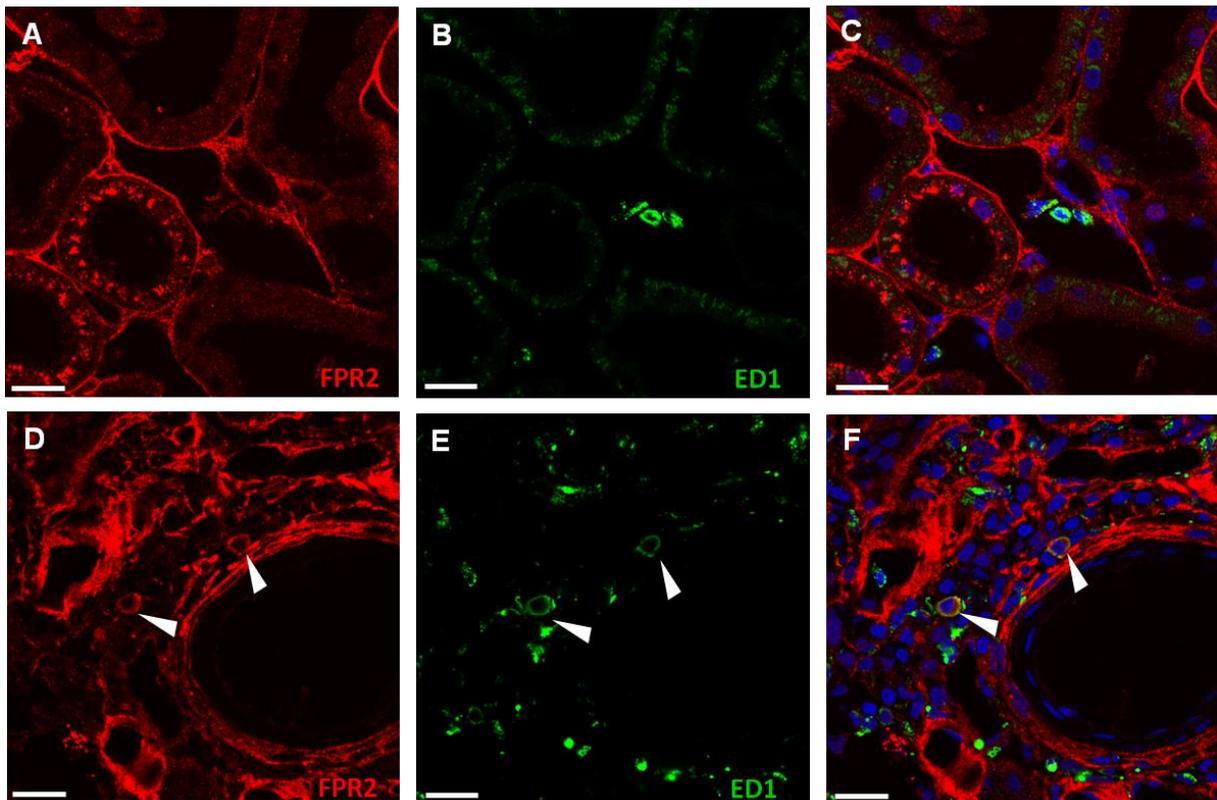


**Abbildung 22:** Exemplarische Darstellung der Doppelimmunfluoreszenz von FPR2 und CD73 im Kortex einer mit ARA behandelten Ratte

In der Immunfluoreszenzdoppelfärbung ist FPR2 (A/D) in Rot und CD73 (B/E) in Grün dargestellt. In A ist die rein interstitielle FPR2-Verteilung zu erkennen. In B sind interstitielle CD73-positive Fibroblasten angefärbt. C zeigt eine hochgradige Kolokalisation beider Marker. Interstitielle Fibroblasten exprimieren den FPR2. In D ist eine starke periglomeruläre Färbung des FPR2 zu erkennen. In E sind interstitielle und periglomeruläre CD73-positive Fibroblasten angefärbt. F zeigt eine Kolokalisation beider Marker. Die Skala entspricht 20 µm.

Neben CD73-positiven Fibroblasten traten auch CD68-positive Makrophagen in den mit ARA behandelten Ratten deutlich vermehrt auf. In den mit ARA behandelten Ratten zeigten die CD68-positiven Makrophagen im Interstitium oder in Gefäßen gesunder Nierenareale keine FPR2-Expression. In Nierenarealen mit inflammatorischer Infiltrationen fanden sich vereinzelte CD68-positive Makrophagen, die FPR2 exprimierten. Der Phänotyp der Makrophagen scheint verantwortlich zu sein für die Proteinexpression sowohl von Annexin A1 als auch von FPR2.

In gesunden Kontrolltieren waren alle CD68-positiven Makrophagen negativ für FPR2 (Daten nicht gezeigt).

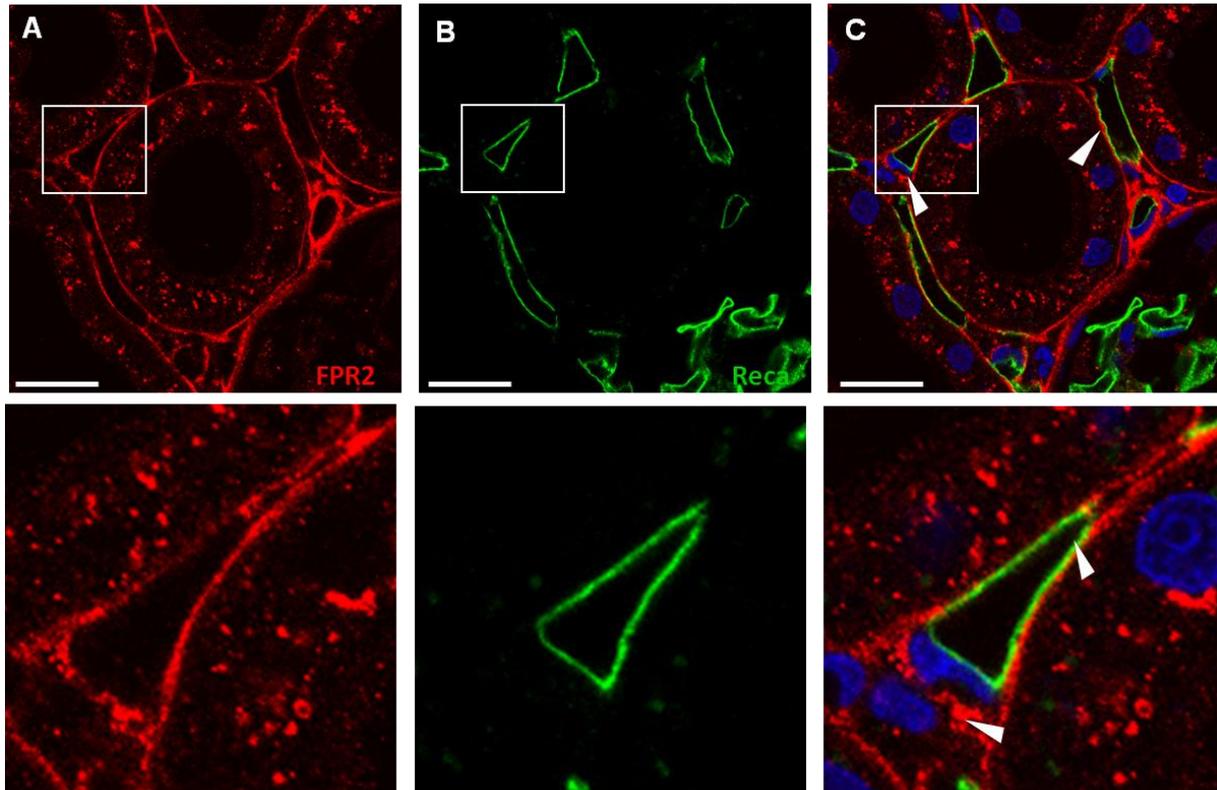


**Abbildung 23:** Exemplarische Darstellung der Doppelimmunfluoreszenz von FPR2 und CD68 im Kortex einer mit ARA behandelten Ratte

In der Immunfluoreszenzdoppelfärbung ist FPR2 (A/D) in Rot und ED1 (B/E) in Grün dargestellt. A, B und C zeigen das renale Interstitium eines gesunden Nierenareals einer mit ARA behandelten Ratte. In A ist das interstitielle FPR2-Verteilungsmuster abgebildet. In B sind CD68-positive Makrophagen angefärbt. C zeigt, dass beide Marker hier nicht kolokalisiert sind. Diese CD68-positiven Makrophagen exprimieren kein FPR2. D, E und F zeigen ein geschädigtes Nierenareal einer mit ARA behandelten Ratte. In D ist die FPR2-Immunreaktivität im perivaskulären Interstitium zu erkennen. In E sind CD68-positive Makrophagen in einem Areal inflammatorischer Infiltration abgebildet. Wie in F zu erkennen, zeigen zwei der CD68-positiven Makrophagen (Pfeile) eine FPR2-Immunreaktivität. Die Skala entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

Die FPR2-Immunreaktivität der Endothelzellen wurde durch eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung mit einem anti-Reca Antikörper charakterisiert. Bei den mit ARA behandelten Ratten zeigten Endothelzellen des glomerulären Kapillarschlingenkonvolutes keine FPR2-Immunreaktivität. Interstitielle Kapillaren zeigten eine FPR2-Immunreaktivität. Bei großer Vergrößerung fiel auf, dass Kapillaren des renalen Interstitiums apikal Reca exprimierten und basolateral den FPR2 trugen. Diese Befunde sind in Abbildung 24 dargestellt.

In gesunden Kontrolltieren waren die peritubulären Kapillarendothelzellen FPR2-positiv (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 24:** Exemplarische Darstellung der Doppelimmunfluoreszenz von FPR2 und Reca im Kortex einer mit ARA behandelten Ratte

In der abgebildeten Immunfluoreszenzdoppelfärbung ist FPR2 (A/D) in Rot und ED1 (B/E) in Grün dargestellt. In A ist die interstitielle FPR2-Verteilung abgebildet. In B sind Endothelzellen angefärbt. C zeigt, dass die beiden Signale dicht beieinander liegen (Pfeile). Auf den unterhalb liegenden Vergrößerungen ist zu erkennen, dass der Endothelzellkern die beiden Signale trennt (Pfeile). Zu vermuten ist, dass Reca apikal lokalisiert ist und FPR2 basolateral. Die Skala entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass mit ARA behandelte Ratten typische Anzeichen einer chronischen Nierenschädigung aufwiesen. Mit ARA behandelte Ratten zeigten eine gesteigerte Annexin A1-Expression und wiesen interstitiell deutlich mehr CD73-positive Fibroblasten und CD68-positive Makrophagen auf. In gesunden und kranken Tieren machten CD73-positive Fibroblasten den Hauptanteil der Annexin A1-positiven Zellen im renalen Interstitium aus. Alle CD73-positiven Fibroblasten exprimierten außer Annexin A1 auch den FPR2.  $\alpha$ -sma-positive Myofibroblasten zeigten keine Annexin A1-Immunreaktivität.

Neben den Fibroblasten trugen CD68-positive Makrophagen zu der gesteigerten Annexin A1-Expression der mit ARA behandelten Ratten bei. In Nierenarealen mit inflammatorischer Infiltration fanden sich Subpopulationen an CD68-positiven Makrophagen, die kein Annexin A1 exprimierten. Subpopulationen von CD68-positiven Makrophagen exprimierten den FPR2. Peritubuläre und glomeruläre Kapillarendothelzellen exprimierten kein Annexin A1. Peritubuläre Kapillarendothelzellen exprimierten im Gegensatz zu den glomerulären Kapillarendothelzellen basolateral den FPR2. Diese Befunde sind in Tabelle 15 dargestellt.

**Tabelle 30:** Zusammenfassung der Annexin A1- und FPR2-Immunreaktivität interstitieller Zellen in mit ARA behandelten Ratten und ihren Kontrollen

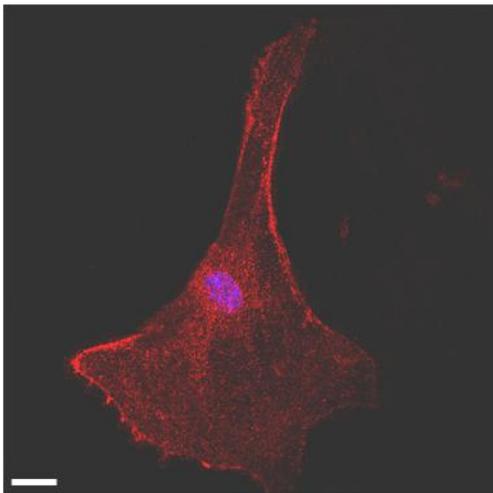
Zelltyp	mit ARA behandelten Ratten		Kontrolltiere	
	Annexin A1-Expression	FPR2-Expression	Annexin A1-Expression	FPR2-Expression
CD73-positive Fibroblasten	ja ein Großteil	ja	ja	ja
$\alpha$ -sma-positive Myofibroblasten	nein	/	keine vorhanden	keine vorhanden
CD68-positive Makrophagen	ja Subpopulationen	ja Subpopulationen	ja	nein
peritubuläre Kapillar-endothelzellen	nein	ja	nein	ja
glomeruläre Kapillar-endothelzellen	nein	nein	nein	nein

Ein zentraler Befund der Lokalisation der interstitiellen Annexin A1- und FPR2-Expression war, dass CD73-positive Fibroblasten sowohl Annexin A1 als auch seinen Rezeptor FPR2 exprimierten. Die Funktion des Annexin A1 in renalen kortikalen Fibroblasten ist bisher noch nicht untersucht. Gegenstand der nachfolgenden funktionellen Arbeiten war es, die Regulation des Annexin A1/FPR2 Systems in renalen kortikalen Fibroblasten zu untersuchen.

#### 4.4 Isolation und Charakterisierung renaler kortikaler Mausfibroblasten

Zur Isolation und Etablierung der Fibroblastenlinien mRCF und Anxa1  $-/-$  wurden die Zellen eines gesamten Nierenkortex einer Bl6/2 Maus oder einer Annexin A1-defizienten Maus nach enzymatischem Aufschluss und verschiedenen Reinigungsschritten auf eine Zellkulturflasche ausgebracht. Nach 24 Stunden waren bereits einige Primärfibroblasten adhärent und nahmen die typische spindelförmige Fibroblastenzellform an. Nach etwa einer Woche erreichten die Zellen eine 100%ige Konfluenz und wurden passagiert. Fibroblasten, die nicht immortalisiert wurden, zeigten ein hohes Maß an Heterogenität in Bezug auf ihr Teilungsverhalten und ihren Phänotyp. Aus Gründen der Reproduzierbarkeit wurden die Fibroblasten in Passage 3 immortalisiert. Kortikale Fibroblasten proliferieren generell schneller als die Epithelzellen des proximalen- und distalen Tubulus und die Endothelzellen der Gefäße. Somit wurde durch das Prinzip der Überwucherung nach drei Passagen ausgeschlossen, dass sich bei der Immortalisierung noch andere Zelltypen des kortikalen Nierenparenchyms in der Zellkultur befinden. Erst durch die Immortalisierung der Fibroblasten mit SV40 konnte eine Stabilität der Kultur erreicht werden.

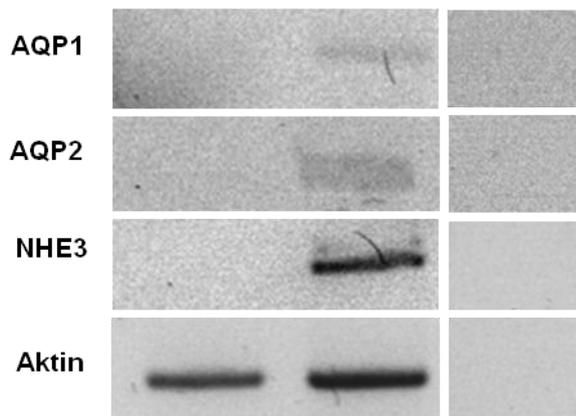
Zur Qualitätskontrolle wurden die mRCF- und die Anxa1 <sup>-/-</sup> Zelllinie zunächst auf Reinheit überprüft. Eine immunhistochemische Färbung mit CD73, dem Marker für kortikale Fibroblasten, zeigte dass alle Zellen eine CD73-Immunreaktivität aufwiesen. Neben den interstitiellen Fibroblasten exprimieren auch Lymphozyten, Zellen des proximalen Tubulus und Schaltzellen des Sammelrohrs CD73 (Kaissling et al. 1996; Kaissling, Le Hir, und Kriz 2013). Allerdings lassen sich diese Zellen morphologisch gut von den Fibroblasten unterscheiden. Aufgrund der CD73-Immunreaktivität und der Morphologie konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei der etablierten mRCF- und der Anxa1 <sup>-/-</sup> Fibroblastenlinie um kortikale Fibroblasten handelte.



**Abbildung 25:** Exemplarische Darstellung der Immunfluoreszenzfärbung von CD73 zur Verifizierung der kortikalen Fibroblastenzelllinie mRCF. Die Immunfluoreszenzfärbung zeigt, dass diese mRCF-Zelle CD73 exprimiert. Aufgrund der CD73-Immunreaktivität und morphologischer Charakteristika kann davon ausgegangen werden, dass es sich um einen kortikalen Fibroblasten handelt. Der Zellkern ist mit DAPI blau angefärbt. Die Skala entspricht 20 µm.

Weiter wurde die Reinheit der mRCF Zellkultur mittels Endpunkt PCR-Methodik untersucht. Es sollte ausgeschlossen werden, dass sich Zellen des proximalen Tubulus oder des kortikalen Sammelrohres in der mRCF Zellkultur befinden. Aquaporin 1 (AQP1) und Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscher 3 (NHE3) sind Marker für den proximalen Tubulus. Aquaporin 2 (AQP2) ist ein spezifischer Marker für das Sammelrohr.

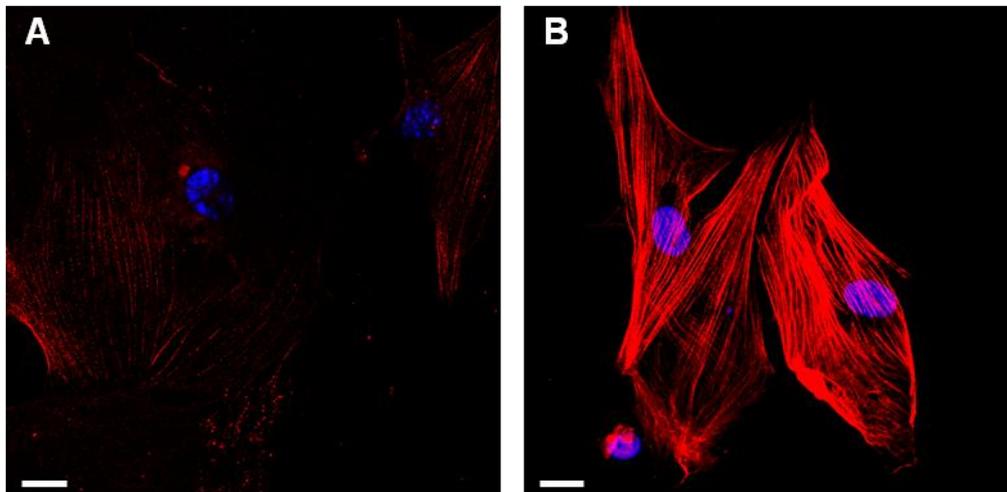
Die Endpunkt PCR zeigte keine Amplifikation der mRCF cDNA mit den Primern von AQP1, AQP2 und NHE3. Jedoch war die mRCF cDNA generell amplifizierbar, wie die Kontrolle mit Aktin-Primern zeigte. cDNA aus einem Gesamtnierenhomogenat einer Maus war mit jedem Primerpaar vervielfältigbar. Es konnte ausgeschlossen werden, dass sich in der mRCF Zellkultur unerwünschte proximale Tubuluszellen oder Zellen des kortikalen Sammelrohres befinden.



**Abbildung 26:** Darstellung der AQP1, AQP2 und NHE3 mRNA Expression in mRCF cDNA (Fibroblasten) und cDNA eines Gesamtnierenhomogenates der Maus (Maus) mit Negativkontrollen (NTC)

Die mRCF cDNA zeigt keine Amplifikation von AQP1, AQP2 und NHE3. Es ist davon auszugehen, dass keine proximalen Tubuluszellen oder kortikale Sammelrohrzellen in der etablierten mRCF Zellkulturlinie vorliegen. Die cDNA des Gesamtnierenhomogenates der Maus führt zur Amplifikation von AQP1, AQP2 und NHE3. Die Aktinbanden zeigen, dass beide cDNA Proben generell amplifizierbar sind. Alle NTC sind negativ.

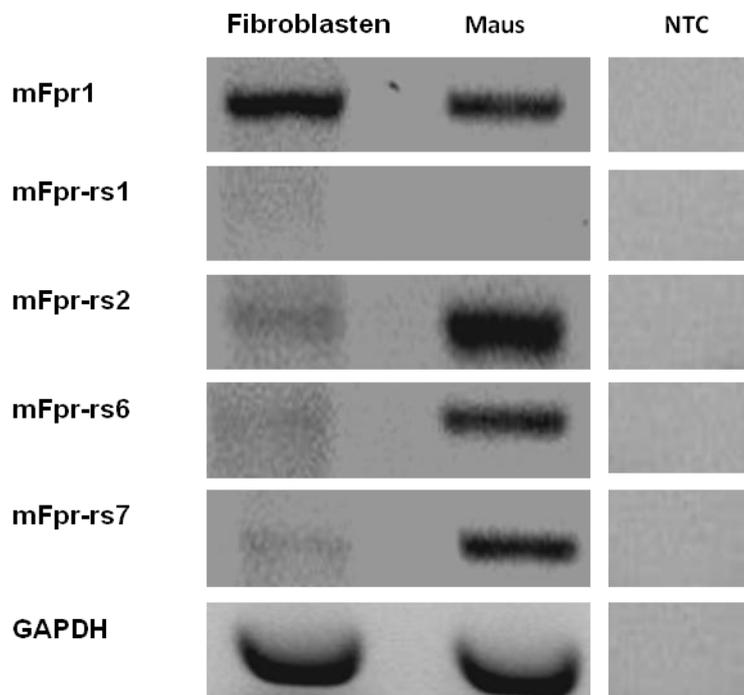
Außerdem wurden die mRCF Fibroblasten mit TGF- $\beta$  behandelt. Eine pro-fibrotische Behandlung induziert in Fibroblasten eine Steigerung der  $\alpha$ -sma Biosynthese. Nach TGF- $\beta$  Behandlung wurden die mRCF Fibroblasten mit einem anti- $\alpha$ -sma Antikörper angefärbt. Die Immunfluoreszenzfärbung zeigte deutlich eine durch TGF- $\beta$  induzierte Steigerung der  $\alpha$ -sma Abundanz in den mRCF Fibroblasten. Auch Myoepithelzellen steigern unter pro-fibrotischen Konditionen die  $\alpha$ -sma Biosynthese, jedoch exprimieren Myoepithelzellen kein CD73. Somit konnte auch die  $\alpha$ -sma Immunfluoreszenzfärbung bestätigen, dass es sich bei den mRCF um Fibroblasten handelte. Diese Befunde sind in Abbildung 27 dargestellt.



**Abbildung 27:** Exemplarische Darstellung der Immunfluoreszenzfärbung von  $\alpha$ -sma zur Untersuchung der  $\alpha$ -sma Biosynthese in mRCF Fibroblasten

Die Immunfluoreszenzfärbung zeigt in A und B eine Färbung mit einem anti- $\alpha$ -sma Antikörper. In A ist die  $\alpha$ -sma Immunreaktivität un behandelter mRCF Fibroblasten dargestellt. B zeigt mRCF Fibroblasten nach einer pro-fibrotischen TGF- $\beta$  Behandlung (22,5ng/ $\mu$ l, 24h). Das Fluoreszenzsignal zeigt deutlich, dass die  $\alpha$ -sma-Biosynthese induziert wird. Die Skala entspricht 20  $\mu$ m.

In den mit ARA behandelten Ratten und ihren Kontrollen konnte der Annexin A1 Rezeptor FPR2 auf renalen kortikalen Fibroblasten lokalisiert werden. Die Expression der Formyl-Peptid Rezeptoren in der mRCF Zellkultur sollte mittels Endpunkt PCR untersucht werden. Es wurde die Expression verschiedener Formyl-Peptid Rezeptoren der Maus untersucht. Die Endpunkt PCR zeigte eine Amplifikation der mRCF cDNA mit den Primern von mFpr1, mFpr-rs2, mFpr-rs6, mFpr-rs7, d.h. die mRCF Fibroblasten exprimierten den FPR1 (mFpr1) und den FPR2 (mFpr-rs2). Zudem fand sich eine Expression des Fpr-rs6 und Fpr-rs7. Die mRCF cDNA zeigte keine Amplifikation mit dem mFpr-rs1 Primerpaar. cDNA aus einem Gesamtnierenhomogenat der Maus war ebenfalls mit den Primern von mFpr1, mFpr-rs2, mFpr-rs6, mFpr-rs7 vervielfältigbar. Der FPR3 (mFpr-rs1) war nicht in der Maus Niere lokalisiert. Diese Befunde sind in Abbildung 28 dargestellt.



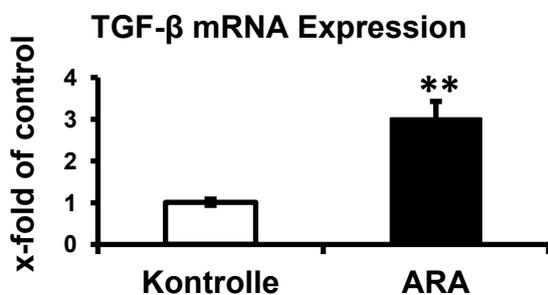
**Abbildung 28:** Darstellung der Formyl-Peptid-Rezeptoren mRNA Expression in mRCF cDNA (Fibroblasten) und cDNA eines Gesamtnierenhomogenates der Maus (Maus) mit Negativkontrollen (NTC)

Die mRCF cDNA zeigt eine Amplifikation von mFpr1, mFpr-rs2, Fpr-rs3, mFpr-rs6 und mFpr-rs7 jedoch nicht von mFpr-rs1. Die cDNA des Gesamtnierenhomogenates der Maus führt ebenfalls zur Amplifikation von mFpr1, mFpr-rs2, Fpr-rs3, mFpr-rs6 und mFpr-rs7. Die GAPDH-Banden zeigen, dass beide cDNA Proben generell amplifizierbar sind. Alle NTC sind negativ.

## 4.5 Regulation von Annexin A1 unter pro-fibrotischen Konditionen

Ein zentraler Befund der Lokalisationsstudien von Annexin A1 und FPR2 war, dass CD73-positive Fibroblasten eine Hauptquelle der gesteigerten interstitiellen Annexin A1 Abundanz in mit ARA behandelten Ratten sind. Aus diesem Grund war die Regulation des Annexin A1/FPR2 Systems in renalen kortikalen Fibroblasten Gegenstand funktioneller Untersuchungen.

Real-Time PCR Daten zeigten, dass die TGF- $\beta$  mRNA Abundanz in mit ARA behandelten Ratten 3,02-fach ( $\pm 0,10$ ) höher lag als in unbehandelten Kontrolltieren. Aufgrund dessen wurde das Zytokin TGF- $\beta$  zur Behandlung der renalen Fibroblasten ausgewählt, um die Regulation des Annexin A1/FPR2 Systems unter pro-fibrotischen Bedingungen zu untersuchen.



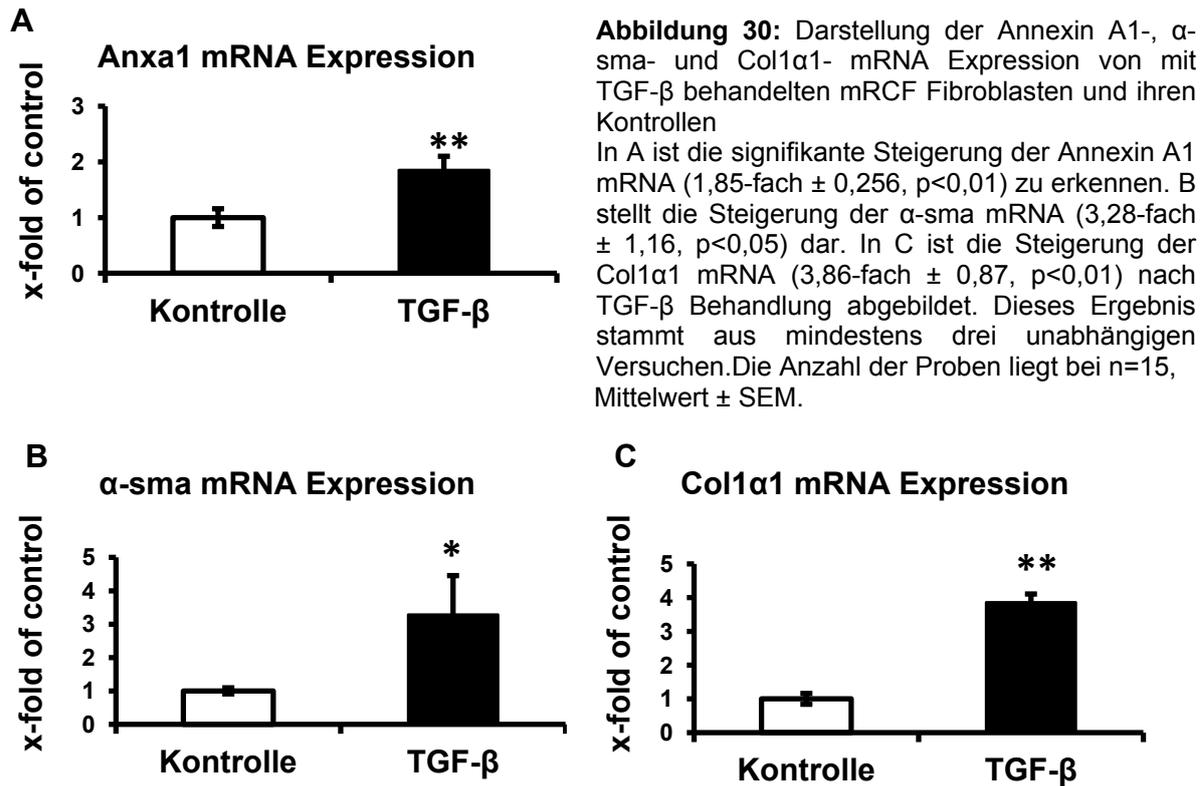
**Abbildung 29:** Darstellung der TGF- $\beta$  mRNA Expression im Nierenhomogenat von mit ARA behandelten Ratten und ihren Kontrollen. Die Menge der TGF- $\beta$  mRNA ist bei den mit ARA behandelten Ratten signifikant erhöht (3,02-fach  $\pm 0,106$ ;  $p < 0,01$ ). Die Anzahl der Proben liegt bei  $n=6$ ; Mittelwert  $\pm$  SEM.

### 4.5.1 Regulation von Annexin A1 in mRCF Fibroblasten

mRCF Fibroblasten wurden in serumfreiem Medium mit TGF- $\beta$  (22,5 ng/ $\mu$ l für 24h) behandelt. Die Analyse auf mRNA-Ebene erfolgte mittels Real-Time PCR Methodik. Die Analyse auf Protein-Ebene fand im Western Blot oder durch Immunfluoreszenz statt.

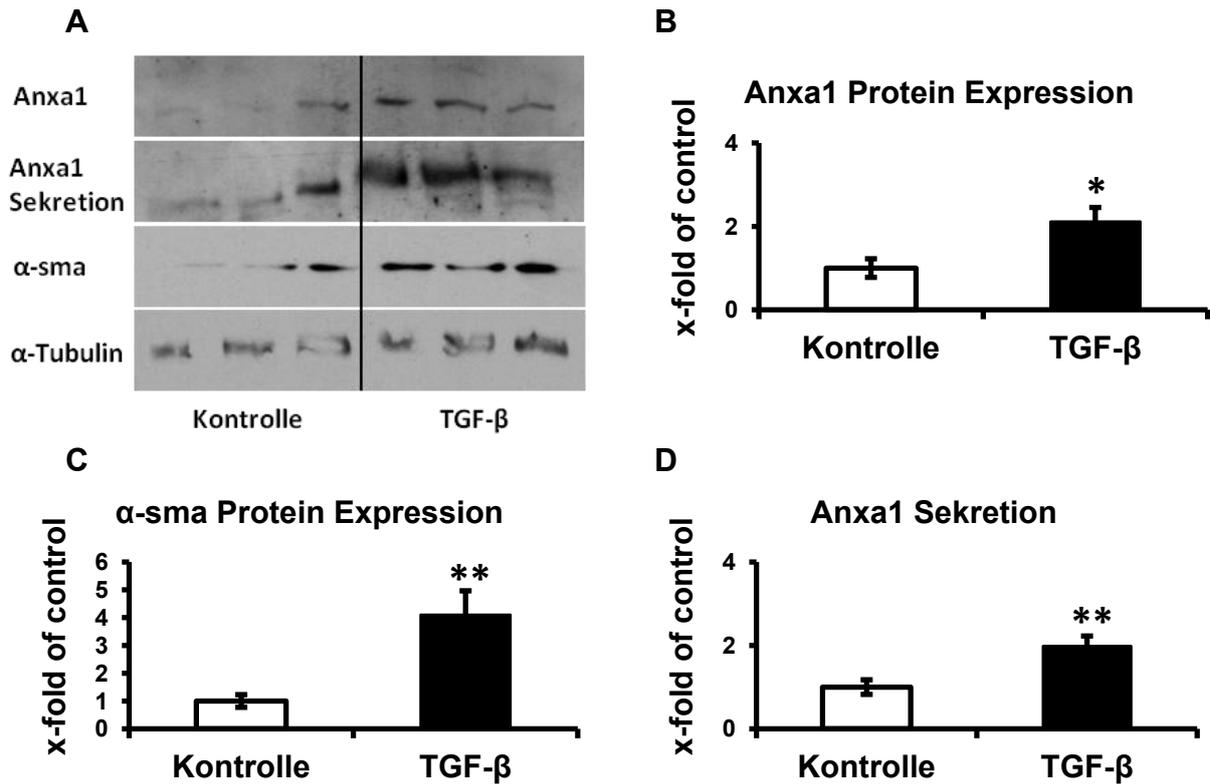
#### *mRNA Expression*

Real-Time PCR Daten von mit TGF- $\beta$  behandelten mRCF Fibroblasten zeigten einen signifikanten Anstieg der  $\alpha$ -sma mRNA um das 3,28-fache ( $\pm 1,16$ ) im Vergleich zu unbehandelten mRCF Fibroblasten. Dieser Anstieg war als *Readout*-Parameter für die TGF- $\beta$  Behandlung zu betrachten, da durch eine Steigerung der  $\alpha$ -sma-Biosynthese der myofibroblastische Phänotyp definiert ist. Zudem war nach der TGF- $\beta$  Behandlung ein signifikanter Anstieg der Annexin A1 mRNA um das 1,85-fache ( $\pm 0,256$ ) zu verzeichnen. Das Maß der Syntheseaktivität von extrazellulärer Matrix von Fibroblasten wurde durch die Kollagen 1 $\alpha$ 1 (Col1 $\alpha$ 1) Biosynthese definiert. Die TGF- $\beta$  Behandlung induzierte eine signifikante Steigerung der Kollagen 1 $\alpha$ 1 mRNA um das 3,86-fache ( $\pm 0,87$ ). Eine pro-fibrotische Behandlung der mRCF Fibroblasten induzierte eine parallele Stimulation der Annexin A1-, der  $\alpha$ -sma- und der Kollagen 1 $\alpha$ 1- mRNA Biosynthese.



#### Proteinexpression

Die Daten des Immunblotting zeigten eine signifikante Steigerung der Annexin A1-Proteinexpression um das 2,1-fache ( $\pm$  0,338) sowie des  $\alpha$ -sma-Proteinexpression um das 4,1-fache ( $\pm$  0,857) in den mit TGF- $\beta$  behandelten mRCF Fibroblasten. Die Fällung des Zellkulturüberstandes zeigte, dass TGF- $\beta$  behandelte mRCF Fibroblasten im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen signifikant mehr Annexin A1 Protein (1,98-fach  $\pm$  0,238) sekretierten.



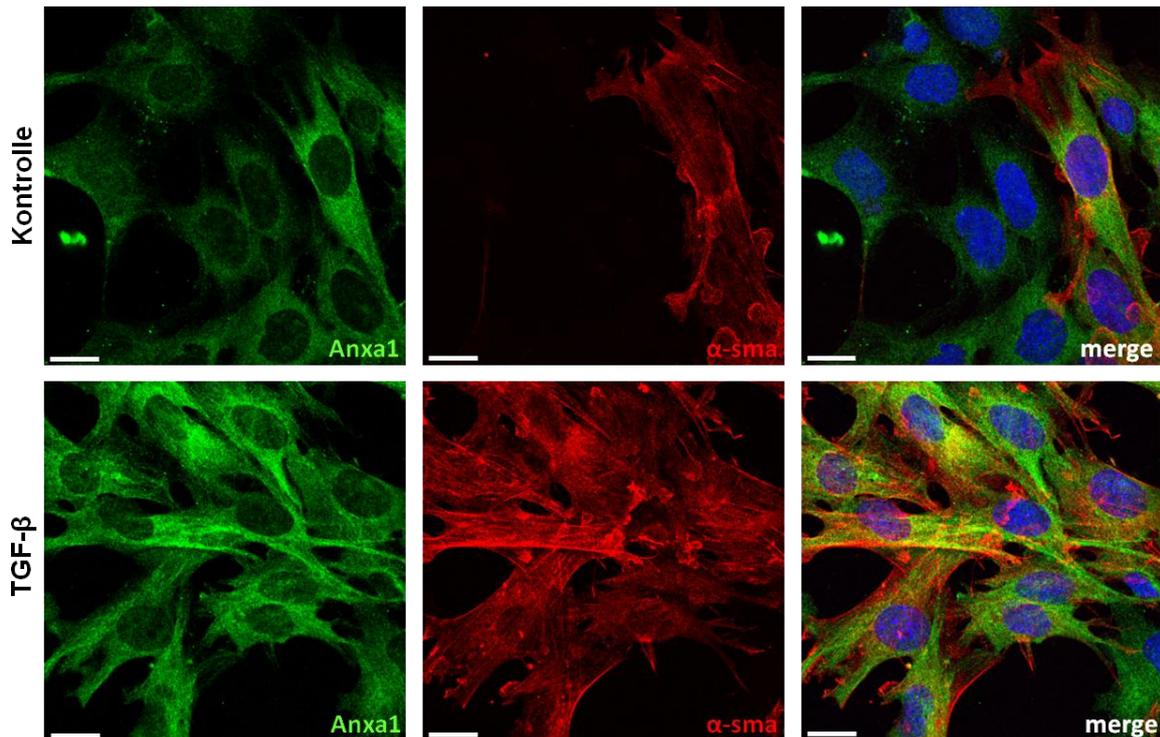
**Abbildung 31:** Darstellung der Anxa1- und  $\alpha$ -sma- Proteinexpression sowie Annexin A1-Sekretion von mit TGF- $\beta$  behandelten mRCF Fibroblasten und ihren Kontrollen

In A sind die Ergebnisse des Western Blot abgebildet. Ganz oben ist die intrazelluläre Annexin A1 Abundanz gezeigt, darunter sind die Sekretion des Annexin A1 und die Proteinexpression des  $\alpha$ -sma abgebildet. Normiert wurden die Werte densitometrisch auf die  $\alpha$ -Tubulin-Expression. Die mit TGF- $\beta$  behandelten mRCF Fibroblasten exprimieren mehr Annexin A1. Die auf  $\alpha$ -Tubulin normierte Expression des Annexin A1 liegt, dargestellt in Graphik B, 2,11-fach ( $\pm 0,338$   $p < 0,05$ ,  $n = 10$ ) höher als in den unbehandelten Kontrollen. Mit TGF- $\beta$  behandelte mRCF Fibroblasten sekretieren, wie in D dargestellt, 1,98-fach ( $\pm 0,238$ ,  $p < 0,01$ ,  $n = 7$ ) mehr Annexin A1 Protein als ihre Kontrollen. In C ist die um 4,1-fach ( $\pm 0,857$ ,  $p < 0,01$ ,  $n = 10$ ) gesteigerte  $\alpha$ -sma-Proteinabundanz zu erkennen. Dieses Ergebnis stammt aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Mittelwert  $\pm$  SEM.

### Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenzfärbungen zeigten deutlich, dass mRCF Fibroblasten, die viel  $\alpha$ -sma exprimierten auch eine intensive Färbung für Annexin A1 aufwiesen.

Die durch TGF- $\beta$  induzierte erhöhte  $\alpha$ -sma Expression war deutlich zu erkennen. Die TGF- $\beta$  Behandlung führte zur einer erhöhten Intensität des Annexin A1-Fluoreszenzsignals. Die Annexin A1-Proteinexpression stieg durch die TGF- $\beta$  Behandlung an.



**Abbildung 32:** Vergleichende Darstellung der Doppelimmunfluoreszenz von Annexin A1 und  $\alpha$ -sma in mit TGF- $\beta$  behandelten mRCF Fibroblasten und ihren Kontrollen

In der oberen Bildreihe sind die unbehandelten Kontrollen abgebildet. Links oben ist Annexin A1 grün gefärbt. Alle Zellen exprimieren Annexin A1. Das mittlere Bild zeigt die  $\alpha$ -sma Färbung in rot. Nur wenige Zellen exprimieren  $\alpha$ -sma. In der Überlagerung oben rechts erkennt man, dass diejenigen Zellen, die  $\alpha$ -sma-positiv sind, ein stärkeres Annexin A1-Fluoreszenzsignal zeigen. Die untere Bildreihe zeigt die mit TGF- $\beta$  behandelten Fibroblasten. Die Signalintensität der Annexin A1-Fluoreszenz ist stärker als bei den unbehandelten Kontrollen. Mittig ist die  $\alpha$ -sma Immunreaktivität in rot abgebildet. Alle Zellen exprimieren  $\alpha$ -sma. Die Induktion der  $\alpha$ -sma-Biosynthese ist zu erkennen. Die Skala entspricht 20  $\mu$ m.

#### 4.5.2 Annexin A1 in fibrotischen Nierenfibroblasten

Fibrotische Fibroblasten (mfF), die aus Maus Nieren nach intraperitonealer Gabe von Folsäure gewonnen wurden, wurden mit Kontrollfibroblasten (mWT) verglichen.

##### *mRNA Expression*

Die mfF Fibroblasten zeigten im Ausgangszustand im Vergleich zu den Kontrollfibroblasten ein signifikant erhöhtes Annexin A1 mRNA-Niveau (11,2-fach  $\pm$  4,82). Zur Kontrolle des fibrotischen Potentials der mfF Fibroblastenlinie wurden zudem die mRNA Expressionslevel von  $\alpha$ -sma und Kollagen 1 $\alpha$ 1 analysiert. Erwartungsgemäß war die  $\alpha$ -sma Expression in den mfF Fibroblasten signifikant höher als in den Kontrollen (25,59-fach  $\pm$  11,796). Die Kollagen 1 $\alpha$ 1 mRNA war allerdings nur leicht erhöht (2,03-fach  $\pm$  0,946).

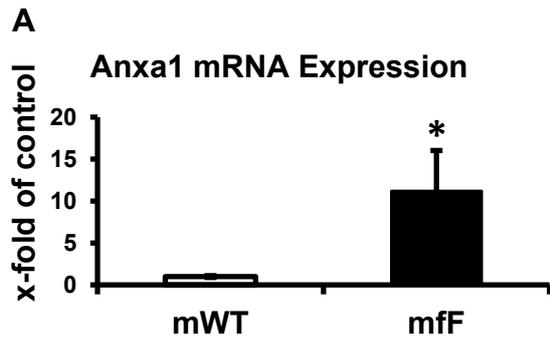
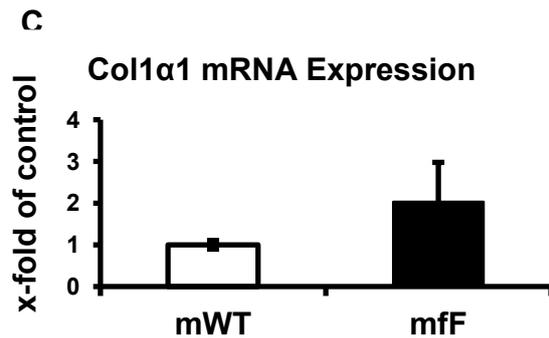
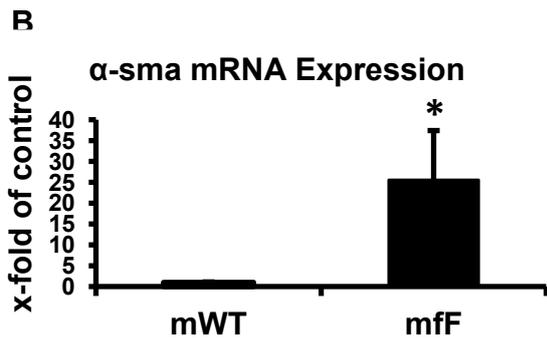


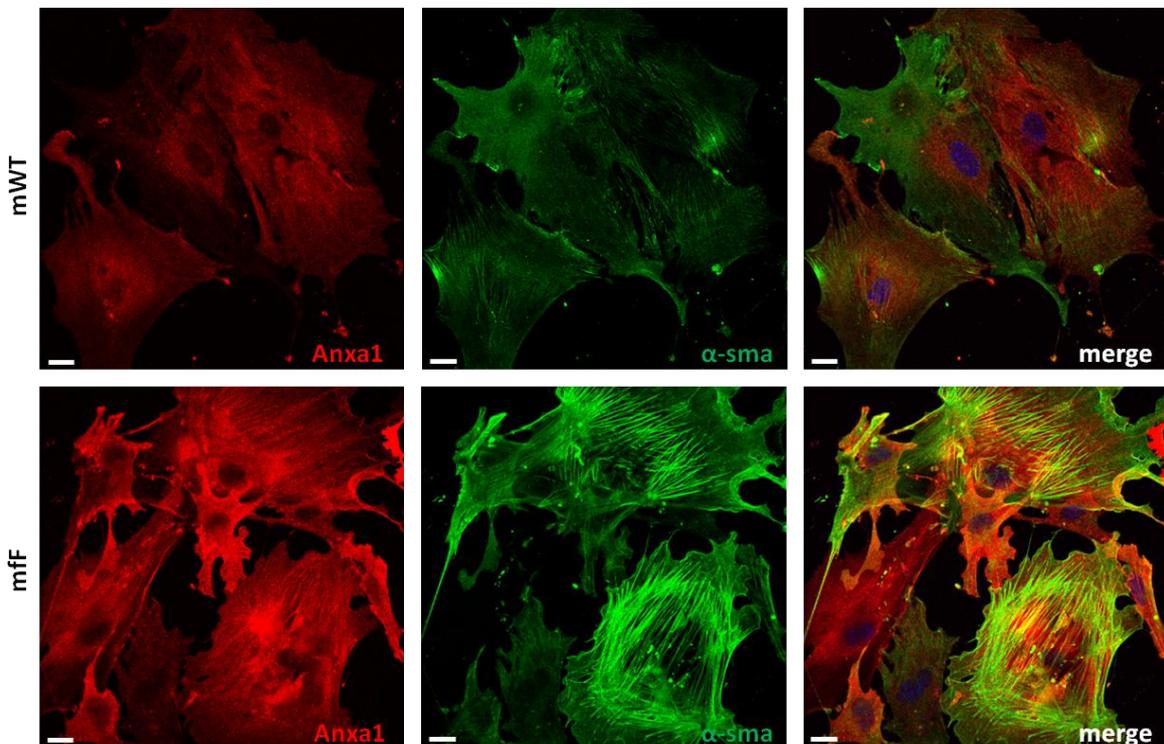
Abbildung 33: Darstellung der Annexin A1-,  $\alpha$ -sma- und Col1 $\alpha$ 1 mRNA Expression mfF Fibroblasten und ihren Kontrollen (mWT)

In A ist die signifikant erhöhte Annexin A1 mRNA Menge der mfF Fibroblasten (11,2-fach  $\pm$  4,82,  $p < 0,05$ ) zu erkennen. In B ist die höhere  $\alpha$ -sma mRNA Abundanz der mfF Fibroblasten (25,59-fach  $\pm$  11,796,  $p < 0,05$ ) dargestellt. In C ist die leicht erhöhte Col1 $\alpha$ 1 mRNA Expression der mfF Fibroblasten (2,03-fach  $\pm$  0,94,  $p = 0,29$ ) dargestellt. Dieses Ergebnis stammt aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Die Anzahl der Proben liegt bei  $n = 17$ , Mittelwert  $\pm$  SEM



*Immunfluoreszenz*

Die Real-Time PCR Ergebnisse konnten durch Immunfluoreszenzdoppelfärbungen mit Antikörpern gegen Annexin A1 und  $\alpha$ -sma bestätigt werden. Die mfF Fibroblasten zeigten im Vergleich zu Kontrollfibroblasten intensivere Fluoreszenzsignale für  $\alpha$ -sma und Annexin A1.



**Abbildung 34:** Vergleichende Darstellung der Doppelimmunfluoreszenz von Annexin A1 und  $\alpha$ -sma in mfF Fibroblasten und ihren Kontrollen (mWT)

In der oberen Bildreihe ist die Proteinexpression der Kontrollfibroblasten (mWT) dargestellt. Alle Kontrollfibroblasten zeigen eine Annexin A1-Immunreaktivität. Einige der Kontrollfibroblasten zeigen ein schwaches  $\alpha$ -sma Fluoreszenzsignal. Die Fibroblasten des fibrotischen Phänotyps (mFF), in der unteren Bildreihe abgebildet, zeigen stärkere Fluoreszenzsignale für Annexin A1 und  $\alpha$ -sma. D.h. die mFF Fibroblasten exprimieren deutlich mehr Annexin A1 und  $\alpha$ -sma.

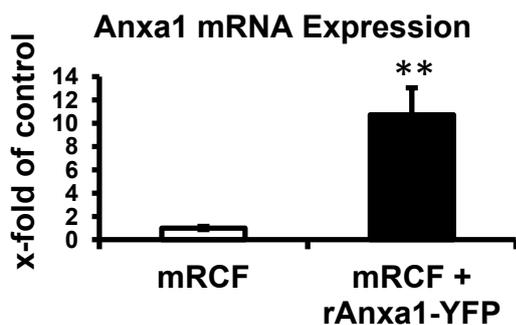
## 4.6 Funktionelle Rolle von Annexin A1 in renalen Fibroblasten

### 4.6.1 Annexin A1-überexprimierende Fibroblasten

Zur Untersuchung der funktionellen Rolle des Annexin A1 in renalen Fibroblasten wurde zunächst eine stabile rAnxa1-YFP überexprimierende Fibroblastenzelllinie generiert. Die immortalisierten mRCF Fibroblasten wurden zunächst mit G418-Konzentrationen von 0,1-2,0 mg/ml über 14 Tage behandelt. Die Konzentration von 1,25mg/ml war in der *killing curve* die niedrigste Konzentration, die zum Absterben aller immortalisierten mRCF Fibroblasten führte. mRCF Fibroblasten wurden mit rAnxa1-pEYFP transfiziert und unter konstantem Selektionsdruck bei 1,25 mg/ml G418 gehalten. Nach ca. 2 Wochen konnten die mRCF+rAnxa1-YFP Fibroblasten in eine größere Zellkulturflasche passagiert werden. Die Annexin A1-Überexpression wurde durch Real-Time PCR und Immunfluoreszenz verifiziert.

#### *mRNA Expression*

Die Analyse der Annexin A1 mRNA Expression zeigte, dass bei den mRCF+rAnxa1-YFP Fibroblasten eine deutliche Überexpression der Annexin A1 mRNA im Vergleich zu den Kontrollen (mRCF) vorlag. Die Annexin A1 mRNA Expression lag 10,7-fach ( $\pm 2,3$ ) höher als bei den untransfizierten mRCF Fibroblasten.

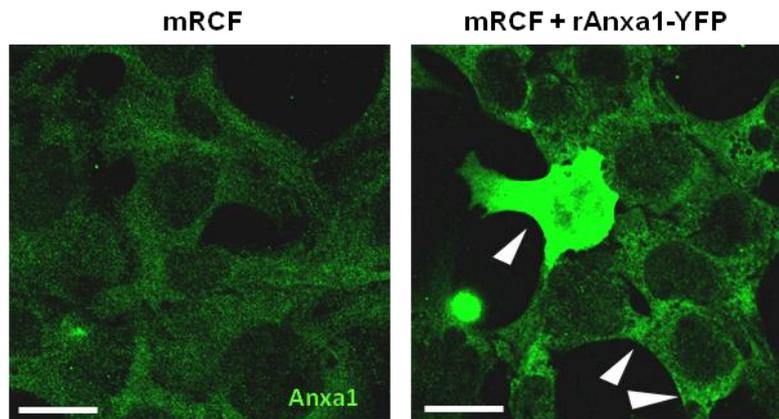


**Abbildung 35:** Darstellung der Annexin A1 mRNA Expression von mRCF+rAnxa1-YFP Fibroblasten und ihren Kontrollen (mRCF)

Eine Analyse der Annexin A1 mRNA Expression der mit rAnxa1-YFP stabil transfizierten Fibroblasten zeigt einen signifikanten Unterschied zu den mRCF Fibroblasten (10,7-fach  $\pm 2,3$ ;  $p < 0,01$ ). Dieses Ergebnis stammt aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Die Anzahl der Proben liegt bei  $n=18$ , Mittelwert  $\pm$  SEM.

### Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenzfärbung mit einem Antikörper gegen Annexin A1 zeigte deutlich, dass der Großteil der mRCF+rAnxa1-YFP Fibroblasten gegenüber den untransfizierten mRCF Fibroblasten ein intensiveres zytoplasmatisches Annexin A1-Fluoreszenzsignal aufwies. Einzelne Zellen zeigten eine stärkere Annexin A1-Überexpression als die restlichen Zellen.



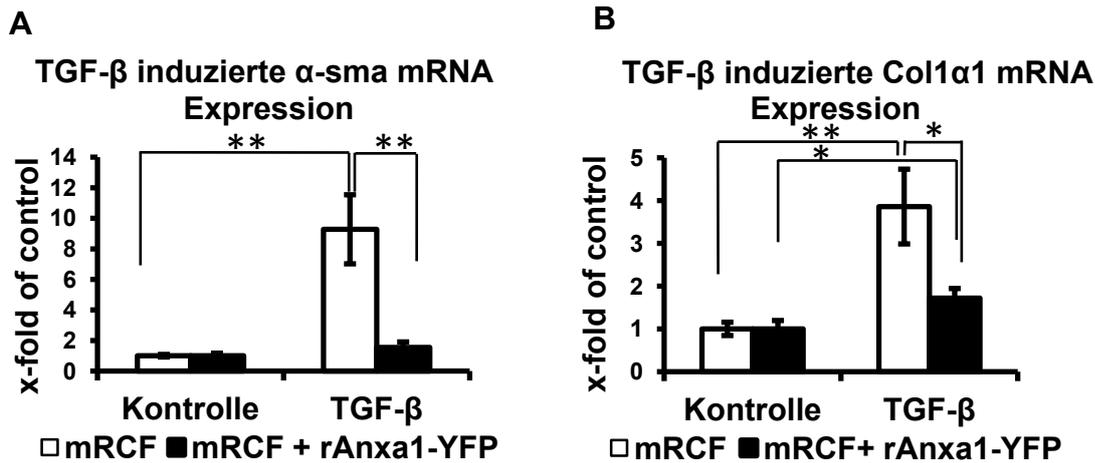
**Abbildung 36:** Vergleichende Darstellung der Immunfluoreszenz von Annexin A1 der mRCF+rANXA1-YFP Fibroblasten und ihren Kontrollen (mRCF)

In der linken Abbildung ist die Annexin A1-Immunreaktivität der Kontrollfibroblasten (mRCF) dargestellt. Die rechte Abbildung zeigt die mRCF+rAnxa1-YFP Fibroblasten. Es ist ein stärkeres zytoplasmatisches Annexin A1-Fluoreszenzsignal zu erkennen (siehe die unteren Pfeile). Zudem finden sich vereinzelte Zellen, die Annexin A1 sehr stark überexprimieren (siehe oberer Pfeil). Die Skala entspricht 20µm.

Nachdem die Überexpression des Annexin A1 in den mRCF+rAnxa1-YFP Fibroblasten festgestellt wurde, wurden diese Zellen einer TGF- $\beta$  Behandlung unterzogen und mit untransfizierten mRCF Fibroblasten verglichen. Die TGF- $\beta$  Behandlung erfolgte nach 24stündiger Serumsdepletion ebenfalls für 24 h.

### mRNA Expression

Eine Stimulation mit TGF- $\beta$  (22,5ng/ $\mu$ l, 24h) zeigte bei den mRCF Fibroblasten eine deutliche Steigerung der  $\alpha$ -sma- (9,27-fach  $\pm$  2,26) und Kollagen 1 $\alpha$ 1- (3,86-fach  $\pm$  0,87) mRNA Expression. Auch die mRCF+rAnxa1-YFP zeigten einen Anstieg der  $\alpha$ -sma- (1,54-fach  $\pm$  0,35) und Kollagen 1 $\alpha$ 1 (1,72-fach  $\pm$  0,22) mRNA Expression. Jedoch zeigten die mRCF+rAnxa1-YFP Fibroblasten einen signifikant geringeren Anstieg der durch TGF- $\beta$  induzierten  $\alpha$ -sma- und Kollagen 1 $\alpha$ 1-Biosynthese im Vergleich zu den untransfizierten mRCF Fibroblasten.



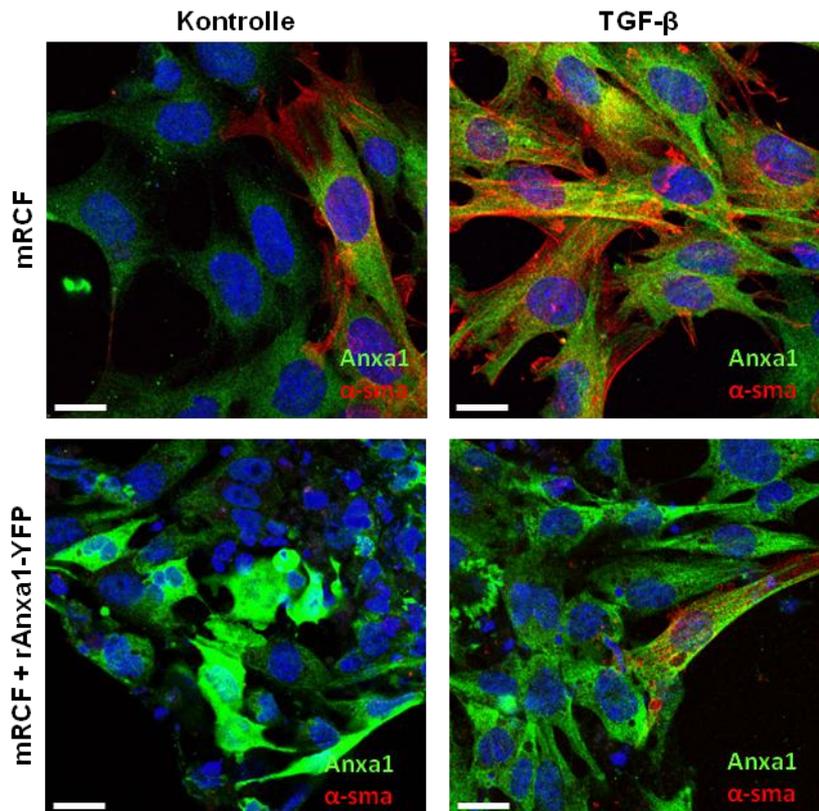
**Abbildung 37:** Darstellung der  $\alpha$ -sma- und Col1 $\alpha$ 1- mRNA Expression von mRCF+rAnxa1-YFP Fibroblasten und ihren Kontrollen (mRCF) unter pro-fibrotischer TGF- $\beta$  Behandlung

In A ist zu erkennen, dass die TGF- $\beta$  Behandlung in den mRCF Fibroblasten einen signifikanten Anstieg der  $\alpha$ -sma-Biosynthese ( $9,27\text{-fach} \pm 2,26$ ,  $p < 0,01$ ) induziert. mRCF+rAnxa1-YFP Fibroblasten zeigen einen leichten Anstieg der  $\alpha$ -sma mRNA Menge ( $1,54\text{-fach} \pm 0,35$ ,  $p = 0,17$ ).

Im Vergleich zu den mRCF Fibroblasten, zeigen die mRCF+rAnxa1-YFP Fibroblasten nur einen moderaten Anstieg der  $\alpha$ -sma mRNA Expression ( $1,54\text{-fach} \pm 0,35$  im Vgl. zu  $9,27\text{-fach} \pm 2,26$ ;  $p < 0,01$ ). In B ist dargestellt, dass die TGF- $\beta$  Behandlung bei den mRCF - und den mRCF+rAnxa1-YFP Fibroblasten zu einem signifikanten Anstieg der Kollagen mRNA Expression führt (mRCF:  $3,86\text{-fach} \pm 0,87$ ,  $p < 0,01$ ; mRCF+rAnxa1-YFP:  $1,72\text{-fach} \pm 0,22$ ,  $p < 0,05$ ). Das Ausmaß der TGF- $\beta$  induzierten Kollagensynthese ist bei den mRCF+rAnxa1-YFP Fibroblasten deutlich geringer ausgeprägt ( $1,72\text{-fach} \pm 0,22$  im Vgl. zu  $3,86\text{-fach} \pm 0,87$ ;  $p < 0,05$ ). Die durch TGF- $\beta$  induzierte  $\alpha$ -sma- und Kollagen1 $\alpha$ 1- Biosynthese ist in mRCF+rAnxa1-YFP Fibroblasten gegenüber den mRCF Fibroblasten deutlich supprimiert. Dieses Ergebnis stammt aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Die Anzahl der Proben liegt bei  $n = 16$ , Mittelwert  $\pm$  SEM.

### Immunfluoreszenz

Die Ergebnisse der Real-Time PCR konnten durch eine Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen Annexin A1 und  $\alpha$ -sma bestätigt werden. Die Immunfluoreszenzdoppelmarkierung zeigte, dass mRCF+rAnxa1-YFP Fibroblasten nach TGF- $\beta$  Stimulation eine deutlich geringer ausgeprägte  $\alpha$ -sma Proteinexpression aufwiesen als die ebenfalls mit TGF- $\beta$  behandelten untransfizierten mRCF Fibroblasten.



**Abbildung 38:** Vergleichende Darstellung der Doppelimmunfluoreszenz von Annexin A1 und  $\alpha$ -sma in mRCF+rAnxa1-YFP Fibroblasten und ihren Kontrollen (mRCF) unter pro-fibrotischer TGF- $\beta$  Behandlung

In der oberen Bildreihe ist die Proteinexpression der mRCF Fibroblasten dargestellt. Die mit TGF- $\beta$  behandelten mRCF Fibroblasten zeigen im Vergleich zu den unbehandelten mRCF Kontrollfibroblasten eine deutlich gesteigerte  $\alpha$ -sma-Proteinexpression. Die untere Bildreihe stellt die mRCF+rAnxa1-YFP Fibroblasten dar. Bei den mit TGF- $\beta$  behandelten mRCF+rAnxa1-YFP Fibroblasten zeigt sich im Vergleich zu unbehandelten mRCF+rAnxa1-YFP Kontrollfibroblasten eine  $\alpha$ -sma-Proteinexpression. Jedoch exprimieren nach TGF- $\beta$  Behandlung deutlich weniger mRCF+rAnxa1-YFP Fibroblasten  $\alpha$ -sma als die mit TGF- $\beta$  behandelten mRCF Fibroblasten. Die Induktion der  $\alpha$ -sma Biosynthese durch TGF- $\beta$  ist durch eine Überexpression von Annexin A1 deutlich reduziert. Die Skala entspricht 20 $\mu$ m.

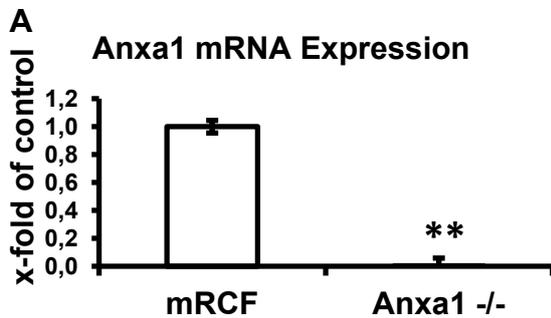
#### 4.6.2 Annexin A1-defiziente Fibroblasten

Aus kortikalen Nierensegmenten Annexin A1-defizienter Mäuse wurden Anxa1-/- Fibroblasten, wie unter 3.2.8.1 und 4.6.1 beschrieben, extrahiert und immortalisiert. Die Anxa1-/- Fibroblasten wurden unter den gleichen Bedingungen wie die mRCF Fibroblasten isoliert und charakterisiert. Der Phänotyp der Anxa1-/- Fibroblasten wurde mit dem Phänotyp der mRCF Fibroblasten nachfolgend verglichen.

##### *mRNA Expression*

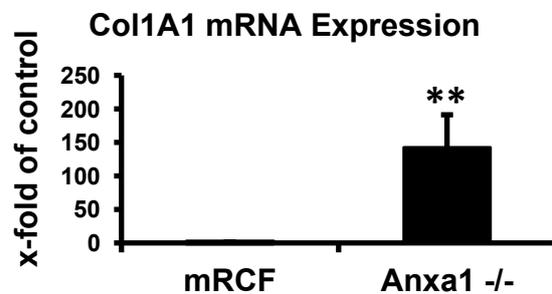
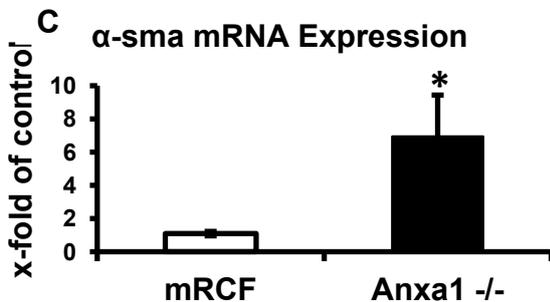
Die Untersuchung der mRNA Expression bestätigt die Abwesenheit von Annexin A1 mRNA in den Anxa1-/- Fibroblasten. Die Annexin A1 mRNA der Anxa1-/- Fibroblasten lag bei dem nur 0,12-fachen ( $\pm$  0,046) der Annexin A1 mRNA Expression von mRCF Fibroblasten. Die mRNA Expression von  $\alpha$ -sma lag bei den Anxa1-/- Fibroblasten um das 6,93-fache ( $\pm$  2,5)

höher als bei den mRCF Fibroblasten. Auch die Expression der Kollagen 1 $\alpha$ 1 mRNA lag in den Annexin A1-defizienten Fibroblasten um das 142,83-fache ( $\pm$  48,54). höher als in den mRCF Fibroblasten.



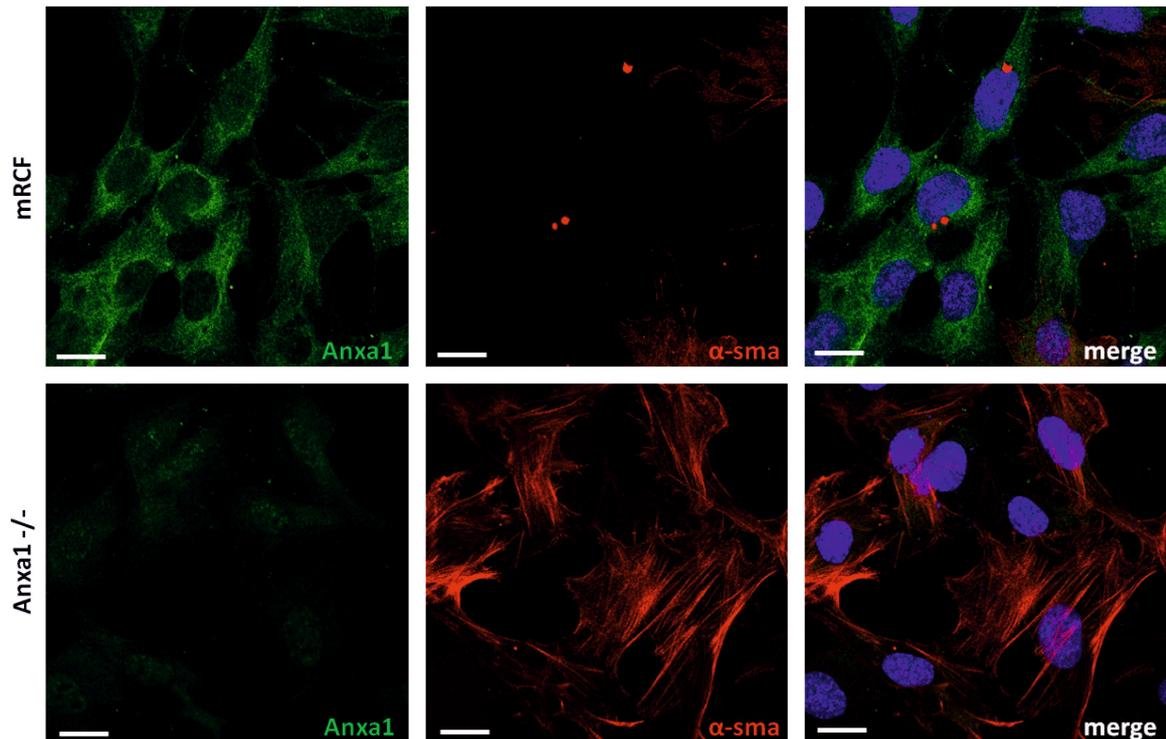
**Abbildung 39:** Darstellung der Annexin A1-,  $\alpha$ -sma- und Col1 $\alpha$ 1- mRNA Expression von Anxa1 $^{-/-}$  Fibroblasten und ihren Kontrollen (mRCF)

In A ist die signifikant reduzierte Annexin A1 mRNA Menge der Anxa1 $^{-/-}$  Fibroblasten (0,01-fach  $\pm$  0,046,  $p < 0,01$ ) dargestellt. B zeigt eine gesteigerte  $\alpha$ -sma mRNA (6,93-fach  $\pm$  2,5,  $p < 0,05$ ) Abundanz. In C ist die gesteigerte Col1 $\alpha$ 1 mRNA Expression (142,83fach  $\pm$  48,54,  $p < 0,01$ ) der Anxa1 $^{-/-}$  Fibroblasten dargestellt. Dieses Ergebnis stammt aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Die Anzahl der Proben liegt bei  $n=9$ , Mittelwert  $\pm$  SEM.



### Immunfluoreszenz

Die Doppelimmunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen Annexin A1 und  $\alpha$ -sma bestätigte die Ergebnisse der Real-Time PCR. Das  $\alpha$ -sma-Fluoreszenzsignal war in den Anxa1 $^{-/-}$  Fibroblasten deutlich stärker als in den mRCF Fibroblasten. D.h. Anxa1 $^{-/-}$  Fibroblasten exprimierten deutlich mehr  $\alpha$ -sma als ihre Wildtypkontrollen die mRCF Fibroblasten.



**Abbildung 40:** Vergleichende Darstellung der Doppelimmunfluoreszenz von Annexin A1 und  $\alpha$ -sma in Anxa1<sup>-/-</sup> Fibroblasten und ihren Kontrollen (mRCF)

In der oberen Bildreihe ist die Proteinexpression von Annexin A1 (Grün) und  $\alpha$ -sma (Rot) der mRCF Fibroblasten dargestellt. Alle mRCF Fibroblasten exprimieren Annexin A1. Nur zwei der mRCF Fibroblasten zeigen eine schwache Expression des  $\alpha$ -sma. In der unteren Bildreihe ist die Proteinexpression der Anxa1<sup>-/-</sup> Fibroblasten zu sehen. Es ist deutlich zu erkennen, dass in Abwesenheit von Annexin A1 mehr  $\alpha$ -sma Protein exprimiert wird.

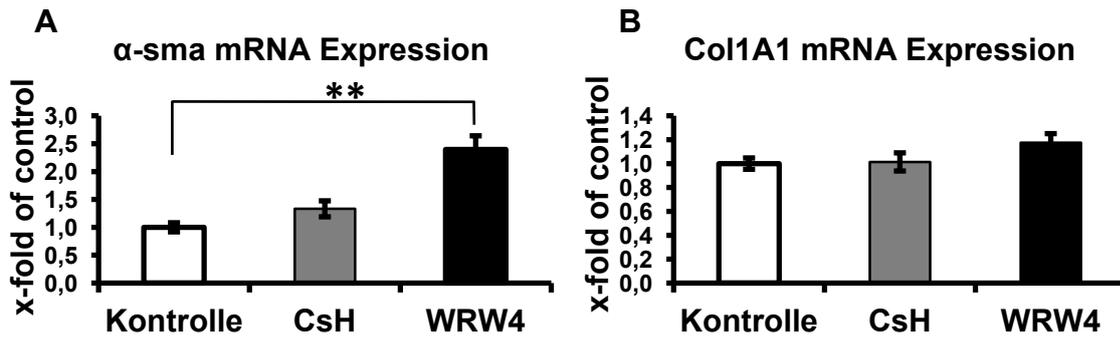
#### 4.6.3 Behandlung mit Antagonisten der Formyl-Peptid-Rezeptoren

Die humanen fibrotischen Nierenfibroblasten TK 188 wurden nach 24-stündiger Serumsdepletion für 24 h mit dem spezifischen Antagonisten des FPR1 Cyclosporin H (CsH) oder dem Antagonisten des FPR2 WRW4-Peptid behandelt und auf die  $\alpha$ -sma- und Kollagen 1 $\alpha$ 1- mRNA Expression hin untersucht.

In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass die TK 188 Fibroblasten signifikante Mengen an Annexin A1 Protein bzw. Annexin A1 Peptiden sekretieren. Somit konnte auf die parallele Behandlung mit Annexin A1 Protein oder Annexin A1 Peptid Ac 2-26 verzichtet werden, um die Rezeptorblockade zu untersuchen.

##### *mRNA Expression*

Die Ergebnisse der Taqman basierten Real-Time PCR zeigten unter WRW4-Behandlung eine signifikante Erhöhung der  $\alpha$ -sma Expression um das 2,39-fache ( $\pm 0,246$ ) im Vergleich zu den Vehikel behandelten Kontrollfibroblasten. Die Behandlung mit Cyclosporin H hatte keinen Effekt auf die  $\alpha$ -sma Biosynthese. Die Kollagen 1 $\alpha$ 1-Biosynthese zeigte weder unter WRW4- noch unter Cyclosporin H-Behandlung Veränderungen.



**Abbildung 41:** Darstellung der  $\alpha$ -sma- und Col1 $\alpha$ 1- mRNA Expression von mit CsH oder WRW4 behandelten Tk 188 Fibroblasten und ihren Kontrollen

In A ist die signifikante Steigerung der  $\alpha$ -sma mRNA Menge (2,39-fach  $\pm$  0,246,  $p < 0,01$ ) nach WRW4-Behandlung dargestellt. Im Gegensatz dazu ließ sich nach Behandlung mit CsH kein Effekt nachweisen. B zeigt, dass weder die Behandlung mit CsH noch die mit WRW4 Effekte auf die Kollagen 1 $\alpha$ 1 Biosynthese hat. Dieses Ergebnis stammt aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Die Anzahl der Proben liegt bei  $n=8$ , Mittelwert  $\pm$  SEM.

## 5 Diskussion

Die chronische Niereninsuffizienz stellt die häufigste Ursache für die Entwicklung einer terminalen Niereninsuffizienz dar und ist ein wichtiger Risikofaktor für die Entstehung kardiovaskulärer Folgeerkrankungen. Durch seine Assoziation mit erheblicher Morbidität und Mortalität ist das chronische Nierenversagen ein beträchtlicher Kostenfaktor des Gesundheitssystems und ein globales Gesundheitsproblem (Schieppati und Remuzzi 2005). Die therapeutischen Optionen zur Behandlung des chronischen Nierenversagens sind stark limitiert. Häufig verbleiben als letzte Interventionsmöglichkeit nur aufwendige Organersatzverfahren.

Die Pathogenese des CKD ist gekennzeichnet durch das parallele Auftreten entzündlicher Prozesse und fibrotischer Veränderungen des Nierengewebes. Dadurch kommt es zu einer Aufweitung des renalen Interstitiums, was zu einer Verlängerung der Diffusionsstrecke von Tubulussegmenten zum Blut und zur Entstehung hypoxischer Konditionen führt (Vielhauer, Schlöndorff, und Anders 2004). Fibroblasten werden als der zentrale Zelltypus in der Pathogenese des chronischen Nierenversagens betrachtet. Sie sind verantwortlich für die Synthese von Extrazellulärmatrix und sezernieren pro-inflammatorische Zytokine (Eddy 2000). Ein Schlüsselfaktor in der Entstehung eines chronischen Nierenversagens ist der Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  (Liu 2006). TGF- $\beta$  induziert die Proliferation der residenten interstitiellen Fibroblasten zu aktiven Extrazellulärmatrix-synthetisierenden Myofibroblasten. Die der Fibrosierung von Nierengewebe zugrunde liegenden Mechanismen sind bisher nur unvollständig verstanden. Derzeitige Forschungsansätze beruhen hauptsächlich auf einer Inhibition des TGF- $\beta$  Signalweges.

Einige Autoren geben erste Hinweise darauf, dass das kalzium- und phospholipidbindende Protein Annexin A1 die Fibroblastenaktivität beeinflusst (Jia et al. 2012) und bei fibrotischen Erkrankungen (Damazo et al. 2011) eine Rolle spielen könnte. Zudem ist das anti-inflammatorische Protein Annexin A1 im akuten Nierenversagen differenziell reguliert (Araujo et al. 2012). Seine Funktion im chronischen Nierenversagen ist jedoch unbekannt. Über den Annexin A1 Rezeptor FPR2 in der Niere liegen bisher keine Daten vor.

Ziel der hier vorgelegten Arbeit war es die Expression und funktionelle Rolle von Annexin A1 und seinem Rezeptor FPR2 im chronischen Nierenversagen zu charakterisieren. Damit sollte die Arbeit einen Beitrag zur Beantwortung der Frage leisten, inwieweit das Annexin A1/FPR2 System als Ziel für eine pharmakologische mechanismus-basierte Therapie der chronischen Niereninsuffizienz angewendet werden kann.

## 5.1 Tiermodell des chronischen Nierenversagen

Das Studium der Mechanismen des chronischen Nierenversagens wird generell dadurch beeinträchtigt, dass es kein Tiermodell gibt, welches alle Facetten des humanen chronischen Nierenversagens widerspiegelt. In der hier vorliegenden Arbeit wurde ein Tiermodell eingesetzt, bei dem ein, in der Phase der Nephrogenese, induzierter Nierenschaden sekundär in einer Hypertonie resultiert und entsprechende Schäden des Nierenparenchyms nach sich zieht. Dieses Modell spiegelt recht gut den Verlauf der Entwicklung eines chronischen Nierenversagens beim Menschen wieder (Keller et al. 2003).

Histologische Färbungen der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die mit ARA behandelten Ratten im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren vor allem im Bereich der äußeren Medulla, aber auch im Kortex eine stark pathologisch veränderte Nierenmorphologie aufwiesen. Es zeigten sich sklerosierte Glomeruli mit verdickter glomerulärer Basalmembran, mit Proteinzyllindern obstruierte Tubuli, periglomeruläre inflammatorische Infiltrationen sowie ausgedehnte Kollagenablagerungen im Sinne einer chronischen Nierenschädigung und einer Nierenfibrosierung. Es waren nicht nur fibrotische Veränderungen festzustellen, sondern auch interstitielle Areale in denen sehr viele Zellen vorlagen. Bei diesen Zellen handelte es sich um Fibroblasten und infiltrierte Zellen in entzündlichen Arealen. Damit bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit die von der Arbeitsgruppe um J. Salazar veröffentlichten Beschreibungen dieses Tiermodells (Saez et al. 2007; Loria et al. 2007; Salazar et al. 2008; Saez et al. 2009).

Andere experimentelle Tiermodelle des Nierenversagens wie die 5/6 Nephrektomie oder das *two kidney one clip* Modell führen zu einem akuten Anstieg des arteriellen Blutdrucks (Brenner, Lawler, und Mackenzie 1996). Im Gegensatz dazu zeigt das in dieser Arbeit eingesetzte Tiermodell einen eher chronisch progredienten Verlauf der arteriellen Hypertonie und ist weniger invasiv. Weitere Tiermodelle des chronischen Nierenversagens wie die *stroke prone* spontan hypertensive Ratten (SHRsp), die Thy-1 Nephritis, die Cyclosporin A induzierte Nephropathie, die Desoxycorticosteronacetat (DOCA)-Salz Ratten oder die Folsäure-induzierte Nephropathie weisen im Vergleich zu dem hier gewählten Modell und dem Krankheitsbild beim Menschen ebenfalls eher akute Verlaufsformen auf, bei denen der inflammatorische Anteil überwiegt (Yang 2010).

Das in dieser Arbeit eingesetzte Tiermodell weist alle morphologischen und funktionellen Facetten eines chronischen Nierenversagens auf und eignet sich daher gut um die Expression von Annexin A1 und FPR2 im chronischen Nierenversagen zu untersuchen.

## 5.2 Renale Annexin A1- und FPR2-Expression

### 5.2.1 Lokalisation von Annexin A1 und seinem Rezeptor FPR2 in der gesunden Niere

In der gesunden Rattenniere wurden verschiedene epitheliale Strukturen als Annexin A1-positiv identifiziert. Im Kortex fand sich eine starke Annexin A1-Expression vor allem in den Podozyten der Glomeruli. Eine etwas schwächere Annexin A1-Immunreaktivität war kortikal in den dicken aufsteigenden Schenkeln der Henle'schen Schleifen zu detektieren. In der äußeren Medulla war eine starke Annexin A1-Expression in den medullären Sammelrohren zu erkennen. Zudem zeigte der medulläre Teil der dicken aufsteigenden Henle'schen Schleife eine Annexin A1-Immunreaktivität. In der inneren Medulla waren die Sammelrohre ebenfalls positiv für Annexin A1. Mesangialzellen und die Endothelzellen der Glomeruli zeigten kein Annexin A1-Signal. Damit bestätigen die Resultate dieser Arbeit die von McKanna et al. publizierte Lokalisation des Annexin A1 in der gesunden Niere (McKanna et al. 1992).

Neben der epithelialen Expression fand sich eine intensive interstitielle Annexin A1-Immunreaktivität. Im Bereich des Kortex wiesen die Annexin A1-positiven Zellen die typische dreieckige Zellform von Fibroblasten auf. In der äußeren Medulla fanden sich interstitielle Annexin A1-Signale periarteriell in Form von adventitiellen Fibroblasten. Im Bereich der inneren Medulla gab es kaum interstitielle Annexin A1-Immunreaktivität. Eine interstitielle Annexin A1-Lokalisation wurde bislang noch nicht beschrieben, obwohl diese auf den immunhistochemischen Aufnahmen von McKanna et al. (1992) zu erkennen ist. In der vorliegenden Arbeit konnte der Großteil der Annexin A1-tragenden Zellen des Tubulointerstitiums in gesunden Individuen als CD73-positive Fibroblasten identifiziert werden. Weitere Annexin A1-positive Zellen konnten als CD68-positive Makrophagen identifiziert werden. Kapillarendothelzellen zeigten kein Annexin A1-Signal.

Der Rezeptor des Annexin A1, der FPR2, konnte mit der vorliegenden Arbeit erstmals in der Niere lokalisiert werden. Es wurde gezeigt, dass im gesunden renalen Interstitium sowohl Fibroblasten als auch Kapillarendothelzellen den FPR2 trugen. Es fand sich keinerlei epitheliales FPR2-Signal in der Niere.

Die räumliche Nähe von Annexin A1 und FPR2, vor allem in CD73-positiven Fibroblasten, legt die Vermutung nahe, dass Annexin A1 im renalen Interstitium parakrine oder autokrine Funktionen haben kann, die über den FPR2 vermittelt werden.

### 5.2.2 Lokalisation von Annexin A1 und seinem Rezeptor FPR2 in mit ARA behandelten Ratten

Mit ARA behandelte Ratten zeigten im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren eine signifikant gesteigerte renale Annexin A1-Expression. Die gesteigerte Annexin A1-Expression war inhomogen über die Niere verteilt. Es gab Areale, die eine physiologische Annexin A1-Immunreaktivität aufwiesen und Areale mit besonders kräftiger Annexin A1-Expression. Dies war einerseits auf stark geschädigte Tubulusabschnitte zurückzuführen, die eine vermehrte Annexin A1-Immunreaktivität aufwiesen, und andererseits auf eine deutliche Zunahme von Annexin A1-immunreaktiven interstitiellen Zellen. Mit ARA behandelte Ratten zeigten im Vergleich zu den Kontrollen zudem im Bereich des Kortex und der äußeren Medulla eine deutlich gesteigerte Anzahl an CD73-positiven Fibroblasten und CD68-positiven Makrophagen. Wie in den gesunden Nieren machten auch in mit ARA behandelten Ratten die CD73-positiven Fibroblasten den Großteil der interstitiellen Annexin A1 Abundanz aus. CD68-positive Makrophagen wiesen teilweise eine Annexin A1 Reaktivität auf. Bei mit ARA behandelten Ratten zeigte sich eine interstitielle und periglomeruläre  $\alpha$ -sma-Expression der Myofibroblasten. Myofibroblasten zeigten *in vivo* keine Annexin A1-Immunreaktivität. Kapillarendothelzellen zeigten ebenfalls keine Annexin A1-Signale.

Wie auch in den gesunden Kontrollen detektiert war der Annexin A1-Rezeptor FPR2 in mit ARA behandelten Ratten auf CD73-positiven Fibroblasten und peritubulären Kapillarendothelzellen lokalisiert. Im Unterschied zu den gesunden Kontrollen fanden sich in den kranken Tieren in Arealen inflammatorischer Infiltrationen Subpopulationen an CD68-positiven Makrophagen, die eine FPR2-Expression aufwiesen.

Zentraler Befund dieser Lokalisationsstudie ist, dass die CD73-positiven Fibroblasten sowohl in gesunden als auch in kranken Tieren den Großteil der Annexin A1 und FPR2 Abundanz ausmachen und die Hauptquelle der gesteigerten Annexin A1-Expression in den mit ARA behandelten Ratten sind. Zudem exprimieren Subpopulationen an CD68-positiven Makrophagen Annexin A1 und FPR2.

Die Expression von Annexin A1 und FPR2 in renalen Fibroblasten wurde bisher noch nicht untersucht. Jedoch zeigen Fibroblasten anderer Organsysteme eine Annexin A1-Expression (Barwise and Walker 1995; Ts'ao et al. 1997; Hsu, Lee, and Tsay 1997; Bizzarro et al. 2012; Yang et al. 2006; Jia et al. 2012). Die sich schneller teilenden adventitiellen Fibroblasten der spontan hypertensiven Ratten (SHR) weisen eine signifikant niedrigere Annexin A1-Expression auf als die Fibroblasten von Wistar Kyoto Kontroll-Ratten (Guo et al. 2010). Bei den SHR liegen perivaskulär mehr aktivierte Fibroblasten, d.h. Myofibroblasten, vor (Hultstrom et al. 2012). So handelt es sich bei den schnell proliferierenden Fibroblasten der Adventitia der SHR vermutlich um Myofibroblasten, die weniger Annexin A1 exprimieren.

Dies deckt sich mit den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit. Myofibroblasten exprimieren *in vivo* kein oder nur geringe Mengen von Annexin A1. VanCompernelle et al. beschreiben erstmals die Expression des FPR und des FPRL1 bzw. FPR2 auf humanen Haut- und Lungenfibroblasten (VanCompernelle et al. 2003). Der FPR2 scheint Effekte auf die Aktivität der Fibroblasten anderer Organsysteme zu vermitteln (Iaccio et al. 2009; Tagoe et al. 2008; Jia et al. 2012).

Schon früh konnte gezeigt werden, dass Annexin A1 eine wichtige Rolle in der Aktivität von Makrophagen und Monozyten spielt (Ambrose, Bahns, und Hunninghake 1992). Dabei hemmt Annexin A1 unter anderem die Phagozytoserate, das Trafficking und die Bildung von Superoxid-Anionen (Goulding, Luying, und Guyre 1990; Solito et al. 2001; Kamal, Flower, und Perretti 2005). Des Weiteren ist Annexin A1 ein wichtiges *Eat me* und *Find me* Signal und in diesem Zusammenhang bedeutend für eine effiziente Phagozytose (Lim und Pervaiz 2007). Die Formyl-Peptid-Rezeptoren auf Monozyten sind ein wichtiger Faktor der angeborenen Immunität, da sie bakterielle Peptide über ein N-terminal formyliertes Methionin erkennen. Später wurde erkannt, dass auch anti-inflammatorische Mediatoren wie Annexin A1 an die Formyl-Peptid-Rezeptoren binden, insbesondere an den FPR2 (Hayhoe et al. 2006). Makrophagen exprimieren den FPR2 auch nach ihrer Differenzierung aus Monozyten (Yang et al. 2001). Makrophagen können je nachdem ob sie IL-10 oder IL-12 exprimieren in zwei verschiedene Phänotypen unterschieden werden. Die Typ M1 Makrophagen exprimieren IL-12, die Typ M2 Makrophagen exprimieren IL-10. Somit haben M2 Makrophagen anti-inflammatorische Funktion und vermitteln die Gewebsreparatur. Li et al. haben herausgefunden, dass Annexin A1 FPR2 vermittelt die Differenzierung von Monozyten zu M2 Makrophagen (Typ M2a, M2c) induziert (Li et al. 2011). Der FPR2 vermittelt in Makrophagen anti-inflammatorische Prozesse. Makrophagen aus FPR2-defizienten Mäusen zeigen eine Verringerung der Chemotaxis und Antwort auf fMLP und der daraus folgenden Phosphorylierung von ERK (Duffon et al. 2010). Zudem scheint die Phagozytose neutrophiler Granulozyten durch Makrophagen vom FPR2 abhängig zu sein (Maderna et al. 2010).

Endothelzellen sind vermutlich eine primäre Zielstruktur für Annexin A1. Bei einer Entzündungsreaktion ist die Beschaffenheit des Endothels maßgeblich verantwortlich für die Extravasation der Leukozyten und somit für deren Immigration in das geschädigte Gewebe. In der vorliegenden Arbeit wurde der Annexin A1 Rezeptor FPR2 auf den Endothelzellen der peritubulären Kapillaren nachgewiesen. Dieser Befund hat eine hohe Relevanz für das parakrine Annexin A1/FPR2 System in der Niere. Leider erlaubt der Umfang der vorliegenden Arbeit darüber hinaus jedoch keine weiterführenden Untersuchungen. Raynal et al. konnten 1992 zeigen, dass Endothelzellen aus der Nabelschnurvene des Menschen und Endothelzellen aus der Kälberaorta eine nukleäre und zytosolische Annexin A1

Distribution aufweisen (Raynal et al. 1992). Eine Lokalisation des FPR2 in den Endothelzellen der Nabelschnurvene wird von Lee et al. beschrieben (Lee et al. 2009). Eine andere Arbeitsgruppe zeigt, dass der FPR2 von mikrovaskulären Endothelzellen exprimiert und im Entzündungsgeschehen hochreguliert wird (Mou et al. 2012).

Mit der vorliegenden Arbeit kann erstmals gezeigt werden, dass Annexin A1 im chronischen Nierenversagen, bei mit ARA behandelten Ratten, stimuliert ist. Einige Publikationen geben Hinweise darauf, dass Annexin A1 im fibrotischen Geschehen reguliert wird. In der Alkohol-induzierten Leberzirrhose sind vor allem Gene der Fibrogenese und der Entzündungsreaktion hochreguliert. Parallel dazu findet sich eine signifikante Erhöhung der Annexin A1-Genexpression (Seth et al. 2003). Im Gegensatz dazu ist Annexin A1 in der zystischen Fibrose herab reguliert (Bensalem et al. 2005; Dalli et al. 2010). Untersuchungen an Annexin A1-defizienten Mäusen zeigen einen höheren Grad der Fibrosierung und einen letalen Verlauf durch eine Bleomycin induzierte Lungenfibrose (Damazo et al. 2011).

Es kann gezeigt werden, dass Annexin A1 und sein Rezeptor FPR2 in enger Nachbarschaft exprimiert werden. Als Determinanten eines parakrinen oder autokrinen Annexin A1/FPR2 Systems der Niere lässt sich eine funktionelle Relevanz vermuten. Verschiedenste Zelltypen scheinen an diesem System beteiligt zu sein. Aufgrund der besonderen Bedeutung der Fibroblasten für die Pathogenese der chronischen Niereninsuffizienz und der Nierenfibrose wurde in dieser Arbeit die Wirkung dieses Systems zunächst in funktionellen Arbeiten an renalen Fibroblasten untersucht.

### **5.3 Isolierung und Charakterisierung der Zellkulturfibroblasten**

Für die Charakterisierung der Annexin A1-Effekte in renalen Fibroblasten musste zunächst ein valides Zellkulturmodell entwickelt werden. Bisherige Kulturversuche an renalen Fibroblasten haben ein hohes Maß an Variabilität des Phänotyps gezeigt (Grupp and Müller 1999). Dies macht die Interpretation der Resultate schwierig. Für die vorliegende Arbeit wurden daher eigene Zellkulturlinien etabliert und mit verschiedenen publizierten Zellkulturlinien verglichen.

Zunächst wurden aus den Annexin A1-defizienten Mäusen und Wildtyp Mäusen aus dem Nierenkortex Primärfibroblasten isoliert. Die Untersuchung dieser Primärfibroblasten zeigte eine hohe Heterogenität und Instabilität des Fibroblasten Phänotyps mit Neigung zur Dedifferenzierung. Um diese Schwierigkeiten in Hinblick auf die Reproduzierbarkeit zellkultureller Experimente zu umgehen, wurden die Fibroblasten durch SV40 Transfektion immortalisiert. Tatsächlich konnte erst durch die Immortalisierung die Stabilität der Kultur und

die Reproduzierbarkeit der Resultate deutlich erhöht werden, sodass ohne diesen essentiellen Schritt funktionelle Arbeiten nicht möglich gewesen wären.

Zur Qualitätskontrolle der etablierten Zellkultur wurde mit einer klassischen PCR aus mRCF Fibroblasten cDNA sichergestellt, dass es sich um eine reine Fibroblasten-Zellkultur handelt und keine Tubulusepithelzellen darin vorkommen. Die Immunfluoreszenzanalyse der etablierten mRCF Fibroblastenlinie zeigte eine Immunreaktivität aller Zellen mit dem Marker für kortikale Fibroblasten CD73. Eine Behandlung mit TGF- $\beta$  führte bei den mRCF Fibroblasten zur Induktion der  $\alpha$ -sma Synthese. Mit einer Endpunkt PCR konnten der murine Fpr-rs2 (humanes Analogon FPR2), der Fpr1 (humanes Analogon FPR), der Fpr-rs6 und Fpr-rs7 aus mRCF cDNA von identifiziert werden.

Parallel dazu wurden fibrotische Nierenfibroblasten aus Mäusen mit Folsäure-induzierter Nephropathie untersucht (Bechtel et al. 2010). Primärfibroblasten aus fibrotischem Nierengewebe behalten ihren Phänotyp auch *in vitro* in Kultur bei (Müller und Rodemann 1991; Rodemann und Müller 1991). Neben den Maus Fibroblasten wurden außerdem humane Nierenfibroblasten aus Nierenbiopsien analysiert. Dabei handelte es sich um eine gesunde Kontrolllinie TK 173 und eine fibrotische Linie TK 188. Zellen, die positiv waren für Vimentin, CD44, CD54,  $\alpha$ -sma und Kollagen I und III und negativ für Zytokeratin, Faktor VIII und MHC2, wurden als Fibroblasten beschrieben (Müller et al. 1995).

In allen untersuchten Fibroblastenlinien wurde eine Annexin A1-Expression festgestellt. Der Annexin A1 Rezeptor FPR2 konnte auf den mRCF Fibroblasten *in vitro* und auf Ratten Nieren Fibroblasten *in vivo* lokalisiert werden. Aufgrund technischer Probleme mit der Spezifität von PCR Primern konnten die Formyl-Peptid-Rezeptoren nicht auf humanen Fibroblasten nachgewiesen werden. Da jedoch pharmakologische Studien im Sinne einer Behandlung mit dem FPR2-spezifischen Rezeptor Antagonisten WRW4 bei den humanen renalen Fibroblasten zu Veränderungen führten, kann davon ausgegangen werden, dass auch diese den FPR2 exprimieren.

Da alle Fibroblastenlinien sowohl Annexin A1 als auch seinen Rezeptor FPR2 exprimieren und Annexin A1 sekretieren, scheint es sich dabei um eine generelle Eigenschaft von renalen kortikalen Fibroblasten zu handeln. Somit ist das etablierte Zellkultursystem von murinen kortikalen Fibroblasten (mRCF) ein gutes Modell zur Untersuchung der Effekte des Annexin A1 in Fibroblasten. Erst das Studium mehrerer Zelllinien ermöglichte die notwendige Sicherheit bei der Interpretation der Befunde. Im Folgenden wurde die Wirkung des Annexin A1/FPR2 Systems an diesen Zelllinien untersucht.

## 5.4 Funktionelle Charakterisierung der Wirkung des Annexin A1/FPR2 Systems in renalen Fibroblasten

### 5.4.1 Regulation von Annexin A1 unter pro-fibrotischen Konditionen

Mit ARA behandelte Ratten zeigten *in vivo* eine Annexin A1-Stimulation. Zudem konnte eine deutlich gesteigerte TGF- $\beta$  mRNA Abundanz in den mit ARA behandelten Ratten detektiert werden. Ein TGF- $\beta$  Anstieg ist mit der Entstehung eines chronischen Nierenversagens assoziiert (Liu 2006) und wird als der bedeutendste Fibrose-induzierende Wachstumsfaktor beschrieben (Koesters et al. 2010). Um die Hypothese *in vitro* zu überprüfen, dass Annexin A1 unter pro-fibrotischen Konditionen stimuliert ist, wurden mRCF Fibroblasten einer pro-fibrotischen Behandlung mit TGF- $\beta$  unterzogen.

Eine pro-fibrotische Behandlung der mRCF Fibroblasten führte zu einem parallelen signifikanten Anstieg der Annexin A1 und  $\alpha$ -sma Expression und einer gesteigerten Syntheseleistung von Extrazellulärmatrix, charakterisiert durch die Expression der Kollagen 1 $\alpha$ 1 mRNA. Der Anstieg des Annexin A1 und  $\alpha$ -sma war sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene zu beobachten. Auffallend war zudem, dass mit TGF- $\beta$  stimulierte mRCF Fibroblasten signifikant mehr Annexin A1 sezernierten. Fibrotische Nierenfibroblasten (fibro Fib) zeigten verglichen mit Kontrollfibroblasten (WT Fib) eine signifikante Erhöhung der Annexin A1- und  $\alpha$ -sma-Expression.

Mit dieser Arbeit kann erstmals gezeigt werden, dass Annexin A1 durch TGF- $\beta$  in renalen Fibroblasten stimuliert wird. Annexin A1 ist *in vitro* unter pro-fibrotischen Bedingungen hochreguliert. Damit bestätigen die *in vitro* Ergebnisse die *in vivo* Resultate über eine erhöhte Annexin A1-Expression im chronischen Nierenversagen. Ausgelöst durch TGF- $\beta$  kommt es zu einer Änderung des Fibroblastenphänotypes hin zu Extrazellulärmatrix-synthetisierenden Myofibroblasten. Annexin A1 wird von diesen Fibroblasten vermehrt sezerniert.

Die Lokalisation des Annexin A1 *in vivo* zeigt, dass Myofibroblasten weniger Annexin A1 exprimieren als nicht aktivierte Fibroblasten. Im Gegensatz zu diesem Befund stehen die Ergebnisse der *in vitro* Zellkulturversuche. Aufgrund der kontraktilen Eigenschaft des  $\alpha$ -sma und dessen Bedarf an intrazellulärem Kalzium jedoch ist es schwer vorstellbar, dass Myofibroblasten intrazellulär große Mengen an Annexin A1 exprimieren. Denn dieses würde das Kalzium puffern und die Myofibroblasten würden ihre Kontraktilität verlieren.

Eine Ursache für die Differenz der Ergebnisse kann sein, dass das artifizielle Zellkulturmodell die komplexen *in vivo* Vorgänge von Entzündung und Fibrose nicht in seiner Gesamtheit abbilden kann. Im fibrotischen Geschehen sind neben TGF- $\beta$  eine Vielzahl verschiedenster pro-fibrotischer Zytokine und Wachstumsfaktoren wie PDGF, CTGF, Endothelin, Angiotensin

II oder TNF- $\alpha$  hochreguliert (Eddy 2000; Qi et al. 2006). In den *in vitro* Studien der vorliegenden Arbeit wurde nur TGF- $\beta$  eingesetzt, welches nicht nur dezidiert pro-fibrotische Eigenschaften, sondern auch anti-inflammatorische Effekte hat (Kehrl et al. 1986b). Ein *Downstream* Mediator des TGF- $\beta$ , CTGF, vermittelt alleinig die pro-fibrotischen Effekte des TGF- $\beta$  (Panek 2008). Eventuell kann dieser Faktor die Divergenz der *in vitro* und *in vivo* Ergebnisse erklären. Das zu klären könnte ein Ziel zukünftiger Studien sein.

Des Weiteren muss auch die Methode der Doppelimmunfluoreszenz kritisch hinterfragt werden, da die Menge des Primärantikörpers so austitriert wird, dass möglichst nur ein geringer Hintergrund auszumachen ist, d.h. die Immunfluoreszenz ist für eine relative Quantifizierung eine gute Methode, jedoch nicht dienlich für die Untersuchung einer absoluten Expression.

Eine abschließende Beurteilung ist hier nicht möglich. Im chronischen Nierenversagen in mit ARA behandelten Ratten exprimieren Myofibroblasten *in vivo* signifikant weniger Annexin A1 als die umliegenden ruhenden Fibroblasten. Insgesamt sind jedoch deutlich mehr Fibroblasten vorhanden, die Annexin A1 exprimieren, als in gesunden Individuen. *In vitro* Versuche zeigen, dass Annexin A1 nach TGF- $\beta$  Behandlung stimuliert ist und vermehrt sezerniert wird.

#### **5.4.2 Funktionelle Rolle des Annexin A1 in renalen Fibroblasten**

Um die Annexin A1-vermittelten Effekte auf Fibroblasten zu untersuchen, wurde Annexin A1 in Fibroblasten überexprimiert und nach einer TGF- $\beta$  Stimulation mit untransfizierten Kontrollzellen verglichen. Außerdem wurden Annexin A1-defiziente Nierenfibroblasten im Grundzustand mit Kontrollfibroblasten im Hinblick auf ihren Phänotyp untersucht. Um die Beteiligung der Formyl-Peptid-Rezeptoren an der Regulation des fibroblastischen Phänotyps zu analysieren wurde mit Antagonisten des FPR und des FPR2 behandelt.

##### *Überexpression des Annexin A1*

Eine Überexpression des Annexin A1 in mRCF Fibroblasten in Form einer stabilen Transfektion mit einem Ratten Annexin A1-pEYFP-N1 Konstrukt zeigte nach der Behandlung mit TGF- $\beta$  im Vergleich zu den mRCF Fibroblasten einen signifikant geringer ausgeprägten Anstieg der  $\alpha$ -sma mRNA und der Kollagen 1 $\alpha$ 1 mRNA. Bestätigt wurde dieses Ergebnis durch Immunfluoreszenzdoppelfärbungen. Eine größere Menge an intrazellulärem Annexin A1 scheint sich inhibitorisch im Hinblick auf einen Myofibroblasten Phänotyp auszuwirken. Die mRCF Fibroblasten zeigten einen stärkeren myofibroblastischen Phänotyp und eine höhere Syntheseleistung an Extrazellulärmatrix als die mRCF+rAnxa1-YFP stabil transfizierten Fibroblasten.

Damit kann gezeigt werden, dass Annexin A1 den Phänotyp von Fibroblasten beeinflussen kann. Eine große Menge an intrazellulärem Annexin A1 erschwert die Stimulation der Fibroblasten zu Myofibroblasten durch TGF- $\beta$ .

#### *Annexin A1-defiziente Fibroblasten*

Die aus Annexin A1-defizienten Mäusen isolierten Nierenfibroblasten zeigten im Grundzustand signifikant erhöhte Expressionsniveaus der  $\alpha$ -sma und Kollagen 1 $\alpha$ 1 mRNA im Vergleich zu mRCF Wildtypfibroblasten. Die Annexin A1-/- Fibroblasten wiesen einen stärkeren myofibroblastischen Phänotyp und eine höhere Kollagensyntheseleistung auf als die Annexin A1-exprimierenden mRCF Fibroblasten.

Dieses Experiment bestätigt die Vermutung, dass intrazelluläres Annexin A1 ein inhibitorischer Faktor im Hinblick auf die Entstehung eines myofibroblastischen Phänotypes ist. Eine Überexpression an Annexin A1 führte nach einer TGF- $\beta$  Stimulation zu einer deutlich geringer ausgeprägten Antwort der  $\alpha$ -sma- und der Kollagen 1 $\alpha$ 1- Biosynthese. Annexin A1-defiziente Fibroblasten wiesen einen starken myofibroblastischen Phänotyp mit induzierter Kollagen 1 $\alpha$ 1 Biosynthese auf. Vermutlich wird Annexin A1 und pro-fibrotischen Konditionen vermehrt in das Zellkulturmedium sekretiert und scheint parakrin oder autokrin den Phänotyp der Fibroblastenpopulation zu beeinflussen. Durch die Lokalisation des FPR2 auf renalen Fibroblasten liegt die Vermutung nahe, dass diese Effekte durch den FPR2 vermittelt werden.

#### *Behandlung mit Antagonisten der Formyl-Peptid-Rezeptoren*

Da die spezifischen Antagonisten des FPR und des FPR2, CsH und WRW4, an humanen Zellen gut etabliert sind (Ye et al. 2009) wurden die Rezeptorblockaden an humanen Fibroblasten untersucht. Die Analyse der Rezeptorblockade wurde an fibrotischen humanen Nierenfibroblasten (TK 188) durchgeführt, da Kontrollfibroblasten (TK 173) ansonsten zunächst mit TGF- $\beta$  behandelt werden müssten, damit vermehrt Annexin A1 in das Medium sekretiert wird. Die humanen fibrotischen Nierenfibroblasten geben eine beträchtliche Menge an Annexin A1 in das Zellkulturmedium ab. Eine Behandlung mit WRW4 zeigte einen signifikanten Anstieg an  $\alpha$ -sma mRNA. Die CsH Behandlung hatte keinen Effekt auf die  $\alpha$ -sma mRNA Synthese.

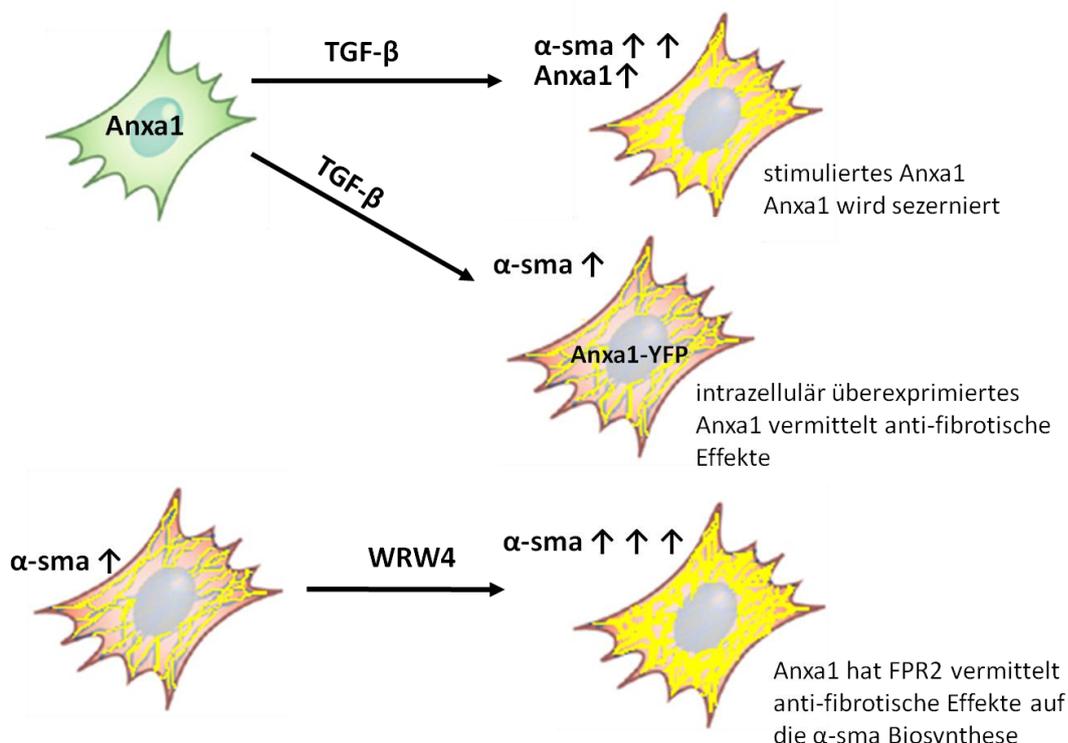
Die Hemmung des FPR2 durch WRW4 scheint den Myofibroblasten Phänotyp zu verfestigen beziehungsweise zu induzieren. Das in das Zellkulturmedium sekretierte Annexin A1 kann durch die WRW4-Blockade des FPR2 den Fibroblastenphänotyp nicht mehr parakrin oder autokrin beeinflussen. Es kommt zu einer Steigerung der  $\alpha$ -sma Biosynthese.

Eine parallele Behandlung mit Annexin A1 Protein oder dem Annexin A1 Peptid Ac2-26 hat sich als nicht sinnvoll erwiesen, da bereits eine große Menge des Proteins von den humanen fibrotischen Fibroblasten sekretiert wird.

Eine gleichzeitige Behandlung der mRCF Fibroblasten mit TGF- $\beta$  und dem Annexin A1 Peptid Ac2-26 oder dem Annexin A1 Protein führte zu instabilen Resultaten. Es ist davon auszugehen, dass bereits durch die TGF- $\beta$  Stimulation große Mengen an Annexin A1 Protein in das Zellkulturmedium gelangen und die daraus resultierenden Effekte auf den Fibroblastenphänotyp durch verschiedene Annexin A1-Konzentrationen im Zellkulturmedium nicht genau definiert werden kann.

## 5.5 Die potentielle protektive Rolle des Annexin A1 im chronischen Nierenversagen

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen deutlich, dass die Annexin A1-Expression *in vivo* im chronischen Nierenversagen im renalen Interstitium stimuliert ist. *In vitro* wird Annexin A1 durch eine TGF- $\beta$  Behandlung von Fibroblasten stimuliert und sezerniert. Funktionelle Studien zeigen, dass sich Annexin A1 inhibitorisch auf pro-fibrotische Bedingungen, charakterisiert durch die  $\alpha$ -sma- und Kollagen 1 $\alpha$ 1- Synthese, auswirkt. Dadurch kann Annexin A1 die Stimulation von Fibroblasten zu Myofibroblasten inhibieren. Dieser Effekt wird vermutlich über den Annexin A1 Rezeptor FPR2 vermittelt. Nachfolgend werden die Ergebnisse schematisch zusammengefasst.

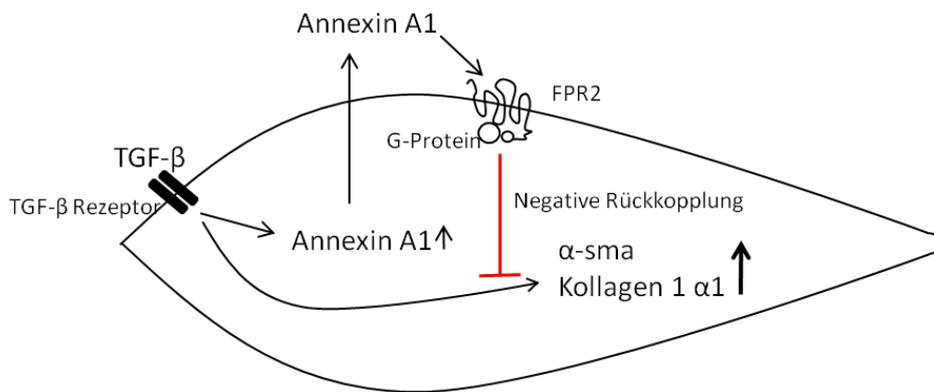


**Abbildung 42:** Zusammenfassung der funktionellen Studien der vorliegenden Arbeit

Fibroblasten (Grün) exprimieren *in vitro* und *in vivo* Annexin A1. Eine TGF- $\beta$  Behandlung führt zu einer parallelen Steigerung der Annexin A1- und  $\alpha$ -sma-Expression. Annexin A1 wird sezerniert. Im Gegensatz zu den mRCF Kontrollfibroblasten zeigen Annexin A1 überexprimierende Fibroblasten (mRCF+rAnxa1-YFP) eine verringerte Antwort auf die TGF- $\beta$  Stimulation. Erhöhte intrazelluläre Annexin A1 Spiegel vermitteln anti-fibrotische Effekte durch Inhibition der  $\alpha$ -sma Synthese. Humane

fibrotische Fibroblasten (unten) zeigen eine Verfestigung des myofibroblastischen Phänotyps unter der FPR2 Blockade durch WRW4. Annexin A1 vermittelt durch den FPR2 anti-fibrotische Effekte.

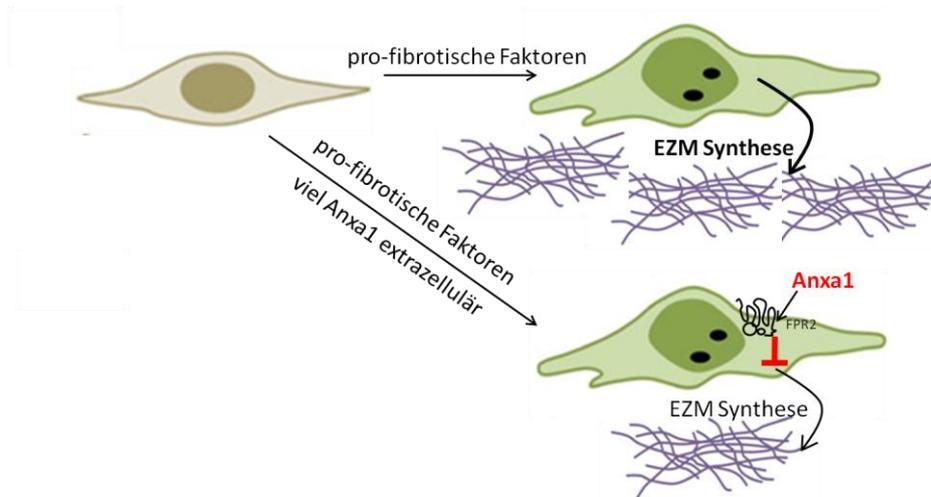
Basierend auf den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit wird das folgende Modell für die Funktion von Fibroblasten in Abhängigkeit von Annexin A1 aufgestellt. Eine TGF- $\beta$  vermittelte Induktion der Annexin A1-Synthese führt zu einer gesteigerten Sekretion des Annexin A1. Annexin A1 bindet an den FPR2 und reguliert dadurch autokrin oder parakrin die  $\alpha$ -sma- und Kollagen 1 $\alpha$ 1-Synthese von Fibroblasten. Diese Regulation kann vermutlich durch die Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration, ausgelöst durch eine Aktivierung des FPR2, erklärt werden. Dadurch wird ERK phosphoryliert, welches letztendlich die Extrazellulärmatrixsynthese reguliert. Die Effekte des Annexin A1 sind somit nicht nur, wie vielfach beschrieben bedeutend für das Entzündungsgeschehen sondern auch für die fibrotischen Veränderungen während einer chronischen Nierenerkrankung.



**Abbildung 43:** Schematische Darstellung der Regulation des Fibroblastenphänotyps durch Annexin A1

Durch TGF- $\beta$  wird sowohl die Annexin A1 Synthese als auch die  $\alpha$ -sma- und Kollagensynthese induziert. Annexin A1 wird von den Fibroblasten sekretiert. Parakrin oder autokrin wird der FPR2 stimuliert und führt zu einer negativen Rückkopplung auf die  $\alpha$ -sma- und Kollagensynthese.

Neben der autokrinen Stimulation kann das Annexin A1/FPR2 System auch parakrine Effekte vermitteln. Pro-fibrotische Faktoren induzieren die Aktivierung der Fibroblasten zu Extrazellulärmatrix-synthetisierenden Myofibroblasten. Liegt extrazellulär viel Annexin A1 vor, etwa durch die Aktivierung von Fibroblasten oder ausgelöst durch eine Entzündungsreaktion, wird die Synthese an Extrazellulärmatrix reduziert und auch das für Myofibroblasten charakteristische Protein  $\alpha$ -sma wird herabreguliert. Annexin A1 greift FPR2 vermittelt entscheidend in den Fibroblasten Phänotyp und die Synthese von Extrazellulärmatrix ein.



**Abbildung 44:** Schematische Regulation des parakrinen Annexin A1/FPR2 Systems

Fibroblasten (Braun) werden durch pro-fibrotische Faktoren zu Extrazellulärmatrix-synthetisierenden Myofibroblasten aktiviert. Von Fibroblasten oder Entzündungszellen sezerniertes Annexin A1 führt FPR2 vermittelt zu einer Reduktion des Myofibroblasten Phänotyps und zur Inhibition der Extrazellulärmatrix Synthese.

Diese Arbeit belegt, dass ein parakriner/autokriner Mechanismus ausgelöst durch die Annexin A1-abhängige Stimulation des FPR2 den Fibroblastenphänotyp beeinflusst. Annexin A1 könnte durch diesen parakrinen Mechanismus im chronischen Nierenversagen möglicherweise auch mit den geschädigten Tubulusepithelzellen und den Entzündungszellen interagieren und dadurch immunmodulatorische Effekte zu vermitteln. Da auch andere für das Entzündungsgeschehen bedeutende Zelltypen, wie die Makrophagen in der Niere den FPR2 exprimieren, stellt das identifizierte Annexin A1/FPR2 System einen neuen potentiellen Ansatzpunkt pharmakologischer Studien in Bezug auf die chronische Nierenerkrankung dar. Durch diese Arbeit wird ein pharmakologischer Ansatzpunkt für Mechanismus-basierte anti-fibrotische Therapiemöglichkeiten identifiziert. Die Hypothese, dass Annexin A1 im chronischen Nierenversagen reguliert ist und somit den Fibroblasten Phänotyp beeinflusst, kann bestätigt werden.

Die vorliegende Arbeit liefert durch die Identifikation der Annexin A1 vermittelten Effekte auf Fibroblasten einen Erklärungsansatz für den in der Arbeit von Araujo beschriebenen protektiven Effekt des Annexin A1 in der Tacrolimus induzierten Nephropathie (Araujo et al. 2010). In mit Tacrolimus behandelten Ratten wurde ein signifikanter Anstieg des TGF- $\beta$  und des Annexin A1 beobachtet. Eine parallele Behandlung mit dem Annexin A1 Peptid Ac2-26 milderte die nephrotoxischen Folgen der Tacrolimus Behandlung ab (Araujo et al. 2010).

Zwei andere Arbeitsgruppen beschreiben bereits eine Rolle des Annexin A1 in der Aktivität von Fibroblasten. Die Arbeitsgruppe um Jia et al. zeigt, dass die TNF- $\alpha$  induzierte Proliferation von Lungenfibroblasten im Wesentlichen von der Annexin A1-Expression abhängig ist. Eine durch TNF- $\alpha$  ausgelöste Proliferation kann durch Annexin A1 siRNA

Behandlung der Fibroblasten drastisch gesteigert werden. Die Annexin A1 abhängige Drosselung der durch TNF- $\alpha$  induzierten Proliferation ist durch eine Hemmung der ERK Phosphorylierung zu erklären. Durch WRW4 konnte der Effekt der Annexin A1 siRNA Behandlung nachgeahmt werden (Jia et al. 2012). Somit scheint auch hier die Fibroblastenaktivität durch endogenes Annexin A1 parakrin über den FPR2 reguliert zu sein. Wobei sich Annexin A1 negativ auf die Proliferation der Fibroblasten, ausgelöst durch TNF- $\alpha$ , auswirkt und durch die parallele Hemmung der IL-6 Sekretion anti-inflammatorische Effekte vermittelt (Jia et al. 2012).

Im Gegensatz dazu zeigen Tagoe et al., dass Annexin A1 TNF- $\alpha$  vermittelt aus Synovialfibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis sezerniert wird und durch die Formyl-Peptid-Rezeptoren abhängige Aktivierung von ERK zur Sekretion der Metalloproteinase-1 führt (Tagoe et al. 2008). Demnach scheint endogenes sekretiertes Annexin A1 in Synovialfibroblasten eine pro-inflammatorische Rolle zu spielen.

Die anti-inflammatorischen Funktionen des Annexin A1 beruhen vor allem auf der Vermittlung der Effekte der Glukokortikoide, der Hemmung der neutrophilen Granulozyten Migration, der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen sowie der Apoptose von neutrophilen Granulozyten. Pro-inflammatorische Effekte können vermittelt werden, indem es beispielsweise die T-Zell Differenzierung unterstützt (D'Acquisto et al. 2007), die Leukozyten Transmigration fördert (Williams et al. 2010), oder die Sekretion der Metalloproteinase 1 (Tagoe et al. 2008) induziert (D'Acquisto, Piras, und Rattazzi 2013). Diese gegensätzlichen Effekte werden durch unterschiedliche Mechanismen hervorgerufen. Vermutlich vermittelt das C-terminale Peptid nach Proteolyse des N-Terminus pro-inflammatorische Effekte durch die Aktivierung von ERK (Williams et al. 2010). Die N-terminalen Peptide sowie das *full-length* Protein sind dagegen für die anti-inflammatorischen Wirkungen verantwortlich (Perretti und D'Acquisto 2009).

Ob die genannten pro-inflammatorischen Effekte des Annexin A1 dessen „dunkle Seite“ beschreiben, muss je nach Verlauf der Entzündungsreaktion beurteilt werden. Da eine Entzündungsreaktion wichtig für die Regeneration des geschädigten Gewebes ist, muss genau zwischen einem akuten und einem chronischen Verlauf unterschieden werden, d.h. auch die Effekte des Annexin A1 sind entsprechend diesen Kontexts zu interpretieren.

Betrachtet man die Fibrosierung von geschädigtem Nierengewebe so stellt sich auch hier die Frage, ob die interstitielle Fibrose per se maligne ist. Ein *Review* von Kaissling et al. (Kaissling, Lehir, und Kriz 2013) geht der Frage nach, ob es sich bei der Fibrose um eine Antwort auf eine Gewebsschädigung handelt oder ob die Fibrose an sich zur Zerstörung des renalen Parenchyms führt. Bei einer Schädigung des Tubulusepithels kommt es zur Entstehung einer lokal begrenzten Entzündungsreaktion. Diese führt zum „Abräumen“ des

geschädigten Tubulusepithels. Dadurch werden residente Fibroblasten aktiviert, die daraufhin in dem geschädigten Bereich akkumulieren und einen Myofibroblasten Phänotyp annehmen (Anders, Vielhauer, und Schlöndorff 2003). In dem Netzwerk aus Myofibroblasten wird Extrazellulärmatrix gebildet, welches zur Narbenbildung in dem Bereich beiträgt und den umliegenden Tubuli eine mechanische Stabilität verleiht. Bei akuten Nierenerkrankungen hat das fibrotische Gewebe demnach eine protektive Rolle, indem es die Heilung unterstützt (Kaissling, Le Hir, und Kriz 2013). Anders ist das bei chronischen Erkrankungen, denn durch die Persistenz der Entzündungsreaktion wird immer mehr Nierengewebe geschädigt und durch fibrotisches Gewebe ersetzt, es kommt zur Entstehung eines Teufelskreises.

Da die chronische Nierenerkrankung durch das parallele Auftreten einer persistierenden Entzündungsreaktion und dem Auftreten von fibrotischen Veränderungen gekennzeichnet ist, kann nicht abschließend geklärt werden, ob es sich bei der Annexin A1-abhängigen Regulation des Fibroblasten Phänotyps um eine „gute“ oder „schlechte“ Eigenschaft handelt, d.h. die Frage ob die Drosselung des Myofibroblastenphänotypes tatsächlich protektive Funktionen im Rahmen des chronischen Nierenversagens hat kann nicht geklärt werden.

Ziel zukünftiger Studien wird es sein, diese Mechanismen genauer zu untersuchen. Dabei ist mit *in vivo* Studien genauer zu klären, ob die Annexin A1-abhängige Inhibition des Myofibroblasten Phänotyps im Rahmen eines chronischen Nierenversagens renoprotektiv ist. Hierzu würde die Induktion eines chronischen Nierenversagens in FPR2-defizienten Mäusen in Frage kommen. Damit könnte geklärt werden, ob die FPR2-defizienten Fibroblasten einen starken Myofibroblastenphänotyp annehmen und inwiefern dies einer Ausheilung im Vergleich zu Wildtyp Kontrollen zuträglich ist. Weiter ist es von besonderem Interesse die intrazellulären Signalwege der Annexin A1/FPR2 vermittelten Inhibition der Kollagen und  $\alpha$ -sma Biosynthese zu identifizieren. Als Voraussetzung dafür dienen die in dieser Arbeit beschriebenen Zellkulturstudien. Zudem ist in Bezug auf die Beurteilung der Bedeutung des Annexin A1/FPR2 Systems in der Niere besonders die Rolle der Endothelzellen und der Makrophagen zu beleuchten.

## 6 Zusammenfassung

**Hintergrund:** Die Pathogenese des CKD ist gekennzeichnet durch das parallele Auftreten entzündlicher Prozesse und fibrotischer Veränderungen des Nierengewebes. Aufgrund der Persistenz der Entzündung kommt es zu einer fortschreitenden Gewebeerstörung durch Hypoxie und nachfolgende Narbenbildung. Ein Schlüsselfaktor in der Entstehung eines chronischen Nierenversagens ist der Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ . TGF- $\beta$  induziert die Proliferation der residenten interstitiellen Fibroblasten zu aktiven Extrazellulärmatrix-synthetisierenden Myofibroblasten.

Annexin A1 entfaltet parakrine anti-inflammatorische Wirkung und hat in verschiedenen Organsystemen auch eine anti-fibrotische Wirkung. Einige der anti-inflammatorischen Effekte des Annexin A1 sind über seinen Rezeptor FPR2 vermittelt. Über eine nephroprotektive Wirkung von Annexin A1 wird spekuliert.

**Ziele:** In dieser Arbeit wurde den Hypothesen nachgegangen, dass Annexin A1 und FPR2 in renalen interstitiellen Fibroblasten exprimiert sind und Annexin A1 unter pro-fibrotischen Bedingungen stimuliert ist. Außerdem wurde untersucht ob sich Annexin A1 regulativ auf den Fibroblasten Phänotyp auswirkt. Ziel der Arbeit war somit die Charakterisierung der Expression und der funktionellen Rolle des Annexin A1 im chronischen Nierenversagen.

**Material und Methoden:** Sprague-Dawley Ratten wurden mit einem Angiotensin II Typ I Rezeptorantagonisten (ARA) oder Vehikel für 14 Tage postnatal behandelt. Mit elf Monaten wurden die Tiere getötet und die Nieren für histologische- oder Genexpressionsuntersuchungen prozessiert. Die Annexin A1-Distribution wurde in den mit ARA behandelten Ratten und in gesunden Kontrollen immunhistochemisch erfasst. Mit Doppelimmunfluoreszenzfärbungen wurde die interstitielle Lokalisation von Annexin A1 und FPR2 untersucht. Dazu wurden Annexin A1 oder FPR2 mit den Antikörpern für 5'Ektonukleotidase als Marker gegen kortikale Fibroblasten,  $\alpha$ -sma als Marker für Myofibroblasten, CD68 als Marker für Makrophagen und Recla als Marker für Endothelzellen gefärbt.

Aus Nieren von Annexin A1-defizienten Mäusen und ihren Kontrollen wurden renale kortikale Fibroblasten extrahiert und immortalisiert. Annexin A1 wurde in den Kontrollfibroblasten stabil überexprimiert. Zudem wurden bereits etablierte Zellkulturlinien fibrotischer Maus Fibroblasten und humaner Nierenfibroblasten (fibrotisch TK188) untersucht. TGF- $\beta$  wurde in der Zellkultur eingesetzt, um pro-fibrotische Bedingungen zu induzieren. Die  $\alpha$ -sma-, Kollagen 1 $\alpha$ 1- und die Annexin A1-Expression wurde durch Real-Time PCR, Western Blot oder Immunfluoreszenz erfasst. Die Annexin A1-Sekretion wurde durch Proteinfällung mit Trichloressigsäure im Western Blot analysiert. Um die Effekte des extrazellulären Annexin

A1 zu erfassen, wurden fibrotische humane Nierenfibroblasten mit den Formyl-Peptid-Rezeptor Antagonisten Cyclosporin H und WRW4 behandelt.

**Resultate:** Mit ARA behandelte Ratten zeigen morphologische Anzeichen einer chronischen Nierenschädigung wie fibrotische Areale, inflammatorische Infiltrationen, mit Protein obstruierte Tubuli und sklerosierte Glomeruli. Annexin A1 wird im renalen Interstitium exprimiert und ist in mit ARA behandelten Ratten signifikant stimuliert. In mit ARA behandelten Ratten ist ein signifikanter Anstieg von CD73-positiven Fibroblasten und CD68-positiven Makrophagen zu beobachten. CD73-positive Fibroblasten machen den Großteil der Annexin A1-positiven interstitiellen Zellen aus. Im renalen Interstitium exprimieren neben den CD73-positiven Fibroblasten auch CD68-positive Makrophagen Annexin A1. CD73-positive Fibroblasten und CD68-positive Makrophagen sind ursächlich für eine gesteigerte Annexin A1-Abundanz in mit ARA behandelten Ratten. Myofibroblasten und Kapillarendothelzellen zeigen *in vivo* keine Annexin A1-Expression. Der Annexin A1-Rezeptor FPR2 kann auf interstitiellen CD73-positiven Fibroblasten und auf peritubulären Kapillarendothelzellen lokalisiert werden. Im Bereich inflammatorischer Infiltrationen exprimieren Subpopulationen an CD68-positiven Makrophagen den FPR2.

Eine Behandlung von renalen kortikalen Fibroblasten mit pro-fibrotischem TGF- $\beta$  führt zu einem signifikanten Anstieg der Annexin A1 mRNA und Proteinmenge mit einem parallelen Anstieg der  $\alpha$ -sma- und Kollagen 1 $\alpha$ 1 mRNA sowie einer deutlich gesteigerten Annexin A1-Sekretion. Durch eine Überexpression von Annexin A1 wird der Effekt der Stimulierbarkeit durch TGF- $\beta$  inhibiert. Es zeigt sich ein signifikant reduziertes Ausmaß der Induktion der  $\alpha$ -sma- und Kollagen 1 $\alpha$ 1-Biosynthese. Annexin A1-defiziente Nierenfibroblasten zeigen eine signifikante Erhöhung der  $\alpha$ -sma- und Kollagen 1 $\alpha$ 1 mRNA auf. Eine Hemmung des FPR2 mit dem FPR2-spezifischen Rezeptorantagonisten WRW4 führt zu einer gesteigerten  $\alpha$ -sma mRNA Abundanz in fibrotischen humanen Nierenfibroblasten. Annexin A1 hemmt FPR2-vermittelt die Aktivierung der Fibroblasten durch TGF- $\beta$ .

**Zusammenfassung und Schlussfolgerung:** Annexin A1 und sein Rezeptor FPR2 werden von renalen interstitiellen Fibroblasten exprimiert. Myofibroblasten exprimieren *in vivo* weniger oder kein Annexin A1. Annexin A1 ist unter pro-fibrotischen Konditionen hochreguliert und wird sezerniert. Als parakriner Mediator führt Annexin A1 zu einer Veränderung des Fibroblastenphänotypen und hat anti-fibrotische Effekte. Diese Effekte werden durch den FPR2 vermittelt.

Mit dieser Arbeit wurde das parakrine Annexin A1/FPR2 System erstmalig in der Niere nachgewiesen und stellt einen pharmakologischen Ansatzpunkte zur Entwicklung Mechanismus-basierter Therapieoptionen von chronischen Nierenerkrankungen dar.

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Diagnoseverteilung bei Dialysepatienten, eigene Darstellung nach QuaSiNiere (2005).....	1
<b>Abbildung 2:</b> Schematische Darstellung der Entstehung eines chronischen Nierenversagens und der Entwicklung einer interstitiellen Fibrose, veränderte Darstellung nach Vielhauer, Schlöndorff und Anders (2004) .....	6
<b>Abbildung 3:</b> Übersicht über die Herkunft renaler Myofibroblasten, veränderte Darstellung nach Gric, Duffield und Humphreys (2012) .....	9
<b>Abbildung 4:</b> Dreidimensionale Struktur des Annexin A1, veränderte Darstellung nach Rosengarth und Luecke (2003).....	12
<b>Abbildung 5:</b> Darstellung der Phosphorylierungsstellen von Annexin A1, Darstellung nach Rothut (1997) .....	13
<b>Abbildung 6:</b> Darstellung der Eicosanoidsynthese und deren Hemmung durch Annexin A1, eigene Darstellung .....	14
<b>Abbildung 7:</b> Schematische Darstellung der vielfältigen Funktionen von intra- und extrazellulärem Annexin A1, veränderte Darstellung nach Lim und Pervaiz (2007) .....	15
<b>Abbildung 8:</b> Spezifische Ligandenbindungsstellen des FPRL1, Darstellung nach Bena et al. (2012) .....	18
<b>Abbildung 9:</b> Vergleichende Darstellung von mit ARA behandelten Ratten und ihren Kontrollen in der SFOG Trichrom-Färbung .....	49
<b>Abbildung 10:</b> : Vergleichende Darstellung von mit ARA behandelten Ratten und ihren Kontrollen in der Sirius Rot-Färbung .....	50
<b>Abbildung 11:</b> Exemplarische Darstellung der pathologischen Veränderungen im Kortex von mit ARA behandelten Ratten in Semidünnschnitten und elektronenmikroskopischen Aufnahmen .....	51
<b>Abbildung 12:</b> Exemplarische Darstellung der Annexin A1-Expression in Nieren junger Kontrolltiere .....	52
<b>Abbildung 13:</b> Darstellung der Annexin A1 mRNA Expression im Nierenhomogenat von mit ARA behandelten Ratten und ihren Kontrollen, .....	53
<b>Abbildung 14:</b> Vergleichende Darstellung der Annexin A1-Expression in mit ARA behandelten Ratten und ihren Kontrollen .....	54
<b>Abbildung 15:</b> Vergleichende Darstellung der CD73-Expression in mit ARA behandelten Ratten und ihren Kontrollen.....	56
<b>Abbildung 16:</b> Exemplarische Darstellung der Doppelimmunfluoreszenz von Annexin A1 und CD73 im Kortex einer mit ARA behandelten Ratte .....	57

<b>Abbildung 17:</b> Exemplarische Darstellung der Doppelimmunfluoreszenz von Annexin A1 und $\alpha$ -sma im Kortex einer mit ARA behandelten Ratte.....	58
<b>Abbildung 18:</b> Exemplarische Darstellung der Doppelimmunfluoreszenz von Annexin A1 und CD73 und Identifizierung weiterer Annexin A1-positiver Zellen im Kortex einer mit ARA behandelten Ratte .....	59
<b>Abbildung 19:</b> Vergleichende Darstellung der CD68-Expression in mit ARA behandelten Ratten und ihren Kontrollen.....	60
<b>Abbildung 20:</b> Exemplarische Darstellung der Doppelimmunfluoreszenz von Annexin A1 und CD68 im Kortex einer mit ARA behandelten Ratte .....	61
<b>Abbildung 21:</b> Exemplarische Darstellung der Doppelimmunfluoreszenz von Annexin A1 und Reca im Kortex einer mit ARA behandelten Ratte .....	62
<b>Abbildung 22:</b> Exemplarische Darstellung der Doppelimmunfluoreszenz von FPR2 und CD73 im Kortex einer mit ARA behandelten Ratte .....	63
<b>Abbildung 23:</b> Exemplarische Darstellung der Doppelimmunfluoreszenz von FPR2 und CD68 im Kortex einer mit ARA behandelten Ratte .....	64
<b>Abbildung 24:</b> Exemplarische Darstellung der Doppelimmunfluoreszenz von FPR2 und Reca im Kortex einer mit ARA behandelten Ratte .....	65
<b>Abbildung 25:</b> Exemplarische Darstellung der Immunfluoreszenzfärbung von CD73 zur Verifizierung der kortikalen Fibroblastenzelllinie mRCF .....	67
<b>Abbildung 26:</b> Darstellung der AQP1, AQP2 und NHE3 mRNA Expression in mRCF cDNA (Fibroblasten) und cDNA eines Gesamtnierenhomogenates der Maus (Maus) mit Negativkontrollen (NTC).....	68
<b>Abbildung 27:</b> Exemplarische Darstellung der Immunfluoreszenzfärbung von $\alpha$ -sma zur Untersuchung der $\alpha$ -sma Biosynthese in mRCF Fibroblasten .....	68
<b>Abbildung 28:</b> Darstellung der Formyl-Peptid-Rezeptoren mRNA Expression in mRCF cDNA (Fibroblasten) und cDNA eines Gesamtnierenhomogenates der Maus (Maus) mit Negativkontrollen (NTC).....	69
<b>Abbildung 29:</b> Darstellung der TGF- $\beta$ mRNA Expression im Nierenhomogenat von mit ARA behandelten Ratten und ihren Kontrollen.....	70
<b>Abbildung 30:</b> Darstellung der Annexin A1-, $\alpha$ -sma- und Col1 $\alpha$ 1- mRNA Expression von mit TGF- $\beta$ behandelten mRCF Fibroblasten und ihren Kontrollen.....	71
<b>Abbildung 31:</b> Darstellung der Anxa1- und $\alpha$ -sma- Proteinexpression sowie Annexin A1-Sekretion von mit TGF- $\beta$ behandelten mRCF Fibroblasten und ihren Kontrollen .....	72
<b>Abbildung 32:</b> Vergleichende Darstellung der Doppelimmunfluoreszenz von Annexin A1 und $\alpha$ -sma in mit TGF- $\beta$ behandelten mRCF Fibroblasten und ihren Kontrollen .....	73
<b>Abbildung 33:</b> Darstellung der Annexin A1-, $\alpha$ -sma- und Col1 $\alpha$ 1 mRNA Expression mF Fibroblasten und ihren Kontrollen (mWT) .....	74

**Abbildung 34:** Vergleichende Darstellung der Doppelimmunfluoreszenz von Annexin A1 und  $\alpha$ -sma in mfF Fibroblasten und ihren Kontrollen (mWT) ..... 74

**Abbildung 35:** Darstellung der Annexin A1 mRNA Expression von mRCF+rAnxa1-YFP Fibroblasten und ihren Kontrollen (mRCF)..... 75

**Abbildung 36:** Vergleichende Darstellung der Immunfluoreszenz von Annexin A1 der mRCF+rANXA1-YFP Fibroblasten und ihren Kontrollen (mRCF) ..... 76

**Abbildung 37:** Darstellung der  $\alpha$ -sma- und Col1 $\alpha$ 1- mRNA Expression von mRCF+rAnxa1-YFP Fibroblasten und ihren Kontrollen (mRCF) unter pro-fibrotischer TGF- $\beta$  Behandlung... 77

**Abbildung 38:** Vergleichende Darstellung der Doppelimmunfluoreszenz von Annexin A1 und  $\alpha$ -sma in mRCF+rAnxa1-YFP Fibroblasten und ihren Kontrollen (mRCF) unter pro-fibrotischer TGF- $\beta$  Behandlung ..... 78

**Abbildung 39:** Darstellung der Annexin A1-,  $\alpha$ -sma- und Col1 $\alpha$ 1- mRNA Expression von Anxa1-/- Fibroblasten und ihren Kontrollen (mRCF) ..... 79

**Abbildung 40:** Vergleichende Darstellung der Doppelimmunfluoreszenz von Annexin A1 und  $\alpha$ -sma in Anxa1-/- Fibroblasten und ihren Kontrollen (mRCF) ..... 80

**Abbildung 41:** Darstellung der  $\alpha$ -sma- und Col1 $\alpha$ 1- mRNA Expression von mit CsH oder WRW4 behandelten Tk 188 Fibroblasten und ihren Kontrollen ..... 81

**Abbildung 42:** Zusammenfassung der funktionellen Studien der vorliegenden Arbeit ..... 92

**Abbildung 43:** Schematische Darstellung der Regulation des Fibroblastenphänotypes durch Annexin A1 ..... 93

**Abbildung 44:** Schematische Regulation des parakrinen Annexin A1/FPR2 Systems..... 94

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Übersicht über die Formyl-Peptid-Rezeptoren.....	17
<b>Tabelle 2:</b> Auflistung des Verbrauchsmaterials .....	22
<b>Tabelle 3:</b> Liste aller Chemikalien und Reagenzien .....	23
<b>Tabelle 4:</b> Auflistung aller Enzyme und dazugehöriger Puffer.....	25
<b>Tabelle 5:</b> Liste der Reagenzien der Zellkultur .....	26
<b>Tabelle 6:</b> Liste der angewendeten Kits .....	26
<b>Tabelle 7:</b> Eingesetzte Geräte .....	26
<b>Tabelle 8:</b> Aufstellung der benutzten Software .....	27
<b>Tabelle 9:</b> Zur Aorta abdominalis eingesetzte Reagenzien und Lösungen .....	29
<b>Tabelle 10:</b> Zur Sirius Rot-Färbung eingesetzte Lösungen .....	31
<b>Tabelle 11:</b> Liste der eingesetzten Primärantikörper .....	31
<b>Tabelle 12:</b> Liste der eingesetzten Sekundärantikörper .....	32
<b>Tabelle 13:</b> Zur Immunhistochemie eingesetzte Puffer .....	33
<b>Tabelle 14:</b> Zur Herstellung von Zelllysaten eingesetzter PI-Puffer .....	33
<b>Tabelle 15:</b> Zur SDS-PAGE eingesetzte Lösungen.....	34
<b>Tabelle 16:</b> Zum Western Blotting eingesetzter Transfer-Puffer.....	36
<b>Tabelle 17:</b> Pipettierschema und Temperatur-Zeitprogramm einer Endpunkt-PCR.....	37
<b>Tabelle 18:</b> Liste der zur Endpunkt-PCR eingesetzten Primer .....	38
<b>Tabelle 19:</b> Zur Agarosegel-Elektrophorese eingesetzter TAE-Puffer .....	38
<b>Tabelle 20:</b> Pipettierschema und Temperatur-Zeitprogramm einer qPCR mit <i>EVAGreen</i> ®..	39
<b>Tabelle 22:</b> Pipettierschema und Temperatur-Zeitprogramm einer qPCR mit <i>Taqman</i> ®- <i>Sonden</i> .....	41
<b>Tabelle 23:</b> Liste der Taqman® Genexpressions Systeme .....	41
<b>Tabelle 24:</b> Pipettierschema und Temperatur-Zeitprogramm einer Klonierungs-PCR .....	42
<b>Tabelle 25:</b> Zusammensetzung des LB-Mediums .....	43
<b>Tabelle 26:</b> Zusammensetzung des LB-Agars .....	44
<b>Tabelle 27:</b> Zusammensetzung des Elektroporationspuffers .....	46
<b>Tabelle 28:</b> Behandlung mit Formyl-Peptid-Rezeptor Antagonisten.....	47
<b>Tabelle 29:</b> Auflistung aller verwendeten und generierten Zelllinien .....	47
<b>Tabelle 30:</b> Zusammenfassung der Annexin A1- und FPR2-Immunreaktivität interstitieller Zellen in mit ARA behandelten Ratten und ihren Kontrollen .....	66

## Literaturverzeichnis

- Aldridge LC, Harris HJ, Plevin R, Hannon R, Bryant CE. (1999) The annexin protein lipocortin 1 regulates the MAPK/ERK pathway. *J Biol Chem*; 274 37620-8.
- Ambrose MP, Bahns CL, Hunninghake GW. (1992) Lipocortin I production by human alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 6 17-21.
- Anders HJ, Vielhauer V, Schlöndorff D. (2003) Chemokines and chemokine receptors are involved in the resolution or progression of renal disease. *Kidney Int*; 63 401-15.
- Araujo LP, Truzzi RR, Mendes GE, Luz MA, Burdmann EA, Oliani SM. (2010) Interaction of the anti-inflammatory annexin A1 protein and tacrolimus immunosuppressant in the renal function of rats. *Am J Nephrol*; 31 527-33.
- Araujo LP, Truzzi RR, Mendes GE, Luz MA, Burdmann EA, Oliani SM. (2012) Annexin A1 protein attenuates cyclosporine-induced renal hemodynamics changes and macrophage infiltration in rats. *Inflamm Res*; 61 189-96.
- Arur S, Uche UE, Rezaul K, Fong M, Scranton V, Cowan AE, Mohler W, Han DK. (2003) Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. *Dev Cell*; 4 587-98.
- Bachmann S, Le Hir M, Eckardt KU. (1993) Co-localization of erythropoietin mRNA and ecto-5'-nucleotidase immunoreactivity in peritubular cells of a rat renal cortex indicates that fibroblasts produces erythropoietin. *J Histochem Cytochem*; 41 335-41.
- Barnes JL, Glass WF, 2nd. (2011) Renal interstitial fibrosis: a critical evaluation of the origin of myofibroblasts. *Contrib Nephrol*; 169 73-93.
- Barwise JL, Walker JH. (1995) Subcellular localization of annexins in human foreskin fibroblasts. *Biochem Soc Trans*; 23 35S.
- Bechtel W, McGoohan S, Zeisberg EM, Müller GA, Kalbacher H, Salant DJ, Müller CA, Kalluri R, Zeisberg M. (2010) Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney. *Nat Med.*; 16 544-50.

- Bena S, Brancaleone V, Wang JM, Perretti M, Flower RJ. (2012) Annexin A1 Interactions with the FPR2/ALX Receptor: Identification of distinct domains and downstream associated signaling. *J Biol Chem*; 287 246890-7.
- Bensalem N, Ventura AP, Vallee B, Lipecka J, Tondelier D, Davezac N, Dos Santos A, Perretti M, Fajac A, Sermet-Gaudelus I, *et al.* (2005) Down-regulation of the anti-inflammatory protein annexin A1 in cystic fibrosis knock-out mice and patients. *Mol Cell Proteomics*; 4 1591-601.
- Bizzarro V, Fontanella B, Carratu A, Belvedere R, Marfella R, Parente L, Petrella A. (2012) Annexin A1 N-terminal derived peptide Ac2-26 stimulates fibroblast migration in high glucose conditions. *PLoS One*; 7 e45639.
- Blackwell GJ, Carnuccio R, Di Rosa M, Flower RJ, Parente L, Persico P. (1980) Macro cortin: a polypeptide causing the anti-phospholipase effect of glucocorticoids. *Nature*; 287 147-9.
- Boor P, Floege J. (2012) The renal (myo-)fibroblast: a heterogeneous group of cells. *Nephrol Dial Transplant*; 27 3027-36.
- Border WA, Noble NA. (1997) TGF-beta in kidney fibrosis: a target for gene therapy. *Kidney Int*; 51 1388-96.
- Brenner BM, Lawler EV, Mackenzie HS. (1996) The hyperfiltration theory: a paradigm shift in nephrology. *Kidney Int*; 49 1774-7.
- Briggs J, Kriz W, Schnermann J. (2001) Overview of the Kidney Function and Structure. In Saunders Elsevier. *Primer on Kidney Diseases: National Kidney Foundation.*
- Campean V, Theilig F, Paliege A, Breyer M, Bachmann S. (2003) Key enzymes for renal prostaglandin synthesis: site-specific expression in rodent kidney (rat, mouse). *Am J Physiol Renal Physiol*; 285 F19-32.
- Cappellesso-Fleury S, Puissant-Lubrano B, Apoil PA, Titeux M, Winterton P, Casteilla L, Bourin P, Blancher A. (2010) Human fibroblasts share immunosuppressive properties with bone marrow mesenchymal stem cells. *J Clin Immunol*; 30 607-19.

- Castro-Caldas M, Duarte CB, Carvalho AP, Lopes MC. (2002) Dexamethasone induces the secretion of annexin I in immature lymphoblastic cells by a calcium-dependent mechanism. *Mol Cell Biochem*; 237 31-8.
- Christmas P, Callaway J, Fallon J, Jones J, Haigler HT. (1991) Selective secretion of annexin 1, a protein without a signal sequence, by the human prostate gland. *J Biol Chem*; 266 2499-507.
- Cirino G, Flower RJ. (1987) Human Recombinant Lipocortin-1 Inhibits Prostacyclin Production by Human Umbilical Artery In vitro. *Prostaglandins*; 34 59-62.
- Comera C, Russo-Marie F. (1995) Glucocorticoid-induced annexin 1 secretion by monocytes and peritoneal leukocytes. *Br J Pharmacol*; 115 1043-7.
- Couser WG, Remuzzi G, Mendis S, Tonelli M. (2011) The contribution of chronic kidney disease to the global burden of major noncommunicable diseases. *Kidney Int*; 80 1258-70.
- Crumpton MJ, Dedman JR. (1990) Protein terminology tangle. *Nature*; 345 212.
- D'Acquisto F, Merghani A, Lecona E, Rosignoli G, Raza K, Buckley CD, Flower RJ, Perretti M. (2007) Annexin-1 modulates T-cell activation and differentiation. *Blood*; 109 1095-102.
- D'Acquisto F, Piras G, Rattazzi L. (2013) Pro-inflammatory and pathogenic properties of Annexin-A1: the whole is greater than the sum of its parts. *Biochem Pharmacol*; 85 1213-8.
- Dalli J, Rosignoli G, Hayhoe RP, Edelman A, Perretti M. (2010) CFTR inhibition provokes an inflammatory response associated with an imbalance of the annexin A1 pathway. *Am J Pathol*; 177 176-86.
- Damazo AS, Sampaio AL, Nakata CM, Flower RJ, Perretti M, Oliani SM. (2011) Endogenous annexin A1 counter-regulates bleomycin-induced lung fibrosis. *BMC Immunology*; 12 1-13.
- Desmouliere A, Chaponnier C, Gabbiani G. (2005) Tissue repair, contractio, and the myofibroblast. *Wound Repair and Regen.*; 13 7-12.

- Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. (1993) Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol*; 122 103-11.
- Di Rosa M, Flower RJ, Hirata F, Parente L, Russo-Marie F. (1984) Nomenclature Announcement: Anti-Phospholipase Proteins. *Prostaglandins*; 28 441-42.
- Direkze NC, Forbes SJ, Brittan M, Hunt T, Jeffery R, Preston SL, Poulson R, Hodivala-Dilke K, Alison MR, Wright NA. (2003) Multiple organ engraftment by bone-marrow-derived myofibroblasts and fibroblasts in bone-marrow-transplanted mice. *Stem Cells*; 21 514-20.
- Duffield JSLMTVJWTA. (2013) Host Responses in Tissue Repair and Fibrosis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*; 8 241-76.
- Dufton N, Hannon R, Brancaleone V, Dalli J, Patel HB, Gray M, D'Acquisto F, Buckingham JC, Perretti M, Flower RJ. (2010) Anti-inflammatory role of the murine formyl-peptide receptor 2: ligand-specific effects on leukocyte responses and experimental inflammation. *J Immunol*; 184 2611-9.
- Dufton N, Perretti M. (2010) Therapeutic anti-inflammatory potential of formyl-peptide receptor agonists. *Pharmacol Ther*; 127 175-88.
- Durstin M, Gao JL, Tiffany HL, McDermott D, Murphy PM. (1994) Differential expression of members of the N-formylpeptide receptor gene cluster in human phagocytes. *Biochem Biophys Res Commun*; 201 174-9.
- Eddy AA. (2000) Molecular basis of renal fibrosis. *Pediatr Nephrol*; 15 290-301.
- Errasfa M, Russo-Marie F. (1989) A purified lipocortin shares the anti-inflammatory effect of glucocorticosteroids in vivo in mice. *Br J Pharmacol*; 97 1051-8.
- Ferlazzo V, D'Agostino P, Milano S, Caruso R, Feo S, Cillari E, Parente L. (2003) Anti-inflammatory effects of annexin-1: stimulation of IL-10 release and inhibition of nitric oxide synthesis. *International Immunopharmacology*; 3 1363-69.
- Fogo AB. (2007) Mechanisms of progression of chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*; 22 2011-22.

- Gabbiani G. (1992) The biology of the myofibroblast. *Kidney Int*; 41 530-2.
- Gao JL, Chen H, Filie JD, Kozak CA, Murphy PM. (1998) Differential Expression of the N-Formylpeptide Receptor Gene Cluster in Human and Mouse. *Genomics*; 51 270-76.
- Gastardelo TS, Damazo AS, Dalli J, Flower RJ, Perretti M, Oliani SM. (2009) Functional and ultrastructural analysis of annexin A1 and its receptor in extravasating neutrophils during acute inflammation. *Am J Pathol*; 174 177-83.
- Goulding NJ, Luying P, Guyre PM. (1990) Characteristics of lipocortin 1 binding to the surface of human peripheral blood leucocytes. *Biochem Soc Trans*; 18 1237-8.
- Goyal VK. (1982) Changes with age in the human kidney. *Exp Gerontol*; 17 321-31.
- Grgic I, Duffield JS, Humphreys BD. (2012) The origin of interstitial myofibroblasts in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*; 27 183-93.
- Grupp C, Müller GA. (1999) Renal fibroblast culture. *Exp Nephrol*; 7 377-85.
- Guo SJ, Wang TR, Chen J, Wu LY, Gao PJ, Zhu DL. (2010) Dynamic expression of proteins associated with adventitial remodeling in adventitial fibroblasts from spontaneously hypertensive rats. *Acta Pharmacol Sin*; 31 1312-8.
- Hannon R, Croxtall JD, Getting SJ, Roviezzo F, Yona S, Paul-Clark MJ, Gavins FN, Perretti M, Morris JF, Buckingham JC, *et al.* (2003) Aberrant inflammation and resistance to glucocorticoids in annexin 1<sup>-/-</sup> mouse. *FASEB J*; 17 253-5.
- Hao S, He W, Li Y, Ding H, Hou Y, Nie J, Hou FF, Kahn M, Liu Y. (2011) Targeted inhibition of beta-catenin/CBP signaling ameliorates renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol*; 22 1642-53.
- Hashimoto N, Jin H, Liu T, Chensue SW, Phan SH. (2004) Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis. *J Clin Invest*; 113 243-52.
- Hayhoe RP, Kamal AM, Solito E, Flower RJ, Cooper D, Perretti M. (2006) Annexin 1 and its bioactive peptide inhibit neutrophil-endothelium interactions under flow: indication of distinct receptor involvement. *Blood*; 107 2123-30.

- Hills CE, Squires PE. (2011) The role of TGF-beta and epithelial-to mesenchymal transition in diabetic nephropathy. *Cytokine Growth Factor Rev*; 22 131-9.
- Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. (2007) The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol*; 170 1807-16.
- Hirata F, Iwata M. (1983) Role of Lipomodulin, a Phospholipase Inhibitory Protein, in Immunoregulation by Thymocytes. *Journal of Immunology*; 130 1930-36.
- Hirata F, Notsu Y, Iwata M, Parente L, Dirosa M, Flower RJ. (1982) Identification of Several Species of Phospholipase Inhibitory Protein(S) by Radioimmunoassay for Lipomodulin. *BBRC*; 109 223-30.
- Hsu TC, Lee TL, Tsay GJ. (1997) Autoantigen components recognizable by scleroderma sera are exported via ectocytosis of fibroblasts. *Br J Rheumatol*; 36 1038-44.
- Hultstrom M, Leh S, Paliege A, Bachmann S, Skogstrand T, Iversen BM. (2012) Collagen-binding proteins in age-dependent changes in renal collagen turnover: microarray analysis of mRNA expression. *Physiol Genomics*; 44 576-86.
- Iaccio A, Cattaneo F, Mauro M, Ammendola R. (2009) FPRL1-mediated induction of superoxide in LL-37-stimulated IMR90 human fibroblast. *Arch Biochem Biophys*; 481 94-100.
- Isaka Y, Fujiwara Y, Ueda N, Kaneda Y, Kamada T, Imai E. (1993) Glomerulosclerosis induced by in vivo transfection of transforming growth factor-beta or platelet-derived growth factor gene into the rat kidney. *J Clin Invest*; 92 2597-601.
- Jia Y, Morand EF, Song W, Cheng Q, Stewart A, Yang YH. (2012) Regulation of lung fibroblast activation by annexin A1. *J Cell Physiol*.
- John CD, Sahni V, Mehet D, Morris JF, Christian HC, Perretti M, Flower RJ, Solito E, Buckingham JC. (2007) Formyl peptide receptors and the regulation of ACTH secretion: targets for annexin A1, lipoxins, and bacterial peptides. *FASEB J*; 21 1037-46.
- Kaissling B, Hegyi I, Loffing J, Le Hir M. (1996) Morphology of interstitial cells in the healthy kidney. *Anat Embryol (Berl)*; 193 303-18.

- Kaissling B, Le Hir M. (2008) The renal cortical interstitium: morphological and functional aspects. *Histochem Cell Biol*; 130 247-62.
- Kaissling B, Le Hir M, Kriz W. (2013) Renal epithelial injury and fibrosis. *Biochim Biophys Acta*.
- Kaissling B, Lehir M, Kriz W. (2013) Renal epithelial injury and fibrosis. *Biochim Biophys Acta*; 1832 931-9.
- Kamal AM, Flower RJ, Perretti M. (2005) An overview of the effects of annexin 1 on cells involved in the inflammatory process. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 100 Suppl 1 39-47.
- Kanemoto K, Usui J, Tomari S, Yokoi H, Mukoyama M, Aten J, Weening JJ, Nagata M. (2003) Connective tissue growth factor participates in scar formation of crescentic glomerulonephritis. *Lab Invest*; 83 1615-25.
- Kehrl JH, Roberts AB, Wakefield LM, Jakowlew S, Sporn MB, Fauci AS. (1986a) Transforming growth factor beta is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes. *J Immunol*; 137 3855-60.
- Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, Jakowlew S, Alvarez-Mon M, Derynck R, Sporn MB, Fauci AS. (1986b) Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med*; 163 1037-50.
- Keller G, Zimmer G, Mall G, Ritz E, Amann K. (2003) Nephron number in patients with primary hypertension. *N Engl J Med*; 348 101-8.
- Kitamura M, Suto TS. (1997) TGF-beta and glomerulonephritis: anti-inflammatory versus pro-sclerotic actions. *Nephrol Dial Transplant*; 12 669-79.
- Koesters R, Kaissling B, Lehir M, Picard N, Theilig F, Gebhardt R, Glick AB, Hahnel B, Hosser H, Grone HJ, *et al.* (2010) Tubular overexpression of transforming growth factor-beta1 induces autophagy and fibrosis but not mesenchymal transition of renal epithelial cells. *Am J Pathol*; 177 632-43.
- Kriz W, Kaissling B, Le Hir M. (2011) Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in kidney fibrosis: fact or fantasy? *J Clin Invest*; 121 468-74.

- Kriz W, LeHir M. (2005) Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases-insights from animal models. *Kidney Int*; 67 404-19.
- Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 227 680-5.
- Lan HY. (2011) Diverse roles of TGF-beta/Smads in renal fibrosis and inflammation. *Int J Biol Sci*; 7 1056-67.
- Le Y, Murphy PM, Wang JM. (2002) Formyl-peptide receptors revisited. *Trends Immunol*; 23 541-8.
- LeBleu VS, Kalluri R. (2011) Blockade of PDGF receptor signaling reduces myofibroblast number and attenuates renal fibrosis. *Kidney Int*; 80 1119-21.
- Lee HY, Kim SD, Shim JW, Yun J, Kim K, Bae YS. (2009) Activation of formyl peptide receptor like-1 by serum amyloid A induces CCL2 production in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*; 380 313-7.
- Lemley KV, Kriz W. (1991) Anatomy of the renal interstitium. *Kidney Int*; 39 370-81.
- Li Y, Cai L, Wang H, Wu P, Gu W, Chen Y, Hao H, Tang K, Yi P, Liu M, *et al.* (2011) Pleiotropic regulation of macrophage polarization and tumorigenesis by formyl peptide receptor-2. *Oncogene*; 30 3887-99.
- Liemann S, Huber R. (1997) Three-dimensional structure of annexins. *Cell Mol Life Sci*; 53 516-21.
- Lim LH, Pervaiz S. (2007) Annexin 1: the new face of an old molecule. *FASEB J*; 21 968-75.
- Liu Y. (2004) Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol*; 15 1-12.
- Liu Y. (2006) Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int*; 69 213-7.

- 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*; 25 402-8.
- Loria A, Reverte V, Salazar F, Saez F, Llinas MT, Salazar FJ. (2007) Sex and age differences of renal function in rats with reduced ANG II activity during the nephrogenic period. *Am J Physiol Renal Physiol*; 293 F506-10.
- Maderna P, Cottell DC, Toivonen T, Dufton N, Dalli J, Perretti M, Godson C. (2010) FPR2/ALX receptor expression and internalization are critical for lipoxin A4 and annexin-derived peptide-stimulated phagocytosis. *FASEB J*; 24 4240-9.
- McKanna JA, Chuncharunee A, Munger KA, Breyer JA, Cohen S, Harris RC. (1992) Localization of p35 (Annexin I, Lipocortin I) in Normal Adult Rat Kidney and During Recovery From Ischemia. *J Cell Physiol*; 153 467-76.
- Meng XM, Huang XR, Xiao J, Chung AC, Qin W, Chen HY, Lan HY. (2012) Disruption of Smad4 impairs TGF-beta/Smad3 and Smad7 transcriptional regulation during renal inflammation and fibrosis in vivo and in vitro. *Kidney Int*; 81 266-79.
- Mou H, Li Z, Kong Y, Deng B, Qian L, Wang JM, Le Y. (2012) Proinflammatory stimulants promote the expression of a promiscuous G protein-coupled receptor, mFPR2, in microvascular endothelial cells. *Inflammation*; 35 656-64.
- Müller GA, Frank J, Rodemann HP, Engler-Blum G. (1995) Human renal fibroblast cell lines (tFKIF and tNKF) are new tools to investigate pathophysiologic mechanisms of renal interstitial fibrosis. *Exp Nephrol*; 3 127-33.
- Müller GA, Markovic-Lipovski J, Frank J, Rodemann HP. (1992) The Role of Interstitial Cells in the Progression of Renal Diseases. *J Am Soc Nephrol*; 2 198-205.
- Müller GA, Rodemann HP. (1991) Characterization of human renal fibroblasts in health and disease: I. Immunophenotyping of cultured tubular epithelial cells and fibroblasts derived from kidneys with histologically proven interstitial fibrosis. *Am J Kidney Dis*; 17 680-3.
- National Kidney Foundation. (2002) K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification. *Am J Kidney Dis*; S1-266.

- Neill T, Schaefer L, Iozzo RV. (2012) Decorin: a guardian from the matrix. *Am J Pathol*; 181 380-7.
- Panek A. (2008) Rolle des Connective Tissue Growth Factors (CTGF) und des PKC-enhanced Protein-Phosphatase 1 Inhibitors (KEPI) für die Funktion des adulten Herzen – Studien an transgenen Tiermodellen. Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
Freie Universität Berlin, Berlin
- Perretti M, D'Acquisto F. (2009) Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*; 9 62-70.
- Perretti M, Flower RJ. (1994) Cytokines, glucocorticoids and lipocortins in the control of neutrophil migration. *Pharmacol Res*; 30 53-9.
- Philip JG, Flower RJ, Buckingham JC. (1998) Blockade of the classical pathway of protein secretion does not affect the cellular exportation of lipocortin 1. *Regul Pept*; 73 133-9.
- Qi W, Chen X, Poronnik P, Pollock CA. (2006) The renal cortical fibroblast in renal tubulointerstitial fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol*; 38 1-5.
- QuaSiNiere. (2005) Diagnoseverteilung der Dialysepatienten. Jahresbericht.
- Quehenberger O, Prossnitz ER, Cavanagh SL, Cochrane CG, Ye RD. (1993) Multiple domains of the N-formyl peptide receptor are required for high-affinity ligand binding. Construction and analysis of chimeric N-formyl peptide receptors. *J Biol Chem*; 268 18167-75.
- Radel SJ, Genco RJ, De Nardin E. (1994) Structural and functional characterization of the human formyl peptide receptor ligand-binding region. *Infect Immun*; 62 1726-32.
- Rane MJ, Carrithers SL, Arthur JM, Klein JB, McLeish KR. (1997) Formyl peptide receptors are coupled to multiple mitogen-activated protein kinase cascades by distinct signal transduction pathways: role in activation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide oxidase. *J Immunol*; 159 5070-8.

- Raynal P, Pollard HB. (1994) Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta*; 1197 63-93.
- Raynal P, van Bergen en Henegouwen PM, Hullin F, Ragab-Thomas JM, Fauvel J, Verkleij A, Chap H. (1992) Morphological and biochemical evidence for partial nuclear localization of annexin 1 in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*; 186 432-9.
- Rodemann HP, Müller GA. (1991) Characterization of Human Renal Fibroblasts in Health and Disease: II. In Vitro Growth, Differentiation, and Collagen Synthesis of Fibroblasts From Kidneys With Interstitial Fibrosis. *Am J Kidney Dis*; XVII 684-86.
- Rodemann HP, Muller GA, Knecht A, Norman JT, Fine LG. (1991) Fibroblasts of rabbit kidney in culture. I. Characterization and identification of cell-specific markers. *Am J Physiol*; 261 F283-91.
- Rosengarth A, Luecke H. (2003) A calcium-driven conformational switch of the N-terminal and core domains of annexin A1. *J Mol Biol*; 326 1317-25.
- Rosengarth A, Rosgen J, Hinz HJ, Gerke V. (2001) Folding energetics of ligand binding proteins II. Cooperative binding of Ca<sup>2+</sup> to annexin I. *J Mol Biol*; 306 825-35.
- Rothhut B. (1997) Participation of annexins in protein phosphorylation. *Cell Mol Life Sci*; 53 522-6.
- Rothhut B, Russo-Marie F, Wood J, DiRosa M, Flower RJ. (1983) Further Characterization Of The Glucocorticoid-Induced Antiphospholipase Protein "Renocortin". *Biochem Biophys Res Commun*; 117 878-84.
- Saez F, Castells MT, Zuasti A, Salazar F, Reverte V, Loria A, Salazar FJ. (2007) Sex differences in the renal changes elicited by angiotensin II blockade during the nephrogenic period. *Hypertension*; 49 1429-35.
- Saez F, Reverte V, Salazar F, Castells MT, Llinas MT, Salazar FJ. (2009) Hypertension and sex differences in the age-related renal changes when cyclooxygenase-2 activity is reduced during nephrogenesis. *Hypertension*; 53 331-7.

- Salazar F, Reverte V, Saez F, Loria A, Llinas MT, Salazar FJ. (2008) Age- and sodium-sensitive hypertension and sex-dependent renal changes in rats with a reduced nephron number. *Hypertension*; 51 1184-9.
- Schieppati A, Remuzzi G. (2005) Chronic renal diseases as a public health problem: Epidemiology, social and economic implications. *Kidney Int Suppl*; 68 S7-S10.
- Schnaper HW, Hayashida T, Hubchak SC, Poncelet AC. (2003) TGF-beta signal transduction and mesangial cell fibrogenesis. *Am J Physiol Renal Physiol*; 284 F243-52.
- Seth D, Leo MA, McGuinness PH, Lieber CS, Brennan Y, Williams R, Wang XM, McCaughan GW, Gorrell MD, Haber PS. (2003) Gene expression profiling of alcoholic liver disease in the baboon (*Papio hamadryas*) and human liver. *Am J Pathol*; 163 2303-17.
- Smith PD, Moss SE. (1994) Structural evolution of the annexin supergene family. *Trends Genet.*; 10 241-6.
- Solito E, Christian HC, Festa M, Mulla A, Tierney T, Flower RJ, Buckingham JC. (2006) Post-translational modification plays an essential role in the translocation of annexin A1 from the cytoplasm to the cell surface. *FASEB J*; 20 1498-500.
- Solito E, de Coupade C, Canaider S, Goulding NJ, Perretti M. (2001) Transfection of annexin 1 in monocytic cells produces a high degree of spontaneous and stimulated apoptosis associated with caspase-3 activation. *Br J Pharmacol*; 133 217-28.
- Strutz F, Okada H, Lo CW, Danoff T, Carone RL, Tomaszewski JE, Neilson EG. (1995) Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J Cell Biol*; 130 393-405.
- Strutz F, Renziehausen A, Dietrich M, Amin J, Becker V, Heeg M, Rastaldi MP, Muller GA. (2001a) Cortical fibroblast culture from human biopsies. *J Nephrol*; 14 190-7.
- Strutz F, Zeisberg M. (2006) Renal fibroblasts and myofibroblasts in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*; 17 2992-8.

- Strutz F, Zeisberg M, Renziehausen A, Raschke B, Becker V, van Kooten C, Muller G. (2001b) TGF-beta 1 induces proliferation in human renal fibroblasts via induction of basic fibroblast growth factor (FGF-2). *Kidney Int*; 59 579-92.
- Tagoe CE, Marjanovic N, Park JY, Chan ES, Abeles AM, Attur M, Abramson SB, Pillinger MH. (2008) Annexin-1 mediates TNF-alpha-stimulated matrix metalloproteinase secretion from rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *J Immunol*; 181 2813-20.
- Ts'ao C, Ward WF, Tsao FH, Taylor JM, Molteni A. (1997) Annexin I in fibrotic rat lung and cultured lung fibroblasts following irradiation. *Int J Radiat Biol*; 72 227-34.
- VanCompernelle SE, Clark KL, Rummel KA, Todd SC. (2003) Expression and function of formyl peptide receptors on human fibroblast cells. *J Immunol*; 171 2050-6.
- Vielhauer V, Schlöndorff D, Anders HJ. (2004) Disease mechanisms of glomerulonephritis: chemokines and chemokine receptors. *Drug Discov Today Dis Models*; 1 83-90.
- Walther A, Riehemann K, Gerke V. (2000) A novel ligand of the formyl peptide receptor: annexin I regulates neutrophil extravasation by interacting with the FPR. *Mol Cell*; 5 831-40.
- Wang W, Creutz CE. (1994) Role of the amino-terminal domain in regulating interactions of annexin I with membranes: effects of amino-terminal truncation and mutagenesis of the phosphorylation sites. *Biochemistry*; 33 275-82.
- Wein S, Fauroux M, Laffitte J, de Nadai P, Guaini C, Pons F, Comera C. (2004) Mediation of annexin 1 secretion by a probenecid-sensitive ABC-transporter in rat inflamed mucosa. *Biochem Pharmacol*; 67 1195-202.
- Williams SL, Milne IR, Bagley CJ, Gamble JR, Vadas MA, Pitson SM, Khew-Goodall Y. (2010) A proinflammatory role for proteolytically cleaved annexin A1 in neutrophil transendothelial migration. *J Immunol*; 185 3057-63.
- Wu SH, Wu XH, Lu C, Dong L, Chen ZQ. (2006) Lipoxin A4 inhibits proliferation of human lung fibroblasts induced by connective tissue growth factor. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 34 65-72.

- Yamabe H, Osawa H, Kaizuka M, Tsunoda S, Shirato K, Tateyama F, Okumura K. (2000) Platelet-derived growth factor, basic fibroblast growth factor, and interferon gamma increase type IV collagen production in human fetal mesangial cells via a transforming growth factor-beta-dependent mechanism. *Nephrol Dial Transplant*; 15 872-6.
- Yang D, Chen Q, Le Y, Wang JM, Oppenheim JJ. (2001) Differential regulation of formyl peptide receptor-like 1 expression during the differentiation of monocytes to dendritic cells and macrophages. *J Immunol*; 166 4092-8.
- Yang HCZ, Y.; Fogo, A.B. (2010) Models of chronic kidney disease. *Drug Discov Today Dis Models*; 7(1-2) 13-19.
- Yang YH, Toh ML, Clyne CD, Leech M, Aeberli D, Xue J, Dacumos A, Sharma L, Morand EF. (2006) Annexin 1 negatively regulates IL-6 expression via effects on p38 MAPK and MAPK phosphatase-1. *J Immunol*; 177 8148-53.
- Ye RD, Boulay F, Wang JM, Dahlgren C, Gerard C, Parmentier M, Serhan CN, Murphy PM. (2009) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family. *Pharmacol Rev*; 61 119-61.
- Zeisberg EM, Potenta SE, Sugimoto H, Zeisberg M, Kalluri R. (2008) Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol*; 19 2282-7.
- Zeisberg M, Neilson EG. (2010) Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol*; 21 1819-34.

## Danksagung

An dieser Stelle meiner Doktorarbeit möchte ich mich bei all Jenen bedanken, die in jeglicher Art an der Entstehung dieser Arbeit beteiligt waren.

Ich danke Herrn Prof. Sebastian Bachmann, der mir die Chance gab meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Er unterstützte diese Arbeit seit ihrer Entstehung bis hin zu ihrer Fertigstellung.

Herrn Prof. Berthold Hocher danke ich für die Begleitung meines Promotionsverfahrens an der Universität Potsdam und die Begutachtung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Alexander Paliege, der diese Dissertation wissenschaftlich eng betreute und mir stets bei jedem kleinen oder großen experimentellen Problem mit Rat und Tat zur Seite stand. Ein großer Dank geht an meine Kollegen in der AG Bachmann. Es war eine Freude in dieser freundschaftlichen Atmosphäre zu arbeiten. An dieser Stelle möchte ich besonders Elisabeth Schindler danken, die mir bei der Pflege meiner Zellen unter die Arme gegriffen hat und stets ein offenes Ohr hatte. Weiter waren Aljona Borschewski und Christin Dathe maßgeblich an dem Abschluss meiner Versuche beteiligt, außerdem machte der rege Austausch mit ihnen jeden noch so oft wiederholten Versuch weniger schlimm. Yan Willière danke ich für die gute und produktive Stimmung in unserem Büro. Bettina Ritter und Anette Drobbe danke ich für die Sprachkorrekturen dieser Arbeit. Herrn Dr. Thorsten Stroh danke ich für die Unterstützung bei der Etablierung der Fibroblastenzellkultur.

Danken möchte ich auch meiner Familie, vor allem meiner Mutter, die mir viel Rückhalt gab und nie müde wurde mich immer wieder zu motivieren. Besonders Danke ich meinem Freund Benjamin Laschat, der sich so oft anhören musste, dass das bis zur Geburt alles nicht mehr machbar ist, und doch recht behalten hat, dass ich es schaffen werde. Danke für deine Unterstützung. Danke an alle Freunde, die ein offenes Ohr für mich hatten und mir immer wieder zeigten, dass auch ein Tag mit einem schlechten Laborergebnis ein guter Tag sein kann.

## Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

### **Annexin A1 im chronischen Nierenversagen**

selbstständig und nur unter Zuhilfenahme der im Literaturverzeichnis angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe.

Diese Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Prüfungsbehörde eingereicht worden.

Berlin den

Hanna Neymeyer