

Aus der Klinik für Nephrologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. L. C. Rump

**Die Rolle von Oncostatin M in der Signaltransduktion, der
Genexpression und dem Migrationsverhalten muriner und
humaner Podozyten**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Manuel Rabani
2014

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan der medizinischen Fakultät Düsseldorf

Referent: PD Dr. med. Quack

Korreferent: PD Dr. med. Fenk

Gewidmet meiner lieben Frau Sahar ohne deren Hilfe und stetigen Zuspruch Vieles nicht möglich gewesen wäre.

Die Rolle von Oncostatin M in der Signaltransduktion, der Genexpression und dem Migrationsverhalten muriner und humaner Podozyten

Zusammenfassung

Das terminale Nierenversagen stellt in der westlichen Welt eines der häufigsten Organkomplikationen epidemiologisch relevanter Erkrankungen, wie z. B. der arteriellen Hypertonie oder des Diabetes mellitus, dar. Ziel der Schädigungen sind dabei meist die spezifischen Epithelzellen der Niere, die Podozyten. Podozyten bilden die zelluläre Funktionseinheit des renalen Filters, sind in ihrer Anzahl begrenzt und besitzen höchstwahrscheinlich keine Regenerationsfähigkeit. Gezielte Therapien sind bis heute nicht möglich, da lediglich einige wenige Mediatoren, welche für die eigentliche Schädigung als auch für nachfolgende Reparation und Reorganisation verantwortlich sind, bekannt sind. Einige Zytokine, welche im Rahmen chronischer Schädigungen und Reparation eine Rolle spielen, sind bereits beschrieben. Oncostatin M (OSM) ist ein Zytokin der IL-6-Familie, welches von aktivierten T-Zellen und Makrophagen sezerniert wird. Für dieses Zytokin wurden bereits eine Vielzahl von Funktionen im Zusammenhang mit Zellüberleben, Reparatur, Wachstum und Differenzierung aufgedeckt. Welchen Einfluss OSM auf den Podozyten ausübt, ist bis heute noch nicht erforscht. Aufgrund dieser Tatsache ist das Ziel der vorliegenden Arbeit, den Einfluss von OSM auf den Podozyten zu beschreiben.

In der Zellkultur wurden humane und murine immortalisierte Podozyten verwendet. Die Untersuchung der Signaltransduktion erfolgte mit Hilfe von Western Blot-Analysen und die RNA-Untersuchungen wurden mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion durchgeführt. Zur Untersuchung der Zellmigration wurde ein klassischer Wound-Scratch-Assay verwendet.

Die vorliegende Arbeit zeigt die Bedeutung der OSM-Wirkung auf den Podozyten auf drei Ebenen: Zum ersten kann eine Stimulation und Aktivitätssteigerung in wichtigen Signalkaskaden des Podozyten gezeigt werden. Dabei wurden Steigerungen in der Aktivität der ERK-, der JAK/STAT3- und der AKT/PKB-Signaltransduktion nachgewiesen.

Zum zweiten können Veränderungen der Genexpression im Podozyten nach OSM-Stimulation gezeigt werden, welche Hinweise auf eine mögliche Entdifferenzierung geben. So konnte für SNAIL, SOCS3, KLF4 und Collagen-I eine gesteigerte Expression gemessen werden. Für gp130 und Cadherin-3 findet sich eine verminderte Expression.

Zum dritten kann im Podozyten nach OSM-Stimulation eine gesteigerte Aktivität und Zellmigration nach einer Schädigung aufgezeigt werden.

Die vorliegende Arbeit zeigt zum ersten Mal die Bedeutung von OSM für die Physiologie des Podozyten. Dabei implizieren die Daten, dass OSM durch eine ERK- und AKT-Aktivierung eine gesteigerte Migration vermittelt. Außerdem kann OSM über die Steigerung der SNAIL-Expression im Podozyten eine Entdifferenzierung im Sinne einer Epithelial-zu-Mesenchymale Transition initiieren.

Diese Ergebnisse identifizieren einen neuen potentiellen Angriffspunkt für therapeutische Intervention bei entzündlichen Nierenerkrankungen.

Abkürzungen

Ab	Antibody
a.d.	aqua dest
AK	Antikörper
AKT	Proteinkinase B
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	B-cell-lymphoma-2
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CDK	Cyklin dependend Kinase
CNTF	ciliary neurotrophic factor
CREB	Cytokine responsive element
CT-1	Cardiotrophin 1
CTP	Cysteintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen- diamintetraessigsäure
EGF	Epidermal groth factor
EMT	Epithelial-zu-mesenchymale Transition
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
ERE	ERK responsive elements
FBS	fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor
Gp	Glycoprotein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
IF	Interferron
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
JAK	Januskinase
JNK	c-Jun-N-terminalen Kinasen
kDa	Kilo Dalton
KLF4	Krüppel-like-factor 4
LIF	Leucaemia inhibitory factor
LIFR	Leucaemia inhibitory factor-Rezeptor
µl	Mikroliter

mA	Milliampere
M	Molar
MAPK	Mitogen aktivierte Kinasen
min	Minuten
MMP	Matrix-Metalloproteinase
ng	Nanogramm
NTP	Nucleotidtriphosphat
OSM	Oncostatin M
OSMR	Oncostatin m-Rezeptor
PCR	Polymerasechainreaction
PDGF	Platelet derived growth factor
PI3K	Phosphatidyinositol-3-Phosphat-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-fluorid
RT	Reverse Transkription
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sec	Sekunden
Ser	Serin
s. g.	so genannt
SH-2	Src-homology 2
SHP2	Src-homology 2-Phosphatase
SOCS	Suppressor of Cytokin Signaling
SOS	Sons of sevenless
STAT	Signal transducer and activator of transcription
Taq	Thermus aquaticus
TGF-β1	Transforming growth factor β 1
Thr	Threonin
TIMP	Tissue inhibitor of matrix metallo proteinase
TTP	Thymintriphosphat
Tyr	Tyrosin
VEGF	vascular endothelial growth factor
V	Volt
WT-1	Wilms-Tumorantigen 1
ZO-1	Zonula occludens 1
ZNS	zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1 Die Niere als Lebenswichtiges Organ	1
1.2 Die Rolle des Podozyten in Funktion und Integrität der Niere	2
1.3. Die IL-6-Familie: Vertreter und Funktionen	3
1.4 Oncostatin M: Funktion und Bedeutung	5
1.5 Die Rolle von Oncostatin M im Entzündungsgeschehen, chronischer Schädigung und Wundheilung	6
1.6 Signaltransduktion und Regulation von Oncostatin M	7
2. Hypothese	8
3. Material und Methoden	9
3.1. Material	9
3.1.1 Material in der Zellkultur	9
3.1.2 Antikörper	12
3.1.3 Primer	14
3.1.4 Sonstige Materialien und Chemikalien	17
3.1.5 Verwendete Software	19
3.2 Methoden	19
3.2.1 Podozyten in der Zellkultur	19
3.2.2 Proteinisolation aus murinen Podozyten	21
3.2.3 Westernblot Analysen	21
3.2.4 RNA-Isolation aus murinen Podozyten	22
3.2.5 Konventionelle Polymerase-Kettenreaktion	24
3.2.6 Migrationsassay (Wundheilungsassay)	25
4. Ergebnisse	26
4.1 Vorarbeiten mit CNTF und anderen Vertretern der IL-6-Familie	26
4.2 Die Rolle von Oncostatin M in der podozytären Signaltransduktion	28
4.2.1 ERK/p42/p44-Signaltransduktion	28
4.2.2 AKT/PKB/PI3K-Signaltransduktion	32
4.2.3 STAT3-Signaltransduktion	36
4.3. Oncostatin M induzierte Änderung der Genexpression im murinen Podozyten	39
4.3.1 OSMR-Expression im Podozyten	40
4.3.2 SOCS3-Expression im Podozyten	41
4.3.3 Expression epithelialer und mesenchymaler Marker im Podozyten	42
4.4 Durchführung von Wound-Scratch-Assays im Podozyten-Zellkulturmodell	45
4.4.1 Das Migrationsverhalten humaner Podozyten unter OSM	46
4.4.2 Die Identifikation relevanter Signalkaskaden für das OSM-induzierte Migrationsverhalten	48
5. Diskussion	51
5.1 Die Bedeutung der Signaltransduktion von Oncostatin M in murinen Podozyten	51
5.1.1 ERK-Signalkaskade	52
5.1.2 AKT-Signalkaskade	54
5.1.3 STAT3-Signalkaskade	56
5.2 Epithelial-zu-Mesenchymale Transition im murinen Podozyten nach OSM-Stimulation	59
5.2.1 Die Veränderte Expression von epithelialen und mesenchymalen Markergenen in murinen Podozyten nach Oncostatin M Stimulation	60
5.2.2 SNAIL-Expression unter OSM-Stimulation	61
5.2.3 Expression epithelialer Markergene nach OSM-Stimulation	62
5.2.4 Expression mesenchymaler Markergene unter OSM-Stimulation	62

6. Zusammenfassung	63
7. Ausblick	64
8. Literaturverzeichnis	64

1. Einleitung

1.1 Die Niere als Lebenswichtiges Organ

Die paarig angelegten, primär retroperitoneal gelegenen Nieren haben im menschlichen Organismus viele wichtige Aufgaben. Ihnen fallen wichtige Funktionen in der Homöostase der Zusammensetzung von Körperflüssigkeiten in Bezug auf Menge, Osmolarität, pH-Wert und Ionenkonzentration zu. Sie nehmen eine zentrale Stellung in der Regulation des Wasserhaushaltes, des Elektrolythaushaltes und von anderen Kreislaufparametern ein. Darüber hinaus ist die Niere ein bedeutendes Ausscheidungsorgan. Zum einen von körpereigenen Stoffen, wie z.B. von Abbauprodukten des Proteinstoffwechsels, aber auch von körperfremden Stoffen, wie z.B. Medikamenten oder Toxinen. Außerdem haben die Nieren endokrine Funktionen. Die Nieren bilden aktiviertes Vitamin D₃ und Erythropoetin und beeinflussen daher u.a. den Knochenstoffwechsel und die Blutbildung. Ebenfalls sind die Nieren maßgeblich in das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System eingebunden, womit sie Einfluss auf die Regulation des systemischen Blutdrucks nehmen.

Die kleinste funktionelle Einheit der Nieren ist das Nephron, von denen pro gesunder Niere im Menschen ca. 1 Millionen existieren. Diese bestehen aus Glomerulum und Bowman-Kapsel, einem nach geschalteten Tubulussystem und Sammelrohren. In den Glomeruli findet die Filtration des Blutplasmas statt. Im nachgeschalteten Tubulussystem finden multiple Rückresorptions- und Sekretionsprozesse statt, die die endgültige Harnzusammensetzung bestimmen.

Die zentrale Funktionseinheit der Blutplasmafiltration liegt im Inneren der Bowman-Kapsel: Hier befindet sich ein dichtes Kapilarknäuel mit fenestriertem Endothel, was die erste Schicht der renalen Filtrationsbarriere bildet. Weiter nach außen befindet sich die glomeruläre Basalmembran, welche durch ihre negative Ladung an der Filtration beteiligt ist. Die dritte Barriere wird vom Podozyten mit seinen Fußfortsätzen auf der harnzugewandten Seite des Filters gebildet. Er stellt das zelluläre Korrelat der nierenspezifischen Filtrationsleistung dar und existiert in der Form ausschließlich an dieser Stelle. Man schreibt diesem Zelltypus zentrale regulatorische und modulierende Aufgaben innerhalb des gesamten Filtrationsprozesses zu, sodass diese Zellen den Fokus vieler wissenschaftlicher Bemühungen auf sich lenken.

1.2 Die Rolle des Podozyten in Funktion und Integrität der Niere

Podozyten sind terminal differenzierte, hochspezialisierte Zellen und bilden das viszerale Blatt der Bowman-Kapsel. Ontogenetisch entwickeln sie sich ausgehend vom metanephrogenen Blastem im Stadium des Metanephros. Hier kommt es während des S-förmigen Stadiums zur Einstülpung von Kapillarschlingen in die Bowman-Kapsel. Von endothelnahem Epithel beginnt die Entwicklung der Podozyten [1]. Dabei findet eine Mesenchymal-zu-Epitheliale Differenzierung statt, die als Resultat den hochdifferenzierten Podozyten als Epithelzelle des viszeralen Blattes der Bowman-Kapsel hervorbringt.

Dem Podozyten als zelluläres Korrelat der Blut-Harn-Schranke kommt dabei eine besondere Rolle zu. Er hat durch seine exponierte Lage im Glomerulum, zugewandt zum viszeralen Blatt der Bowman-Kapsel, eine herausragende Bedeutung in der Filtrationsleistung der Nieren.

So gehen viele Erkrankungen, die mit der Zerstörung von Podozyten enden, mit einer Einschränkung der Nierenfunktion einher. Durch irreversible Zerstörung von Podozyten im Rahmen von chronischen Nierenerkrankungen kommt es zur progredienten Zerstörung der Filtrationsbarriere der Niere, zur zunehmenden Proteinurie, Kreatininerhöhung im Serum und schließlich zur Ausbildung einer Glomerulosklerose [2, 3].

Der Podozyt besitzt dabei einen breiten, flächigen Zellkörper mit sternförmig angeordneten primären Fortsätzen, welche dann in die Fußfortsätze übergehen. Diese dienen zum einen der Befestigung der Podozyten an der Basalmembran. Diese wird über Integrine [4] und Dystroglykane [5] vermittelt. Zum anderen enthalten diese Fußfortsätze eine hohe Dichte an Aktin und anderen Intermediärfilamenten, welche für die Erhaltung der podozytären Morphologie und deren Beweglichkeit verantwortlich sind.

Ebenso kommt es zur Ausbildung von Interdigitationen zwischen benachbarten Podozyten. Der dabei zu überbrückende Schlitz stellt eine spezialisierte gap junction dar und bildet die Schlitzmembran mit einer durchschnittlichen Weite von 40 nm. Diese stellt den zentralen Ort des renalen Filtrationsgeschehens dar.

Am Aufbau der glomerulären Schlitzmembran sind eine Vielzahl von podozytären Proteinen beteiligt. Hierzu zählen u.a. Nephrin [6], Podocin [7], Nephrin-1, ZO-1 und Densin [8]. Diese wiederum interagieren mit dem Aktin-Zytoskelett des Podozyten und sind so direkt mit im Rahmen einer podozytären Schädigung zu beobachtenden Proteinurie in Verbindung zu bringen. Diese Interaktion erfolgt über CDK2, welches die Nephrin-Komplex-Proteine über u.a. WASP, Cortaktin oder Arp2/3 mit dem Aktin Skelett verbindet, oder es erfolgt eine direkte Interaktion über ZO-1.

Der apikale Pol des Podozyten trägt maßgeblich zur Ladungsselektivität der glomerulären Filtrationsbarriere bei. Hierbei spielen besonders die negativ geladenen Membranproteine Podocalyxin [9], Podoplanin und Podoendin eine Rolle.

Die Funktionen des Podozyten erklären sich unter anderem aus dem komplexen Interaktionsmuster zwischen verschiedenen Podozyten, mit der Basalmembran und dem Kapillarendothel des Vas afferens. Der Podozyt stellt nicht nur eine Größen- sondern auch eine Ladungsbarriere für filtrierte Proteine dar. Er sichert die Struktur des glomerulären Kapillarknäuels und beteiligt sich an der Druckregulation in intraglomerulären Gefäßen. Der Podozyt besitzt auch sekretorische Funktionen. Er bildet und unterhält die Matrix der Basalmembran und sezerniert u.a. VEGF [2].

Störungen einer oder mehrerer dieser Funktionen führen zur Proteinurie und zum Anstieg des Serumkreatinins.

Morphologisch reagiert der Podozyt auf Schädigungen mit dem so genannten Effacement, welches 1957 von Farquhar [10] erstmals beschrieben wurde. Hierbei handelt es sich u.a. um eine Abflachung der podozytären Fußfortsätze kombiniert mit einer zunehmenden Zellschwellung.

Auch die Reduktion der Gesamtanzahl an Podozyten wurde bereits vielfach in Zusammenhang mit diversen glomerulären Erkrankungen gebracht. Dabei wurde z.B. das Ausmaß der Podozytopenie als Hinweis für die Schwere der Ig-A-Nephropathie gesehen [11]. Bei der diabetischen Nephropathie konnte ebenfalls eine Podozytopenie nachgewiesen werden [12].

Kriz und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Abnahme der Anzahl an Podozyten letztendlich zur Glomerulosklerose führt [13, 14]. Das Schädigungsmuster der Podozyten reicht dabei vom Effacement über die Ablösung der Podozyten von der Basalmembran bis hin zur Apoptose mit Zurückbleiben einer nackten Stelle auf der Basalmembran.

1.3. Die IL-6-Familie: Vertreter und Funktionen

In der vorliegenden Arbeit liegt das Interesse auf Oncostatin M (OSM), einem Zytokin aus der Familie der IL-6 Zytokine. Zu dieser Familie gehören außerdem IL-6, IL-11, Ciliary neurotrophic factor (CNTF), Cardiotrophin 1 (CT-1), Leukemia inhibitory factor (LIF) [15] und Leptin. Tabelle 1 gibt einen kurzen Überblick über die bis dato untersuchten Eigenschaften der IL-6-Zytokine.

Tabelle 1 : Überlappende Eigenschaften der Zytokine der IL-6 –Familie (Taga et al 1997, Grant et al 1999; modifiziert nach Lotfi 2004).

	IL-6	IL-11	IL-1	IL-6	IL-1	IL-1
Erhaltung d. Pluripotenz von ES	- (*)	-	+	+	+	+
Hypertrophie von Herzzellen	- (*)	+	+	+	+/-	+
Induktion von APP	+	+	+	+	+	+
Makrophagendifferenzierung aus M1- Zellen#	+	-	+	+	-§	+
Wachstum von Myelomzellen	+	+	+	+	+	n. B.
Wachstum hämatopoietischer Vorläuferzellen	+	+	+	+	n. B.	n. B.
Thrombopoiese	+	+	+	+	n. B.	n. B.
Induktion von Osteoklasten-bildung in vitro	-	+	+	+	n. B.	n. B.
Überleben von Neuronen und deren Differenzierung	+	+	+	+	+	+
Expression von Adhäsions-molekülen wie TIMP-1, ICAM-1 und VCAM-1	+	+	+	+	n. B.	n. B.
Inhibition von Lipoproteinlipase	+	+	+	+	n. B.	n. B.

Legende: ES: embryonale Stammzellen; APP: akute Phase Protein; M1-Zellen: murine myeloide Leukämiezellen; n. B. : nicht Berichtet; (*) : ja bei gleichzeitiger Gabe von IL-6-Rezeptor; §: ja bei gleichzeitiger Gabe von löslichem CNTF-Rezeptor; #: begleitet von Wachstumsinhibition.

Diese Zytokine werden auf Grund ihrer Sequenzhomologie und ihrer gleichen Grundstruktur bestehend aus 4 helikalen Bündeln zu einer Familie zusammengefasst [16]. Des Weiteren verwenden diese Zytokine z.T. dieselben Membranrezeptoren, wie z.B. das gp130. Eine weitere Gemeinsamkeit stellt die intrazelluläre Signaltransduktion dar. So verwenden alle IL-6-Zytokine zumindest einen der folgenden Signalwege: den JAK/STAT-Signalweg [17], den MAPK Signalweg oder den AKT/PKB Signalweg.

1.4 Oncostatin M: Funktion und Bedeutung

Oncostatin M ist ein 28 kDa großes Glykoprotein und besteht aus 196 Aminosäuren, wobei das Genprodukt des OSM-Gens zunächst aus 252 Aminosäuren besteht. Das funktionsfähige Protein entsteht durch posttranslationale Abspaltung einer aus 25 Aminosäuren bestehenden Sequenz vom N-Terminus und Abspaltung eines Peptides bestehend aus 31 Aminosäuren vom C-Terminus [18]. Der Genlocus für OSM befindet sich auf Chromosom 22q12, lediglich 19 kb entfernt vom LIF-Genlocus [19]. Dabei weist es eine signifikante Homologie, sowohl in seiner primären Aminosäurestruktur als auch in dessen Sekundärstruktur, mit LIF, CNTF, IL-6, Granulocyte-Colony-stimulating factor (G-CSF) und IL-11 auf [20]. Dabei besteht die größte Übereinstimmung auf genomischer und auf Aminoäurenebene zwischen OSM und LIF. Diese Betrachtungen legen die Vermutung nahe, dass beide Moleküle aus einer Genduplikatur entstanden sind [21].

Oncostatin M bildet vier α -Helix-Regionen und drei invertierte Helix-Regionen. Erstmals wurde es 1986 von Zarling und Mitarbeitern beschrieben. Hier konnte gezeigt werden, dass OSM einen inhibierenden Effekt auf die humane Melanomzelllinie A375 ausübt [22]. Damals konnte OSM aus humanen histiozytischen Lymphomzelllinien isoliert werden, nachdem sie mit Phorbolestern stimuliert wurden.

OSM wird vor allem von T-Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen gebildet und sezerniert [23], welche im Rahmen einer Entzündung oder chronischen Schädigung vermehrt in ein Gewebe einwandern.

Dies wird deutlich durch den Nachweis einer Beteiligung von OSM an der Entwicklung von Leber- [24] und Lungenfibrose [25], wobei in gesunden Individuen ein Nachweis von OSM in Leber und Lunge nicht gelang [26].

Znoyko und Mitarbeiter konnten außerdem eine konstitutiv hohe Expression von OSM in anderen Organsystemen zeigen. In den Inselzellen des Pankreas, in den glomerulären Mesangiumzellen der Maus und in den distalen Tubuluszellen des proximalen Konvolutes der

Niere bei Ratten und Wüstenrennmäusen sowie in den Leydig-Zellen des Hodens konnte eine starke Expression nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte eine OSM-Expression in der roten Pulpa der Milz, in endokrinen Zellen des Magens sowie in vereinzelt Zellen im Marklager des Hirnstamms nachgewiesen werden [26-28].

Für Oncostatin M als pleiotropes Zytokin der IL-6-Familie wurden bereits eine Vielzahl an biologischen Funktionen beschrieben [29, 30], wobei ein Unterschied in der biologischen Aktivität von humanem und murinem OSM bekannt ist [31]. Dies liegt u.a. daran, dass murines OSM ausschließlich über den OSMR wirken kann, während hingegen humanes OSM über den OSMR und über den LIFR wirken kann. OSM spielt dabei eine wichtige Rolle in der Regulation von Wachstum und Differenzierung von Tumoren und in der Embryonalentwicklung, innerhalb der Hämatopoese und während des akuten und chronischen Entzündungsgeschehens.

OSM nimmt zum ersten einen Einfluss auf Zellwachstum und Differenzierung, vor allem bei Tumorgewebe. Zum Beispiel wurde bewiesen, dass OSM fähig ist TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase-1) hoch zu regulieren, welches einen Inhibitor des Metastasierungsprozesses darstellt [32]. Weiterhin konnte eine Wachstumsinhibierende Wirkung von OSM bei verschiedenen Melanomzelllinien [33], in humanem Meningeomgewebe des ZNS [34] und in gesunden und malignen Epithelzellen des Brustgewebes [35] nachgewiesen werden.

Auf der anderen Seite ist OSM in der Lage Wachstumsprozesse zu fördern. Murakami-Mori und Mitarbeiter haben festgestellt, dass das Wachstum von Karposi-Sarkom-Zelllinien unter OSM-Einfluss gesteigert wird [36]. Darüber hinaus nimmt man an, dass OSM das Wachstum dermalen Fibroblasten stimuliert [37].

Überdies konnten Tamura und Mitarbeiter die Expression der OSM-spezifischen OSMR-Untereinheit während der Embryonalentwicklung von Mäusen zu unterschiedlichen Zeiten auf unterschiedlichen Organen nachweisen. So konnte OSMR als erstes in aortalen Endothelzellen nachgewiesen werden. Postpartal konnte die Expression des OSMR in Lymphknoten, im Knochenmark, im Dünndarm, im Herz und der Niere nachgewiesen werden [38], was die zentrale Stellung von OSM in der embryonalen Entwicklung beweist und den Einfluss auf die Niere verdeutlicht.

1.5 Die Rolle von Oncostatin M im Entzündungsgeschehen, chronischer Schädigung und Wundheilung

Im Rahmen des Entzündungsprozesses spielen insbesondere Zytokine der Interleukin-6-Familie eine zentrale Rolle [39]. Diese lösen eine schnelle und vermehrte Bildung von Akute-Phase-Proteinen aus. Richards und Mitarbeiter zeigten eine Steigerung der Bildung von Akute-Phase-Proteinen in humanen HepG2-Zellen, H35-Zellen der Ratte und in Hepatozyten der Ratte in

Primärkultur nach Stimulation mit OSM [40]. OSM nimmt direkt und indirekt Einfluss auf das akute Entzündungsgeschehen über eine Modulation der Sekretion anderer Zytokine. Damit bewirkt OSM eine gesteigerte Bildung von IL-6 in Endothelzellen [41] und eine Steigerung der Bildung von IL-6-Rezeptor in HepG2-Zellen [42].

Im Rahmen entzündlicher Prozesse spielt ein gewisses Remodelling des extrazellulären Gewebes eine entscheidende Rolle für die Ausdehnung der Entzündung und die Organisation anschließender Heilungsprozesse.

OSM trägt hier maßgeblich zur Aufrechterhaltung der Balance zwischen Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und gewebsständigen Inhibitoren der Matrixmetalloproteinasen (TIMPs) bei. Eine OSM-Stimulation steigert die Expression von TIMP-1 in Fibroblastenkulturen [32] und die Expression von MMP-1 und MMP-3 in Astrozyten [43]. Folglich kann eine wichtige Rolle von OSM innerhalb der Wundheilung angenommen werden, weil OSM beim Auf- und Abbau der extrazellulären Matrix beteiligt ist.

Dabei kommt dem membranständigen gp130, als Rezeptorbestandteil vieler IL-6-Familie-Zytokinen, im Rahmen von Entzündungen, Ausbildung von Autoimmunität und Tumorentstehung eine wichtige Funktion zu [44]. Es liegt experimentelle Evidenz dafür vor, dass z.B. Oncostatin M in renalen Inflammationsprozessen eine besondere Rolle spielt. So konnte gezeigt werden, dass in Transplantatnieren die Entzündungsreaktion im Rahmen einer Abstoßung vor allem durch Oncostatin M und den Oncostatin M – Rezeptor reguliert wird [45]. Generell wird die Stellung von Oncostatin M innerhalb des Inflammationsprozesses jedoch kontrovers diskutiert. Es wurde gezeigt, dass in Endothelzellen Oncostatin M über die verstärkte Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen einen proinflammatorischen Effekt ausübt [46]. Auf der anderen Seite hat Oncostatin M in chronischen Entzündungsprozessen wie z.B. der rheumatoiden Arthritis oder der multiplen Sklerose im Tiermodell eher einen antiinflammatorischen Effekt. Hier konnte gezeigt werden, dass die Oncostatin M Wirkung zur Suppression der floriden Entzündung und zur Protektion beschädigten Gewebes führt [47].

1.6 Signaltransduktion und Regulation von Oncostatin M

Oncostatin M bindet an einen heterodimeren Rezeptorkomplex auf der Zielzelle. Dieser besteht aus zwei Transmembranproteinen, welche eine extrazelluläre Bindungsdomäne, eine transmembranäre Domäne und eine intrazelluläre Domäne besitzen. Dabei ist gp130 immer einer der beiden Bestandteile des Rezeptorkomplexes. Das zweite transmembranäre Protein, welches mit gp130 ein Heterodimer bildet ist OSMR. Als eine besondere Eigenschaft von humanem OSM kann dieses auch über einen heterodimeren Komplex aus LIFR und gp130 sein Signal weiterleiten. Die extrazelluläre gp130-Domäne besteht aus 6 Fibronectin-III-Domänen [48].

Zwei von ihnen mit je ca. 100 Aminosäuren, bilden eine genetisch hoch konservative Zytokinrezeptor-Familie-Domäne. Diese ist gekennzeichnet durch 4 Cystein-Reste in fixer Position am N-terminalen Ende und einem WSXWS-Motiv am C-terminalen Ende [49], was ein Charakteristikum der Klasse-I-Zytokinrezeptoren darstellt.

Das OSM-spezifische Transmembranprotein OSMR ist ein 150 kDa großes Protein mit einer OSM-spezifischen Bindungsstelle und bildet mit gp130 ein Heterodimer, welches eine hochaffine Bindung mit OSM eingeht und die Signaltransduktion ins Zellinnere einleitet [50].

Nach Bindung eines OSM Moleküls an die Zytokinrezeptorfamilie-Domäne kommt es nach Heterodimerisierung zur Aktivierung von gp130 assoziierten JAK-Molekülen, welche dann Tyrosinreste an der intrazellulären Domäne der Rezeptoren phosphoryliert. Dies hat zur Folge, dass via SH2 z.B. STAT3 zur Zellmembran transloziert und weitere Effekte vermittelt [51].

Als Möglichkeiten der Regulation dieses Signalweges gibt es in der Zelle verschiedene Phosphoproteinphosphatasen, wie z.B. SHP2, welche durch JAK phosphorylierte Proteine dephosphoryliert und somit deren Aktivierungsniveau senkt [52]. Des Weiteren existiert noch eine Art negativer Feedback über die Aktivierung von STAT-Aktivierbaren STAT-Inhibitoren der SOCS-Familie, welche von Starr [53] erstmals beschrieben wurden.

Auch die unterschiedlichen Halbwertszeiten der einzelnen Komponenten der Signalkaskade scheinen eine Rolle bei der Regulation dieser Kaskaden zu spielen [54]. Als weitere Wege der intrazellulären Signalweiterleitung nach OSM-Bindung sind der MAPK/ERK1/2-Signalweg sowie der AKT/PKB-Signalweg zu nennen.

2. Hypothese

In Zusammenschau aller vorher erläuterten Zusammenhänge zwischen OSM und Entzündung und Wachstum sowie Differenzierung einerseits, und zwischen OSM und der Niere andererseits soll die physiologische Wirkung von OSM auf den Podozyten beschrieben werden.

Die Arbeit von Esashi mit OSM-Knockout-Mäusen konnte zeigen, dass diese Tiere zwar überlebensfähig waren, jedoch eine Thymushypoplasie aufwiesen und interessanterweise häufiger an Glomerulonephritis litten als die Kontrolltiere. Dies äußerte sich in einer vermehrten Ausscheidung von Proteinen im Urin der Knockout-Mäuse [55].

Insbesondere die Arbeit von Luyckx und Mitarbeitern, die zeigte, dass OSM besonders an Entzündungsprozessen der Niere beteiligt ist, richtete unseren Fokus auf OSM. So sind vor allem renale Tubuluszellen nach OSM-Stimulation in der Lage eine intrinsische Akute-Phase-Reaktion

zu initiieren [45]. So postulieren wir in dieser Arbeit, dass Oncostatin M ein wesentlicher Modulator podozytärer Funktionen ist.

Um diese These zu belegen stellten wir uns zunächst die Frage, wie OSM die podozytäre Signaltransduktion beeinflusst. Hierfür wurden murine Podozyten mit OSM stimuliert, geerntet und im Anschluss die Aktivität der einzelnen Signalkaskaden mittels Western Blot untersucht. In der vorliegenden Arbeit werden dabei der ERK/MAPKinase-Weg, der AKT/PKB-Signalweg sowie der STAT3-Signalweg dargestellt.

Als Zweites stellten wir uns die Frage, ob OSM im Podozyten eine Entdifferenzierung im Sinne einer Epithelial-zu-Mesenchymalen Transition induzieren kann. Hierfür wurden Podozyten erneut mit OSM stimuliert und im Anschluss mittels PCR-Untersuchungen die Expression verschiedener Gene nachgewiesen. Dabei galt unser Interesse zunächst den Rezeptorbestandteilen der OSM-Signaltransduktion. Darüber hinaus wurden verschiedene für Wachstum und Differenzierung sowie für die Epithelial-zu-Mesenchymale Transition wichtige Gene gemessen.

Als Drittes stellten wir uns die Frage, ob eine mögliche Entdifferenzierung einen Einfluss auf das Migrationsverhalten von Podozyten hat. Um dieser Fragestellung nachzugehen wurden Migrationsassays mit humanen Podozyten durchgeführt.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1 Material in der Zellkultur

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die verwendeten Materialien zur Kultivierung und Versorgung der Podozyten:

Tabelle 2 : Verwendete Materialien in der Zellkultur

	Produkt	Hersteller	Art. Nr.	Bemerkungen
--	---------	------------	----------	-------------

1.	Nährmedium VLE RPMI 1640	BIOCHROM	FG1415	
2.	FBS Superior	Biochrom	S.0615	
3.	PBS Dulbecco	Biochrom	L.1825	Low endotoxin
4.	Trypsin-EDTA-Solution	Biochrom	L.2143	
5.	DMSO	Sigma	D2650	
6.	IST	Invitrogen	0398	Nur für humane Podozyten
7.	Collagen Type I	BD-Biosciences	354236	Rat tail, geliefert in leicht schwankenden Konzentrationen um 4,0 mg/ml
8.	6-well-Platten	Corning inc. Costar	3506	
9.	12-well-Platten	Corning inc. Costar	3512	
10.	Rasterschälchen, 2ml	Nunc	174926	35 x 10 w/grid
11.	Kulturflaschen, 250 ml, T75	Nunc	156800	
12.	Penicillin/Streptomycin	Biochrom	A2213	10.000U/ml
13.	Interferon γ	Roche	1.2226300	Mouse
14.	Mycoplasmentest: Myco Alert	Lonza		
15.	Zellzählkammer	Neubauer		0,1mm Tiefe, 0,0025mm ²
16.	Phasenkontrastmikroskop	Zeiss	Axiovert 40 CFL	
17.	Digitalkamera Coolpix	Nikon		
18.	Eppendorf Pipetten	Eppendorf		
19.	Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf		0,5; 1,5; 2 ml
20.	Reaktionstubes	Falcon		15ml und 50 ml

Alle für die Zellkultur verwendeten Agenzien und Materialien wurden unter sterilen Bedingungen verwendet. Es wurde durchgehend unter einer Sterilbank von Thermo Scientific (Hera Safe) gearbeitet. Außerdem wurde jede Substanz vor dem Kontakt mit den Zellen entsprechend auf gereinigt oder autoklaviert.

Die den Zellen im Laufe der Experimente zugeführten Stimulantien, Zytokine und Inhibitoren sind in der folgenden Tabelle wiedergegeben:

Tabelle 3 : Verwendete Agenzien und Stimulantien für Zellversuche

	Produkt	Hersteller	Art. Nr.	Bemerkungen
1.	rOncostatin M (Mouse)	R&D Systems	495-MO/CF	21 kDa
2.	rOncostatin M (Human)	R&D Systems	295-OM/CF	22 kDa
3.	rIL-6 (Mouse)	R&D Systems	406-ML/CF	21,8 kDa
4.	rCNTF [56]	R&D Systems	557-NT	22,8 kDa
5.	rCNTF	Alomone	C-240	
6.	rCNTF	Serotec	PRP-26	
7.	rCT-1 mouse	R&D Systems	438-CT	
8.	rLIF mouse	R&D Systems		
9.	rCNTFR α human	R&D Systems	303-CR	Löslicher Rezeptor
10.	rLeptin mouse	R&D Systems	498-OB	
11.	U0126	Promega	V1121	MEK Inhibitor
12.	Ly294002	MERCK Chemicals	440202-5MG	PI3Kinase Inhibitor
13.	AG490	Calbiochem	658401	JAK2-Inhibitor
14.	Bafilomycin A1			H ⁺ -ATPase- Inhibitor
15.	STAT3-Inhibitor VII	Santa cruz	SC-355978	

Um den Einfluss anderer Faktoren auf die Zellen zu minimieren, beispielsweise bestimmter Wachstumsfaktoren im FBS, wurden die Zellen vor jeder Stimulation mindestens für 12 h auf Hungermedium gesetzt. Hungermedium entsprach dabei demselben Grundmedium wie beim Vollmedium, allerdings ohne FBS. Bei FBS handelte sich um fetales bovines Serum, welches als Zugabe zum Nährmedium zur Kultivierung der sich ausdifferenzierenden Podozyten nötig war. Darin enthalten sind viele Proteine, Kohlenhydrate und Wachstumsfaktoren.

Bei den verwendeten Agonisten und Antagonisten wurde auf Keimfreiheit geachtet. Die beschriebenen Substanzen wurden unter der Sterilbank dem Hungermedium der Zellen zugegeben und anschließend je nach Setting erneut bei 37°C inkubiert.

Die Pharmaka wurden nach Erhalt entsprechend der Vorschrift des Herstellers gelöst und aliquotiert.

Für die Lösung der Substanzen wurde das Lösungsmittel mit der geringsten Zytotoxizität verwendet. Meist war dies gut mit PBS-Puffer zu realisieren, jedoch benötigten einige wenige Substanzen das lipophilere Agens DMSO.

3.1.2 Antikörper

In den Western Blot Analysen zur Detektion spezifischer Proteinstrukturen wurden die entsprechenden Antikörper verwendet.

Prinzipiell unterscheidet man zwischen primären und sekundären Antikörpern.

Der Primärantikörper dient der Detektion des Zielproteins und erkennt die lineare Aminosäuresequenz des zu untersuchenden Proteins. Der Sekundärantikörper erkennt nun eine spezifische Sequenz des Primärantikörpers und bindet an ihn. Der sekundäre Antikörper besitzt in der Regel eine spezielle enzymatische Aktivität, welche dem Sichtbarmachen des Zielproteins dient.

In unserem Labor verwendeten wir in der Regel Antikörper mit Horse-Radish-Peroxidase-Aktivität.

Der Zweitantikörper wurde speziesspezifisch entsprechend des Primärantikörpers gewählt.

Eine Übersicht über alle verwendeten Antikörper geben Tabelle 4 und 5.

Tabelle 4 : Verwendete Primärantikörper

	Produkt	Hersteller	Art. Nr.	Bemerkungen
1.	α -p44/42 MAPK (ERK1/2)	Cell Signaling	#4695	Aus Rabbit, mAb
2.	α -Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2)	Cell Signaling	#4377	Aus Rabbit, mAb
3.	α -AKT (PKB)	Cell signaling	#9272	Aus Rabbit
4.	α -Phospho-AKT (PKB)	Cell signaling	#4060	Aus Rabbit, Ser473
5.	AKT Control Cell Extracts	Cell signaling	#9273	Positivkontrolle
6.	α -Stat3 (79D7)	Cell signaling	#4904	Aus Rabbit, mAb
7.	α -Phospho-Stat3 (D3A7)	Cell signaling	#9145	Aus Rabbit, mAb, Tyr705
8.	α -Phospho-p70S6K (108D2)	Cell signaling	#9234	Aus Rabbit, Thr389
9.	α -p70S6K α (H-160)	Santa Cruz Biotech. Inc.	Sc-9027	Aus Rabbit
10.	α -PI3 Kinase p85 (19H8)	Cell signaling	#4257	Aus Rabbit
11.	α -Phospho-PI3K p85	Cell signaling	#4228	Aus Rabbit, Tyr199
12.	α -CNTF	Swiss-Prot	P26441	Aus Chicken, pAb
13.	α -Podocin	Sigma	P0372	Aus Rabbit
14.	α -WT-1			
15.	α -Nephrin	Progen	GP-N2	aus Meerschweinchen
16.	α -CNTF	Millipore	AB5749	Aus chicken
17.	α -GAPDH	Cell signaling	#2118	Aus rabbit

Tabelle 5. : Verwendete Sekundärantikörper

	Produkt	Hersteller	Art. Nr.	Bemerkungen
--	---------	------------	----------	-------------

1.	α -Rabbit IgG	GE Healthcare UK ltd.	NA934V	
2.	α -Chicken AK			
3.	α -Mouse AK	Dako	P0447	Aus goat, polyklonal

Die entsprechenden Konzentrationen wurden für jede Charge gelieferter Antikörper neu ausgetestet, um optimale Bandenqualität zu erzielen.

3.1.3 Primer

Tabelle 6 gibt einen Überblick über Art, Größe und Sequenz der verwendeten Primer für die Polymerase Kettenreaktion.

Tabelle 6 : Verwendete Primer

	Produkt	Spezies	Sequenz	Band e BP	An nea ling °C
1.	Socs3 mm FP1	mouse	TGC AGG AGA GCG GAT TCT AC	132	58
2.	Socs3 mm RP1	mouse	TGA CGC TCA ACG TGA AGA A		

3.	mmSnai l qPCR FP	mouse	AGC CCA ACT ATAGCG AGC TG	150	58
4.	mmSnai l qPCR RP	mouse	CCA GGA GAG AGT CCC AGA TG		
5.	gp130 FP	mouse	CAC CCA GCC CCT GCT AGA CT	77	58
6.	gp130 RP	mouse	TCT CAT CCC CAC CGT CTA CAC T		
7.	LIFRb FP	mouse	GGA AGT CCG TGC TCC ATC AA	90	58
8.	LIFRb RP	mouse	AAA GGA CCA CCC TCC TCC ATT A		
9.	OSM Rez Q FP1	mouse	TCATACTACCCAT GACCCTCT	115	58
10.	OSM Rez Q RP1	mouse	ATGCTGCTCTTGT ACGGATTG		
11.	mmCad herin3 q FP1	mouse	TGCTGAACATCA CTGACAAGG	138	58
12.	mmCad herin3 q RP1	mouse	GGAACTTCTTCA GGGACAAGG		
13.	ZO1 EIE FP1	mouse	ATC TCC TGA CCA ACG TTC AGA	96	58
14.	ZO1 EIE RP1	mouse	ATT CGC TCT TCC TCT CTG CTC		

15.	Nephrin EIE FP3	mouse	TCT TCA AAT GCA CAG CCA CCA	152	58
16.	Nephrin EIE RP3	mouse	AAA GCC AGG TTT CCA CTC CAG TC		
17.	Podocin EIE FP1	mouse	GTA GTG GAC GTG GAC GAG GT	107	60
18.	Podocin EIE RP1	mouse	CCT AAT CCA GAG GGC TTG ATG		
19.	mmDes qPCR FP1	mouse	TGCAGCCACTCT AGCTCGTA	150	58
20.	mmDes qPCR RP1	mouse	GACATGTCCATC TCCACCTG		
21.	mmColl 1 qPCR FP1	mouse	ATC TCC TGG TGC TGA TGG AC	154	58
22.	mmColl 1 qPCR RP1	mouse	ACC TTG TTT GCC AGG TTC AC		
23.	mm β - Actin FP1	mouse	AGATCTGGCACC ACACCTTCT	390	58
24.	mm β - Actin RP1	mouse	CTTTGATGTCACG CACGATTTC		
25.	Gapdh EIE mm FP1	mouse	GTG TTC CTA CCC CCA ATG TGT	137	58
26.	Gapdh EIE mm RP1	mouse	GTC CTC AGT GTA GCC CAA GAT G		

27.	mmKlf4 qPCR FP1	mouse	AAAGAACAGCCA CCCACACTTG	106	58
28.	mmKlf4 qPCR RP1	mouse	TAAGGTTTCTCGC CTGTGTGAG		
29.	mmT- box3 Q FP1	mouse	TGTTCCCGGAAA CAGAATTCATC	108	
30.	mmT- box3 Q RP1	mouse	ATTGCCAGTGTCT CGAAAACCC		
31.	mmFN1 qPCR FP1	mouse	CGAGGTGACAGA GACCACAA	149	58
32.	mmFN1 _qPCR_ RP1	mouse	CTGGAGTCAAGC CAGACACA		

3.1.4 Sonstige Materialien und Chemikalien

Weitere Materialien und Geräte finden sich in Tabelle 7.

Tabelle 7 : weitere Verwendete Materialien

	Produkt	Hersteller	Art. Nr.	Bemerkungen
1.	Easypet Pippetierhilfe	Eppendorf	4421 000.013	
2.	Pipette Reference	Eppendorf	➤ 4900 000.028 ➤ 4900 000.117 ➤ 4900 000.125 ➤ 4900 000.133 ➤ 4900 000.524	➤ 2 µl ➤ 20 µl ➤ 50 µl ➤ 100 µl ➤ 1000 µl
3.	Pipetman Classic	Gilson	➤ F144801 ➤ F144802 ➤ F123600 ➤ F123615 ➤ F123601 ➤ F123602	➤ P2 ➤ P10 ➤ P20 ➤ P100 ➤ P200 ➤ P1000

4.	Western-Blot Zubehör	Biorad		
5.	PCR-Cycler	Biorad		
6.	Phasenkontrastmikroskop	Zeiss		
7.	Imager	Fluor Chem HD2	517106	

Im Nachfolgenden werden alle für die Versuche verwendeten Chemikalien aufgelistet.

Tabelle 8 : verwendete Chemikalien

	Produkt	Hersteller	Art. Nr.	Bemerkungen
1.	Agarose MEE0 Ultra –Quality	Roth	2268.4	
2.	APS			
3.	Bromphenolblau	Merck	L456422	
4.	BSA			
5.	Coomassie brilliant blue R250	ICN	821616	
6.	DMSO	Sigma	2650	
7.	Ethanol	Merck	1.11727.2500	
8.	Ethidiumbromid	Roth	HP47,1	
9.	Glycin p.A.	AppliChem	A1377.5000	
10.	KCL	Merck	4938	
11.	Laemmli sample buffer	Sigma	S-3401	
12.	Luminol	Fluka	09253	
13.	MgCl ₂	Merck	1.05833.1000	
14.	Methanol	AppliChem	A0688.25004PE	
15.	NaCl	AppliChem	A2942.5000	
16.	OrangeG	Fluka	75380	
17.	PBS Puffer			
18.	p-Coumaric acid	Sigma	C9008-10G	
19.	PMSF	Kommt als Pulver		In Isopropanol
20.	Proteinmarker 7 – 175 kDa	Biolabs	P7708L	
21.	Rotiophorese	Roth	3029.2	
22.	SDS	Biomol	0451.1	
23.	Sodiumorthovandate			Na ₃ VO ₄
24.	TEMED	Roth	2367.2	
25.	Tris Base	Roth	4855.3	
26.	Tris-HCL	Sigma	T5941-1KG	
27.	Triton X100	Sigma	X100	

28.	Tween 20	Merck	8.17072.1000	
29.	2-Propanol	Roth	6752.1	
30.	100-bp-DANN-Marker	Biolabs	N3231L	

3.1.5 Verwendete Software

Zur densitometrischen Auswertung von Banden wurde das Programm Alpha Ease FC verwendet. Zur Flächenmessung auf Bilddateien kam das Programm Image J zur Anwendung. Alle Tabellen, Diagramme und statistischen Auswertungen wurden mit Microsoft Excel 2010 erstellt.

3.2 Methoden

3.2.1 Podozyten in der Zellkultur

Die terminale Differenzierung der Zellen stellt für die Kultivierung *in vitro* eine Herausforderung dar, da sich die Zellen im ausdifferenzierten Zustand nicht mehr teilen. Um dieses Problem zu lösen verwendeten wir in meiner Arbeit verschiedene Zellsysteme. Murine immortalisierte Podozyten (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. P. Mundel, MGH, Boston, MA, USA) und humane immortalisierte Podozyten (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Professor Moin Saleem, Bristol, Großbritannien).

Erstere sind mit dem thermosensitiven Large-T-antigen ausgestattet. Dies ermöglichte es, die Podozyten bei 33°C, 5% CO₂ und Anwesenheit von Interferon- γ in einem undifferenzierten und teilungsfähigen Zustand zu halten und zu vermehren. Um die terminale Differenzierung einzuleiten, mussten die Zellen bei 37°C, 5% CO₂ und in Abwesenheit von Interferon γ für 12 bis 14 Tage inkubiert werden. Durch den Temperaturwechsel und den Entzug von Interferon wird das Large-T-Antigen abgebaut und die replikative Phase der Zellen beendet. Die von Professor Saleem zur Verfügung gestellten immortalisierten humanen Podozyten exprimieren ebenfalls eine thermosensitive Form des SV40-Large-T-antigens. Diese Zellen proliferieren bei einer Temperatur von 33°C und 5% CO₂. Bei einer Temperatur von 37°C und 5% CO₂ kommt es dann zum Teilungsstopp und zur terminalen Ausdifferenzierung der Zellen.

Nach diesem Intervall können dann Experimente mit den Zellen durchgeführt werden, wobei die Zellen 12 bis 24 h vor Experimentbeginn auf 1 ml Hungermedium (VLE RPMI 1640, BIOCHROM und 1% Penicillin/Streptomycin) gesetzt werden.

Als podozytäre Marker und als Nachweis für die terminale Differenzierung dient u.a. der Nachweis von Podocin, Nephrin und Neph1 im Westernblot.

Die Kultivierung der Vorläuferzellen erfolgte in mit Kollagen (Collagen Type I, Biosciences) beschichteten 250 ml (T75) Corning Flaschen bei zwei- bis dreitägiger Passage. Die Kultivierung der ausdifferenzierten Zellen hingegen erfolgte in 6-Well-Schalen von Corning, oder aber in 2ml Raster-Schälchen (Nunc) für die Migrationsversuche.

Als Nährmedien wurde VLE RPMI 1640 (Biochrom) mit Zusatz von 10% FBS (Biochrom) und 1% Penicillin/Streptomycin verwendet. Dieses wurde drei Mal pro Woche gewechselt, wobei hier immer ein Spülschritt erfolgte, um evtl. abgestorbene Zellen aus den Wells zu entfernen.

Zur Beurteilung des Wachstums und der Morphologie, sowie zum Erkennen möglicher Infektionen, erfolgte täglich die Visitation unter dem Phasenkontrastmikroskop (Zeiss: Axiovert 40 CFL). Weiterhin erfolgten regelmäßige Testungen auf Mycoplasmen durch PCR.

Die immortalisierten Podozyten mussten alle zwei bis drei Tage zum Erhalt einer Mutterkolonie gesplittet werden. Dafür mussten die Zellen aufgrund ihrer starken Adhärenz an kollagenisiertem Untergrund zuerst mit 0,05% Trypsin (Biochrom) bei 37°C für vier bis fünf Minuten inkubiert werden. Anschließend konnten die Zellen nun aus den T75-Flaschen überführt werden. Nach standardisiertem Passagieren der Zellen konnten entweder neue T75-Flaschen zum Erhalt oder nun 6-Wells zur Ausdifferenzierung ausgesät werden. Das Passagieren erfolgte maximal bis zur 30. Passage. Für die Versuche wurden bevorzugt Zellen der Passagen 12 bis 27 verwendet.

Zum Ausdifferenzieren wurden in 6-Well Platten (Corning) 25000 Podozyten pro Well ausgesät. Gezählt wurden die Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop mit speziellen Zählkammern. Die 6-Well Platten bedurften keiner vorherigen Beschichtung. Die optimale Anordnung der Zellen innerhalb eines Wells war beim Aussähen besonders wichtig. Hierbei wurde auf die Lage der Zellen zueinander Wert gelegt. Um eine möglichst physiologische Anordnung der Podozyten zu erzielen, war ein möglichst dichter Zellrasen erwünscht, der das großvolumige Ausdifferenzieren der Zellen erlaubte, nicht jedoch die Zellen so eng zusammen brachte, dass mögliche zu frühe Zell-Zell-Kontakte einen wachstumshemmenden Reiz ausüben könnten.

Nach einem Tag im Brutschrank wurde nach dem Aussähen das Medium erneut gewechselt und mehrfach gespült, um alle Reste von Interferon γ zu entfernen.

3.2.2 Proteinisolation aus murinen Podozyten

Nach Stimulation entsprechend Protokoll wurden die Podozyten für die nachfolgende Proteinaufarbeitung wie folgt geerntet. Nach Entnahme der Zellen aus dem Brutschrank wurden sie samt 6-Well-Schale auf einen Eisblock kühl gestellt. Dann wurde das Hungermedium abgesaugt und mit zwei bis drei ml 4°C kühlem PBS gespült. Nach erneutem Absaugen wurde 1% Triton X100 Lysispuffer mit PMSF je 50 μ l pro Well zugegeben um dann mit einem flachen Zellschaber nach standardisiertem Schema die Zellen mechanisch zu lösen. Das so gewonnene Lysat wurde in neue 1,5ml –Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und sofort wieder auf Eis gestellt. Nach 30minütiger Inkubation auf Eis wurde den Proben abschließend 4fach Laemmli im Verhältnis 1:3 zugeführt und bei 95°C für 5 Minuten gekocht. Die fertigen Proteinlysate konnten zur weiteren gelelektrophoretischen Aufarbeitung verwendet werden.

3.2.3 Westernblot Analysen

Zur Durchführung der SDS-Page-Gelelektrophorese und des anschließenden Westernblots wurden ausschließlich Systeme von Biorad verwendet.

Das verwendete SDS-Gel wurde jeweils nach obigem Rezept direkt vor der Elektrophorese frisch gegossen. Hierbei wurden meist zehnzinkige Gelkämme (0,75 mm Dicke) von Biorad verwendet. Je nach zu detektierendem Protein und dessen Molekulargewicht wurde 10%iges oder 12%iges SDS-Gel hergestellt.

Nach Laden von je 15 μ l Proteinlysates pro Tasche, 8 μ l Proteinmarker und 10 μ l zweifach Laemmli in die unbeladenen Taschen, wurde das Gel standardisiert zuerst für 30 Minuten bei 70V und im Anschluss für 120 Minuten bei 20mA pro Gel für insgesamt 2h laufen gelassen.

Die Überführung der Proteine auf eine Membran erfolgte als Tankblot in Transferpuffer (10% MeOH) bei 200 mA für 2h, bei kleineren Proteinen teilweise auch 1,5 h, auch hier mit dem Tankblotsystem von Biorad. Hierbei erfolgte der eigentliche Proteintransfer vom SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran.

Nach erfolgreichem Blot wurde die Membran in 5%igem bovines Serumalbumin (BSA) bei 4°C über Nacht geblockt, um unspezifische Proteinbindungsstellen abzudecken und so die Membranen für weitere Antikörperinkubationen vorzubereiten.

Zur Proteindetektion wurden Primärantikörper verwendet, deren optimale Verdünnung vorher getestet wurde. Als Sekundärantikörper wurden an Horse-radish-Peroxidase gekoppelte AK verwendet (siehe Tabelle 4 und 5).

Anschließend wurde ein Immunoblot durchgeführt. Hierfür wurden zwei Lösungen angefertigt, die direkt vor dem Immunoblot gemischt wurden und dann gleichmäßig auf die Membran gegeben wurden.

Lösung A:

1m Tris pH8,5 2ml
a.d. 17,7 ml
Coumarin acid 88µl
Luminol 200µl

Lösung B:

1ml Tris pH8,5 2ml
a.d. 18 ml
H2O2 30% 12µl

Bei Zusammenkunft von H₂O₂, Luminol und dem Sekundär-AK entstand ein mit einer CCD-Kamera (alpha-Imager) detektierbares Signal, welches digital erfasst wurde. Zur Quantifizierung z.B. des Phosphorylierungsniveaus, wurde jede Probe zweimal geblottet und dann mit dem Gesamt-Protein-AK und dem Phospho-Protein-AK separat inkubiert. Im Anschluss wurden die im Immunoblot erhaltenen Bilder densitometrisch ausgemessen und die Bandenstärke einer relativen Einheit zugeordnet. Zuletzt wurde der Quotient aus Phospho-Protein : Gesamt-Protein gebildet, der für weitere Datenverarbeitungen die Grundlage bildete.

3.2.4 RNA-Isolation aus murinen Podozyten

Für die RNA-Isolation aus Podozyten wurde das RNeasy Plus Mini Kit von Qiagen verwendet. Generell galt das Prinzip des RNase freien Arbeitens. Jeder Gegenstand, der für die Isolation benötigt wurde, wurde mit den entsprechenden RNase-away Produkten behandelt. Nach dem Absaugen des Hungermediums wurden die Zellen mit 4°C kaltem RNase freiem PBS gespült und dann in RLT-Puffer nach obigem standardisiertem Schema gekratzt um das Lysat anschließend in spezielle RNA-Eppendorf-Reaktionsgefäße zu überführen. Der RLT-Puffer diente dabei der Lyse der Zellmembranen und der Stabilisierung der RNA. Ohne weitere Behandlung konnten diese Lysate dann weiter verarbeitet werden.

Die RLT-Lysate wurden zuerst für drei Minuten zentrifugiert. Der dabei gewonnene Überstand wurde dann mit 350 µl 70%igem Ethanol eluiert. Hiernach wurde das Gemisch auf spezielle RNA-Säulen gegeben und mit diesen für 15 s zentrifugiert. Dann wurden 350 µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben und erneut für 15 s bei 8000 g zentrifugiert. Auf die Membran der Säulen wurde im Anschluss 75µl einer DNase haltigen Lösung gegeben und für 15 Minuten bei

Raumtemperatur inkubiert. Hierbei sollten alle DNA-Reste des Lysates verdaut werden um reine RNA zu erhalten. Hierfür wurde ein Gemisch aus DNase und RDD-Puffer im Verhältnis 1:7 verwendet. Der RDD-Puffer diene dabei der Stabilisierung der DNase. Nach den 15 Minuten folgte ein weiterer Waschschrift mit 350 µl und 15 s bei 8000 g Zentrifugation und zwei Waschschriffe mit je 500 µl RPE-Puffer und 15 s bei 8000 g. Beim RPE-Puffer handelt es sich um einen speziellen Puffer zum Waschen membrangebundener RNA. Im Anschluss wurden die Säulen in ein neues Auffanggefäß überführt und erneut zwei Minuten lang bei Vmax zentrifugiert um alles Ethanol aus den Membranen zu entfernen. Nach Überführen der Säule in ein RNase-freies Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde dann die RNA mit 30 µl RNase-freiem Wasser bei 8000 g für eine Minute aus den Membranen gewaschen. Für die Kontroll-PCR zur Überprüfung der Reinheit der RNA-Proben wurde an dieser Stelle 0,5 µl entnommen.

Als nächster Schritt folgte das Umschreiben der RNA in cDNA mit Hilfe des QuantiTect Reverse Transkription-Kit von Qiagen. Hierfür wurde das aus Retroviren bekannte Prinzip der reversen Transkription genutzt. Davor wurde mit 2 µl gDNA-wipeout Puffer ein weiterer Verdau genomischer DNA und Inkubation für drei Minuten durchgeführt. Anschließend wurden die Proben sofort für 30 Minuten auf Eis gekühlt. Um den zweiten DNA-Verdau zu überprüfen wurde zu diesem Zeitpunkt eine zweite 0,5µl-Probe entnommen. Für die reverse Transkription wurde ein Reverse-Transkriptions-Mix mit folgenden Komponenten hergestellt:

- 4 µl Quantiscript RT-Puffer
- 1µl RT-Primermix
- 1 µl reverse Transkriptase
- 14 µl RNA-Probe

Das Enzym Reverse Transkriptase wurde hierbei bis zur Zugabe auf -20°C gehalten. Nach Zugabe der Reversen Transkriptase wurden die Proben dann für 25 Minuten bei 42°C und - im Anschluss - für drei Minuten und 30 sec bei 95°C inkubiert. Die Konzentration der gewonnenen cDNA wurde im Photometer bei 260 nm gemessen und betrug im Durchschnitt 1500 µg/ml.

Die abschließende Kontroll-PCR wurde mit GAPDH durchgeführt. Bei GAPDH handelt es sich um das Gen der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, ein Enzym, welches in nahezu allen eukaryoten Zellen ubiquitär exprimiert wird. Es wurden hierfür 40 Zyklen bei 58°C Annealing-Temperatur benutzt. Sie enthielt die Proben in dreifacher Ausführung: zum ersten die reinen RNA-Lysate vor dem zweiten DNA-Verdau, zum zweiten die Proben nach dem zweiten DNA-Verdau und schlussendlich die Produkte nach der reversen Transkription. Damit ließ sich sowohl der Erfolg der einzelnen DNA-Verdauschritte als auch die Reinheit des cDNA-

Endproduktes überprüfen. Als Endprodukt erhielt man 20 µl cDNA, welche für die weiteren Nachweise in der konventionellen PCR verwendet werden konnten. Die Lagerung der cDNA erfolgte für kurze Zeit bei 4°C, für längere Zeiträume bei -20°C.

3.2.5 Konventionelle Polymerase-Kettenreaktion

Die Durchführung einer konventionellen PCR erfolgt im Labor nach standardisiertem Schema. Hierfür wurde das HotStar-Taq-DNA-Polymerase Kit von Quiagen verwendet. Es gab ein genaues Rezept zur Anfertigung eines PCR-Mixes der alle für die Reaktionen im Cycler benötigten Substanzen enthielt. Als Grundmaterialien benötigte man einen 10x PCR Puffer, Nukleotide (dATP, dGTP, dTTP und dCTP), den gewünschten Primer und die DNA-Polymerase. Die einzelnen Bestandteile setzten sich wie folgt zusammen:

- 16,78 µl steriles H₂O
- 2 µl 10x PCR Puffer (enthält 15mM MgCl₂)
- 0,4 µl dNTP
- 2x 0,1 µl Primer (Vorwärts- und Rückwärtsprimer)
- 0,12 µl Taq-Polimerase
- 0,5 µl cDNA-Probe

Dies ergab ein Gesamtvolumen von 20 µl pro cDNA-Probe. Je nach Probenanzahl wurde der PCR-Mix entsprechend vorbereitet und vorgelegt. Als letzte Zugabe erfolgte immer die Taq-Polymerase, um das Enzym nicht zu lange bei Raumtemperatur zu belassen.

Je nach gewünschter Untersuchung wurden verschieden viele Zyklen zur Amplifikation verwendet. So z.B. in der Kontroll-PCR nach der reversen Transkription 40 Zyklen. Im Standardprotokoll für die meisten anderen Untersuchungen wurden 35 Zyklen verwendet.

Zur Anwendung hatte man für die meisten Durchgänge ein standardisiertes Protokoll:

Zuerst wurde die cDNA und der PCR-Mix für 15 Minuten bei 95°C gekocht um somit alle kovalenten Bindungen innerhalb der cDNA aufgeschmolzen, um sie somit in die einsträngige lineare Form zu bringen. Diese 15 Minuten erfolgten vor jeder PCR einmalig. Anschließend folgten weitere 30 sec bei 95°C, die sich in jedem Zyklus wiederholten, um nach der Polymerisation ein erneutes Aufschmelzen zu ermöglichen. Die nächsten 30 sec wurde das Gemisch auf der Annealing-Temperatur des gewünschten Primers gehalten. Diese Betrag in der Regel um die 58°C und diente der sequenzspezifischen Anlagerung (Annealing) des Primers an

die cDNA. Nach dem die Anlagerung erfolgte, wurde das Gemisch für weitere 30 sec bei 72°C gehalten, was dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase entsprach, die nun die gewünschte Sequenz polymerisierte. Hiernach erfolgte ein erneutes Aufschmelzen der cDNA bei 95°C für 30 sec. Ab hier wurde der Zyklus wiederholt bis die vorgesehene Anzahl an Zyklen erreicht war. Danach schloss sich eine 5 minütige Inkubation bei 72°C an, damit die Taq-Polymerase inkomplette Stränge vervollständigen konnte.

Nach erfolgreicher PCR wurden die Amplifikate bei 4°C kühl gestellt. Anschließend wurden sie mit je 4 µl 5x OrangeG-Puffer versetzt. Dieser OrangeG-Puffer trägt zum einen zur Verbesserung der Laufeigenschaften der Lysate im Agarosegel und zum anderen zur besseren Handhabung und Sichtbarmachen der Lauffront bei.

Für die folgende gelelektrophoretische Auftrennung wurde 1,5%ige Agarose verwendet, die kurz vor der Elektrophorese frisch hergestellt wurde und bei 60°C gelagert wurde. Das Agarose-Gel wurde mit Ethidiumbromid versetzt, welches mit der DNA interkaliert und im UV-Licht fluoresziert. Nach Laden von je 9µl Probe pro Geltasche und 6µl 100-bp-Marker von Biolaps wurde die Gelelektrophorese bei 350 mA und ca. 90 V für 20 bis 30 Minuten durchgeführt. Nach dieser ladungsgebundenen Auftrennung der Amplifikate wurden die gesuchten Banden durch UV-Behandlung sichtbar gemacht. Auch hier kam das Imagingsystem mit CCD-Kamera von FluorChem zum Einsatz.

Für die Messung und Quantifizierung der Ergebnisse wurde bei jeder Probe pro zu untersuchendem Primerpaar noch einmal parallel mit GAPDH geladen, um einen Basiswert zu haben. Beide Bandenstärken wurden im Anschluss densitometrisch mit Hilfe der Software AlphaEase ausgemessen und relativen Einheiten zugeordnet. Die Grundlage für weitere statistische Analysen bildete der Quotient der Bandenstärke Zielprimer : Bandenstärke GAPDH

3.2.6 Migrationsassay (Wundheilungsassay)

Um die funktionellen Auswirkungen der OSM-induzierten Signaltransduktion auf den Podozyten zu untersuchen, wurde die Migrationsfähigkeit der Zellen untersucht. Hierzu wurde der Migrationsassay, auch Wundheilungsassay, eingesetzt.

Die Podozyten wurden aus der Mutterkultur direkt in 2 cm durchmessende Schälchen von Nunc überführt und 10-12 Tage zur Ausdifferenzierung bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Diese Schälchen besaßen am Boden eine leicht erhabene Gitterunterteilung die es ermöglichte, unter dem Phasenkontrastmikroskop über einen längeren Zeitraum immer dieselben Zellen zu beobachten.

Ziel war es, nach 12 Tagen in jedem Gitterkästchen einen möglichst dichten, komplett geschlossenen, homogenen Zellrasen zu erhalten. Dieser diente als Ausgangspunkt um eine gleichmäßigere Wundfläche am Tag 12 zu erzeugen.

Diese Wundfläche wurde mechanisch gesetzt, indem eine sterile 20µl Pipettenspitze von Gilson verwendet wurde, und manuell ein Kratzer möglichst in der Mitte einer Zählkästchenreihe gezogen wurde. Dabei wurde von oben nach unten gekratzt und drei bis fünf Kratzer pro Schälchen gesetzt. Nach der Entfernung der Zelltrümmer wurde das Schälchen unter dem Phasenkontrastmikroskop begutachtet und einige Kästchen zur weiteren Beobachtung ausgewählt. Diese mussten einen möglichst dichten Zellrasen besitzen und der Kratzer sollte etwa mittelgroß sein und mittig im Zählkästchen verlaufen. So wurde gewährleistet, dass sich eine annähernd gleiche Zellpopulation auf beiden Seiten der Wunde befand und vergleichbare Ausgangssituationen für die Migration bestanden.

Nach Kratzen und Spülen wurden dann die jeweiligen Stimulantien zugegeben. Je nach Fragestellung wurde den Zellen 24h vor Versuchsbeginn entweder Hungermedium zugesetzt oder sie auf Vollmedium belassen.

Die zur Beobachtung ausgewählten Kästchen wurden am Phasenkontrastmikroskop begutachtet und der aktuelle Stand mit einer Nikon CoolPix Digitalkamera über einen Tubus am Mikroskop fotografiert. Die gewonnenen Bilddateien wurden gesammelt und die Wundflächen mit dem Bildbearbeitungsprogramm Image J ausgewertet und die Ergebnisse statistisch weiterverarbeitet.

4. Ergebnisse

4.1 Vorarbeiten mit CNTF und anderen Vertretern der IL-6-Familie

Zu Beginn der Arbeit sollte die Rolle der Zytokine der IL-6-Familie in podozytären Zellsignalkaskaden untersucht werden. In Versuchen wurden immortalisierte murine Podozyten gemäß Protokoll für 12-14 Tage ausdifferenziert und dann für 12 h mit Hungermedium inkubiert, um die Aktivierung der Signalwege durch die Faktoren im Kälberserum möglichst gering zu halten. Die Zellen wurden anschließend mit den Zytokinen der IL-6-Familie behandelt. Den Zellen wurden 1, 5 und 10 ng/ml Leukaemia-Inhibitory-Factor [15], 50 ng/ml Ciliary

Nerurotrophic Factor (CNTF), 50 ng/ml Oncostatin M (OSM), 1, 5 und 10 ng/ml Leptin, 1, 5 und 10 ng/ml Interleukin 6 (IL-6) und Cardiotrophin 1 (CT-1) zugeführt und für 15 Minuten inkubiert. Westernblot-Analysen zeigten, dass im Podozyten nach Stimulation mit Leptin, CT-1 oder IL-6 sowohl auf der ERK-, der STAT3- als auch der AKT-Achse keine signifikanten Aktivitätssteigerungen entstanden. Die Aktivität wurde durch Bildung des Quotienten aus der Menge phosphorylierter Proteine zu Gesamtproteinmenge gemessen und so das Phosphorylierungsniveau bestimmt.

Demgegenüber fand sich ein erhöhtes Phosphorylierungsniveau auf allen drei Signalachsen bei Stimulation mit CNTF, Oncostatin M und LIF.

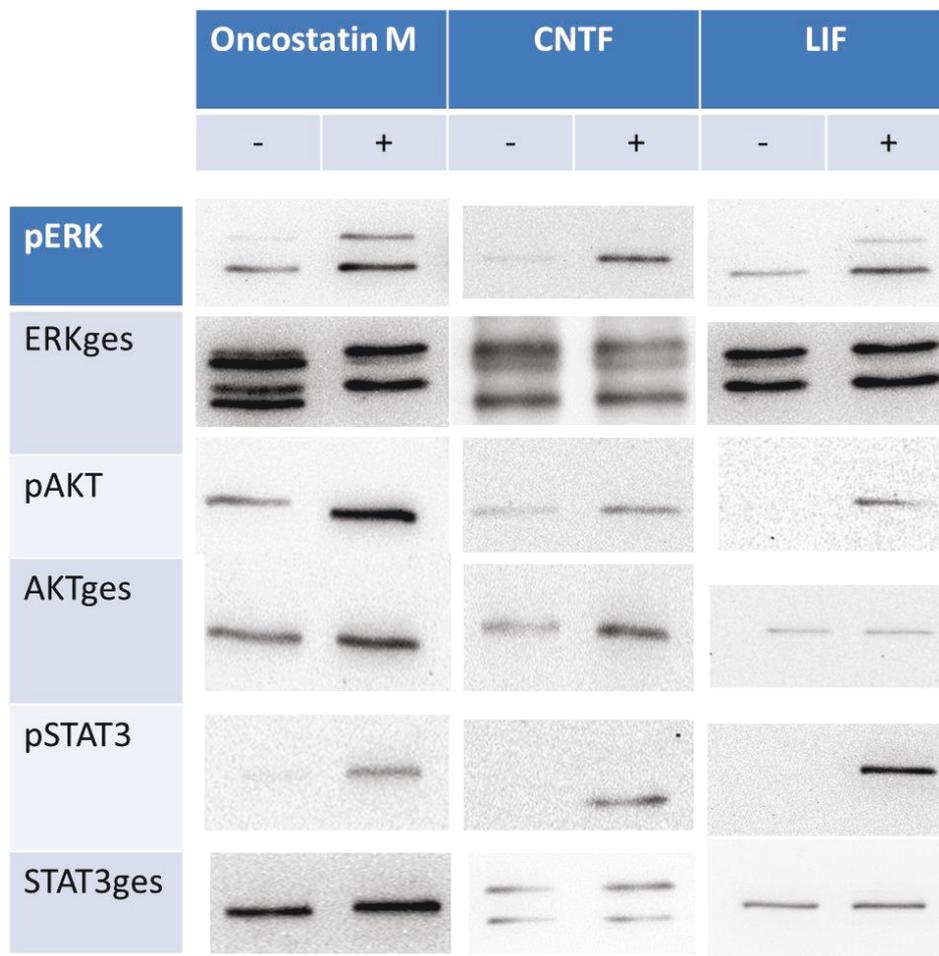


Abb. 1: Aktivierung der ERK-, AKT- und STAT3-Signalkaskade durch Zytokine der IL-6-Familie: Westernblot, verwendete Konzentrationen: OSM 50 ng/ml, CNTF 100 ng/ml, LIF 50 ng/ml. Aufgetragen und übereinander gestellt sind jeweils die Phospho-Antikörper oben und die Gesamtantikörper unten.

In Experimenten mit murinen Podozyten, die mit CNTF stimuliert wurden, zeigte sich ein erhöhtes Phosphorylierungsniveau der ERK-Kinasen und der AKT-Kinasen.

Hierzu wurden immortalisierte murine Podozyten nach Protokoll in Kultur gehalten. Nach Zugabe von CNTF wurde die Aktivitätssteigerung gemessen. Dabei zeigt sich, dass die Konzentration von CNTF zur maximalen Steigerung des AKT-Phosphorylierungsniveaus bei 50 ng/ml, für die ERK-Aktivierung bei 100 ng/ml lag. Des Weiteren untersuchten wir die zeitabhängige Phosphorylerungszunahme von ERK und AKT-Kinasen nach CNTF-Stimulation. Hier konnten wir zeigen, dass die ERK-Phosphorylierung nach 5 Minuten, die AKT-Phosphorylierung nach 15 Minuten ihr Maximum erreichte. Eine Übersicht über die erhobenen Voruntersuchungen zeigt Abbildung 1.

Außerdem testeten wir rekombinantes CNTF (rcCNTF) von drei verschiedenen Firmen (R&D, Alomone, Serotec). Hierbei ist der Umstand zu beachten, dass murines CNTF zum Zeitpunkt der Experimente nicht erhältlich war. Um in den folgenden Experimenten mögliche unspezifische Nebeneffekte gering zu halten wurde nach dem CNTF mit der niedrigsten nötigen Dosis gesucht. Es zeigte sich, dass sich mit rcCNTF der Firma R&D das beste Aktivierungsniveau bei niedrigster Konzentration erzielen lässt.

Als nächstes beschäftigten wir uns mit dem LIF-Signaling im Podozyten. Dabei wurde auch in Zeit- und Konzentrationsgradienten stimuliert und danach die Phosphorylierungsniveaus der AKT-, der STAT3- und der ERK-Achse untersucht. Hier kann man beobachten, dass die maximale ERK- und AKT-Aktivierung nach 10 bis 15 Minuten Stimulationszeit und einer Konzentration von 10 ng/ml erreicht wurde.

Durch Stimulation mit Oncostatin M lässt sich eine besonders stabile Signaltransduktion im Podozyten auslösen. Daher befasst sich der Hauptteil der vorliegenden Arbeit mit der Untersuchung der Bedeutung von Oncostatin M für die Funktion des Podozyten. Die Ergebnisse sind in den folgenden Abschnitten beschrieben.

4.2 Die Rolle von Oncostatin M in der podozytären Signaltransduktion

4.2.1 ERK/p42/p44-Signaltransduktion

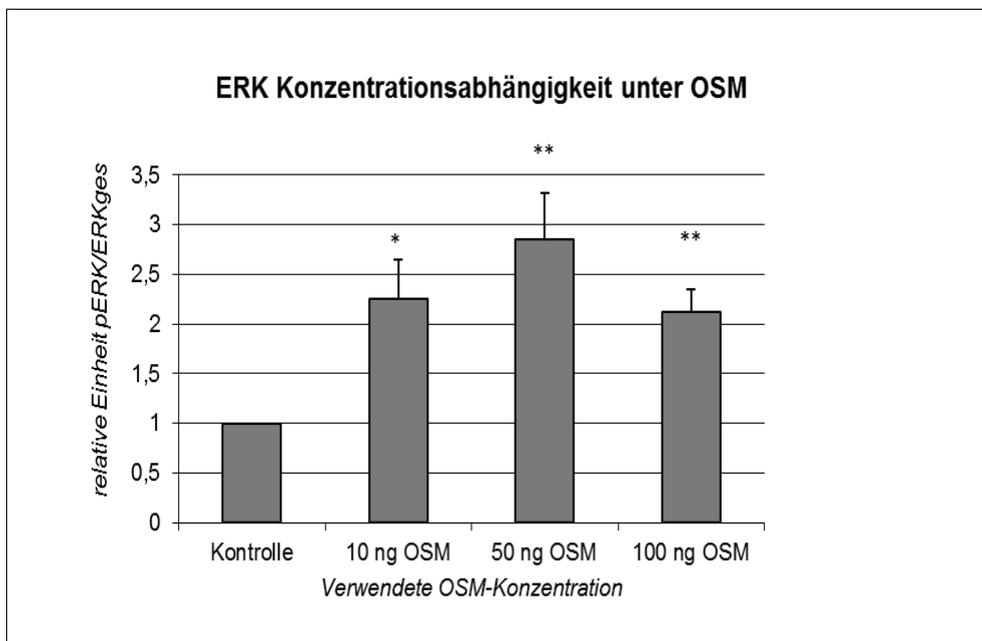
Für die folgenden Versuche wurde rekombinantes murines Oncostatin M (OSM) der Firma R&D verwendet.

Zuerst untersuchten wir den Einfluss von OSM-Stimulation auf die ERK-Signalkaskade im murinen Podozyten. Hierfür wurden murine Podozyten gemäß Protokoll kultiviert und vorbereitet.

Zunächst wurde die Konzentrationsabhängigkeit der ERK-Phosphorylierung durch OSM untersucht. Die Podozyten wurden mit OSM in einer Konzentration von 10 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml stimuliert und nach 15 Minuten geerntet. Anschließend wurden im Westernblot die Proteine aus den Ganzzellisolaten aufgetrennt und fixiert. Der Nachweis von Gesamt-ERK und Phospho-ERK ((Thr202/Tyr204)) per Immunoblot erfolgte mit spezifischen Antikörpern. Die Auswertung wurde per Densitometrie durchgeführt und das Verhältnis von Phospho-ERK zu Gesamt-ERK berechnet. Das Signifikanzniveau wurde mit dem Student's T-Test berechnet. Als signifikant gilt ein $p < 0,05$.

Es wurde gezeigt, dass im Verhältnis zur Negativkontrolle mit PBS die Stimulation mit 10 ng/ml OSM eine signifikante Steigerung der Phosphorylierung von ERK um den Faktor $2,25 \pm 0,39$ bewirkt ($p = 0,015$). Die Stimulation mit einer Konzentration von 50 ng/ml OSM kann eine durchschnittliche Aktivitätssteigerung um den Faktor $2,85 \pm 0,46$ erzielen ($p = 0,009$). Bei Verwendung einer Konzentration von 100 ng/ml kann die Aktivität um den Faktor $2,125 \pm 0,23$ gesteigert werden ($p = 0,006$). Dargestellt sind diese Daten in Abb. 2.

A:



B:

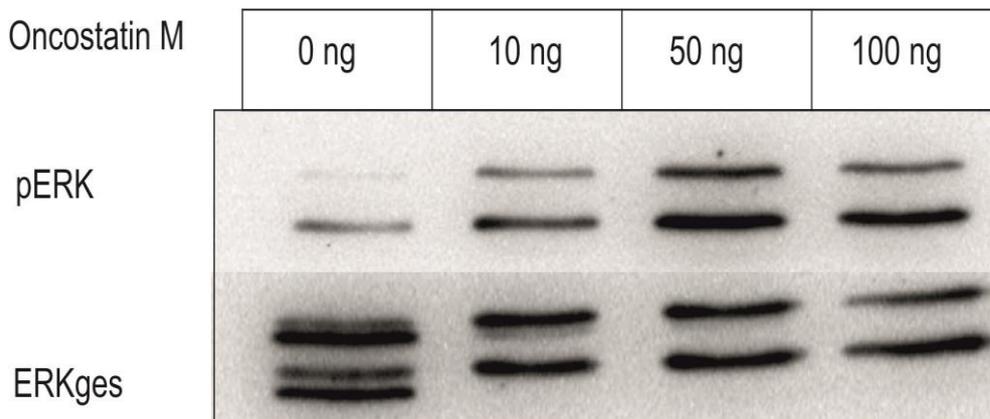
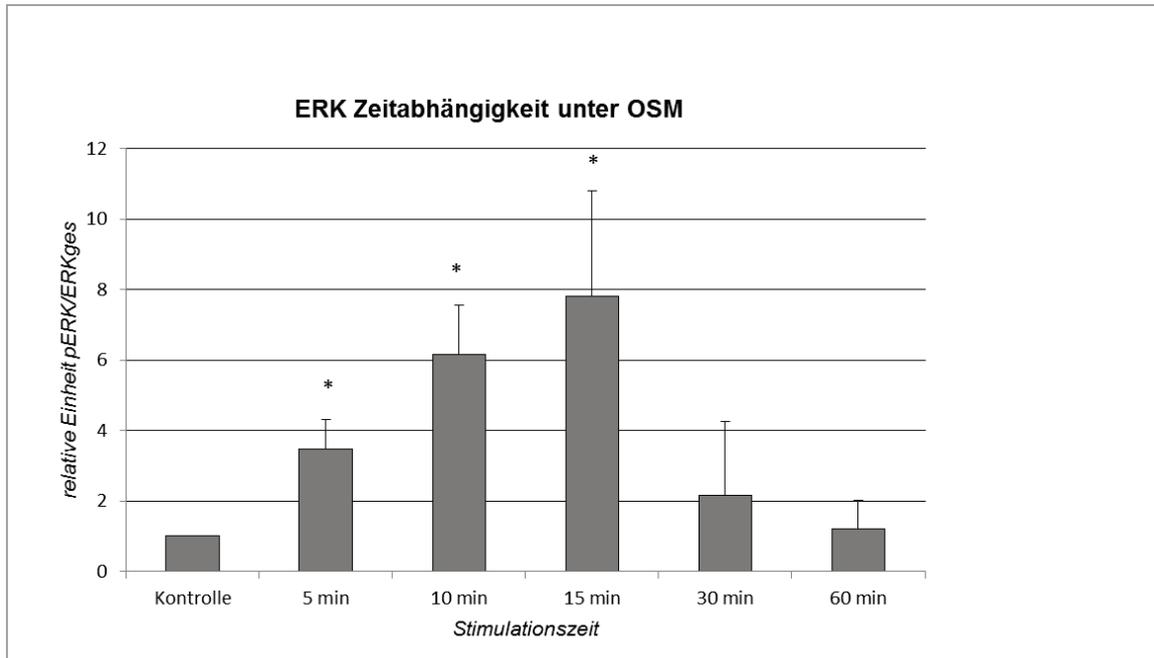


Abb. 2: Konzentrationskinetik der ERK-Phosphorylierung durch Stimulation mit OSM in murinen Podozyten. Die Zellen wurden für 15 min mit der angegebenen Konzentration von OSM stimuliert. A) Densitometrische Auswertung der Banden im Westernblot. Aufgetragen ist das Verhältnis Phospho-ERK / Gesamt-ERK (n= 3, *: p< 0,05, **: p<0,005 Statistische Auswertung mittels Student's T-Test). B) Repräsentativer Westernblot. Obere Reihe: Phospho-ERK (Thr202/Tyr204). Untere Reihe: Gesamt-ERK.

Anschließend wurde eine zeitabhängige Aktivitätssteigerung auf der ERK-Signalkaskade nachgewiesen (Abb. 3). Dafür wurde eine Konzentration von 50 ng/ml OSM verwendet, da sich hier die stärkste Aktivierung der ERK-Kinasen zeigte. Die Zellen wurden jeweils nach 5, 10, 15, 30 und 60 Minuten Stimulationszeit geerntet. Pro Sixwell-Platte wurde ein Well mit PBS stimuliert um eine entsprechende Negativkontrolle zu erhalten.

Wir stellten fest, dass im ERK-Signalweg nach 10 Minuten eine signifikante Steigerung des Phosphorylierungsniveaus um den Faktor $6,16 \pm 1,39$ vorliegt ($p= 0,02$). Bereits nach 5 Minuten kann eine Aktivitätssteigerung um den Faktor $3,47 \pm 0,85$ beobachtet werden, wobei im T-Test der p-Wert bei 0,03 liegt. Nach 15 Minuten Stimulationszeit kann eine signifikante Steigerung des Phosphorylierungsniveaus der ERK-Kinasen um den Faktor $8 \pm 2,99$ ($p=0,04$) gemessen werden. Nach 30 Minuten beträgt die Steigerung der ERK-Phosphorylierung den Faktor $2,16 \pm 2,08$ ($p=0,25$) um dann zwischen 30 und 60 Minuten wieder auf den Ausgangswert zu sinken.

A:



B:

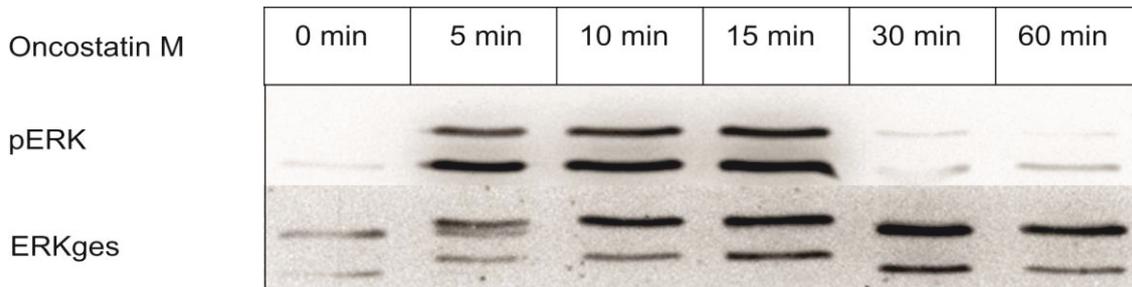


Abb. 3: Zeitkinetik der ERK-Phosphorylierung durch Stimulation mit OSM in murinen Podozyten. Die Zellen wurden mit 50 ng/ml für den angegebenen Zeitraum mit OSM stimuliert. A) Densitometrische Auswertung der Banden im Westernblot. Aufgetragen ist das Verhältnis Phospho-ERK / Gesamt-ERK. (n= 3, *: p< 0,05, Statistische Auswertung mittels Student's T-Test). B) Repräsentativer Westernblot. Obere Reihe: Phospho-ERK (Thr202/Tyr204). Untere Reihe: Gesamt-ERK.

Die konzentrationsabhängige Steigerung der Phosphorylierung von ERK-Kinasen im Podozyten nach OSM-Stimulation kann mit dem Inhibitor U0126 inhibiert werden (Abb. 4). U0126 ist ein chemisch synthetisiertes, organisches Protein, welches die ERK1/2-Kinasen hemmt, indem es die Aktivierung der vorgeschalteten MEK1/2-Kinasen inhibiert und so den gesamten Signalweg unterbricht. Dafür wurden die Podozyten in 3 von 6 Wells, nach dem sie für 12 h auf Hungermedium gesetzt waren, 60 Minuten vor der OSM-Stimulation mit U0126 (10 μ M) inkubiert. Danach erfolgte die oben beschriebene OSM Stimulation in einer Konzentration von 10 und 50 ng/ml, wobei wir zeigen konnten, dass die Steigerung der Phosphorylierung nach OSM-Stimulation um den Faktor 10 reduziert wird und dadurch komplett aufhebbar ist.

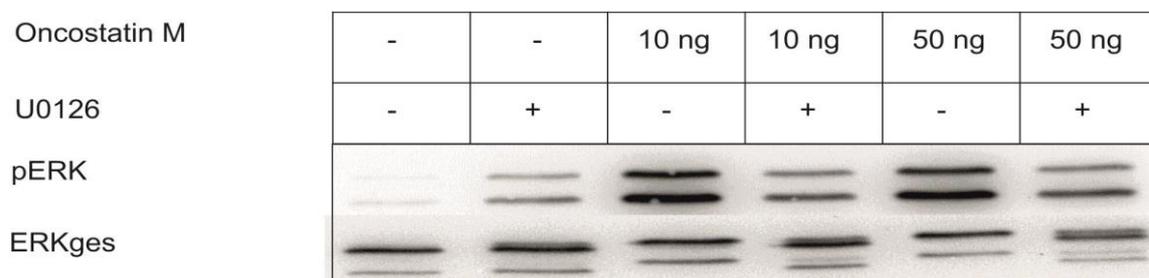


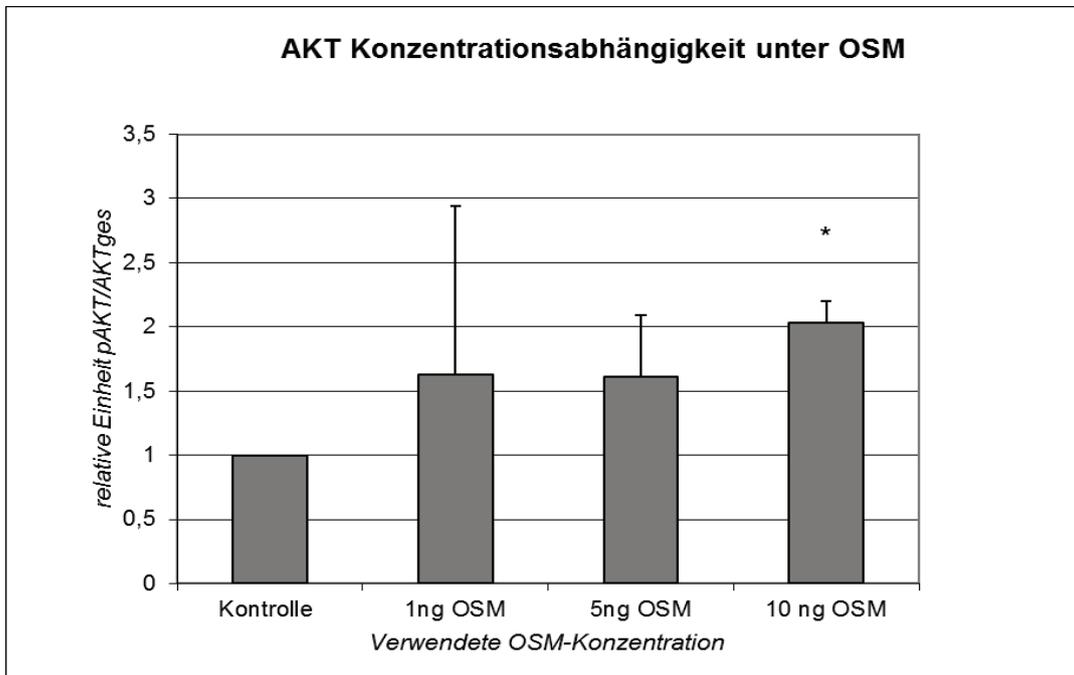
Abb. 4: Effekt von U0126 bei Koinkubation mit OSM auf die ERK-Phosphorylierung in murinen Podozyten: Stimulation mit OSM in einer Konzentration von 10 und 50 ng/ml, Zeitdauer von 30 min; U0126 in einer Konzentration von 200 μ M, repräsentativer Westernblot: Obere Reihe: Phospho-ERK (Thr202/Tyr204). Untere Reihe: Gesamt-ERK

4.2.2 AKT/PKB/PI3K-Signaltransduktion

Als nächstes Ziel wollten wir eine Steigerung des Phosphorylierungsniveaus nach OSM-Stimulation auf der AKT/PKB-Achse nachweisen (Abb. 5).

Zunächst untersuchten wir auf der AKT-Achse eine konzentrationsabhängige Steigerung des Phosphorylierungsniveaus. Aus hier nicht gezeigten Voruntersuchungen wissen wir, dass für die Aktivierung der AKT-Signalachse geringere Konzentrationen OSM notwendig sind. Dazu wurden die Podozyten für je 15 Minuten mit OSM in den Konzentrationen 1 ng/ml, 5 ng/ml und 10 ng/ml stimuliert. Hierbei zeigte sich, dass unter Verwendung von OSM in einer Konzentration von 1 ng/ml eine Steigerung der AKT-Phosphorylierung im Durchschnitt um den Faktor $1,62 \pm 1,31$ ($p= 0,25$) erzielt werden kann. Bei einer Konzentration von 5 ng/ml kann eine Steigerung um den Faktor $1,61 \pm 0,48$ ($p= 0,08$) gemessen werden, mit 10 ng eine signifikante Steigerung um den Faktor $2,03 \pm 0,17$ ($p= 0,004$). Unter Verwendung des OSM in einer Konzentration von 50 ng/ml konnte der Phosphorylierungsgrad von AKT um den Faktor $2,65 \pm 0,99$ ($p= 0,02$) gesteigert werden.

A:



B:

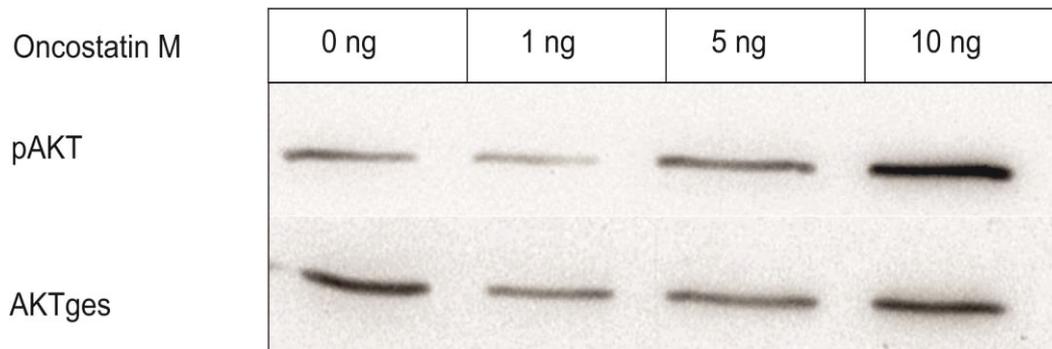
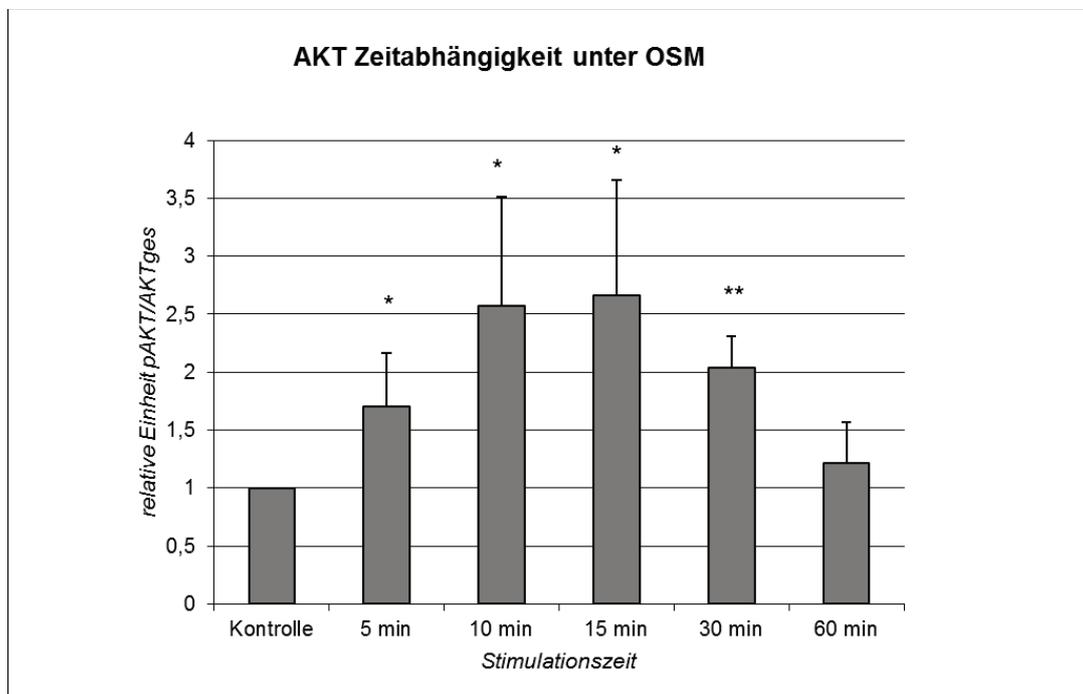


Abb. 5: Konzentrationskinetik der Abhängigkeit der AKT-Phosphorylierung nach OSM-Stimulation von murinen Podozyten. Die Zellen wurden mit oben genannten Konzentrationen für einen Zeitraum von 15 Minuten stimuliert. A) Densitometrische Auswertung der Banden im Westernblot. Aufgetragen ist das Verhältnis Phospho-AKT / Gesamt-AKT (n= 3, *: p< 0,05, Statistische Auswertung mittels Student's T-Tes). B) Repräsentativer Westernblot. Obere Reihe: Phospho-AKT (Ser473). Untere Reihe: Gesamt-AKT.

Anschließend wurden die Podozyten mit je 50 ng/ml OSM für 5', 10', 15', 30'- und 60 Minuten stimuliert und geerntet. Hierbei konnte gezeigt werden (Abb. 6), dass bereits nach 5 Minuten das Phosphorylierungsniveau um den Faktor $1,7 \pm 0,47$ steigt ($p= 0,03$). Nach 10 Minuten ist es im Durchschnitt um den Faktor $2,57 \pm 0,93$ gestiegen ($p= 0,02$), nach 15 Minuten um den Faktor $2,65 \pm 0,99$ ($p= 0,02$) im Vergleich zum Ausgangswert. Nach 30 Minuten ist die Phosphorylierung des AKT immer noch verdoppelt ($p= 0,002$). Nach 60 Minuten nähert sich die Aktivität wieder dem Ausgangswert bei $1,21 \pm 0,35$ facher Erhöhung ($p= 0,16$).

A:



B:

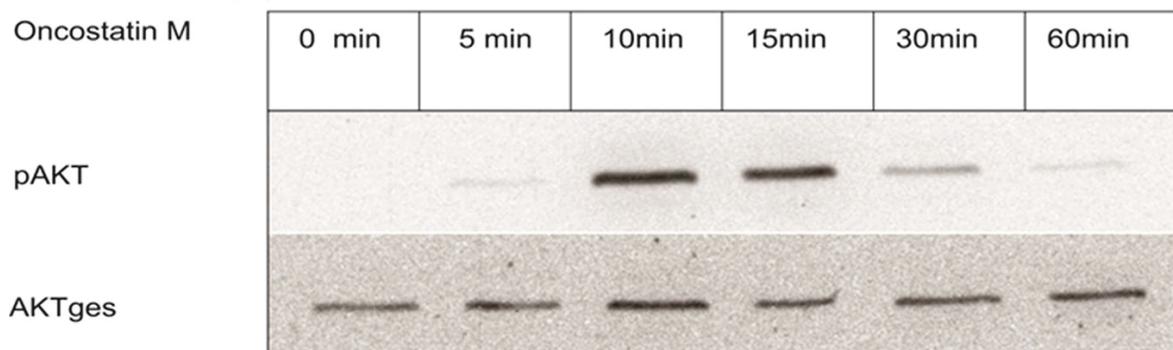


Abb. 6: Zeitabhängigkeit der AKT-Phosphorylierung nach OSM-Stimulation von murinen Podozyten. Die Zellen wurden mit OSM in einer Konzentration von 50 ng/ml für die oben beschriebenen Zeiträume stimuliert. A) Densitometrische Auswertung der Banden im Westernblot. Aufgetragen ist das Verhältnis Phospho-AKT / Gesamt-AKT (n= 4, *: p< 0,05, **: p< 0,005 Statistische Auswertung mittels Student's T-Test). B) repräsentativer Westernblot, obere Reihe: Phospho-AKT Antikörper (Ser473); untere Reihe: Gesamt-AKT-Antikörper.

Dieser Effekt kann unter Koinkubation mit dem PI3-Kinase-Inhibitor Ly294002 selektiv gehemmt werden (Abb. 7). Die PI3-Kinase befindet sich im AKT-Pathway upstream von AKT. Dazu wurde wie oben bereits für U0126 beschrieben, 60 Minuten vor OSM-Stimulation der Inhibitor Ly294002 (25mM) bei 37 °C in 3 von 6 Wells zugegeben und im Anschluss OSM mit einer Konzentration von 10 und 50 ng/ml zu den Podozyten gegeben. Dabei konnte gezeigt werden, dass die AKT-Aktivität unter Koinkubation von 10 ng/ml OSM und Ly294002 im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit 10 ng OSM eine Aktivitätsreduktion um ca. 30 % zu erzielen ist. Bei Verwendung von 50 ng/ml OSM kann dieser Effekt allerdings wieder aufgehoben werden und es zeigt sich hier keine wesentliche Reduktion der AKT-Phosphorylierung.

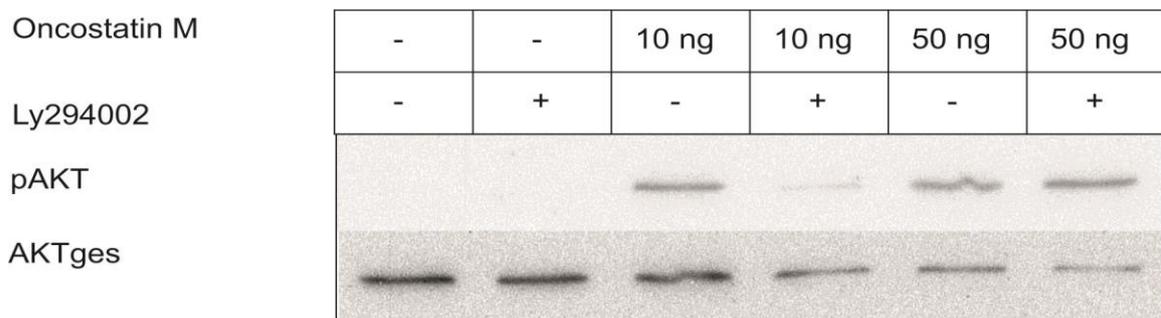


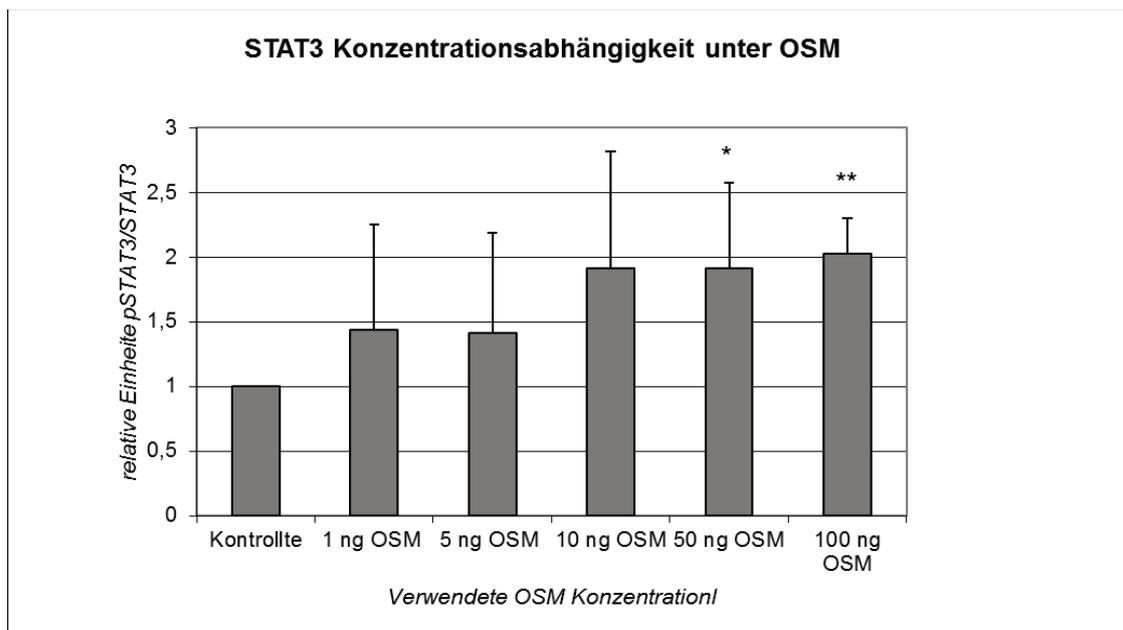
Abb. 7: Effekt von Ly294002 bei Koinkubation mit OSM auf die AKT-Phosphorylierung in murinen Podozyten: Stimulation mit OSM in einer Konzentration von 10 und 50 ng, Zeitdauer von 30 min, Ly294002 in einer Konzentration von 25 mM,, repräsentativer Westernblot: Obere Reihe: Phospho-AKT (Thr 308), untere Reihe: Gesamt-AKT.

4.2.3 STAT3-Signaltransduktion

In diesem Abschnitt untersuchten wir, welchen Einflusses OSM auf die podozytäre STAT3-Signaltransduktion hat. Dafür wurden die Podozyten nach oben beschriebener Art behandelt und anschließend mit OSM stimuliert.

Die Konzentrationsabhängigkeit des STAT3-Phosphorylierungsniveaus wird hierzu geprüft. Hierfür wurden die immortalisierten murinen Podozyten für je 15 Minuten mit OSM in Konzentrationen von 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml stimuliert (Abb. 8). Dabei zeigte sich eine nicht signifikante Phosphorylierungssteigerung des STAT3 unter 1 und 5 ng/ml OSM jeweils um den Faktor $1,43 \pm 0,82$ ($p = 0,18$) für 1 ng und um den Faktor $1,41 \pm 0,78$ ($p = 0,18$) für 5 ng. Unter Verwendung von 10 ng/ml OSM kann die STAT3-Phosphorylierung verdoppelt werden ($p = 0,15$). Unter Verwendung von 50 ng/ml OSM als auch unter 100ng OSM kann eine signifikante Steigerung des Phosphorylierungslevels des STAT3 jeweils um den Faktor $1,91 \pm 0,66$ ($p = 0,03$) für 50 und um den Faktor $2,03 \pm 0,27$ ($p = 0,002$) für 100 ng/ml OSM gezeigt werden.

A:



B:

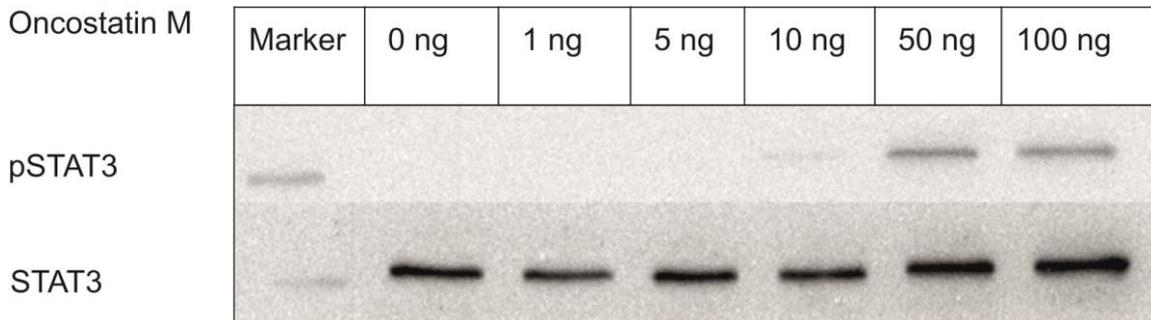
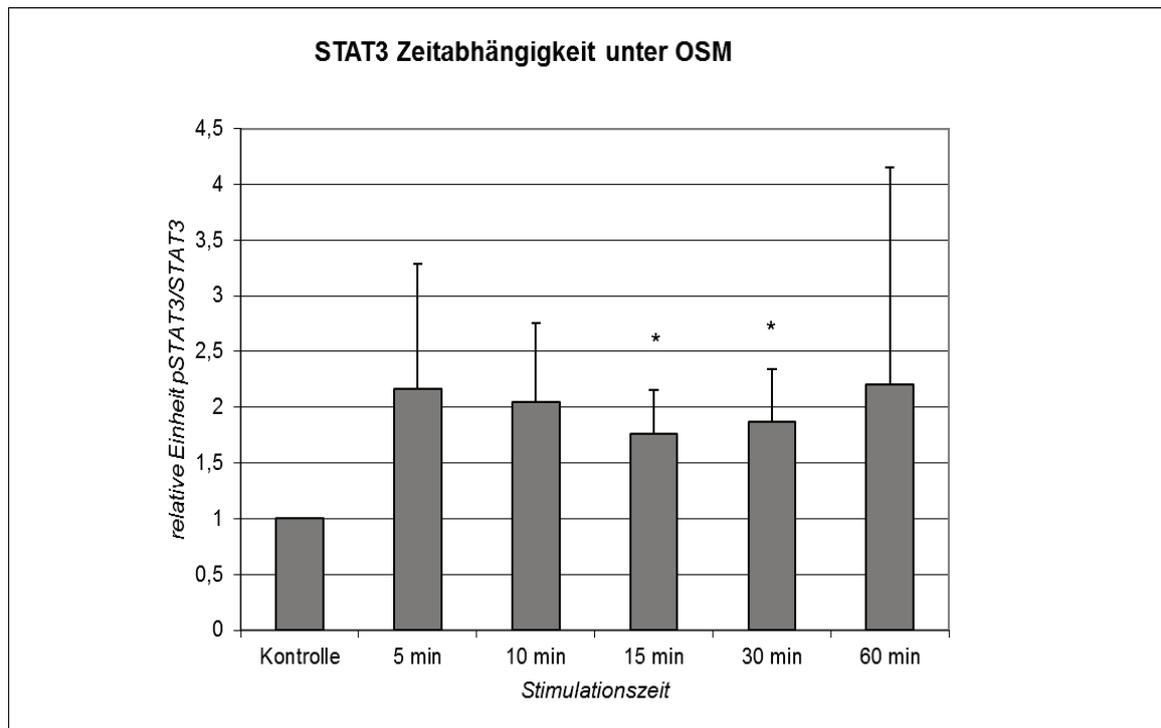


Abb. 8: Konzentrationskinetik der Abhängigkeit der STAT3-Phosphorylierung nach OSM-Stimulation von murinen Podozyten. Die Zellen wurden mit oben angegebenen Konzentrationen über einen Zeitraum von 15 Minuten stimuliert. A) Densitometrische Auswertung der Banden im Westernblot. Aufgetragen ist das Verhältnis Phospho-STAT3 / Gesamt-STAT3 (n= 4, *: p< 0,05, **: p< 0,005, statistische Auswertung mittels Student's T-Test). B) repräsentativer Westernblot, obere Reihe: Phospho-STAT3-Antikörper (Tyr705); untere Reihe: Gesamt-STAT3-Antikörper.

Anschließend wurde der zeitabhängige Zusammenhang zwischen der OSM-Stimulation und der Intensität der STAT3-Phosphorylierung untersucht (Abb. 9).

Hierfür wurden die immortalisierten murinen Podozyten mit je 50 ng/ml OSM stimuliert und anschließend nach 5', 10', 15', 30' und 60 Minuten geerntet. Dabei zeigt sich, dass bereits nach 5 Minuten das STAT3-Phosphorylierungsniveau um den Faktor $2,16 \pm 1,12$ gesteigert ist (p= 0,17). Nach 10 Minuten ist eine Steigerung der Phosphorylierung um den Faktor $2,05 \pm 0,70$ (p= 0,06) zu messen. Nach 15 Minuten kann eine signifikante Steigerung des Phosphorylierungslevels um den Faktor $1,76 \pm 0,39$ (p= 0,03), nach 30 Minuten um den Faktor $1,86 \pm 0,47$ (p= 0,04) gemessen werden. Nach 60 Minuten Stimulationszeit sinkt das STAT3-Phosphorylierungsniveau wieder auf Ausgangsniveau zurück. In der statistischen Analyse zeigt sich bei einem der 4 Versuche ein Ausreißer nach oben, weshalb die grafische Darstellung dies nicht sehen lässt.

A:



B:

Oncostatin M

pSTAT3

STAT3

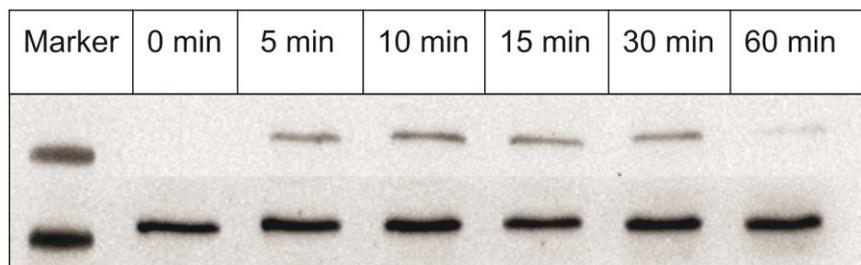


Abb. 9: Zeitabhängigkeit der STAT3-Phosphorylierung nach OSM-Stimulation von murinen Podozyten. Die Zellen wurden mit einer Konzentration von 50 ng/ml für die angegebenen Zeiträume stimuliert. A) Densitometrische Auswertung der Banden im Westernblot. Aufgetragen ist das Verhältnis Phospho-STAT3 / Gesamt-STAT3 (n= 4, *= p< 0,05, statistische Auswertung mittels Student's T-Test). B) repräsentativer Westernblot, obere Reihe: Phospho-STAT3 Antikörper (Tyr705); untere Reihe: Gesamt-STAT3-Antikörper.

Dieser Effekt konnte unter Verwendung eines spezifischen JAK2-Inhibitors gehemmt werden (Abb. 10). JAK2 ist die vorgeschaltete Kinase, die STAT3 phosphoryliert.

Hierfür wurden in 3 von 6 Wells Podozyten 60 Minuten vor Stimulation mit OSM mit AG490 (10 mM) inkubiert. Anschließend wurde den Zellen OSM in einer Konzentration von 10 und 50 ng/ml zugeführt und nach 15 Minuten geerntet. Dabei konnte gezeigt werden, dass die unter alleiniger OSM-Stimulation erreichte Steigerung der STAT3-Phosphorylierung unter Koinkubation mit AG490 komplett aufhebbar ist.

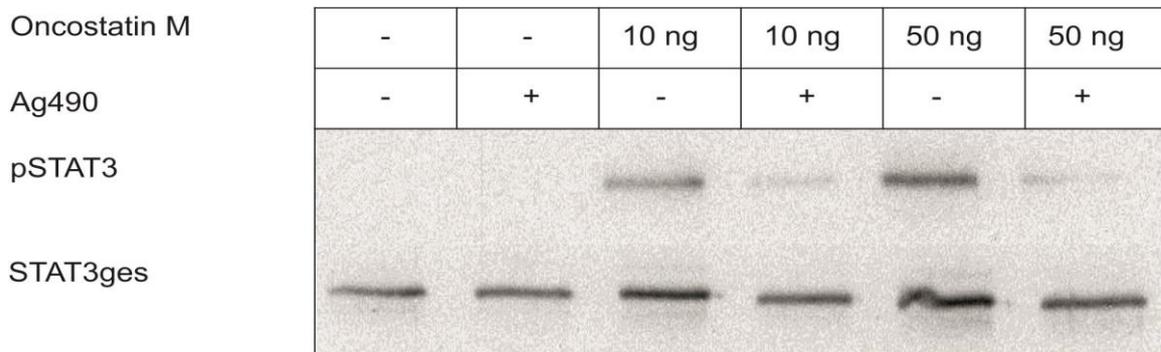


Abb. 10: Effekt von AG490 bei Koinkubation mit OSM auf die STAT3-Phosphorylierung in murinen Podozyten: Stimulation mit OSM in einer Konzentration von 10 ng und 50 ng, Zeitdauer von 30 min, AG490 in einer Konzentration von 200 μ M, repräsentativer Westernblot: Obere Reihe: Phospho-STAT3 (Tyr 705), untere Reihe: Gesamt-STAT3.

4.3. Oncostatin M induzierte Änderung der Genexpression im murinen Podozyten

Im nächsten Schritt untersuchten wir den Einfluss von OSM auf die Expression verschiedener Effektorgene auf Ebene der mRNA. Hierfür wurde, wie oben beschrieben, RNA aus den immortalisierten murinen Podozyten isoliert und in cDNA umgeschrieben.

Mit Hilfe der konventionellen PCR und semiquantitativen Messmethoden wurde untersucht, ob und welche Veränderungen in der Expression bestimmter Gene vorliegen.

Für detaillierte Angaben zu den verwendeten Primer siehe Tab. 6.

4.3.1 OSMR-Expression im Podozyten

Der erste Schritt war der Nachweis der Expression des OSM-Rezeptorkomplexes im Podozyten auf mRNA-Ebene (Abb. 11).

Hierzu zählen zum einen der OSMR und das gp130-Protein. Ebenso kann OSM auch an einen Heterodimer bestehend aus gp130 und LIFR binden, so dass auch die Expression von LIFR untersucht wurde.

Hierfür wurden die immortalisierten murinen Podozyten in analoger Weise mit OSM in einer Konzentration von 50 ng/ml stimuliert und nach 2h, 4h, 8h, 12h, und 24h Stimulationszeit geerntet. Ebenso wurde eine Negativkontrolle mit PBS stimuliert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die mRNA sowohl des OSMR, des LIFR als auch des gp130-Proteins in immortalisierten murinen Podozyten expremiert werden. Dabei ist zu vermerken, dass die Expression aller drei Rezeptorbestandteile unabhängig von der verwendeten OSM-Konzentration im Podozyten zu beobachten ist.

Hingegen nimmt der Zeitraum der OSM-Stimulation einen Einfluss auf die Expression. Es zeigt sich eine signifikante Reduktion der gp-130- Expression nach 8 h Stimulation mit OSM um den Faktor $0,81 \pm 0,025$ ($p = 0,003$).

Die Expression des OSMR ist nach 2 h OSM-Stimulation um den Faktor $1,46 \pm 0,38$ ($p= 0,08$) erhöht. Die Expression von LIFR zeigte einen Peak nach 4 h OSM-Stimulation mit einer mittleren Zunahme um den Faktor $1,99 \pm 1,65$ ($p= 0,20$).

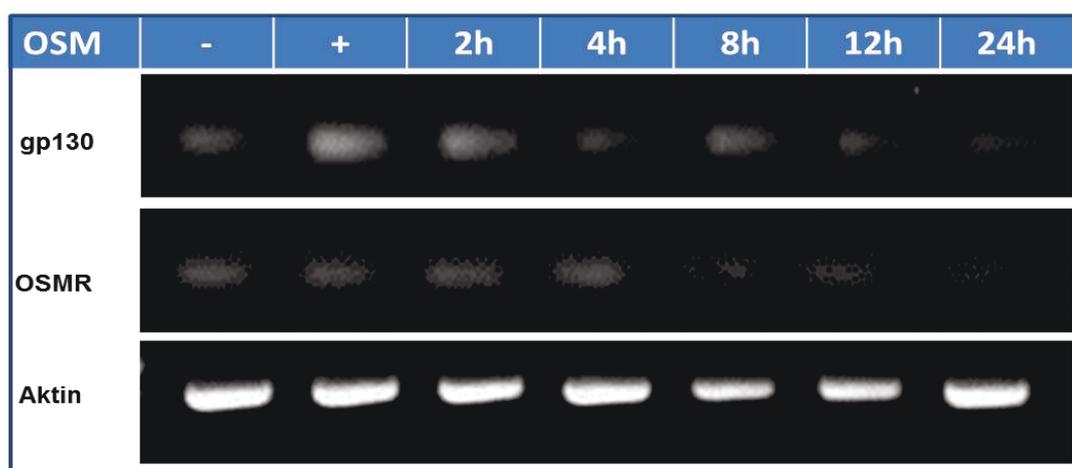


Abb. 11: Expression der mRNA der OSM-Rezeptor-Bestandteile im murinen Podozyten. Stimulation in einer Konzentration von 50 ng/ml über einen Zeitraum von 2h, 4h, 8h, 12h, und 24h. Aufgetragen sind die

Banden nach konventioneller PCR, links Zeitpunkt 0 (-), rechts daneben Positivkontrolle (lysierte Mäusenieren), nach rechts dann aufsteigende Stimulationszeiten.

4.3.2 SOCS3-Expression im Podozyten

Im Sinne eines negativen Feedbackmechanismus gibt es in anderen Zellen die Möglichkeit über die Hochregulation von Proteinen der Supressor-of-Cytokine-Signaling-Familie (SOCS) die Antwort auf eine Zytokinstimulation wieder zu hemmen. Hierbei führt z.B. SOCS3 zur Dephosphorylierung der vorgeschalteten Kinase JAK, welche in seiner aktiven Form rezeptorassoziiert ist. Hierfür sollte die mRNA des SOCS3 im Podozyten untersucht werden (Fig. 12). Dafür wurden die Podozyten nach 12 h Hungermedium mit OSM in einer Konzentration von 50 ng/ml stimuliert und dann nach 2h, 4h, 8h und 24h geerntet. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Expression der SOCS3-mRNA nach 2h Stimulationszeit hochsignifikant um den Faktor $1,99 \pm 0,35$ ($p= 0,002$) erhöht ist. Ebenso zeigte sich nach 4h Stimulationszeit eine durchschnittliche Expressionsverstärkung um den Faktor $2,01 \pm 0,73$ ($p= 0,02$). Nach 8 bzw. 24 h zeigt sich eine signifikante Erhöhung der Expression, jeweils um den Faktor $1,96 \pm 0,69$ nach 8 h ($p= 0,02$) und um den Faktor $1,85 \pm 0,6$ nach 24 h ($p= 0,02$). Ähnliche Beobachtungen konnten auch über einen längeren Stimulationszeitraum hinaus gemacht werden, sodass nach 72h OSM-Stimulation eine um den Faktor 2,07 erhöhte SOCS3-Expression vorlag (Daten nicht gezeigt).

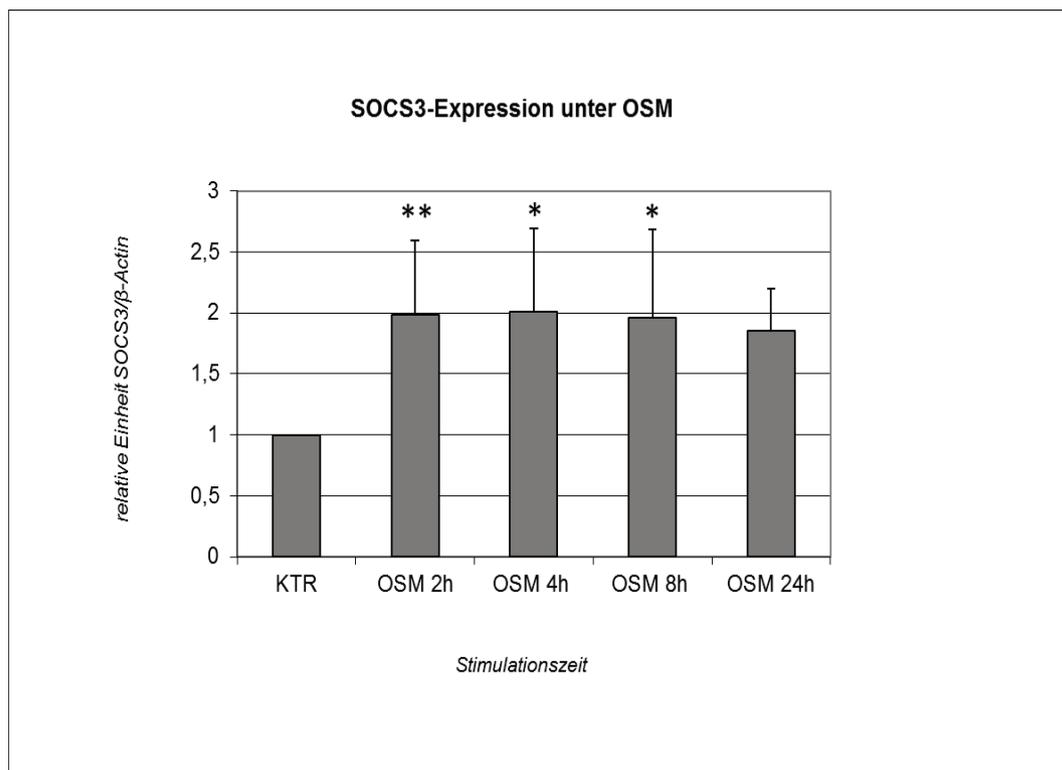


Abb. 12: Zeitabhängigkeit der SOCS3-Expression nach OSM-Stimulation in murinen Podozyten. Die Zellen wurden mit OSM in einer Konzentration von 50 ng/ml für die angegebenen Zeiträume stimuliert. Konventionelle PCR, densitometrische Auswertung der Banden der PCR. Aufgetragen ist das Verhältnis von SOCS3 zu β -Actin (n=5, *: p< 0,05, **:p< 0,005, statistische Auswertung mittels Student's T-Test).

4.3.3 Expression epithelialer und mesenchymaler Marker im Podozyten

Die Epithelial-zu-Mesenchymale Transition beschreibt einen Vorgang von Epithelzellen, die im Rahmen einer Schädigung, einer Entzündung oder eines Reparatursprozesses abläuft.

Hierbei kommt es zur Entdifferenzierung epithelialer Zellen und zur Ausdifferenzierung hin zu einem mesenchymalen Geno- und Phänotyp. Dadurch erlangt die ehemalige Epithelzelle Fähigkeiten ähnlich der von Mesenchymzellen. Dazu gehört die Fähigkeit zur Migration oder zur Synthese von extrazellulärer Matrix.

So wurden zeitabhängige Stimulationen immortalisierter muriner Podozyten mit OSM durchgeführt, um die mögliche Expressionsänderung zum Einen in epithelialen und zum Anderen in mesenchymalen Marker-Genen zu erfassen. Als mesenchymale Marker wurden Collagen-I, Desmin und Fibronectin 1 verwendet. Als epitheliale Marker dienten Cadherin 3, ZO-1 und als podozytenspezifische Marker Nephrin und Podocin. Darüber hinaus wurden eventuelle Expressionsveränderungen in Genen wie z.B. SNAIL untersucht, welches ein zentrales Regulatorgen im Prozess der Epithelial-zu-Mesenchymalen Transition darstellt. Weiterhin wurden die Expressionen der Transkriptionsfaktoren wie TBX3 oder KLF4 untersucht.

Als Kontrolle wurden GAPDH oder das β -Actin verwendet, deren Expression sich durch Stimulation mit OSM nicht verändert.

Auch hierfür wurden die Podozyten mit 50 ng/ml OSM stimuliert und dann für 2h, 4h, 8h und 24 h inkubiert und anschließend geerntet. Als Kontrolle wurden mit PBS stimulierte Podozyten mitgeführt. In der anschließenden Gel-Elektrophorese wurde als Positivkontrolle ein cDNA-Isolat aus murinen Nieren verwendet, als Negativkontrolle diente RNA freies Wasser.

4.3.3.1 SNAIL

Es konnte gezeigt werden, dass sich die Expression von SNAIL im Podozyten nach OSM-Stimulation signifikant erhöht (Abb. 13). Nach 2 h OSM-Einwirkung ist die SNAIL-Expression im Mittel um den Faktor $1,61 \pm 0,64$ (p= 0,022) erhöht, nach 4 h um den Faktor $2,36 \pm 1,44$ (p= 0,02). Nach 8 h OSM-Einwirkzeit ist das Expressionsniveau auf das 1,83fache $\pm 1,39$ (p= 0,083) erhöht, nach 24 h auf das 1,29fache $\pm 0,44$ (p= 0,06).

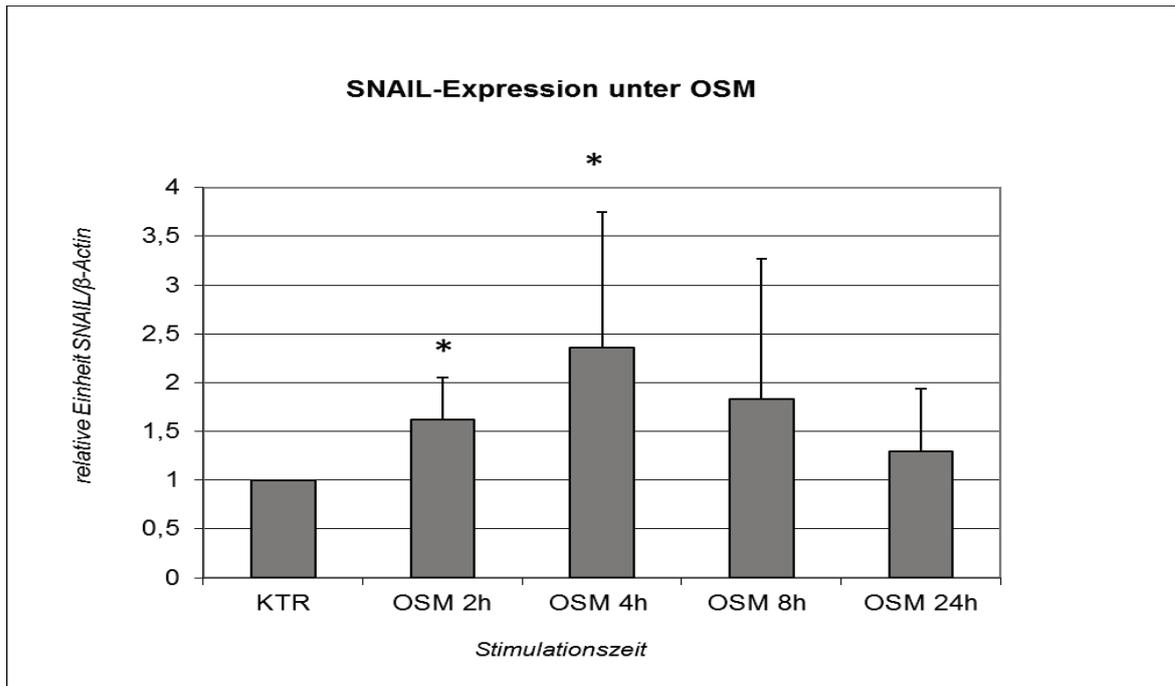


Abb. 13: Zeitabhängigkeit der SNAIL-Expression nach OSM-Stimulation in murinen Podozyten, konventionelle PCR. Die Zellen wurden mit OSM in einer Konzentration von 50 ng/ml für die angegebenen Zeiträume stimuliert, densitometrische Auswertung der Banden der PCR. Aufgetragen ist das Verhältnis von SNAIL zu β -Actin ($n=7$, *: $p < 0,05$, statistische Auswertung mittels Student's T-Test).

4.3.3.2 Mesenchymale Marker

Weiterhin zeigte sich, dass die Expression von Collagen-I nach 4 h OSM-Stimulation im Mittel um den Faktor $1,6 \pm 1,4$ ($p = 0,26$) gesteigert war. Dieser Umstand ist in Abb. 14 dargestellt.

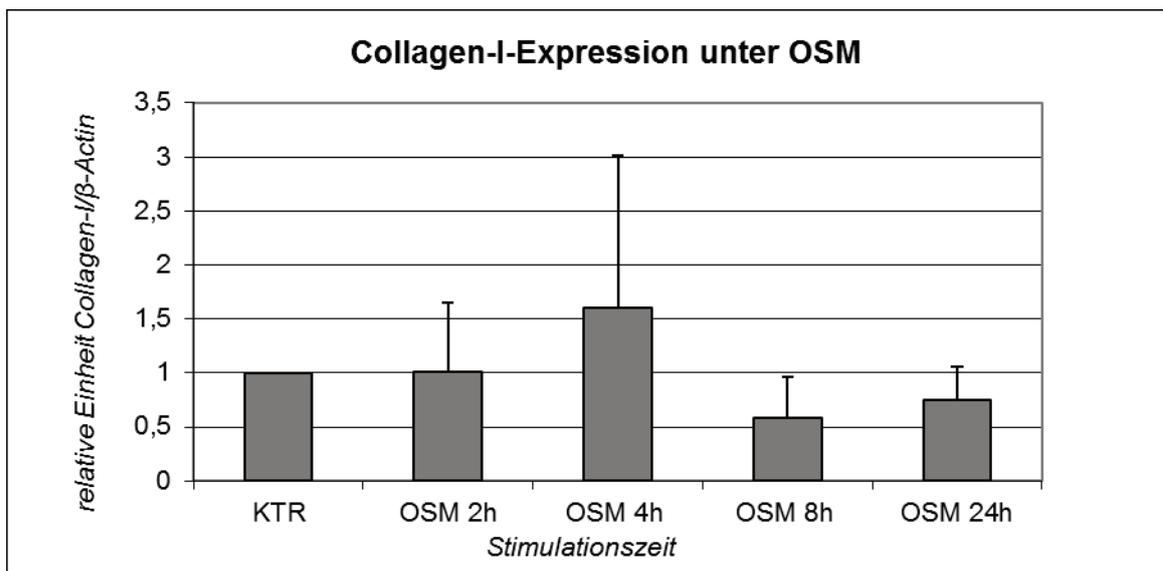


Abb. 14: Zeitabhängigkeit der Collagen-I-Expression nach OSM-Stimulation in murinen Podozyten, konventionelle PCR. Die Zellen wurden mit OSM in einer Konzentration von 50 ng/ml für die angegebenen Zeiträume stimuliert, densitometrische Auswertung der Banden der PCR. Aufgetragen ist das Verhältnis von Collagen I zu β -Actin (n=3, statistische Auswertung mittels Student's T-Test).

Nach OSM-Stimulation des Podozyten zeigte sich außerdem, dass sich die Expression des Fibronectin 1 nach 2 h und 4 h verdoppelt. Dabei ist nach 2 h eine Erhöhung des Fibronectin-Expressionsniveaus um den Faktor $2,21 \pm 2,78$ ($p= 0,22$) und nach 4 h um den Faktor $2,405 \pm 3,06$ ($p= 0,21$) zu beobachten (Abb. 15). Beides war statistisch nicht signifikant.

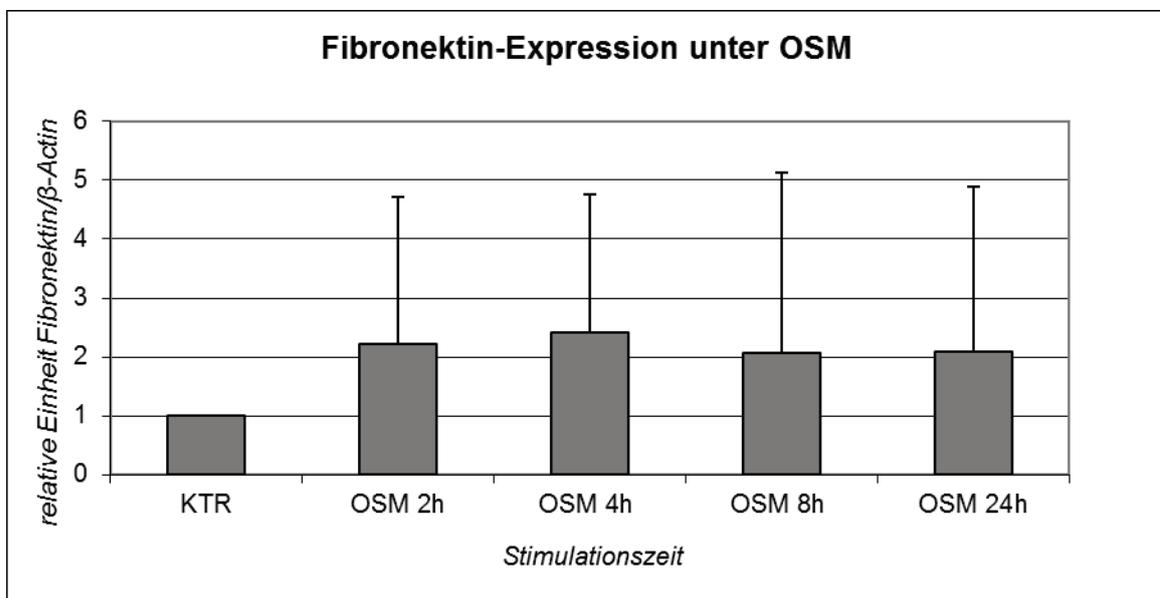


Abb. 15: Zeitabhängigkeit der Fibronectin-Expression nach OSM-Stimulation in murinen Podozyten, konventionelle PCR. Die Zellen wurden mit OSM in einer Konzentration von 50 ng/ml für die angegebenen Zeiträume stimuliert, densitometrische Auswertung der Banden der PCR. Aufgetragen ist das Verhältnis von Fibronectin zu β -Actin (n=3, statistische Auswertung mittels Student's T-Test).

4.3.3.3 Epitheliale Marker

Für den epithelialen Marker Cadherin-3 konnte gezeigt werden, dass dessen Expression nach OSM-Stimulation im Podozyten abfällt, so dass im Mittel nach 24h OSM die Cadherin3-Expression um den Faktor $0,77 \pm 0,14$ ($p= 0,05$) gesunken ist (Abb. 16).

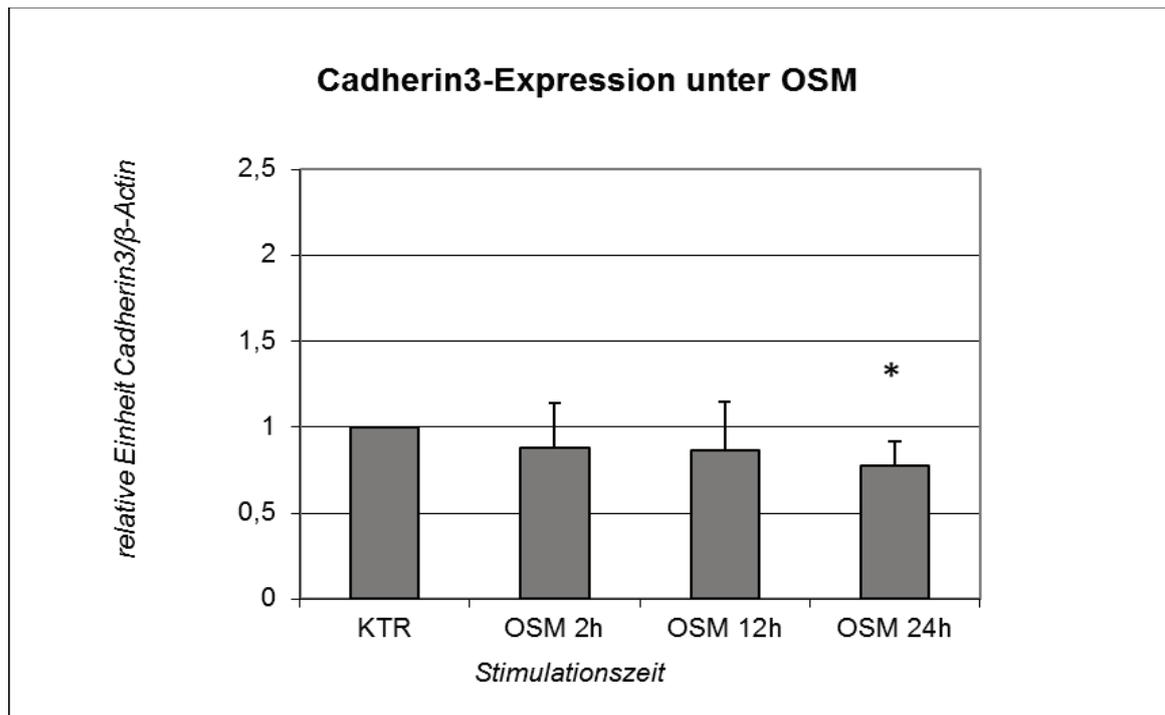


Abb. 16: Zeitabhängigkeit der Cadherin3-Expression in murinen Podozyten nach OSM-Stimulation in einer Konzentration von 50 ng/ml für die oben beschriebenen Zeiträume, Densitometrische Auswertung der Banden der PCR. Aufgetragen ist das Verhältnis von Cadherin3 und β -Actin (n=7, *: p< 0,05, statistische Auswertung mittels Student's T-Test).

4.4 Durchführung von Wound-Scratch-Assays im Podozyten-Zellkulturmodell

In der Literatur gibt es viele Hinweise dafür, dass unter OSM-Stimulation Zellen verschiedener Gewebe zu gesteigerter Proliferation und Migration angeregt werden. Diese Tatsache sollte nun ebenso für Podozyten untersucht werden. Um die Bedeutung der OSM-Signaltransduktion zu untermauern, wurden eine Reihe von Migrationsassays im Sinne klassischer Wound-Scratch-Assays durchgeführt. Wie oben beschrieben wurden die Podozyten in Rasterschälchen mit zwei ml Vollmedium ausdifferenziert. Ab Tag 12 nach Aussaat konnte dann mit den Experimenten begonnen werden.

Aufgrund der generell aktiveren und somit leichter zu beobachtbaren Migration humaner Podozyten werden in den folgenden Versuchen humane Podozyten verwendet.

4.4.1 Das Migrationsverhalten humaner Podozyten unter OSM

Für die Untersuchung des Migrationsverhaltens immortalisierter humaner Podozyten unter Stimulation mit OSM, wurden Experimente mit dem gleichen Ansatz wie im Methodenteil beschrieben, durchgeführt. Anstelle des murinen OSM wurde humanes rekombinantes OSM zur Stimulation verwendet.

Es zeigte sich, dass humane Podozyten mit PBS-Stimulation nach 8 h eine Reduktion der anfänglichen Wundfläche um $4,75\% \pm 17\%$ ($p = 0,31$) und nach 24 h um $54,7\% \pm 6\%$ ($p = 0,0003$) aufweisen. Im Vergleich dazu konnten dieselben Zellen in Anwesenheit von 50 ng/ml OSM nach 8 h Einwirkzeit ihre Wundfläche um $40,75\% \pm 16\%$ ($p = 0,012$), nach 24 h um $88,1\% \pm 7\%$ ($p = 0,0001$) im Vergleich zum Ausgangswert verringern.

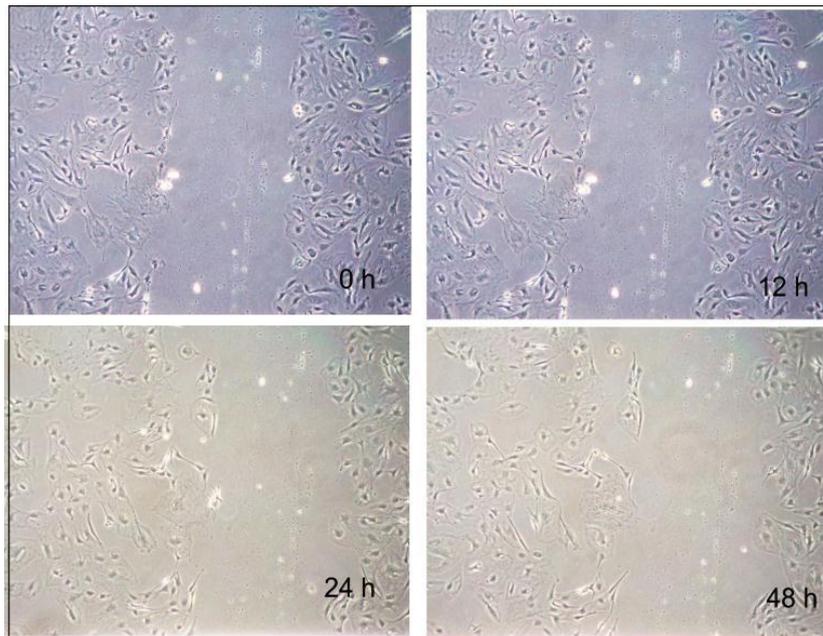
Im Vergleich zur PBS-Kontrolle bedeutet dies eine Verstärkung der Reduktion der Wundfläche nach 8 h um 36% ($p = 0,032$) und nach 24 h um 33% ($p = 0,0025$). Beispielhaft wird dies in Abb. 17 gezeigt.

Um die Konzentrationsabhängigkeit dieses Effektes zu untersuchen, führten wir den selben Versuch mit OSM in Konzentration von 50 und 100 ng/ml durch, beobachteten die Zellen nach 12h, 24h und 36h und verglichen die Werte mit den PBS-stimulierten Negativkontrollen. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich die Wundfläche nach 12h unter Stimulation mit 50 ng/ml OSM im Mittel um $82\% \pm 6\%$ ($p = 0,00096$), nach 24h um $82,6\% \pm 7\%$ ($p = 0,0013$) und nach 36h um $90,3\% \pm 2\%$ ($p = 0,0001$) im Vergleich zum Ausgangswert reduziert hatte. Das bedeutet im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Zunahme der Wundflächenreduktion um 25,6% ($p = 0,02$) nach 12h, um 18,2% ($p = 0,014$) nach 24 h und um 44,3% ($p = 0,057$) nach 36h.

Unter Verwendung von 100 ng/ml OSM kann hingegen nach 12 h Einwirkzeit im Mittel eine Wundflächenreduktion um $7,75\% \pm 8\%$ ($p = 0,0018$), nach 24h um $84,8\% \pm 5\%$ ($p = 0,0006$) und nach 36 h um $90,4\% \pm 4\%$ ($p = 0,0004$) im Vergleich zum Ausgangswert gemessen werden. Das wiederum bedeutet im Mittel eine Zunahme der Wundflächenreduktion um 19,27% ($p = 0,032$) nach 12 h, um 20,44% ($p = 0,018$) nach 24h und um 44,4% ($p = 0,057$) nach 36h im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Wenn man die Effekte der Stimulation mit 50 und 100 ng/ml OSM miteinander vergleicht, so zeigt sich, dass die Wundflächenreduktion nach 12h bei Verwendung von 50 ng/ml OSM um 6,3% stärker ausfällt ($p = 0,073$) als bei Stimulation mit 100 ng/ml. Nach 24 h zeigte sich eine um 2,3% stärkere Reduktion der Wundfläche ($p = 0,12$) unter Verwendung von 100 ng/ml OSM. Nach 36 h wiederum zeigt sich eine 2,1% stärkere Wundflächenreduktion bei der 50 ng/ml Gruppe ($p = 0,494$). Somit ließ sich kein signifikanter Effekt durch Dosissteigerung erzielen.

A:



B:

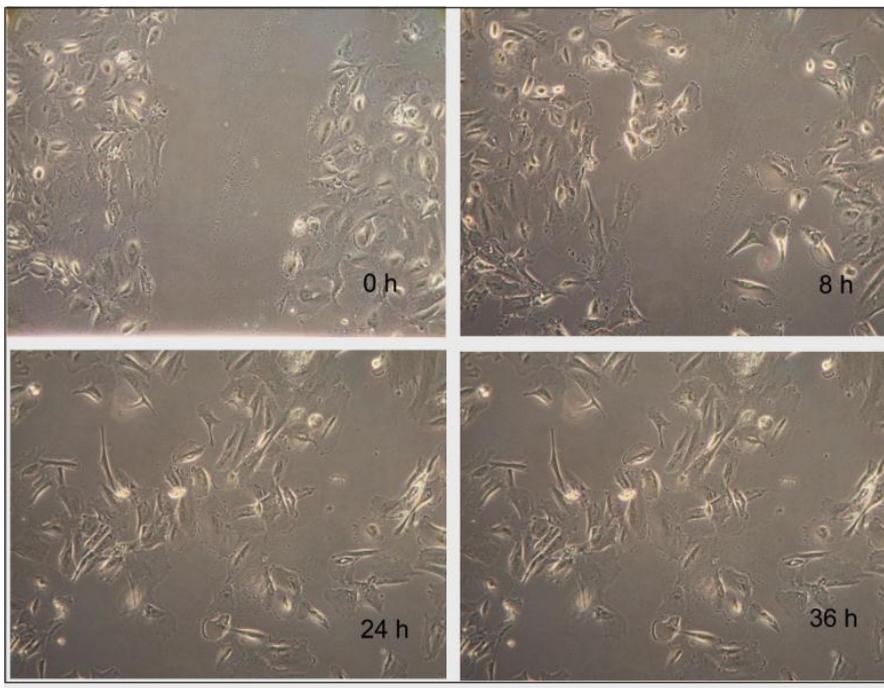


Abb. 17: Woundscratch-Assay mit humanen Podozyten. Jeweils in der Mitte der Schale wurde ein länglicher Zellschaden gesetzt. Zeitpunkt 0 h ist direkt nach Setzen des Schadens. A) Humane Podozyten unter Stimulation mit 1 μ l aqua dest. alle 12h. B) Humane Podozyten unter Stimulation mit OSM in einer Konzentration von 50 ng/ml alle 12 Stunden.

4.4.2 Die Identifikation relevanter Signalkaskaden für das OSM-induzierte Migrationsverhalten

Es war das Ziel der anschließenden Experimente die Signalkaskade, welche für das gesteigerte Migrationsverhalten der Podozyten unter OSM verantwortlich ist, zu identifizieren.

In den vorhergehenden Experimenten konnte eine Aktivierung der STAT3-, der ERK- und der AKT-Signalkaskade durch Stimulation mit OSM nachgewiesen werden. Durch Inhibition einzelner Signalwege sollte deren Bedeutung für die Steigerung des Migrationsverhaltens untersucht werden.

Hierfür wurden zum einen der STAT3-Inhibitor VII (40 μ M), der MEK-Inhibitor U0126 (20 μ M), und der PI3Kinase-Inhibitor Ly294002 verwendet.

Die hierfür verwendete Versuchsanordnung entsprach den vorangegangenen Versuchen, wobei hier jeweils 50 bzw. 100 ng/ml OSM verwendet wurden. Es wurden in jedem Rasterschälchen drei Kästchen beobachtet. Neben einer Negativkontrollgruppe, welche mit PBS stimuliert wurde, und einer Positivkontrollgruppe, welche mit OSM stimuliert wurde, wurde eine Gruppe der OSM-/Inhibitor- Costimulation eingeführt und miteinander verglichen.

4.4.2.1 Gruppe ohne Inhibitor

Bei dieser Versuchsreihe konnte in der OSM-Stimulationsgruppe (50 ng/ml) im Mittel eine Reduktion der Wundfläche um 52 % \pm 2,5% (p= 0,035) nach 8h, um 44% \pm 2 % (p= 0,031) nach 12 h und um 67% \pm 1,9 % (p= 0,013) nach 24h im Vergleich zum Ausgangswert gemessen werden. Das entspricht einer Zunahme der Wundflächenreduktion um den Faktor 35 % (p= 0,034) nach 8h, um den Faktor 32 (p= 0,044) nach 12h und um 63 % (p= 0,039) nach 24 h im Vergleich zur PBS-stimulierten Kontrollgruppe.

4.4.2.2 STAT3-Inhibitor

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass unter Koinkubation mit STAT3-Inhibitor VII und OSM (50 ng/ml) eine kontinuierliche Zunahme der Wundfläche nach den beobachteten Zeiträumen vorhanden war. Nach 8h kann eine durchschnittliche Zunahme der Wundflächen um 8 % \pm 10 % (p= 0,153) festgestellt werden. Nach 12 h kann im Mittel eine signifikante Zunahme der Wundfläche um 91 % \pm 18 % (p= 0,006) und nach 24 h um 120 % \pm 12 % (p= 0,001) im Vergleich zum Ausgangswert beobachtet werden.

4.4.2.3 MEK-Inhibitor

Unter Koinkubation von U0126 und OSM konnte gemessen werden, dass unter Verwendung von 100 ng/ml nach 8h die Wundflächenreduktion um $39\% \pm 18,6\%$ ($p=0,012$) geringer ausfiel, als unter 100 ng OSM allein. Nach 12h war die Wundflächenreduktion im Mittel um $35\% \pm 16,04\%$ ($p=0,03$), nach 24h um $23\% \pm 22,9\%$ ($p=0,04$) im Vergleich zur alleinigen OSM-Stimulation abgeschwächt (Abb. 18).

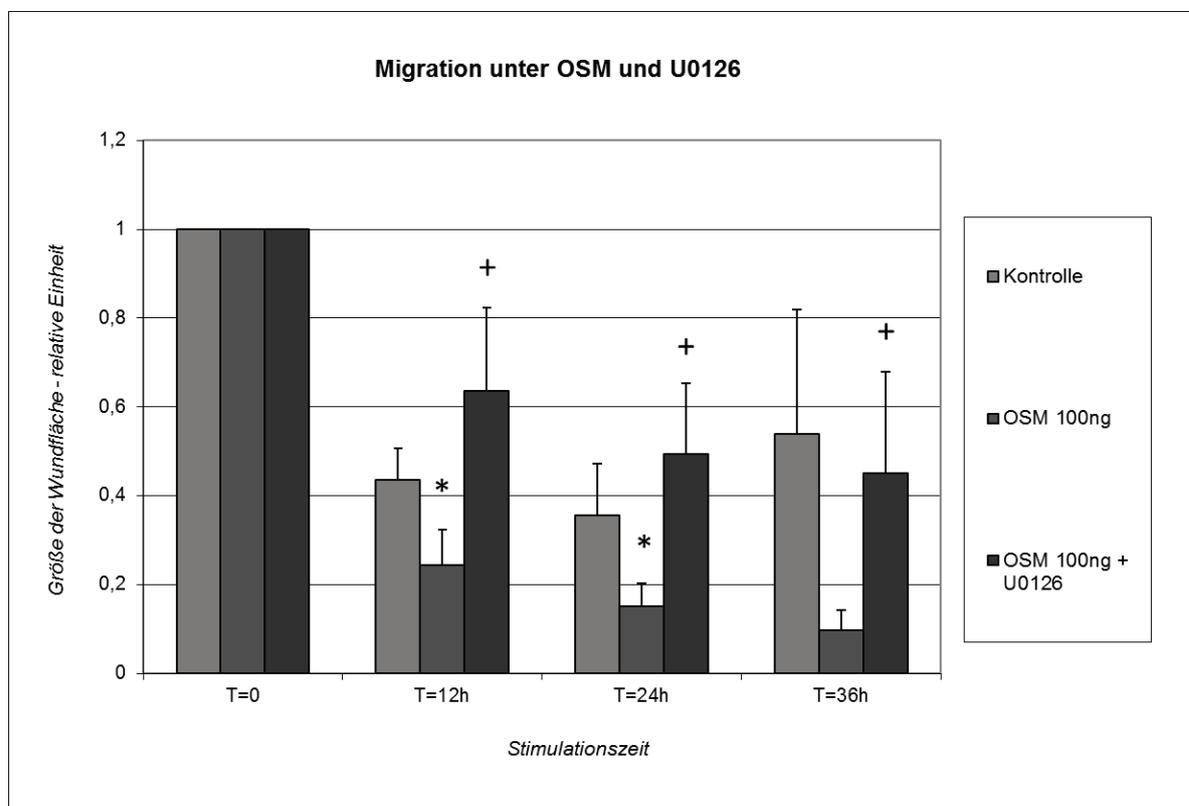


Abb. 18: Migration humaner Podozyten nach Stimulation mit OSM in einer Konzentration von 100 ng/ml und Koinkubation mit einem MEK-Inhibitor (U0126) in einer Konzentration von 20 μ M. Aufgetragen sind die gemessenen Wundflächen nach den oben beschriebenen Zeiträumen ($n=3$, *: $p < 0,05$ bei verwendetem OSM 100 ng im Vgl. zur Kontrolle; +: $p < 0,05$ bei U0126 im Vergleich zu 100 ng OSM, Statistische Auswertung mittels Student's T-Test).

4.4.2.4 PI3-Kinase-Inhibitor

Um den Effekt der Blockade der AKT-Signalkaskade zu überprüfen wurden humane Podozyten zuerst mit OSM 50 ng/ml stimuliert und dann eine zweite Reihe mit 50 ng/ml und Ly294002 (40

μM) koinkubiert. Anschließend wurden weitere Zellen mit 100 ng/ml behandelt und dann ebenfalls mit Ly294002 koinkubiert.

Unter Koinkubation von 50 ng/ml OSM und Ly294002 konnte im Vergleich zur alleinigen OSM-Stimulation nach 8 h eine um $40,8 \% \pm 4,1 \%$ ($p= 0,017$) geringere Wundflächenreduktion gemessen werden. Nach 24 h konnte dabei eine um $46,9 \% \pm 12,9 \%$ ($p= 0,01$) geringere Wundflächenreduktion beobachtet werden (Abb. 19).

Unter alleiniger OSM-Stimulation mit 100 ng/ml konnte in einer weiteren Versuchsreihe gezeigt werden, dass nach 12 h Stimulation im Vergleich zur Kontrollgruppe eine um $16 \% \pm 24 \%$ ($p= 0,19$) verstärkte Wundflächenreduktion zu beobachten war. Nach 24 h war diese Verstärkung signifikant um $35 \% \pm 22 \%$ ($p= 0,02$) angestiegen. Nach 36 h konnte eine um $30 \% \pm 60,8 \%$ ($p= 0,15$) verstärkte Wundflächenreduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen werden. Unter Koinkubation mit dem Inhibitor fiel diese im Vergleich zur OSM-Stimulations-Gruppe nach 12 h im Mittel um $55,4\% \pm 9 \%$ ($p= 0,05$) geringer aus. Nach 24h konnte eine um $101,3\% \pm 16,5 \%$ ($p= 0,02$) geringere Wundflächenreduktion beobachtet werden. Nach 36 h konnte eine um $97\% \pm 30,7 \%$ ($p= 0,103$) geringere Wundflächenreduktion im Vergleich zur OSM-Gruppe gemessen werden.

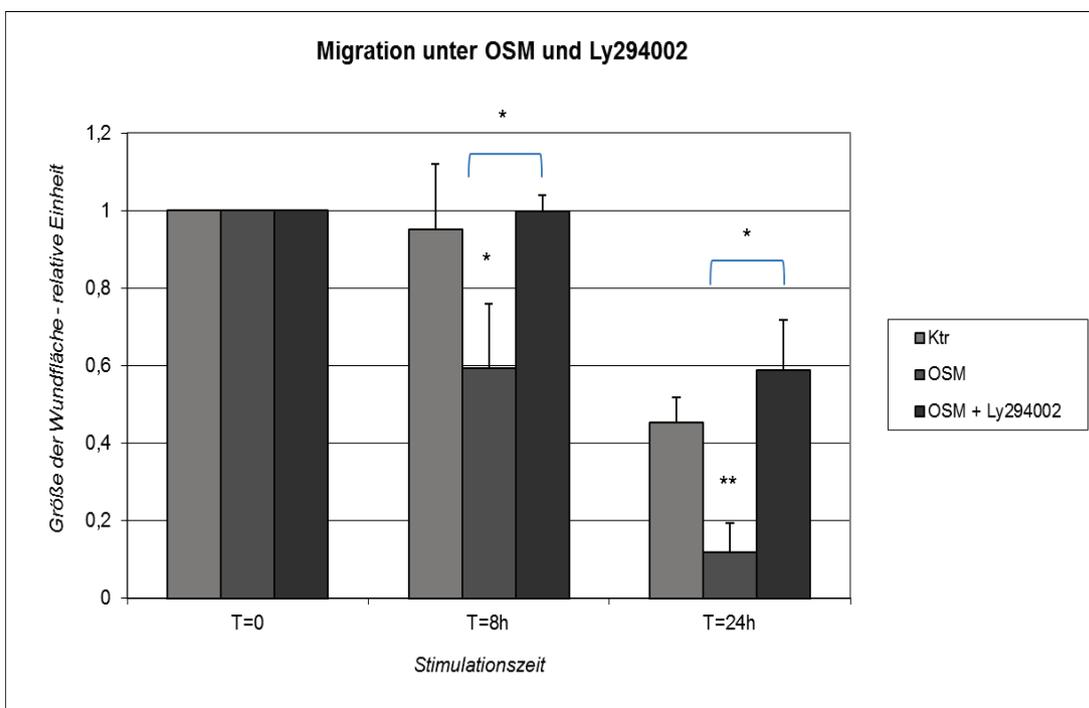


Abb. 19: Migration humaner Podozyten nach OSM-Stimulation in einer Konzentration von 50 ng/ml und mit Koinkubation mit einem PI3-Kinase-Inhibitor in einer Konzentration von 40 μM . Aufgetragen sind die gemessenen Wundflächen nach den oben beschriebenen Zeiträumen ($n=4$, *: $p < 0,05$ im Vgl. zur Kontrolle, * über Klammern: $p < 0,05$ im Vgl. zw. OSM und OSM + Ly294002, statistische Auswertung mittels Student's T-Test).

5. Diskussion

Über die Bedeutung von OSM für die Funktion des Podozyten war bisher nichts bekannt. Lediglich die Arbeit von Esashi mit OSM-Knockout-Mäusen hat gezeigt, dass die betroffenen Tiere häufiger an Glomerulonephritis litten und auch häufiger eine Proteinurie zeigten als die Kontrolltiere [55]. Dies ist ein erster Hinweis auf die Stellung von OSM in der Regulation der physiologischen Podozytenfunktion. Die vorliegende Arbeit kann nun zeigen, dass OSM zum einen eine Veränderung der Signaltransduktion im Podozyten bewirkt. Zum anderen ist eine OSM-Stimulation dazu in der Lage die Expression von für Entdifferenzierung wichtiger Gene zu beeinflussen. Zum Dritten legen die Daten der vorliegenden Arbeit nahe, dass Podozyten unter OSM-Einfluss eine gesteigerte Migrationsfähigkeit aufweisen.

5.1 Die Bedeutung der Signaltransduktion von Oncostatin M in murinen Podozyten

Oncostatin M als Mitglied der IL-6-Familie, bindet wie alle anderen Mitglieder auch an ein transmembranäres Rezeptorprotein der Klasse I. Dabei spielt das Transmembranprotein gp130 eine wichtige Rolle. Gp130 ist als ein Bestandteil des OSM-Rezeptorkomplexes in allen Fällen enthalten. Hierbei kommt es nach Bindung von OSM an einen der beiden möglichen Komplexpartner OSMR oder LIFR zur Heterodimerisierung. Alle drei Rezeptorkomponenten konnten in unserer Arbeit auf mRNA-Ebene im murinen Podozyten nachgewiesen werden. Somit ist die grundlegende Voraussetzung für eine Antwort des Podozyten auf eine OSM-Einwirkung erfüllt.

Maßgeblich muss in diesem Zusammenhang das unterschiedliche Bindungs- bzw. Signaltransduktionsverhalten von humanem im Vergleich zu murinem OSM in humanen oder murinen Zelllinien beachtet werden. Humanes OSM ist dazu in der Lage in humanen Zelllinien sein Signal über eine niedrig affine Bindung zu einem Heterodimer aus LIFR und gp130 oder OSMR und gp130 zu vermitteln, sodass sich die Wirkungen von humanem OSM und LIF redundant verhalten können. In murinen Zelllinien vermittelt humanes OSM seine Wirkung ausschließlich über den LIFR/gp130-Heterodimer, sodass es in murinen Zellen die Wirkung von LIF imitiert [57]. Im Gegensatz dazu besitzt murines OSM diese Fähigkeit nicht und vermittelt seine Wirkung in murinen Zelllinien ausschließlich über die Nutzung des OSMR-Proteins, was dessen eigenständige biologische Funktion beobachtbar macht [31, 58].

Gp130 selbst besitzt am extrazellulären Anteil keine spezifische Bindungsdomäne für OSM und kann lediglich eine niedrigaffine Bindung mit OSM eingehen, wobei diese Bindung nicht ausreicht, um ein Signal nach intrazellulär zu vermitteln [59]. In der vorliegenden Arbeit wurde in den Experimenten zum Nachweis der aktivierten Signalkaskaden ausschließlich murines rekombinantes OSM, wie oben beschrieben, verwendet. Dies soll sicherstellen, dass die untersuchten Effekte auf die Wirkung von OSM und dessen Signalkaskaden zurückzuführen sind. Um sowohl die Dosis als auch die Zeit der Einwirkung von OSM auf den murinen Podozyten zu bestimmen, unter der eine maximale Wirkung und Aktivierung der Signalkaskaden erzielt werden kann, wurden zum einen Experimente mit aufsteigenden OSM-Konzentrationen und zum anderen Experimente mit unterschiedlichen Stimulationszeiten durchgeführt. Die weitere zytosolische Signaltransduktion erfolgt über eine Aktivierung des MAPK/ERK-, des JAK/STAT-Weges [30] und des AKT/PKB-Weges [60]. Diese drei Achsen wurden von uns auf deren Aktivitätsniveau im murinen Podozyten untersucht.

5.1.1 ERK-Signalkaskade

Die vorliegenden Daten zeigen eine signifikante Zunahme des Phosphorylierungsniveaus der podozytären ERK1/2-Kinasen nach OSM-Stimulation in Abhängigkeit von Zeitdauer und Konzentration. Dabei konnten wir ein Aktivierungsmaximum bei einer Konzentration von 50 ng/ml OSM mit einer Steigerung um den Faktor 2,85 nachweisen.

Diese Ergebnisse decken sich mit der Arbeit von Liu und Mitarbeitern: diese konnten nach Stimulation von HepG2-Zellen mit OSM in aufsteigender Dosis eine verstärkte Aktivierung der ERK-Kinasen nachweisen, verwendeten dabei allerdings feinere Schritte der Dosissteigerung und arbeiteten mit einer Maximaldosis von 20 ng/ml OSM [61].

In weiteren Experimenten zeigen wir mit derselben OSM-Konzentration ein Aktivitätsmaximum nach 10 Minuten, wobei die Steigerung um den Faktor 7 erfolgte. Diese Beobachtungen decken sich mit den Arbeiten von Meloche. Dieser konnte zeigen, dass in CCL39-Hamsterfibroblasten nach Wachstumsfaktor-Stimulation eine rasche Steigerung der Phosphorylierung der ERK-1-Kinasen nach 5-10 Minuten zu beobachten war [62]. Darüber hinaus konnte Meloche und Mitarbeiter noch einen zweiten, länger anhaltenden Peak der Steigerung der ERK-1-Phosphorylierung beobachten, was einen Hinweis auf die Rolle der ERK-Kinasen in der Regulation der Progression des Zellzyklus darstellt. Diesen zweiten Anstieg der Phosphorylierung konnten wir in murinen Podozyten nicht sehen. Dieser Umstand kann durch die relativ kurze maximale Beobachtungszeit der Zellen von lediglich 60 Minuten nach Stimulation zurückzuführen sein.

Die vorliegenden Daten zeigen hier zum ersten Mal eine Steigerung der Aktivität der ERK-Kinasen nach OSM-Stimulation im Podozyten. Durch die Koinkubation mit OSM mit dem MEK-Inhibitor U0126 lässt sich die Aktivierung von ERK blockieren. Da MEK im Signalweg direkt oberhalb von ERK angesiedelt ist lässt sich ableiten, dass die Aktivierung der ERK-Kinasen nach OSM-Stimulation über den MAP-Kinase-Weg erfolgt, und mögliche Seitenaktivierungen hierbei im Podozyten keine Rolle spielen.

Um den funktionellen Aspekt dieser Ergebnisse zu untermauern, führten wir Migrationsversuche im Sinne eines klassischen Wound-Scratch-Assays durch. Dieses Vorgehen wurde schon vielfach beschrieben und angewandt, so z.B. von Lampugnani und Mitarbeitern [63].

Bei diesen Versuchen zeigte sich, dass humane Podozyten nach Stimulation mit OSM 8h nach Setzen der Wundfläche durch Migration in den Wundspalt eine Reduktion dieser Fläche um 40,75% erzielten, im Vergleich zu 4,75% Reduktion der Wundfläche in Abwesenheit von OSM. Nach 24 h ist die Wundfläche unter OSM-Einfluss um 88,1% reduziert im Vergleich zu 54,7%iger Wundflächenreduktion in der Kontrollgruppe. Das bedeutet, dass die Assays mit OSM stimulierten Podozyten 8 h nach Setzen der Wundfläche eine um 36% und nach 24 h eine um 33,4 % kleinere Wundfläche aufwiesen als in der Kontrollgruppe. An beiden erwähnten Zeitpunkten ist dieses Ergebnis signifikant. Eine von der Änderung der OSM-Konzentration abhängige Steigerung der Migration ließ sich dabei nicht zeigen. Zusammenfassend zeigen unsere Daten eine gesteigerte migratorische Potenz humaner Podozyten unter dem Einfluss von OSM.

Diese Daten bestätigen die Ergebnisse von Wijelath und Mitarbeitern. Diese konnten bereits in Endothelzellen einen Migrationsfördernden Effekt von OSM zeigen [64]. Strand und Mitarbeiter konnten darauf hin nachweisen, dass dieser migrationssteigernde Effekt für Endothelzellen durch eine OSM-induzierte Steigerung der Expression von Urokinase-Plasminogen-Aktivator und Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Rezeptor [65] bewirkt wird.

Ebenso konnten Albasanz-Puig und Mitarbeiter ähnliche Ergebnisse für glatte Muskelzellen demonstrieren [66]. Diese Daten zeigen eine Steigerung der Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen unter Stimulation von 50 ng/ml OSM um 24 % bis 43 %. Die verwendete OSM-Konzentration entspricht der von uns verwendeten und kann auch in Podozyten eine vergleichbare Steigerung der Migration erzielen. Kritisch dabei ist zu vermerken, dass Albasanz-Puig und Mitarbeiter ein PDGF-haltiges Serum verwendeten, um diese Ergebnisse zu erzielen, was diesen Effekt nicht sicher auf OSM zurückführen lässt.

Um nun zu überprüfen, welche Rolle die ERK/MAPK-Signalachse in dem Prozess der gesteigerten Migration spielt, bedienten wir uns erneut dem oben beschriebenen Inhibitor U0126. Dazu wurden humane Podozyten einmal mit OSM allein und mit OSM und U0126 gemeinsam inkubiert und die Migration der Zellen beobachtet. Dabei konnte gezeigt werden, dass die

Wundflächenreduktion in der Inhibitorgruppe nach 8 h um 39,3%, nach 12 h um 34,2% und nach 24h um 22,3% geringer ausfiel als in der OSM-Stimulationsgruppe.

Dies bedeutet, dass die durch den OSM-Einfluss gesteigerte Mobilität der Podozyten durch die Blockade des ERK/MAPK-Signaltransduktionsweges nahezu komplett aufhebbar ist. Daraus lässt sich schließen, dass dieser Signalweg eine zentrale Rolle in der Vermittlung der Steigerung der Migration humaner Podozyten nach OSM-Stimulation einnimmt. Unsere Ergebnisse bestätigen die Vermutungen von Demyanets und Mitarbeiter. Diese konnten nachweisen, dass in glatten Muskelzellen durch OSM-Stimulation eine Steigerung der PAI-1-Expression mit der Folge einer gesteigerten Proliferation und Migration durch die Aktivierung von ERK-Kinasen und PI3-Kinase vermittelt wird [67]. Ebenso konnten z.B. Zou und Mitarbeiter zeigen, dass die durch Osteopontin-Stimulation erzeugte Steigerung der Migration von mesenchymalen Stammzellen maßgeblich durch eine Aktivitätszunahme auf Ebene der ERK-Kinasen erzielt wird [68].

Welche pathophysiologische Rolle könnte nun der gesteigerten Motilität zukommen? Im Rahmen einer inflammatorischen Schädigung, wie z.B. einer Glomerulonephritis könnte durch eine gesteigerte Migration mit nachfolgend gesteigerter Ablösetendenz der Zellen von der Basalmembran eine Podozytopenie entstehen. Diese unterliegt wiederum der Regulation durch Synaptopodin vermittelter Reorganisation des podozytären Aktins, wie durch Asanuma et al. bereits beschrieben wurde [69].

5.1.2 AKT-Signalkaskade

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine signifikante Zunahme des Phosphorylierungslevels der Proteinkinase B/AKT in Abhängigkeit von Zeitdauer und Konzentration der OSM-Einwirkung im Podozyten. So wurde bei einer OSM-Konzentration von 50 ng/ml ein Aktivierungsmaximum mit einer signifikanten Steigerung der AKT-Phosphorylierung um den Faktor 2,65 gemessen.

Nach einer Zeitspanne von 15 Minuten unter Verwendung von 50 ng/ml OSM kann eine signifikante maximale Phosphorylierung der AKT-Kinasen mit einer Steigerung um den Faktor 2,65 gemessen werden, wobei 60 Minuten nach Stimulationsbeginn der Wert wieder nahezu auf Ausgangsniveau gefallen ist. Diese Daten decken sich mit den Ergebnissen von Oh und Mitarbeitern. Diese konnten zeigen, dass eine über LIF vermittelte gp130 Aktivierung zu einer verstärkten Aktivität des PI3-Kinase Signalweges in Cardiomyozyten führt [70]. Diese Aktivitätssteigerung war auch hier nach 10 Minuten maximal und nach 60 Minuten weitestgehend abgeebbt.

Die vorliegende Arbeit zeigt zum ersten Mal eine OSM-abhängige Aktivierung der AKT/PKB-Kinasen im murinen Podozyten.

Der AKT/PKB-Signalweg ist eine weitere Möglichkeit der OSM-Signaltransduktion. Dabei kommt es nach Bindung von OSM und anschließender Rezeptorheterodimerisierung zur Aktivierung einer Januskinase an der zytoplasmatischen Seite des Rezeptorkomplexes. Diese führt zur Aktivierung der PI3-Kinase, welche die Bildung von Phosphatidy-Inositol-Triphosphat fördert. Dieses Lipid ist dazu in der Lage nicht aktiviertes AKT zur Plasmamembran zu befördern. Hier kann es zum einen von einer weiteren membranständigen Kinase, der PDK-1, am Threonin308 phosphoryliert werden, zum anderen von einer zweiten Kinase am Serin473. Nach dieser Doppelphosphorylierung ist AKT voll aktiviert [71]. Hier liegt der Grund dafür, weshalb wir für die Westernblotanalysen den Phospho-Antikörper Serin 473 verwendet haben. Die komplette Aktivierung des AKT-Weges setzt die Serin473-Phosphorylierung voraus. Im aktivierten Zustand ist AKT dazu in der Lage mit einer Vielzahl an weiteren Proteinen zu interagieren. Z.B. kommt es zur Aktivierung von mTOR (Mamalian Target of Rapamycin), welches eine zentrale Stellung in der Regulation der Proteinsynthese in Abhängigkeit von vorhandenen Energieträgern einnimmt [72, 73]. Darüber hinaus kommt es zur Interaktion mit weiteren Proteinen wie BAD, CREB, Transkriptionsfaktoren aus der Forkhead-Familie, I κ -B-Kinase, Procaspase-9, GSK-3- α/β und p21WAF1 [71]. Diese Vielzahl an möglichen Interaktionspartnern zeigt den großen Einfluss des AKT-Signalweges auf das Zellüberleben, insbesondere auch der Suppression der Apoptose, der Förderung der Tumorentstehung [74] und Migration.

Bereits von Huber und Mitarbeitern konnte gezeigt werden, dass die Nephrin induzierte AKT-Aktivierung in immortalisierten murinen Podozyten zur Inhibition der podozytären Apoptose führt [75]. Dies geschah insbesondere über die AKT-vermittelte Phosphorylierung von Bad, einem Protein mit multipler Apoptose inhibierender Wirkung.

Dabei konnte dieser Effekt unter Verwendung des hochspezifischen PI3K-Inhibitors Ly294002 vollständig gehemmt werden. Diese Tatsache deckt sich auch mit den Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit. Auch hier konnten wir zeigen, dass die OSM-vermittelte Aktivierung von AKT durch die Koinkubation mit Ly294002 aufgehoben werden konnte, was einen Hinweis darauf gibt, dass die OSM-induzierte AKT-Aktivierung über die PI3K vermittelt wird.

Weitere interessante Hinweise auf die antiapoptotische Wirkung von OSM konnten Scaffidi und Mitarbeiter aufzeigen: Sie konnten nachweisen, dass Oncostatin M die Apoptose von humanen Lungenfibroblasten signifikant inhibiert [76]. Darüber hinaus konnte für LIF beispielsweise erst vor kurzem ein protektiver Effekt auf Podozyten im Rahmen von oxidativem Stress während glukoseinduzierter Apoptose gezeigt werden [77].

Die weitere Untersuchung der antiapoptotischen Wirkung des OSM im murinen Podozyten scheint in Anbetracht der in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten lohnenswert. Hierfür sind

noch weitere Experimente, wie z.B. Apoptoseassays nötig, um über die Quantifizierung und direkte Messung des Apoptosevorganges differenziertere Aussagen über diesen Effekt treffen zu können.

Um die funktionelle Bedeutung der vorliegenden Ergebnisse noch weiter zu untermauern, arbeiteten wir im Rahmen der oben beschriebenen Migrationsassays auch mit dem PI3Kinase-Inhibitor Ly294002. Auch hierzu wurden humane Podozyten einmal mit OSM allein und dann mit OSM und Ly294002 gemeinsam inkubiert und anschließend die Zellmigration gemessen. Hier zeigt sich, dass die Reduktion der Wundfläche in der Inhibitorgruppe nach 8 h signifikant um 40,8% und nach 24 h um 46,9% geringer ist, als in der OSM-Stimulationsgruppe. Das heißt, dass die unter OSM-Stimulation beobachtete Verstärkung der podozytären Migration nach Blockade der PI3K komplett aufgehoben werden kann. Dieser Umstand impliziert eine zentrale Rolle der PI3K/AKT/PKB-Signalachse in der Vermittlung einer durch OSM induzierten gesteigerten Migration im Podozyten. Dabei ist zu vermerken, dass die prozentuale Inhibition der Migration durch die Blockade des AKT-Signalweges etwas stärker ausfällt als in den Experimenten mit der ERK-Signalwegblockade. Man könnte daraus schließen, dass die AKT-Signalachse bei der Vermittlung dieses migrationssteigernden Effektes die wichtigste Rolle einnimmt.

Diese Beobachtungen sind mit den Ergebnissen von Weissenbach und Mitarbeitern in Einklang zu bringen. Sie konnten zeigen, dass eine Aktivierung der MAP-Kinase, der AKT- als auch der JAK/STAT-Signaltransduktion nach IL-6-Stimulation zu einer vermehrten Migration von T-Zellen führt [78].

In Anbetracht der hier erhobenen Daten postulieren wir, dass OSM im Podozyten über eine Aktivierung des ERK- und des AKT/PKB-Signaltransduktionsweges eine gesteigerte Migration induziert. Dabei ist eine migrationssteigernde Wirkung nur bei Aktivierung beider Signalachsen möglich, wenn jedoch eine dieser Achsen blockiert ist, kann der OSM-Effekt aufgehoben werden. Die Signaltransduktion über die AKT-Achse scheint jedoch etwas größeren Einfluss auf die migratorische Potenz zu haben.

5.1.3 STAT3-Signalkaskade

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine sowohl zeit- als auch dosisabhängige Steigerung der STAT3-Phosphorylierung in murinen Podozyten nach OSM-Stimulation. So können wir zeigen, dass unter Verwendung von OSM in einer Konzentration von 50 bzw. 100 ng/ml eine

signifikante maximale Steigerung des Phosphorylierungsniveaus erreicht werden kann, jeweils um den Faktor 2. Bereits nach 5 Minuten wird eine Maximalsteigerung der STAT3-Phosphorylierung erreicht, und zwar um den Faktor 2,16, wobei 60 Minuten nach Stimulation wieder das Ausgangsniveau erreicht wurde.

Diese Daten demonstrieren zum ersten Mal, dass eine OSM-Stimulation im Podozyten zu einer vermehrten Phosphorylierung der STAT3-Proteine führt.

Die STAT-Proteine sind eine eigene Familie von Transkriptionsfaktoren, bestehend aus insgesamt sieben Mitgliedern, welche eine zentrale Rolle innerhalb der IL-6-Signaltransduktion einnehmen.

Für OSM ist bereits bekannt, dass es dazu in der Lage ist, als potenter STAT-Aktivator zu fungieren, wobei die stärkste Aktivierung für STAT5 gezeigt wurde [79].

Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte STAT3 wird nach OSM-Rezeptorbindung und Heterodimerisierung des Rezeptorkomplexes von membranassoziierten Januskinasen am Tyrosin705 phosphoryliert und damit aktiviert [80]. Dies hat eine Homodimerisierung zweier STAT3-Moleküle zur Folge, welche in diesem Zustand aktiv sind und in den Zellkern translozieren. Dabei wurde der Transport von aktiviertem STAT3 nach Stimulation mit EGF als an Endozytosevesikel gekoppelt beschrieben [81].

Im Zellkern bindet STAT3 an bestimmte responsive Elemente in der Promotorregion der zu regulierenden Gene. Generell sind hier das ISRE (interferon stimulates responsive element) und das GAS (interferon γ activation site) zu nennen [82]. Als Folge dessen kommt es dann zur Aktivierung von Genen wie Haptoglobin [83], Fibrinogen [84], TIMP-1 [43, 85], p21WAF1/cip1 [86] und ICAM-1 [87]. Die möglicherweise aktivierbaren Gene geben Anlass zu der Vermutung, dass eine durch OSM induzierte STAT3-Aktivierung einen antiapoptotischen und zytoprotektiven Effekt im Podozyten haben könnte.

So konnte z.B. von Yajima und Mitarbeitern für Cardiomyozyten gezeigt werden, dass diese während einer viralen Infektion durch den Einfluss von STAT3-Signaltransduktion bis zum Anlaufen der spezifischen Immunantwort vor einem frühzeitigen Zelluntergang bewahrt werden [88]. Ebenso unterstreicht die Arbeit von Jacoby die Rolle des STAT3-Signalweges im Cardiomyozyten. STAT3-defiziente Mäuse entwickeln rasch eine kardiale Fibrose und Herzinsuffizienz [89].

Von Sarközi und Mitarbeitern konnte des Weiteren eine antifibrotische Wirkung durch OSM-induzierte STAT3-Aktivierung für proximale Tubuluszellen demonstriert werden. Dieser Effekt wurde dabei über eine OSM-vermittelte Inhibition der TGF- β 1 induzierten Expression von SPARC, TSP-1, TNC, und CTGF vermittelt [90]. Diese Arbeit belegt die wichtige Rolle von OSM in der Entwicklung renaler Fibrose auf der Ebene der Tubuluszellen. Die vorliegenden Daten lassen nun ähnliche Wirkungen auch auf der Ebene der Podozyten vermuten.

Weiterhin konnte von Kortylewski gezeigt werden, dass der wachstumsinhibierende Effekt von OSM auf die humane Melanomzelllinie A375 über eine Aktivitätssteigerung von STAT3 und einer nachfolgenden gesteigerten Expression des Cyklin-abhängigen Kinase Inhibitors p27/Kip1 [91] vermittelt wird. Im Gegensatz dazu fanden Halfter und Mitarbeiter, dass eine OSM-vermittelte Phosphorylierung sowohl der STAT3-Moleküle als auch der ERK-Kinasen auf die humanen Gliomzelllinien A172 und U343-MG keine suffiziente Wachstumsinhibition erwirken kann [92].

Auf der anderen Seite ist eine OSM-induzierte STAT3 Aktivierung in humanen Osteosarkomzellen für eine vermehrte Expression von VEGF verantwortlich [93]. Dies begünstigte das lokal invasive Wachstum der Osteosarkomzellen.

So ist abschließend eine Wirkung durch die OSM-vermittelte STAT3-Aktivierung auf u.a. Tumorwachstum, Zellproliferation sowie dessen mögliche protektive Effekte differenziert zu betrachten. In der Literatur konnten sowohl inhibierende als auch fördernde Effekte auf das Wachstum verschiedener Tumore nachgewiesen werden.

Die vorliegende Arbeit kann zeigen, dass die SOCS3-mRNA nach OSM-Stimulation im Podozyten signifikant steigt. Dabei handelt es sich bei SOCS3 um einen STAT3-Inhibitor, der als eine Art negative Feedbackschleife fungiert. So zeigte sich bereits zwei Stunden nach Stimulation mit OSM eine hochsignifikante Verdopplung der Expression der SOCS3-mRNA. Nach vier Stunden konnte sogar eine signifikante Steigerung der Expression um den Faktor 2,45 gemessen werden. Selbst nach 72 Stunden konnte immer noch eine Verdopplung der Expression gezeigt werden, dann jedoch nicht mehr signifikant. Während unserer mRNA-Expressions-Versuche in Podozyten war dieser Effekt am stabilsten vor allen anderen beschriebenen Veränderungen nachzuweisen.

Diese Daten decken sich mit den Ergebnissen von Stross und Mitarbeitern [94]. Sie konnten zeigen, dass OSM eine starke Erhöhung der SOCS3-Expression in HepG2-Zellen zur Folge hat. Dreißig bis Neunzig Minuten nach OSM-Stimulation war sowohl eine erhöhte SOCS3 mRNA als auch erhöhte SOCS3 Proteinspiegel im Westernblot nachweisbar.

Diese Beobachtung bestätigen auch die Daten von Chattopadhyay [95]. Die Gruppe konnte in Lungenepithelzellen nachweisen, dass die durch OSM induzierte Erhöhung der SOCS3-Expression nach einer Stunde ihr Maximum erreichte und bis zu 48 h anhielt. Dieser Effekt wurde hier allerdings auf Proteinebene nachgewiesen, die zeitlichen Relationen sind trotzdem ähnlich.

Die biologische Bedeutung dieser SOCS3-Induktion durch Zytokine der IL-6-Familie liegt in einer negativen Feedbackregulation und Modulation der Zytokinantwort.

Dabei setzt die vermehrte SOCS3-Expression eine vorangegangene Aktivitätserhöhung der STAT-Proteine voraus. Diese wurde bereits oben besprochen. Diese erhöhen dann im Sinne

eines negativen Feedbacks die SOCS3-Expression. Die inhibierende Wirkung des SOCS3 kann dabei auf verschiedenen Wegen realisiert werden. So können sie eine Dephosphorylierung der JAK- oder STAT-Proteine bewirken, oder über eine Interaktion mit gp130 hemmenden Einfluss auf diese Signalkaskaden nehmen. Für die zuletzt genannte Interaktion ist eine Bindung von SOCS3 an das Phospho-Tyr759 des gp130 beschrieben worden [96, 97], welches die Bindungsstelle für SHP2-Moleküle darstellt und somit dessen weitere Signaltransduktion inhibiert.

Studien mit Knockout-Mäusen zu SOCS3 implizieren die weitere Bedeutung und Funktion dieser Feedbackregulation auf Ebene der JAK/STAT-Signaltransduktion. So konnte gezeigt werden, dass SOCS3-Knockout-Mäuse bereits während der Schwangerschaft an Entwicklungsverzögerung leiden und an übersteigerter Erythropoese versterben [98].

Ebenso scheint SOCS3 eine wichtige Rolle in Entzündungsreaktionen, z.B. in der Niere zu spielen. So konnte von Liu und Mitarbeitern gezeigt werden, dass in humanen Tubulusepithelzellen eine gesteigerte SOCS3-Aktivität dazu in der Lage ist, eine durch IL-1 β oder OSM induzierte Transdifferenzierung hin zum fibroblastischen Phänotyp zu verhindern [99].

In Anbetracht dieser Daten scheint die SOCS3-Hochregulation nach OSM-Stimulation den eigentlichen Effekt wieder zu inhibieren und die Genexpression der entsprechenden Effektorgene zu regulieren.

Im Podozyten zeigen diese Daten die durch OSM induzierte gesteigerte SOCS3-Expression zum ersten Mal. Ihre vorrangige Bedeutung liegt dabei sicherlich in einer negativen Feedbackregulation der Signalantwort. Weitere biologische Bedeutungen dieser Entdeckung im Podozyten gilt es durch fortgeführte experimentelle Bemühungen näher zu beleuchten. Möglich aber ist auch hier eine Art Feinregulation der Einleitung einer Epithelial-zu-Mesenchymalen Transition des Podozyten.

5.2 Epithelial-zu-Mesenchymale Transition im murinen Podozyten nach OSM-Stimulation

Die Zunahme der migratorischen Fähigkeiten einer Zelle geht häufig mit einer gewissen Entdifferenzierung einher. Im Falle der Podozyten zeigt sich eine Veränderung des ausdifferenzierten epithelialen Phänotyps in eine weniger differenzierte mesenchymale Form. Diese Veränderung kann durch externe Stimuli, welche zu einer Änderung der Expression bestimmter Markergene führt, hervorgerufen werden.

In weiteren Experimenten haben wir Veränderungen in der podozytären Genexpression auf Ebene der mRNA nach Stimulation mit OSM untersucht.

Dabei lag unser Focus zum einen auf Regulatorgenen der Epithelial-zu-Mesenchymalen Transition (EMT), wie z.B. SNAIL [100] als einer der Hauptinitiatoren für die EMT und auch bedeutsam in der Regulation des Zellüberlebens, der Tumorentstehung und der Modulation des Immunsystems.

Weiterhin wurden in dieser Arbeit epithelial-podozytäre Marker wie Nephrin, Podocin und ZO-1 untersucht, ebenso wie mesenchymale Marker wie Desmin und Kollagen1.

Ziel war es dabei, mögliche Veränderungen in Genen zu erfassen, welche einen Hinweis auf einen zytoprotektiven Effekt der OSM-Stimulation im Podozyten geben.

5.2.1 Die Veränderte Expression von epithelialen und mesenchymalen Markergenen in murinen Podozyten nach Oncostatin M Stimulation

Um nachzuweisen, dass es sich bei den verwendeten immortalisierten Podozyten tatsächlich um Podozyten handelt, wurde die mRNA von Podocin und Nephrin, zwei für Podozyten spezifische epitheliale Marker, untersucht. Diese konnten unter Koinkubation mit Retinoiden nachgewiesen werden, wie oben bereits beschrieben.

Das Ziel der folgenden Experimente war mögliche Veränderung der mRNA des Podozyten zu finden, die Hinweise liefern, dass die Stimulation mit OSM im Podozyten eine Entdifferenzierung im Sinne einer Epithelial-zu-Mesenchymalen Transition initiieren kann. Dabei handelt es sich um eine phänotypische Veränderung von Epithelzellen, in der diese unter anderem ihre typische Verankerung mit der Basalmembran sowie mit benachbarten Epithelzellen verlieren, ihre für Epithelzellen typische Polarität aufgeben und eine eher spindelförmige Morphologie, ähnlich der von Mesenchymzellen wie zum Beispiel Fibroblasten, einnehmen [101]. Dabei kommt es zur Bildung von Zellen, die zur vermehrten Produktion von extrazellulärer Matrix befähigt sind und später für das Versagen parenchymatöser Organe verantwortlich gemacht werden können.

Dieser Prozess der Fibrose tritt als Antwort auf chronische Schäden in vielen Organen auf, beschrieben zum Beispiel in der Leber [102]. Auch für die Tubulusepithelzellen der Niere ist bereits bekannt, dass diese als Reaktion auf eine chronische Schädigung mit einer EMT reagieren können [103, 104]. Li und Mitarbeiter konnten bereits zeigen, dass die EMT auch in der Entwicklung podozytärer Dysfunktion und der Pathophysiologie der Entstehung von Proteinurie eine Rolle spielt [105]. Ein potenter bereits bekannter Aktivator der EMT ist TGF- β -1. Das Ziel unserer Arbeit war nun, für OSM die Induktion der EMT nachzuweisen. Dabei wurden auf der einen Seite epitheliale Marker wie z.B. Cadherin-3 nach OSM-Stimulation im Podozyten beobachtet. Diese sollte im Rahmen einer beginnenden EMT dann vermindert expremiert

werden. Auf der anderen Seite wurden mesenchymale Marker, wie z.B. Collagen-1 und Fibronectin untersucht. Dessen Expression müsste sich im Falle einer einsetzenden EMT erhöhen. Darüber hinaus wurde noch die Expression von SNAIL, einem der Hauptinitiatoren der EMT, untersucht.

5.2.2 SNAIL-Expression unter OSM-Stimulation

Die vorliegenden Daten können eine signifikante Steigerung der SNAIL-Expression nach OSM-Stimulation im Podozyten nach 2 h um den Faktor 1,61, nach 4 h um den Faktor 2,36 zeigen. Nach 8h Stimulationszeit ist immer noch eine Steigerung um den Faktor 1,86 und nach 24 h um den Faktor 1,29 zu messen, beides nicht mehr signifikant. Diese Daten zeigen im Vergleich mit den Arbeiten von Hotz eine sehr rasche Expressionssteigerung von SNAIL im Podozyten nach OSM-Stimulation. Hotz und Mitarbeiter konnten eine maximale SNAIL-Expression nach 48 h in Makrophagen in der Darmwand von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nachweisen [106].

SNAIL zählt zur Superfamilie der SNAIL-Zink-Finger-Proteine und hat seine Funktion als Transkriptionsfaktor. Hierbei spielt es eine herausragende Rolle in der embryonalen Entwicklung von vielen Lebewesen. Dabei vermittelt SNAIL seine Wirkungen über eine durch die Repression von E-Cadherin induzierte EMT [107], was phänotypisch zur vermehrten Zellmigration führt. Diese ist Bedeutsam während der Embryonalentwicklung aber auch bei invasivem oder metastasierendem Wachstum von Tumorzellen, der Regulation des Zellüberlebens und der Immunantwort, sowie während der Wundheilung.

So konnte gezeigt werden, dass SNAIL-Knockout Mäuse nicht lebensfähig sind [108]. Sie versterben aufgrund von massiven Defekten während der Gastrulation, was wiederum auf die ausbleibende Zellmigration zurückzuführen ist.

Diese Ergebnisse lassen sich gut mit den von uns erhobenen Daten der gesteigerten Migration humaner Podozyten nach OSM-Stimulation vereinbaren, welche demnach über eine Aktivierung der AKT-/ERK-Signalwege zur gesteigerten SNAIL-Expression mit Folge einer supprimierten E-Cadherin-Expression und somit zur gesteigerten Migration führt.

Eine SNAIL-Aktivierung wurde bereits in mehreren Tumorentitäten in Zusammenhang mit der Ausbildung von Metastasen und Tumorrezidiven gebracht. Erklärt wird dieser Fakt durch die Suppression von E-Cadherin, was zum Verlust der Zelladhärenz von epithelialen Tumorzellen führt und somit eine Filiarisierung erst ermöglicht.

So konnte zum Beispiel von Moody und Mitarbeitern nachgewiesen werden, dass eine erhöhte Expression von SNAIL in Mamakarzinomgewebe mit einer gesteigerten Rate an Rezidiven korreliert [109].

Darüber hinaus konnte Hotz und Mitarbeiter eine Bedeutung von SNAIL über die beschriebene Rolle als potenter Induktor der EMT hinaus zeigen. Sie konnten nachweisen, dass u.a. in humanen Gewebeproben von entzündlich verändertem Darmgewebe und von Wundregionen immunhistochemisch eine verstärkte SNAIL-Expression nachweisbar ist [106]. In diesem Zusammenhang kann man eine Rolle von SNAIL im akuten Entzündungsgeschehen und in der Wundheilung annehmen.

In der Literatur wird darüber hinaus diskutiert, ob die komplexe SNAIL-vermittelte Regulation der EMT eine Rolle in der Entwicklung von chronischen Entzündungen und Fibrose spielt [110]. Nach dieser Vermutung wäre die Wirkung von OSM mit nachfolgender SNAIL-Hochregulation eher als prodestruktiv zu werten.

5.2.3 Expression epithelialer Markergene nach OSM-Stimulation

Die vorliegenden Daten können eine auf eine mögliche EMT hinweisende Veränderung von epithelialen und mesenchymalen Markern nachweisen.

So können wir zeigen, dass die Cadherin-3-Expression im Podozyten 24 h nach OSM-Stimulation signifikant um den Faktor 0,77 reduziert wurde. Diese Daten bestätigen die Ergebnisse von Pollack und Mitarbeitern, welche nach 6 h OSM-Stimulation in humanen Tubulusepithelzellen eine Reduktion der Expression von E-Cadherin um 23,3% nachweisen konnten [111]. Diese Ergebnisse könnten zu einer beginnenden durch OSM induzierte EMT passen.

5.2.4 Expression mesenchymaler Markergene unter OSM-Stimulation

Bei der Beobachtung mesenchymaler Markergene im Podozyten nach OSM-Stimulation zeigt sich zum Beispiel für Collagen- I nach 4 h eine Expressionssteigerung um den Faktor 1,6. Diese Daten bestätigen die Ergebnisse von Pollack und Mitarbeitern. Diese konnten zeigen, dass nach 6 h OSM-Stimulation in HK-2-Zellen eine Steigerung der Expression von Collagen-I um den Faktor 2 zu beobachten war [111]. Für die Expression von Fibronectin-1 kann eine gesteigerte Expression nach 4 h OSM-Stimulation um den Faktor 2,4 nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse waren beide nicht signifikant. Dabei können wir hier zum ersten Mal zeigen, dass

OSM in Podozyten eine Steigerung der Collagen-I-Expression bewirkt. Diese Ergebnisse könnten für eine beginnende, durch OSM induzierte EMT sprechen.

Aufgrund der hier detektierten Veränderungen mit Steigerung der mesenchymalen und Verminderung der epithelialen Marker postulieren wir, dass OSM im Podozyten über eine Induktion von SNAIL eine Entdifferenzierung im Sinne einer EMT initiieren kann. Die Veränderungen in epithelialen und mesenchymalen Markern sind weitestgehend nicht signifikant, sodass der endgültige Beweis für dieses Postulat noch nicht erbracht ist. Dieser Nachweis könnte durch eine Erhöhung der Experimentanzahl und durch längere Beobachtungszeiträume sowie mit Hilfe von RT-PCR-Untersuchungen bestätigt werden. Außerdem sollten die gewonnenen Ergebnisse noch auf der Proteinebene bestätigt werden. Allerdings zeigen die vorliegenden Daten bereits einen deutlichen Trend, und gerade in Zusammenschau der Daten aus den Migrationsassays ist eine durch OSM induzierte Entdifferenzierung hin zum mesenchymalen Phänotyp durchaus plausibel.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig der Einfluss des Zytokins Oncostatin M (OSM) auf die Funktion des Podozyten untersucht. Folgende neue Erkenntnisse wurden erzielt: 1) OSM führt zu einer Steigerung der ERK, AKT/PKB und STAT3-vermittelten Signaltransduktion. 2) OSM bewirkt eine Zunahme der Migrationsfähigkeit von Podozyten in vitro. 3) OSM induziert eine Änderung der Genexpression: Steigerung mesenchymaler Markergene und Herunterregulation epithelialer Markergene, im Sinne einer Epithelial-zu-Mesenchymalen Transition.

Die Behandlung immortalisierter Podozyten mit OSM führt zu einer Steigerung der zellulären Signaltransduktion. Es ließ sich eine Steigerung der ERK-Kinasen, der AKT/PKB und der STAT3-Proteine nach weisen. Diese Signalwege spielen bei der Aktivierung und Steigerung zellulärer Proliferation, der Inhibition von Apoptose und der Inhibition von Fibrose sowie der Steigerung des Zellüberlebens und der Migration eine entscheidende Rolle. Die Behandlung mit OSM führt zu einer signifikanten Steigerung der Migrationsfähigkeit humaner Podozyten. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen wurde die podozytäre Migration durch die Stimulation mit OSM um 18,2% bis 44,4% gesteigert. Blockade des ERK- oder AKT/PKB-Signalwegs durch die entsprechenden pharmakologischen Inhibitoren verhinderte die OSM-induzierte

Motilitätssteigerung. Passend zur gesteigerten Motilität zeigte sich auf Ebene der Genexpression eine Entdifferenzierung vom epithelialen hin zum mesenchymalen Zellphänotyp. Es fand sich eine signifikante Steigerung der SNAIL-mRNA, einer der Hauptinduktoren der Epithelial-zu-Mesenchymalen Transition. (EMT). Konsekutiv reduzierte OSM im Podozyten die Expression epithelialer Marker, wie Cadherin-3 und erhöhte die Expression mesenchymaler Marker, wie Fibronectin 1 und Collagen I. In vivo könnte dieser Prozess für den Podozyten eine Antwort auf eine chronisch entzündliche Belastungssituation sein. Dabei ist möglich, dass der Podozyt hier versucht, durch die EMT und Migration zu defekten Arealen und anschließender Redifferenzierung zum Podozyten mögliche Schäden zu beheben. Möglich wäre aber auch, dass die beginnende EMT als Ausdruck des zunehmenden Untergangs und der Fibrosierung von Nierengewebe anzusehen ist. Dabei könnte die beginnende EMT eine Zunahme der Podozytopenie durch Reduktion der epithelialen Zelladhärenz mit nachfolgend vermehrter Zellablösung, begünstigen.

7. Ausblick

Die vorliegenden Daten lassen eine zytoprotektive aber auch eine destruktive Wirkung auf die Physiologie des Podozyten in vitro vermuten. Beides ist denkbar und wie so oft höchstwahrscheinlich abhängig von der Situation und anderen Kofaktoren, die auf den Podozyten einwirken. Die vorliegenden Ergebnisse ermutigen zur Untersuchung des Effekts von OSM auf weitere zelluläre Funktionen, wie Apoptose oder Proliferationsfähigkeit. Ein weiterer spannender Schritt wird die Untersuchung der Rolle von OSM bei verschiedenen Nierenerkrankungen im Tiermodell sein. Hier wird sich zeigen, ob Applikation oder die Blockade von OSM sich zu einem therapeutischen Ansatz bei inflammatorischen Nierenerkrankungen entwickeln könnte.

8. Literaturverzeichnis

1. Saxen, L. and H. Sariola, *Early organogenesis of the kidney*. *Pediatr Nephrol*, 1987. **1**(3): p. 385-92.
2. Shankland, S.J., *The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis*. *Kidney Int*, 2006. **69**(12): p. 2131-47.
3. Wiggins, R.C., *The spectrum of podocytopathies: a unifying view of glomerular diseases*. *Kidney Int*, 2007. **71**(12): p. 1205-14.
4. Adler, S. and X. Chen, *Anti-Fx1A antibody recognizes a beta 1-integrin on glomerular epithelial cells and inhibits adhesion and growth*. *Am J Physiol*, 1992. **262**(5 Pt 2): p. F770-6.
5. Kojima, K. and D. Kerjaschki, *Is podocyte shape controlled by the dystroglycan complex?* *Nephrol Dial Transplant*, 2002. **17 Suppl 9**: p. 23-4.
6. Ruotsalainen, V., et al., *Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(14): p. 7962-7.
7. Roselli, S., et al., *Podocin localizes in the kidney to the slit diaphragm area*. *Am J Pathol*, 2002. **160**(1): p. 131-9.
8. Ahola, H., et al., *A novel protein, densin, expressed by glomerular podocytes*. *J Am Soc Nephrol*, 2003. **14**(7): p. 1731-7.
9. Kerjaschki, D., D.J. Sharkey, and M.G. Farquhar, *Identification and characterization of podocalyxin--the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell*. *J Cell Biol*, 1984. **98**(4): p. 1591-6.
10. Farquhar, M.G., R.L. Vernier, and R.A. Good, *An electron microscope study of the glomerulus in nephrosis, glomerulonephritis, and lupus erythematosus*. *J Exp Med*, 1957. **106**(5): p. 649-60.
11. Lemley, K.V., et al., *Podocytopenia and disease severity in IgA nephropathy*. *Kidney Int*, 2002. **61**(4): p. 1475-85.
12. Steffes, M.W., et al., *Glomerular cell number in normal subjects and in type 1 diabetic patients*. *Kidney Int*, 2001. **59**(6): p. 2104-13.
13. Kriz, W. and K.V. Lemley, *The role of the podocyte in glomerulosclerosis*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 1999. **8**(4): p. 489-97.
14. Kim, Y.H., et al., *Podocyte depletion and glomerulosclerosis have a direct relationship in the PAN-treated rat*. *Kidney Int*, 2001. **60**(3): p. 957-68.
15. Cawston, T.E., et al., *The role of oncostatin M in animal and human connective tissue collagen turnover and its localization within the rheumatoid joint*. *Arthritis Rheum*, 1998. **41**(10): p. 1760-71.
16. Somers, W., M. Stahl, and J.S. Seehra, *1.9 A crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling*. *EMBO J*, 1997. **16**(5): p. 989-97.
17. Stahl, N., et al., *Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components*. *Science*, 1994. **263**(5143): p. 92-5.
18. Malik, N., et al., *Molecular cloning, sequence analysis, and functional expression of a novel growth regulator, oncostatin M*. *Mol Cell Biol*, 1989. **9**(7): p. 2847-53.
19. Jeffery, E., V. Price, and D.P. Gearing, *Close proximity of the genes for leukemia inhibitory factor and oncostatin M*. *Cytokine*, 1993. **5**(2): p. 107-11.
20. Bruce, A.G., P.S. Linsley, and T.M. Rose, *Oncostatin M*. *Prog Growth Factor Res*, 1992. **4**(2): p. 157-70.
21. Rose, T.M., et al., *Oncostatin M (OSM) inhibits the differentiation of pluripotent embryonic stem cells in vitro*. *Cytokine*, 1994. **6**(1): p. 48-54.
22. Zarling, J.M., et al., *Oncostatin M: a growth regulator produced by differentiated histiocytic lymphoma cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986. **83**(24): p. 9739-43.
23. Pelletier, J.P. and J. Martel-Pelletier, *Oncostatin M: foe or friend?* *Arthritis Rheum*, 2003. **48**(12): p. 3301-3.

24. Levy, M.T., M. Trojanowska, and A. Reuben, *Oncostatin M: a cytokine upregulated in human cirrhosis, increases collagen production by human hepatic stellate cells*. J Hepatol, 2000. **32**(2): p. 218-26.
25. Atamas, S.P. and B. White, *Cytokine regulation of pulmonary fibrosis in scleroderma*. Cytokine Growth Factor Rev, 2003. **14**(6): p. 537-50.
26. Znoyko, I., et al., *Comparative studies of oncostatin M expression in the tissues of adult rodents*. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 2005. **283**(1): p. 182-6.
27. Znoyko, I., et al., *Expression of oncostatin M and its receptors in normal and cirrhotic human liver*. J Hepatol, 2005. **43**(5): p. 893-900.
28. de Miguel, M.P., et al., *Ontogeny and localization of an oncostatin M-like protein in the rat testis: its possible role at the start of spermatogenesis*. Cell Growth Differ, 1997. **8**(5): p. 611-8.
29. Gomez-Lechon, M.J., *Oncostatin M: signal transduction and biological activity*. Life Sci, 1999. **65**(20): p. 2019-30.
30. Tanaka, M. and A. Miyajima, *Oncostatin M, a multifunctional cytokine*. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 2003. **149**: p. 39-52.
31. Hara, T., et al., *Cloning and biological activity of murine oncostatin M*. Leukemia, 1997. **11 Suppl 3**: p. 449-50.
32. Richards, C.D., et al., *Selective regulation of metalloproteinase inhibitor (TIMP-1) by oncostatin M in fibroblasts in culture*. J Immunol, 1993. **150**(12): p. 5596-603.
33. Gibbs, P., Q. Chen, and W.A. Robinson, *Effects of oncostatin M and tamoxifen on human melanoma cells*. Melanoma Res, 1998. **8**(3): p. 221-6.
34. Schrell, U.M., et al., *Formation of autocrine loops in human cerebral meningioma tissue by leukemia inhibitor factor, interleukin-6, and oncostatin M: inhibition of meningioma cell growth in vitro by recombinant oncostatin M*. J Neurosurg, 1998. **88**(3): p. 541-8.
35. Liu, J., et al., *Oncostatin M-specific receptor expression and function in regulating cell proliferation of normal and malignant mammary epithelial cells*. Cytokine, 1998. **10**(4): p. 295-302.
36. Murakami-Mori, K., et al., *AIDS-associated Kaposi's sarcoma (KS) cells express oncostatin M (OM)-specific receptor but not leukemia inhibitory factor/OM receptor or interleukin-6 receptor. Complete block of OM-induced KS cell growth and OM binding by anti-gp130 antibodies*. J Clin Invest, 1995. **96**(3): p. 1319-27.
37. Ihn, H. and K. Tamaki, *Oncostatin M stimulates the growth of dermal fibroblasts via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway*. J Immunol, 2000. **165**(4): p. 2149-55.
38. Tamura, S., et al., *Developmental expression pattern of oncostatin M receptor beta in mice*. Mech Dev, 2002. **115**(1-2): p. 127-31.
39. Gabay, C. and I. Kushner, *Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation*. N Engl J Med, 1999. **340**(6): p. 448-54.
40. Richards, C.D., et al., *Recombinant oncostatin M stimulates the production of acute phase proteins in HepG2 cells and rat primary hepatocytes in vitro*. J Immunol, 1992. **148**(6): p. 1731-6.
41. Brown, T.J., et al., *Regulation of IL-6 expression by oncostatin M*. J Immunol, 1991. **147**(7): p. 2175-80.
42. Cichy, J., et al., *Oncostatin M stimulates the expression and release of the IL-6 receptor in human hepatoma HepG2 cells*. J Immunol, 1997. **159**(11): p. 5648-53.
43. Korzus, E., et al., *The mitogen-activated protein kinase and JAK-STAT signaling pathways are required for an oncostatin M-responsive element-mediated activation of matrix metalloproteinase 1 gene expression*. J Biol Chem, 1997. **272**(2): p. 1188-96.

44. Silver, J.S. and C.A. Hunter, *gp130 at the nexus of inflammation, autoimmunity, and cancer*. J Leukoc Biol. **88**(6): p. 1145-56.
45. Luyckx, V.A., et al., *Oncostatin M pathway plays a major role in the renal acute phase response*. Am J Physiol Renal Physiol, 2009. **296**(4): p. F875-83.
46. Modur, V., et al., *Oncostatin M is a proinflammatory mediator. In vivo effects correlate with endothelial cell expression of inflammatory cytokines and adhesion molecules*. J Clin Invest, 1997. **100**(1): p. 158-68.
47. Wahl, A.F. and P.M. Wallace, *Oncostatin M in the anti-inflammatory response*. Ann Rheum Dis, 2001. **60 Suppl 3**: p. iii75-80.
48. Patthy, L., *Homology of a domain of the growth hormone/prolactin receptor family with type III modules of fibronectin*. Cell, 1990. **61**(1): p. 13-4.
49. Bazan, J.F., *Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(18): p. 6934-8.
50. Heinrich, P.C., et al., *Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway*. Biochem J, 1998. **334 (Pt 2)**: p. 297-314.
51. Taga, T. and T. Kishimoto, *Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 797-819.
52. Xu, D. and C.K. Qu, *Protein tyrosine phosphatases in the JAK/STAT pathway*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 4925-32.
53. Starr, R., et al., *A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling*. Nature, 1997. **387**(6636): p. 917-21.
54. Siewert, E., et al., *Different protein turnover of interleukin-6-type cytokine signalling components*. Eur J Biochem, 1999. **265**(1): p. 251-7.
55. Esashi, E., et al., *Oncostatin M deficiency leads to thymic hypoplasia, accumulation of apoptotic thymocytes and glomerulonephritis*. Eur J Immunol, 2009. **39**(6): p. 1664-70.
56. Rathje, M., et al., *A peptide derived from the CD loop-D helix region of ciliary neurotrophic factor (CNTF) induces neuronal differentiation and survival by binding to the leukemia inhibitory factor (LIF) receptor and common cytokine receptor chain gp130*. Eur J Cell Biol. **90**(12): p. 990-9.
57. Lindberg, R.A., et al., *Cloning and characterization of a specific receptor for mouse oncostatin M*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(6): p. 3357-67.
58. Ichihara, M., et al., *Oncostatin M and leukemia inhibitory factor do not use the same functional receptor in mice*. Blood, 1997. **90**(1): p. 165-73.
59. Gearing, D.P., et al., *The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor*. Science, 1992. **255**(5050): p. 1434-7.
60. Demyanets, S., et al., *Oncostatin M-enhanced vascular endothelial growth factor expression in human vascular smooth muscle cells involves PI3K-, p38 MAPK-, Erk1/2- and STAT1/STAT3-dependent pathways and is attenuated by interferon-gamma*. Basic Res Cardiol. **106**(2): p. 217-31.
61. Liu, H., et al., *Molecular dissection of human oncostatin M-mediated signal transductions through site-directed mutagenesis*. Int J Mol Med, 2009. **23**(2): p. 161-72.
62. Meloche, S., et al., *Biphasic and synergistic activation of p44mapk (ERK1) by growth factors: correlation between late phase activation and mitogenicity*. Mol Endocrinol, 1992. **6**(5): p. 845-54.
63. Lampugnani, M.G., *Cell migration into a wounded area in vitro*. Methods Mol Biol, 1999. **96**: p. 177-82.
64. Wijelath, E.S., et al., *Oncostatin M induces basic fibroblast growth factor expression in endothelial cells and promotes endothelial cell proliferation, migration and spindle morphology*. J Cell Sci, 1997. **110 (Pt 7)**: p. 871-9.

65. Strand, K., et al., *Induction of the urokinase plasminogen activator system by oncostatin M promotes endothelial migration*. J Cell Biochem, 2000. **79**(2): p. 239-48.
66. Albasanz-Puig, A., et al., *Oncostatin M is expressed in atherosclerotic lesions: a role for Oncostatin M in the pathogenesis of atherosclerosis*. Atherosclerosis. **216**(2): p. 292-8.
67. Demyanets, S., et al., *The inflammatory cytokine oncostatin M induces PAI-1 in human vascular smooth muscle cells in vitro via PI 3-kinase and ERK1/2-dependent pathways*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(3): p. H1962-8.
68. Zou, *Osteopontin promotes Mesenchymal Stem Cell Migration and Lessens Cell Stiffness via Integrin β 1, FAK and ERK pathways*. Cell Biochem Biophys, 2012.
69. Asanuma, K., et al., *Synaptopodin orchestrates actin organization and cell motility via regulation of RhoA signalling*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(5): p. 485-91.
70. Oh, H., et al., *Activation of phosphatidylinositol 3-kinase through glycoprotein 130 induces protein kinase B and p70 S6 kinase phosphorylation in cardiac myocytes*. J Biol Chem, 1998. **273**(16): p. 9703-10.
71. Nicholson, K.M. and N.G. Anderson, *The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy*. Cell Signal, 2002. **14**(5): p. 381-95.
72. Gingras, A.C., B. Raught, and N. Sonenberg, *Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR*. Genes Dev, 2001. **15**(7): p. 807-26.
73. Dennis, P.B., et al., *Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor*. Science, 2001. **294**(5544): p. 1102-5.
74. Martelli, A.M., et al., *Intranuclear 3'-phosphoinositide metabolism and Akt signaling: new mechanisms for tumorigenesis and protection against apoptosis?* Cell Signal, 2006. **18**(8): p. 1101-7.
75. Huber, T.B., et al., *Nephrin and CD2AP associate with phosphoinositide 3-OH kinase and stimulate AKT-dependent signaling*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(14): p. 4917-28.
76. Scaffidi, A.K., et al., *Oncostatin M stimulates proliferation, induces collagen production and inhibits apoptosis of human lung fibroblasts*. Br J Pharmacol, 2002. **136**(5): p. 793-801.
77. Xu, J., et al., *Protective effects of leukemia inhibitory factor against oxidative stress during high glucose-induced apoptosis in podocytes*. Cell Stress Chaperones. **17**(4): p. 485-93.
78. Weissenbach, M., et al., *Interleukin-6 is a direct mediator of T cell migration*. Eur J Immunol, 2004. **34**(10): p. 2895-906.
79. Lai, C.F., et al., *Separate signaling mechanisms are involved in the control of STAT protein activation and gene regulation via the interleukin 6 response element by the box 3 motif of gp130*. J Biol Chem, 1995. **270**(25): p. 14847-50.
80. Kaptein, A., V. Paillard, and M. Saunders, *Dominant negative stat3 mutant inhibits interleukin-6-induced Jak-STAT signal transduction*. J Biol Chem, 1996. **271**(11): p. 5961-4.
81. Bild, A.H., J. Turkson, and R. Jove, *Cytoplasmic transport of Stat3 by receptor-mediated endocytosis*. EMBO J, 2002. **21**(13): p. 3255-63.
82. Heim, M.H., *The Jak-STAT pathway: cytokine signalling from the receptor to the nucleus*. J Recept Signal Transduct Res, 1999. **19**(1-4): p. 75-120.
83. Akira, S., et al., *Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway*. Cell, 1994. **77**(1): p. 63-71.
84. Tian, S.S., et al., *Multiple signaling pathways induced by granulocyte colony-stimulating factor involving activation of JAKs, STAT5, and/or STAT3 are required*

- for regulation of three distinct classes of immediate early genes. *Blood*, 1996. **88**(12): p. 4435-44.
85. Bugno, M., et al., *Identification of the interleukin-6/oncostatin M response element in the rat tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) promoter*. *Nucleic Acids Res*, 1995. **23**(24): p. 5041-7.
 86. Chin, Y.E., et al., *Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT1*. *Science*, 1996. **272**(5262): p. 719-22.
 87. Caldenhoven, E., et al., *Stimulation of the human intercellular adhesion molecule-1 promoter by interleukin-6 and interferon-gamma involves binding of distinct factors to a palindromic response element*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(33): p. 21146-54.
 88. Yajima, T., et al., *Innate defense mechanism against virus infection within the cardiac myocyte requiring gp130-STAT3 signaling*. *Circulation*, 2006. **114**(22): p. 2364-73.
 89. Jacoby, J.J., et al., *Cardiomyocyte-restricted knockout of STAT3 results in higher sensitivity to inflammation, cardiac fibrosis, and heart failure with advanced age*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(22): p. 12929-34.
 90. Sarkozi, R., et al., *Oncostatin M is a novel inhibitor of TGF-beta1-induced matricellular protein expression*. *Am J Physiol Renal Physiol*. **301**(5): p. F1014-25.
 91. Kortylewski, M., et al., *Interleukin-6 and oncostatin M-induced growth inhibition of human A375 melanoma cells is STAT-dependent and involves upregulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1*. *Oncogene*, 1999. **18**(25): p. 3742-53.
 92. Halfter, H., et al., *Activation of the Jak-Stat- and MAPK-pathways by oncostatin M is not sufficient to cause growth inhibition of human glioma cells*. *Brain Res Mol Brain Res*, 2000. **80**(2): p. 198-206.
 93. Fossey, S.L., et al., *Oncostatin M promotes STAT3 activation, VEGF production, and invasion in osteosarcoma cell lines*. *BMC Cancer*. **11**: p. 125.
 94. Stross, C., et al., *Oncostatin M receptor-mediated signal transduction is negatively regulated by SOCS3 through a receptor tyrosine-independent mechanism*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(13): p. 8458-68.
 95. Chattopadhyay, S., et al., *Interleukin-31 and oncostatin-M mediate distinct signaling reactions and response patterns in lung epithelial cells*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(5): p. 3014-26.
 96. Schmitz, J., et al., *SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(17): p. 12848-56.
 97. Nicholson, S.E., et al., *Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(12): p. 6493-8.
 98. Marine, J.C., et al., *SOCS3 is essential in the regulation of fetal liver erythropoiesis*. *Cell*, 1999. **98**(5): p. 617-27.
 99. Liu, Q., et al., *Suppressors of cytokine signaling inhibit tubular epithelial cell-myofibroblast transdifferentiation*. *Am J Nephrol*. **34**(2): p. 142-51.
 100. Wu, Y. and B.P. Zhou, *Snail: More than EMT*. *Cell Adh Migr*. **4**(2): p. 199-203.
 101. Carew, R.M., B. Wang, and P. Kantharidis, *The role of EMT in renal fibrosis*. *Cell Tissue Res*. **347**(1): p. 103-16.
 102. Diaz, R., et al., *Evidence for the epithelial to mesenchymal transition in biliary atresia fibrosis*. *Hum Pathol*, 2008. **39**(1): p. 102-15.

103. Yang, J. and Y. Liu, *Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis*. Am J Pathol, 2001. **159**(4): p. 1465-75.
104. Iwano, M., et al., *Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis*. J Clin Invest, 2002. **110**(3): p. 341-50.
105. Li, Y., et al., *Epithelial-to-mesenchymal transition is a potential pathway leading to podocyte dysfunction and proteinuria*. Am J Pathol, 2008. **172**(2): p. 299-308.
106. Hotz, B., et al., *Beyond epithelial to mesenchymal transition: a novel role for the transcription factor Snail in inflammation and wound healing*. J Gastrointest Surg. **14**(2): p. 388-97.
107. Cano, A., et al., *The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(2): p. 76-83.
108. Carver, E.A., et al., *The mouse snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(23): p. 8184-8.
109. Moody, S.E., et al., *The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence*. Cancer Cell, 2005. **8**(3): p. 197-209.
110. Thiery, J.P. and J.P. Sleeman, *Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(2): p. 131-42.
111. Pollack, V., et al., *Oncostatin M-induced effects on EMT in human proximal tubular cells: differential role of ERK signaling*. Am J Physiol Renal Physiol, 2007. **293**(5): p. F1714-26.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

28.08.2013, Manuel Rabani, geb. Meinhardt