

# Untersuchungen zur Rolle von Notch-3 Rezeptoren in experimentellen Schädigungsmodellen der Niere

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der RWTH Aachen  
University zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften  
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologin

Sonja Djudjaj

aus

Würselen



# Untersuchungen zur Rolle von Notch-3 Rezeptoren in experimentellen Schädigungsmodellen der Niere

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der RWTH Aachen  
University zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften  
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologin

Sonja Djudjaj

aus

Würselen

Berichter: Universitätsprofessor  
Dr. med. Peter R. Mertens

Universitätsprofessor  
Dipl. Ing. Dr. Werner Baumgartner

Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.2012

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Inmitten der Schwierigkeiten  
liegt die Möglichkeit.

Albert Einstein

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>4</b>
1.1 DER NOTCH-SIGNALTRANSDUKTIONSWEG .....	4
1.1.1 Funktionen der Notch-Signaltransduktion .....	5
1.1.2 Struktureller Aufbau der Notch-Rezeptoren .....	6
1.1.3 Liganden der Notch-Rezeptoren .....	8
1.1.4 Die Notch-Signalkaskade.....	8
1.1.5 Modulatoren der Notch-Signaltransduktion.....	10
1.2 NOTCH-ASSOZIIERTE ERKRANKUNGEN .....	11
1.3 EXPRESSION VON NOTCH-REZEPTOREN IN DER NIERE.....	12
1.4 ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	14
<b>2. MATERIAL</b> .....	<b>15</b>
2.1 GERÄTE .....	15
2.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	16
2.3 REAGENZIEN .....	16
2.4 INHIBITOREN UND STIMULANZIEN.....	18
2.5 REAKTIONSKITS.....	19
2.6 PRIMER UND SONDEN.....	19
2.7 ANTIKÖRPER .....	20
2.8 PLASMIDE .....	21
2.9 ZELLINIEN.....	21
2.10 BAKTERIENSTÄMME .....	22
2.11 SOFTWARE.....	22
<b>3. METHODEN</b> .....	<b>23</b>
3.1 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	23
3.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	23
3.1.2 Transiente Transfektion von NRK52E Zellen mit TransIT-LT1 .....	23
3.1.3 Proliferations-Bestimmung .....	23
3.2 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN .....	24
3.2.1 Kultivierung und Lagerung von Bakterienkulturen.....	24
3.2.2 Herstellung Hitzeschock-kompetenter E.coli.....	24
3.2.3 Hitzeschock-Transformation von E.coli.....	25
3.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA .....	25
3.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN .....	26
3.3.1 RNA-Isolation aus eukaryotischen Zellen.....	26
3.3.2 Herstellung von komplementärer DNA (complementary DNA, cDNA).....	26

3.3.3	<i>Quantifizierung von Nukleinsäuren</i> .....	27
3.3.4	<i>Polymerase-Ketten-Reaktion (reverse transcription, RT-PCR)</i> .....	27
3.3.5	<i>Echtzeit-Polymerase-Ketten-Reaktion (quantitative real time PCR, qRT-PCR)</i> .....	28
3.4	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN .....	29
3.4.1	<i>Herstellung von Zellysaten</i> .....	29
3.4.2	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i> .....	29
3.4.3	<i>Transfer auf Nitrozellulosemembran</i> .....	30
3.4.4	<i>Immundetektion</i> .....	31
3.5	TIEREXPERIMENTELLE METHODIK.....	31
3.5.1	<i>Tierhaltung</i> .....	31
3.5.2	<i>Induktion der Glomerulonephritis</i> .....	31
3.5.3	<i>Einseitige Ureter Ligatur</i> .....	32
3.5.4	<i>Urinanalyse</i> .....	32
3.5.5	<i>Serumanalyse</i> .....	32
3.5.6	<i>Gewebe-Entnahme und Fixation</i> .....	33
3.5.7	<i>RNA-Isolation aus Gewebe</i> .....	33
3.5.8	<i>Lysatherstellung aus Gewebe</i> .....	34
3.6	HISTOLOGISCHE METHODEN.....	34
3.6.1	<i>Herstellen der Gewebeschnitte</i> .....	34
3.6.2	<i>Entparaffinieren der Gewebeschnitte</i> .....	34
3.6.3	<i>PAS-Färbung</i> .....	34
3.6.4	<i>Siriusrot-Färbung</i> .....	35
3.6.5	<i>TUNEL-Färbung</i> .....	35
3.6.6	<i>Immunhistologische Färbungen</i> .....	36
3.6.7	<i>Morphometrische Auswertung</i> .....	37
3.6.8	<i>Evaluation proliferierender und apoptotischer Zellen</i> .....	37
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>38</b>
4.1	<b>TGF-<math>\beta</math>1 ALS INDUKTOR DER NOTCH-REZEPTOREN IN MESANGIALZELLEN</b> .....	<b>38</b>
4.2	<b>NOTCH-3 REZEPTOR-EXPRESSION BEI DER NEPHROTOXISCHEN NEPHRITIS (NTN)</b> .....	<b>40</b>
4.3	<b>VERGLEICH DER DURCH NTN-INDUZIERTEN SCHÄDIGUNG IN NOTCH-3 KO UND WILD-TYP-MÄUSEN</b>	<b>42</b>
4.4	<b>EXPRESSION DES REZEPTORS NOTCH-3 NACH NTN IN DDR1 <i>KNOCKOUT</i>-MÄUSEN</b> .....	<b>49</b>
4.5	<b>EXPRESSION DES REZEPTORS NOTCH-3 NACH UNILATERALER URETEROBSTRUKTION (UUO)</b> .....	<b>50</b>
4.6	<b>REZEPTOR NOTCH-3 DEPLETION WIRKT RENOPROTEKTIV BEI UUO-INDUZIERTER SCHÄDIGUNG</b> .....	<b>53</b>
4.7	<b>EXPRESSION WEITERER KOMPONENTEN DER NOTCH-SIGNALTRANSDUKTION NACH UUO</b> .....	<b>54</b>
4.8	<b>VERGLEICH DER DURCH UUO-INDUZIERTEN FIBROSE IN NOTCH-3 -/- UND WILD-TYP-MÄUSEN</b> .....	<b>56</b>
4.9	<b>EINFLUSS DER NOTCH-3 DEFIZIENZ AUF DIE EPITHELIAL-MESENCHYMIALE TRANSITION</b> .....	<b>60</b>

4.10 REZEPTOR NOTCH-3 DEFIZIENZ REDUZIERT DIE INTERSTITIELLE FIBROSE UND DIE EINWANDERUNG INFLAMMATORISCHER ZELLEN NACH UUO .....	62
4.11 NOTCH-3 BEEINFLUSST SOWOHL <i>IN VIVO</i> ALS AUCH <i>IN VITRO</i> DIE ZELLPROLIFERATION .....	64
4.12 EXPRESSION VON NOTCH-REZEPTOREN UND LIGANDEN IN ENTZÜNDLICHEN GLOMERULÄREN UND TUBULOINTERSTITIELLEN HUMANEN ERKRANKUNGEN .....	67
<b>5. DISKUSSION .....</b>	<b>70</b>
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>79</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>81</b>
<b>8. ANHANG.....</b>	<b>89</b>
8.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	89
8.2 DANKSAGUNG.....	93
8.3 LEBENSLAUF.....	94
8.4 PUBLIKATIONSLISTE .....	95

## 1. Einleitung

### 1.1 Der Notch-Signaltransduktionsweg

Für die Entwicklung der Vielzahl von Zelltypen in multizellulären Organismen stellt der Notch-Signalweg eine wichtige Transduktionskaskade dar. Er ist beteiligt an zentralen Mechanismen wie Apoptose, Proliferation, Differenzierung, Erhalt von Stammzellen und der Ausbildung von Gewebegrenzen, sowie an Myogenese, Neurogenese und Gliogenese<sup>1-4</sup>.

Notch-Rezeptoren wurden erstmals zu Beginn des 20. Jahrhunderts von Thomas Hunt Morgan in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* beschrieben. Heterozygote Tiere mit nur einem funktionstüchtigen Notch-Allel (Haploinsuffizienz) weisen verschiedene Entwicklungsstörungen auf. Charakteristisch sind Kerben am Flügelrand, die als „notched wings“ (gekerbte Flügel) bezeichnet werden und dem Rezeptor seinen Namen verliehen<sup>5</sup>.

In *Drosophila* gibt es einen Notch-Rezeptor und zwei membrangebundene Liganden: Delta und Serrate. In Vertebraten sind bisher vier verschiedene Isoformen (Notch-1 bis -4) und sechs membranständige Liganden (Delta-1, -2, -3, -4 und Jagged-1, -2) beschrieben (Tabelle 1)<sup>6-10</sup>. Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass auch lösliche Liganden wie das *Y-box* Protein-1 (YB-1) existieren<sup>11</sup>.

Der durch die Ligand-Rezeptor-Interaktion vermittelte Signaltransduktionsweg stellt einen evolutionär hoch konservierten Mechanismus dar, der eine lokale Zell-Zell-Kommunikation benachbarter Zellen erlaubt<sup>12, 13</sup>. Das exakte Zusammenspiel der verschiedenen Rezeptoren, Liganden und zusätzlicher Regulatoren ist bisher erst fragmentarisch geklärt. Sicher ist aber, dass Störungen im Notch-Signaltransduktionsweg zu Entwicklungsstörungen, Erkrankungen und Onkogenese führen (s. Kapitel 1.2).

	<i>Drosophila</i>	<i>C. elegans</i>	<i>Xenopus</i>	Huhn	Säugetiere
Rezeptor	Notch	Lin-12	xNotch1/ Xotch	cNotch	Notch-1 Notch-2 Notch-3 Notch-4
Ligand	Delta	Lag-2	xDelta-1 xDelta-2	cDelta-1 cDelta-2	Dll-1 Dll-2 Dll-3 Dll-4
	Serrate	Apx-1		c-Serrate-1 c-Serrate-2	Jagged-1 Jagged-2
Mediator	Suppressor of hairless (Su(H))	Lag-1	xSu(H)		Su(H)/RBP-Jκ/CBF1

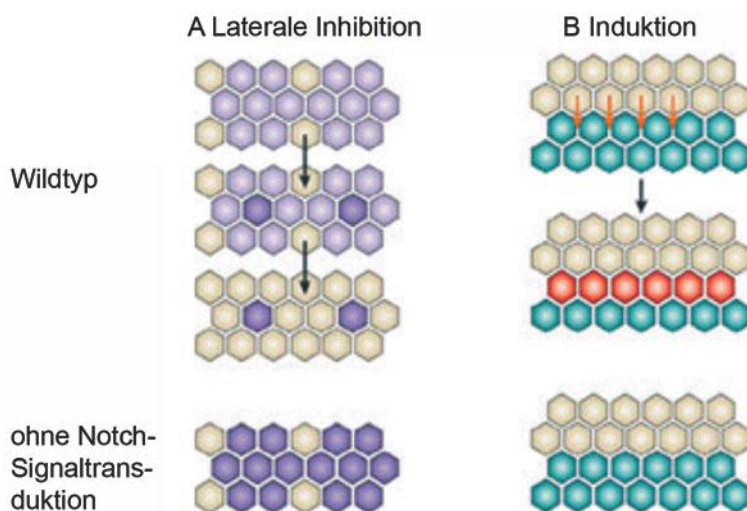
**Tabelle 1: Nomenklatur der Proteine, die in der Notch-Signaltransduktion involviert sind** (nach Beatus und Lendahl, 1998)



### 1.1.1 Funktionen der Notch-Signaltransduktion

Notch-Signalwege nehmen an verschiedenen Entwicklungsvorgängen teil, wobei ihre Wirkungsweise im Wesentlichen auf zwei Mechanismen zurückgeführt werden kann : A) Laterale Inhibition und B) Induktion <sup>2</sup>.

Im Rahmen der peripheren Neurogenese von *Drosophila melanogaster* exprimieren gleichartige Vorläuferzellen zunächst gleiche Mengen an Notch-Rezeptoren und Liganden. Jede Zelle im Zellverband sendet über den Notch-Signaltransduktionsweg in gleicher Weise hemmende Signale aus und unterbindet die Zelldifferenzierung. Geringe stochastische Mengenunterschiede in einer Zelle führen dazu, dass diese Zelle ausdifferenziert und gleichzeitig stärkere hemmende Signale an ihre Nachbarzellen sendet, so dass diese gehindert werden, sich in die gleiche Differenzierungslinie zu entwickeln <sup>13</sup>. Ein klassisches Beispiel für dieses als „laterale Hemmung“ bezeichnete Prinzip ist die Entwicklung von *Drosophila* Sinneszellen. Vorläuferzellen mit einem hohen Notch-Rezeptor-Gehalt differenzieren zu epithelialen Zellen, während sich Vorläuferzellen mit geringer Notch-Expression zu Sinneszellen entwickeln (Abbildung 1 A) <sup>14</sup>.



**Abbildung 1: Laterale Hemmung und induktiver Signalweg (aus Haines und Irvine, 2003)** Der Notch-Signalweg beeinflusst die Zellentwicklung. (A) Laterale Hemmung: eine Gruppe von äquivalenten Vorläuferzellen (hell violett) signalisieren über den Notch-Signalweg und inhibieren so gegenseitig ihre Differenzierung. Ändert sich in einer Zelle aus dem Zellverband der Notch-Gehalt minimal (dunkel violett) resultiert daraus ein anderes Zellschicksal für die restlichen Zellen im Verband (beige). Ohne Notch-Signaltransduktion würden alle Zellen im Verband zum selben Zelltyp ausdifferenzieren. (B) Induktiver Signalweg: Eine Zellgruppe (beige) signalisiert (orange Pfeile) benachbarten Zellen (grün) über den Notch-Signalweg ein anderes Zellschicksal an der angrenzenden Oberfläche zu induzieren (rot).

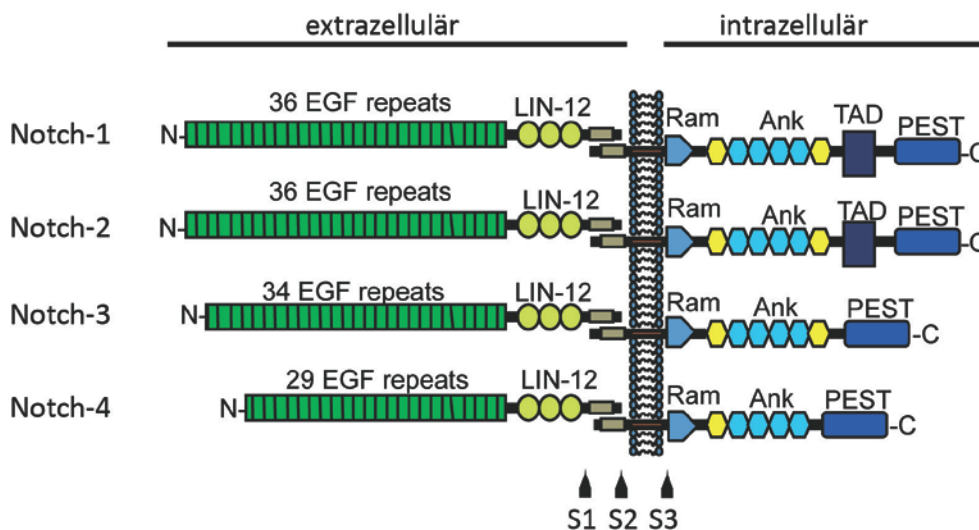
Beim induktiven Signalweg sind zwei verschiedene Zelltypen beteiligt, die entweder Rezeptoren oder Liganden exprimieren. Durch Rezeptor-Ligand-Interaktion entsteht ein induktives Signal. Dieses Signal ist zeitlich und räumlich begrenzt und löst daher nur in einem Teil der Zellpopulation die Zelldifferenzierung aus (Abbildung 1 B) <sup>14</sup>.

In Vertebraten konnte Notch auf hämatopoetischen Stammzellen nachgewiesen werden. Von großer Bedeutung ist Notch bei der Differenzierung von B- und T-Zellen<sup>15, 16</sup>. So führt eine Inaktivierung von Notch-1 in Knochenmarksvorläuferzellen dazu, dass im Thymus weniger T-Zellen und mehr B-Zellen reifen<sup>17-19</sup>. Somit scheint Notch-1 die Entwicklung zu B-Zellen zu unterdrücken und die T-Zellentwicklung zu fördern. Hingegen hat eine Inaktivierung der anderen Notch-Rezeptoren keinen Einfluss auf die T-Zellentwicklung<sup>20-24</sup>. Mehrere Studien weisen darauf hin, dass die Notch-vermittelte Signaltransduktion auch den Zellzyklus, die Proliferation und die Apoptose beeinflusst<sup>25-29</sup>.

Die zahlreichen Effekte der Notch-Signalgebung hängen vermutlich vom Entwicklungsstand ab und beruhen auf zeitlichen und räumlichen Unterschieden bezüglich der Expression verschiedener Rezeptor-Liganden-Paarungen sowie auf unterschiedlichen Signalstärken.

### 1.1.2 Struktureller Aufbau der Notch-Rezeptoren

In Vertebraten sind bisher vier verschiedene Notch-Rezeptor-Homologe identifiziert worden (Notch-1 bis -4). Notch-1 und Notch-2 zeigen untereinander die größten Homologien, während Notch-3 und Notch-4 strukturelle Unterschiede zu Notch-1 und -2 aufweisen (Abbildung 2). Notch-Rezeptoren gehören den Typ 1 Transmembranproteinen an, sie besitzen nur eine Transmembrandomäne, einen intrazellulär lokalisierten C-Terminus und einen extrazellulären N-Terminus.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der humanen Notch-Rezeptoren (Notch-1 bis -4)** Notch-Rezeptoren werden als nicht-kovalent gebundene Heterodimere an der Zelloberfläche exprimiert. Der N-terminale, extrazelluläre Bereich besteht aus 29-36 EGF (*epidermal growth factor-like*) Wiederholungssequenzen, gefolgt von drei Lin12 Domänen (LIN12). Auf der intrazellulären Seite schließen sich subtransmembranär eine RAM-Domäne und mit NLS (*nuclear localization signal*)-Sequenzen flankierte Ankyrin (Ank) Wiederholungsdomänen an. Notch-1 und Notch-2 Rezeptoren besitzen zusätzlich eine transkriptionelle Aktivierungsdomäne (TAD). C-terminal befindet sich die PEST-Region, deren 20 Aminosäuren vorwiegend aus Prolin, Glutamin, Serin und Threonin bestehen. Die Rezeptoren durchlaufen posttranslational eine Reihe von Spaltungen (S1-3). Die erste proteolytische Spaltung findet im Golgi-Apparat statt. Die Spaltungen S2 und S3 erfolgen nach Aktivierung der Rezeptoren durch Ligandenbindung.

Im N-terminalen Bereich befinden sich zahlreiche *epidermal growth factor-like domains* (EGF-Domänen), gefolgt von drei Lin12 Wiederholungsdomänen, die die sogenannte LNR- (Lin12/Notch *repeats*) Region bilden. Über die EGF-Domänen wird die Ligandenbindung vermittelt, während die LNR-Region eine von Liganden unabhängige Rezeptoraktivierung unterdrückt<sup>30-32</sup>. Die Anzahl der EGF-Domänen variiert bei den unterschiedlichen Notch-Rezeptoren und zwischen den Spezies, so wurden 10 bis 36 Domänen gefunden<sup>9, 10</sup>. Jede EGF-Domäne besteht aus sechs konservierten Cystein-Resten, die untereinander drei Disulfidbrücken ausbilden<sup>13</sup>. Der Transmembrandomäne folgen verschiedene Motive, die an der Signalgebung beteiligt sind. Das RBP-Jκ assoziierte Modul (RAM) enthält eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor CBF-1 (C Promotor Bindungsfaktor 1). Dies stellt ein humanes Homolog zu *Drosophila Suppressor of Hairless* Su(H) dar<sup>33</sup>. Die anschließenden Ankyrin-Wiederholungsdomänen, die von *nuclear localization signal* (NLS)-Sequenzen flankiert werden, sind an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt und interagieren mit CBF-1 und Modulatoren wie Deltex und Mastermind<sup>30, 31, 34, 35</sup>. Die Rezeptoren Notch-1 und Notch-2 besitzen zudem eine Transaktivierungsdomäne (TAD), die für die Transkription einiger Zielgene benötigt wird<sup>36</sup>. Am C-terminalen Ende befindet sich eine Region, die vorwiegend aus den Aminosäuren Prolin, Glutamin, Serin und Threonin (PEST-Domäne) besteht und zur Stabilität des Proteins beiträgt<sup>37</sup>.

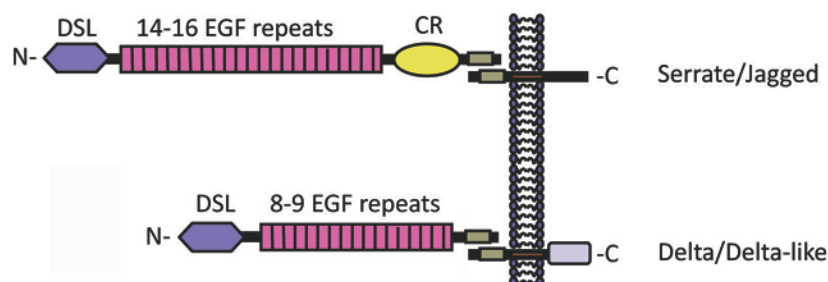
Die Notch-Rezeptoren werden als etwa 300 kDa große Vorläuferproteine im Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und während des Transports an die Zelloberfläche prozessiert. Im *trans*-Golgi Netzwerk spaltet an der sogenannten S1-Spaltstelle eine Furin-ähnliche Konvertase das Vorläuferprotein proteolytisch in die extrazelluläre (etwa 210 kDa) und intrazelluläre Domäne (etwa 97 kDa)<sup>38</sup>. An der Zelloberfläche bilden beide Domänen kalziumabhängig ein nicht kovalent gebundenes, heterodimeres Rezeptorprotein. Die Entfernung von Kalzium durch 0,1 % SDS oder Chelatoren wie EDTA führen in der Zellkultur zu einer Rezeptoraktivierung<sup>39</sup>.

Das Notch-3 Gen (*accession no.*: 00000263388) kodiert für ein aus 2321 Aminosäuren bestehendes Protein, das extrazellulär 34 EGF-Domänen, 3 Cystein-reiche LNR-Regionen sowie trans- und intrazelluläre Rezeptorabschnitte enthält, jedoch keine Transaktivierungsdomäne<sup>9</sup>.

### 1.1.3 Liganden der Notch-Rezeptoren

Mehrere Liganden für die Notch-Rezeptoren sind in Vertebraten und Invertebraten identifiziert worden. Bei den Liganden handelt es sich, wie bei den Rezeptoren selbst, um Typ 1 Transmembranproteine, die der DSL (*Delta/Serrate/Lag2*) Proteinfamilie angehören. In *Drosophila* existieren zwei Liganden, Delta und Serrate. In Wirbeltieren konnten entsprechende Proteinhomologe identifiziert werden, Delta-like-1 (Dll-1), Delta-like-2 (Dll-2), Delta-like-3 (Dll-3), Delta-like-4 (Dll-4) sowie die Serrate-Orthologe Jagged-1 und Jagged-2<sup>2, 40</sup>.

Alle Notch-Liganden weisen eine große extrazelluläre Domäne auf, im N-terminalen Bereich ein DSL-Motiv gefolgt von EGF-ähnlichen Wiederholungen. Die EGF-ähnlichen Wiederholungen und die DSL-Domänen sind an der Notch-Rezeptor-Bindung beteiligt, wobei die DSL-Domäne die wichtigste minimale Einheit zur Bindung und Aktivierung der Notch-Rezeptoren darstellt<sup>41, 42</sup>. Im Unterschied zu der Gruppe der Delta-Liganden enthält die Gruppe der Serrate-Liganden zusätzlich noch mehrere Cystein-reiche Regionen (CR). Die intrazellulären Domänen der Liganden sind relativ klein und weisen im Gegensatz zu den Notch-Rezeptoren untereinander kaum strukturelle Ähnlichkeiten auf (Abbildung 3).

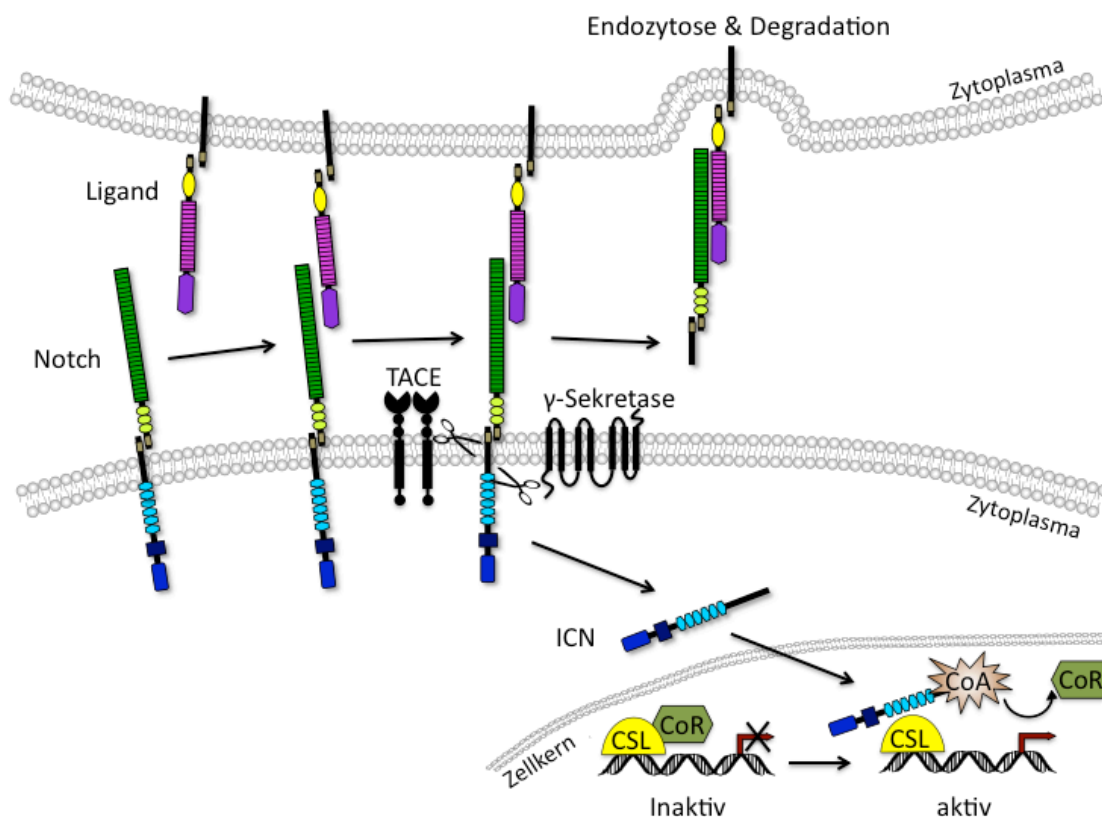


**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Notch-Liganden-Familien Serrate/Jagged und Delta/Delta-like (nach Guidos 2002)** Die Notch-Liganden Serrate/Jagged und Delta/Delta-like weisen hauptsächlich extrazelluläre Domänen auf. Diese besitzen im N-Terminus ein DSL-Motiv, gefolgt von EGF (*epidermal growth factor-like*) Wiederholungen. Bei Serrate/Jagged-Liganden liegen zusätzlich noch Cystein-reiche Regionen (CR) vor.

### 1.1.4 Die Notch-Signalkaskade

Die extrazelluläre Bindung eines Liganden an den Notch-Rezeptor induziert zwei proteolytische Spaltungsprozesse innerhalb des Rezeptors. Die erste Spaltung wird durch die ADAM-Metalloprotease TACE (*tumor necrosis factor  $\alpha$ -converting enzyme*) vermittelt, die den Rezeptor an der sogenannten S2-Spaltungsstelle (s. Abbildung 2) nahe der Transmembrandomäne spaltet<sup>2, 43, 44</sup>. Die abgespaltene extrazelluläre Domäne wird durch die Liganden-exprimierende Zelle endozytiert. Die zweite proteolytische Spaltung findet innerhalb der Transmembrandomäne an der S3-Spaltungsstelle durch eine Presenilin-abhängige  $\gamma$ -

Sekretase statt <sup>45</sup>. Die freigesetzte intrazelluläre zytoplasmatische Notch-Domäne (ICN) wird in den Zellkern transloziert, interagiert mit einem basischen helix-loop-helix (bHLH) Transkriptionsfaktor der CSL-Familie (CBF im Menschen, RBPJ- $\kappa$  in der Maus, *Supressor of Hairless* [Su(H)] in *Drosophila*, Lag1 in *C.elegans*) und verwandelt diesen mit Hilfe von Modulatoren (s. Kapitel 1.1.5) von einem transkriptionellen Repressor in einen transkriptionellen Aktivator und initiiert somit die Transkription der Zielgene (Abbildung 4) <sup>2</sup>  
46-48.



**Abbildung 4: Die Notch-Signaltransduktion (nach Radtke 2002)** Die Notch-Signalkaskade wird durch die Bindung eines Liganden initiiert. Zwei proteolytische Spaltungen folgen, die erste innerhalb der extrazellulären Domäne durch die ADAM-Metalloprotease TACE (*tumor necrosis factor  $\alpha$ -converting enzyme*). Die abgespaltene extrazelluläre Domäne des Rezeptors wird von der benachbarten, Liganden-exprimierenden Zelle endozytiert. Die zweite Spaltung innerhalb der Transmembrandomäne wird durch eine  $\gamma$ -Sekretase vermittelt. Die freigesetzte intrazelluläre Domäne von Notch (ICN) transloziert in den Zellkern und bindet an den Transkriptionsfaktor CSL (CBF1 im Menschen, RBPJ- $\kappa$  in der Maus, *Supressor of Hairless* in *Drosophila* und LAG in *C. elegans*). Diese Interaktion führt zur Verdrängung des Corepressors (CoR) und simultaner Rekrutierung des Coaktivators (CoA) und somit zur transkriptionellen Aktivierung der Zielgene.

Primäre Zielgene der Notch-Signaltransduktion sind die transkriptionellen Repressoren der *Enhancer of split* [E(spl)] in *Drosophila* <sup>12</sup> sowie HES- (*Hairy/Enhancer of Split*) und HERP- (*HES-related repressor protein*: Hey, HRT, Hesr, CHF, gridlock) Gene bei Säugetieren <sup>49</sup>.

HES-1 wird in Zellen epithelialer und mesodermaler Herkunft exprimiert und spielt eine Rolle in der embryonalen Gehirnentwicklung von Säugetieren. Erst durch verminderte HES-1 Expression differenzieren neuronale Vorläuferzellen zu Neuronen und Gliazellen. HES-1 *knockout* Mäuse weisen eine verfrühte neuronale Differenzierung auf, mit Augen- und

Gehirndefekten. Die Mäuse sterben spätestens kurz nach der Geburt<sup>50</sup>. Neben HES-1 sind bisher fünf weitere Mitglieder der HES-Genfamilie bekannt: HES-2, -3, -5, -6 und -7<sup>51</sup>. Die Effekte der Notch-Rezeptoren auf die Genregulation sind Gegenstand der aktuellen Forschung. Bisher konnte gezeigt werden, dass Notch-1 Rezeptoren im Gegensatz zu Notch-3 Rezeptoren starke Aktivatoren der HES-1 und HES-5 Promotoren in verschiedenen Zelltypen sind<sup>52</sup>. Über den Effekt von Notch-3 auf den HES-1 Promotor existieren widersprüchliche Ergebnisse. Beatus et al. beschreiben eine Hemmung der Notch-1-vermittelten HES-1 Aktivierung durch den Rezeptor Notch-3<sup>46</sup>. Shimizu et al. beobachten dagegen eine starke Transaktivierung des HES-1 Promotors durch Notch-3<sup>47</sup>. Der HES-5 Promotor wird durch Notch-1 und durch Notch-3 Rezeptoren, jedoch nicht durch Notch-2 Rezeptoren aktiviert. Als mögliche Ursache für diese divergierenden Beobachtungen wird das Ausmaß der CSL-Expression angenommen. HES-2 war bis vor kurzem nicht als Zielgen der Notch-Rezeptoren beschrieben<sup>53</sup>. In eigenen Vorarbeiten konnte unsere Arbeitsgruppe jedoch zeigen, dass Notch-3 den HES-2 Promotor transaktiviert<sup>11</sup>.

Gene der HERP-Familie werden vorrangig in der Gefäßmuskulatur embryonaler Gewebe exprimiert. Eine Aktivierung der Hey-1, Hey-2 und Hey-L Promotoren durch alle vier Notch-Rezeptoren wurde nachgewiesen.

Weitere Zielgene umfassen Mediatoren des Zellzyklus, wie p21<sup>chip/waf1</sup> und Cyclin D1, sowie Transkriptionsfaktoren der NF- $\kappa$ B- und der PPAR (*peroxisome proliferator activated receptor*)-Familie<sup>54-57</sup>.

Der Notch-Signaltransduktionsweg reguliert demnach in Abhängigkeit von der Rezeptor-Ligand-Paarung, dem Zelltyp sowie dem Differenzierungsstadium der Zelle unterschiedliche Zielgene.

### 1.1.5 Modulatoren der Notch-Signaltransduktion

Der Notch-Signalweg wird durch Modulatoren beeinflusst, die die Endozytose und die Affinität der Liganden zu dem Rezeptor regulieren<sup>58</sup>.

#### Fringe:

*Fringe*-Proteine gehören zu den Glycosyltransferasen ( $\beta$ 1,3 N-Aceetylglucosaminyl Transferase). Über posttranslationale Modifikationen reguliert *Fringe* die Fähigkeit des Liganden, Rezeptoren zu aktivieren. In Säugern sind drei *Fringe*-Gene bekannt: *lunatic*, *manic* und *radical Fringe*<sup>59</sup>. *Fringe* katalysiert im Golgi-Apparat die Anheftung von O-Fucose an Serin- und Threoninreste der EGF-Domäne des Notch-Vorläuferproteins<sup>60</sup>. Nach

dieser Glycosylierung können nur noch Liganden der Delta-Familie, nicht aber der Serrate/Jagged-Familie, an den Rezeptor binden und diesen aktivieren <sup>61</sup>.

### Numb:

*Numb* ist ein zytoplasmatisches Protein, welches die Notch-Signaltransduktion hemmt <sup>2</sup>. In der Entwicklung des peripheren Nervensystems bei *Drosophila* und in der Maus wird *Numb* asymmetrisch auf die Tochterzellen verteilt. Dadurch wird in Zellen mit *Numb*-Expression der Notch-Signalweg unterdrückt und die neuronale Differenzierung eingeleitet <sup>62, 63</sup>. *Numb* ist an der Endozytose beteiligt, indem es an  $\alpha$ -Adaptin bindet.  $\alpha$ -Adaptin ist Bestandteil des Adaptorproteins-2 (AP2) Komplexes, welcher bei der Beladung von Vesikeln zur Endozytose beteiligt ist. *Numb* bindet an Notch-Rezeptoren und  $\alpha$ -Adaptin und rekrutiert Notch so direkt in Endozytosevesikel <sup>64</sup>.

### Ubiquitinierung:

Der Notch-Signalweg wird durch mehrere E3-Ubiquitin-Ligasen reguliert. Diese haben den Rezeptor oder Komponenten des Signalweges als Substrat und steuern die Degradation. Zu den E3-Ubiquitin-Ligasen gehören *Mindbomb*, *Neutralized*, *Deltex* und *Su(dx)/Itch*. *Su(dx)/Itch* sind negative Regulatoren der Notch-Signaltransduktion <sup>2</sup>. Sie binden N-terminal an der intrazellulären Notch-Domäne und fördern somit ihren Abbau <sup>65</sup>. *Deltex* bindet ebenfalls an intrazelluläre Domänen und wirkt antagonistisch zu *Su(dx)/Itch*. *Neutralized* und *Mindbomb* bewirken dagegen den Abbau der Liganden <sup>58</sup>.

## 1.2 Notch-assoziierte Erkrankungen

Mutationen innerhalb der Notch-Rezeptoren führen in Mäusen zu Entwicklungsstörungen während der Embryogenese. Auch im Menschen sind Erkrankungen wie das CADASIL-Syndrom (cerebrale autosomal-dominante Arteriopathie mit subcorticalen Infarkten und Leukoencephalopathie) auf Mutationen im Notch-Gen, in diesem Fall im Notch-3 Gen, zurückzuführen <sup>66</sup>. Beim CADASIL-Syndrom liegt eine Veränderung der zerebralen Gefäße vor, die auf eine Fehlbildung der arteriellen, glatten Muskelschicht zurückzuführen ist. Es ist die häufigste Form erblich bedingter Schlaganfälle. Die Patienten weisen eine Punktmutation im Notch-3 Gen auf, welche zum Verlust oder zum Anfügen eines Cystein-Restes innerhalb der EGF-Domänen und somit zu einer veränderten Proteinfaltung führt <sup>67, 68</sup>. Bei dem Alagille-Syndrom (AGS) liegt eine Mutation im Gen des Notch-Rezeptor-Liganden Jagged-1 vor, die zu einer Verkürzung des Proteins führt <sup>69, 70</sup>. Das Alagille-Syndrom umfasst Veränderungen der Leber, des Herzen, der Augen, im Gesicht und Skelettsystem. Eine andere

Mutation im Jagged-1 Gen führt zu einer autosomalen Erbkrankheit mit ähnlichen Symptomen <sup>71</sup>. Des Weiteren ist eine Beteiligung von Notch-1 Rezeptoren bei der akuten lymphoblastischen Leukämie vom T-Zelltyp (T-ALL) beschrieben. Hier führt eine Translokation im Notch-1 Gen zur Überexpression der intrazellulären Domänen <sup>72</sup>.

Da Notch-Rezeptoren eine zentrale Rolle bei der Proliferation und Apoptose spielen, werden sie häufig mit der Entstehung von Tumoren in Verbindung gebracht. Aktuelle Studien zeigen, dass Notch-Rezeptoren in einem T-ALL Mausmodell durch Hemmung der Apoptose und Stimulation der Proliferation die Tumorgenese fördern <sup>73</sup>. Zudem ist eine Überexpression von Notch-1 und -2 in humanen Kolon-Adenokarzinomen <sup>74</sup> und Notch-3 sowie -4 in Mammakarzinomen beschrieben <sup>75</sup>. Beim humanen Nierenkarzinom (engl.: *renal cell carcinoma* (RCC)) wurde im Vergleich zu normalem Gewebe ebenfalls eine veränderte Notch-Rezeptor Expression beobachtet <sup>76, 77</sup>. Eine Übersicht über Notch-assoziierte Erkrankungen ist in der folgenden Tabelle gegeben (Tabelle 2).

Notch Rezeptor oder Ligand	Erkrankung beim Menschen
Notch-1	akute lymphoblastische T-Zell-Leukämie (T-ALL) diverse Tumore, u.a. Kolon-Adenokarzinom
Notch-2	nicht bekannt diverse Tumore. u.a. Kolon-Adenokarzinom
Notch-3	CADASIL-Syndrom diverse Tumore, u.a. Mammakarzinom
Notch-4	Assoziation mit Schizophrenie Assoziation mit Alopecia areata Aktivierung in humanen Tumorzelllinien
Delta-like-1	nicht bekannt
Delta-like-3	Spondylokostale Dysostose
Delta-like-4	nicht bekannt
Jagged-1	Alagille Syndrom

**Tabelle 2: Notch-assoziierte Erkrankungen** (nach Harper 2003)

### 1.3 Expression von Notch-Rezeptoren in der Niere

Die Notch-Rezeptoren und ihre Liganden üben wichtige Funktionen während der Embryogenese aus und spielen folglich auch eine wichtige Rolle in der Entwicklung der



Niere. McCright et al. untersuchten die Expression von Rezeptoren und Liganden in unterschiedlichen Stadien der Nierenentwicklung. Sie zeigten, dass die Rezeptoren Notch-1 und Notch-2 mit ihren Liganden Dll-1 und Jagged-1 in den prä-tubulären Aggregaten (*comma* und *S-shaped bodies*) exprimiert werden. Bei der Ausbildung des Glomerulus werden Notch-1 und -2 in Epithelzellen, Jagged-1 und Dll-4 dagegen in den Endothelzellen exprimiert. Eine Deletion des Rezeptors Notch-2 führt zu einer deutlich reduzierten Anzahl an funktionsfähigen Glomeruli und belegt die entscheidende Bedeutung der Notch-Signaltransduktion für die Nephronentwicklung. Im späteren Entwicklungsverlauf ist eine Dll-1 Expression nicht mehr detektierbar<sup>78</sup>. In der adulten Niere werden Rezeptoren und Liganden nur noch schwach exprimiert<sup>79,80</sup>. Erst während des vergangenen Jahrzehnts wurde die Expression der Notch-Signalweg-Komponenten innerhalb pathologischer Prozesse in der Niere untersucht. Interessanterweise verändert sich ihre Expression bei entzündlichen Prozessen signifikant. So beschreiben Morrisey et al. 2002, dass nach Stimulation von Nierene epithelzellen mit dem profibrotisch wirksamen Zytokin *transforming growth factor* (TGF)- $\beta$ 1 unterschiedliche Rezeptor- und Liganden-Subtypen vermehrt exprimiert werden. In einem Mausmodell der renalen Fibrose, der unilateralen Ureterobstruktion (UUO), wurde eine Hochregulation der Jagged-1 und Jagged-2 mRNA beobachtet<sup>81</sup>.

Aktuelle Studien der Arbeitsgruppe von Katalin Susztak beschäftigen sich mit der Rolle von Notch-1 Rezeptoren in humanen Nierenerkrankungen und den entsprechenden Mausmodellen. Sie zeigten, dass die aktive Notch-1 Rezeptor-Form (ICN1) in der gesunden Niere nur schwach in einigen tubulären Zellen exprimiert wird. In glomerulären Erkrankungen wie der diabetischen Nephropathie (DNP) und der fokalen segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) steigt die Expression von Notch-1 Rezeptoren in glomerulären Zellen und hierbei hauptsächlich in Podozyten, an<sup>82,83</sup>. Eine gesteigerte Notch-1 Expression konnte zudem in tubulären Zellen in der tubulointerstitiellen Fibrose (TIF) gezeigt werden<sup>84</sup>. Weitere Mitglieder der Notch-Signaltransduktion, die in einem durch Folsäure induzierten Mausmodell der tubulointerstitiellen Fibrose hochreguliert werden, sind die Rezeptoren Notch-2 und -3, sowie die Liganden Jagged-1, Dll-1 und -4<sup>84</sup>. Die Lokalisation und die Rolle des Notch-3 Rezeptors wurde in diesem Zusammenhang bisher nicht näher untersucht.

Das Expressionsmuster von Notch-3 Rezeptoren wurde bislang vornehmlich in der Organogenese von Nagetieren studiert. Notch-3 Rezeptoren werden während der Gastrulation hauptsächlich in dem sich entwickelnden Nervensystem exprimiert<sup>9</sup>. In der Postnatalperiode kommt es zu einer deutlich reduzierten Proteinexpression. Eine Depletion des Rezeptors führt zu keiner Veränderung in der Embryogenese<sup>20</sup>. Notch-3 Rezeptoren werden in verschiedenen

adulten Geweben des Menschen (Herzmuskulatur, Niere, Gehirn, große Arterien, Skelettmuskulatur, Lunge, Harnblase und Darm) in glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert <sup>85</sup>.

In eigenen Vorarbeiten konnten wir zeigen, dass Notch-3 auf mRNA-Ebene in einigen renalen Zelllinien exprimiert wird. Zudem wird Notch-3 in einem Modell der mesangioproliferativen Nephritis (anti-Thy1.1 Nephritis) zum Zeitpunkt der maximalen mesangialen Zellproliferation in Ratten hochreguliert und nachfolgend die Notch-3 spezifischen Zielgene HES-2 und Hey-2 aktiviert <sup>11</sup>.

### **1.4 Zielsetzung der Arbeit**

Die interstitielle Fibrose ist bei der Mehrzahl der zur terminalen Niereninsuffizienz führenden, dialysepflichtigen Nierenerkrankungen, aber auch bei dem chronischen Transplantatversagen zu finden und bestimmt die Progredienz. Bei der Fibrose kommt es zu einer Vermehrung des Bindegewebes und die physiologischen Organfunktionen werden durch die Veränderung der Gewebsarchitektur beeinträchtigt.

In der vorliegenden Arbeit soll die Bedeutung des Rezeptors Notch-3 in terminalen Nierenerkrankungen untersucht werden. Hierzu wird zunächst die Expression von Notch-3 in zwei unterschiedlichen Mausmodellen untersucht, der unilateralen Ureterobstruktion und der nephrotoxischen Serum-Nephritis. Im Weiteren werden die experimentellen Schädigungsmodelle mit Notch-3 defizienten Mäusen durchgeführt, um den Beitrag des Rezeptors Notch-3 an entzündlichen und fibrotischen Veränderungen zu definieren. Des Weiteren werden glomeruläre und tubuläre Nierenerkrankungen mit der Notch-3 Rezeptor Expression in humanen Biopsaten von Patienten korreliert.

## 2. Material

Material und Methoden sind nach Standardprotokollen der Medizinischen Klinik II, RWTH Aachen, verfasst und entsprechend individueller experimenteller Änderungen modifiziert.

### 2.1 Geräte

ABI Prism 7400 <i>sequence detection system</i>	<i>Life technologies (Darmstadt)</i>
Agarose-Gel-UV-Auswertungssystem	<i>Biorad (München)</i>
Agarose-Gel-Apparatur	<i>Biorad (München)</i>
Apparatur Western Blot	<i>Biorad (München)</i>
Brutschrank	<i>Heraeus (Hanau)</i>
Dampfsterilisator Varioclav	<i>H&amp;P Labortechnik (München)</i>
Einbettautomat	<i>Digitana AG, Sakura (Horgen, Schweiz)</i>
Einblockautomat <i>Histoembedder</i>	<i>Leica Instruments GmbH (Nussloch)</i>
Lichtmikroskop mit Fluoreszenzlampe BX41TF	<i>Olympus optical&amp;Co ltd (Hamburg)</i>
Homogenisator RZR 2020	<i>Heidolph (Schwabach)</i>
Kühlplatte COP30	<i>Medite (Burgdorf)</i>
LAS 3000 <i>Luminescent Image Analyzer</i>	<i>Fujifilm (Edenbridge, UK)</i>
Luminometer	<i>Berthold (Bad Wilbad)</i>
PCR System GeneAmp 2400	<i>Perkin Elmer (Rodgau)</i>
Photometer BioPhotometer	<i>Eppendorf (Hamburg)</i>
Pipetus-Akku	<i>Hirschmann Laborgeräte</i>
Pipetten	<i>Eppendorf (Hamburg)</i>
Rotationsmikrotom CUT5062	<i>Slee (Mainz)</i>
Rotor: F45-30-11	<i>Eppendorf (Hamburg)</i>
Schüttler Vortex-Genie2	<i>Scientific Industries, Inc., (New York, USA)</i>
Sterile Arbeitsbank (Zellkultur) Hera safe	<i>Heraeus (Hanau)</i>
Tischzentrifuge Zentrifuge 5415D	<i>Eppendorf (Hamburg)</i>
Thermoblock Thermomixer comfort	<i>Eppendorf (Hamburg)</i>
Transformator Power Pac 1000	<i>Biorad (München)</i>
Wasserbad für Paraffinschnitte	<i>Barnstead (Electrothermal) (Iowa, USA)</i>
Zentrifuge 5417R	<i>Eppendorf (Hamburg)</i>

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

Amersham Hyperfilm™ ECL	<i>GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)</i>
Deckgläser	<i>Engelbrecht Labortechnik (Edermünde)</i>
Einbettkassetten	<i>Kisker (Steinfurt)</i>
Eppendorfreaktionsgefäße	<i>Biorad (München)</i>
Nahtmaterial Mersilene 5-0	<i>Ethicon (Norderstedt)</i>
Neubauer Zählkammer	<i>Braun (Melsungen)</i>
Objektträger Superfrost Plus	<i>Menzel GmbH (Braunschweig)</i>
Operationsbesteck	<i>FST (Heidelberg)</i>
Protran Nitrozellulosemembran	<i>Schleicher und Schuell (Dassel)</i>
Parafilm	<i>American National Can. (Menshasa, USA)</i>
Petrischalen	<i>Nunc (Nürtingen)</i>
Serologische Pipetten	<i>Corning (New York, USA)</i>
Pipettenspitzen	<i>Eppendorf (Hamburg)</i>
Plastikküvetten	<i>Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)</i>
Probengefäß 1,1 ml Z-Gel	<i>Sarstedt AG&amp;Co (Nümbrecht)</i>
Whatman-Filterpapier	<i>Biorad (München)</i>
Zellkulturplatten, 6 Vertiefungen	<i>Nunc (Nürtingen)</i>
Zellkulturplatten, 12 Vertiefungen	<i>Nunc (Nürtingen)</i>
Zellkulturflaschen, 75 cm <sup>2</sup> Wachstumsfläche	<i>Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)</i>
Zellschaber	<i>Nunc (Nürtingen)</i>

## 2.3 Reagenzien

Acryl-/Bisacrylamid 30%	<i>Serva (Heidelberg)</i>
Agar	<i>Difco Lab. (Detroit, USA)</i>
Agarose	<i>Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)</i>
Ammoniumpersulfat	<i>Biorad (München)</i>
Ampicillin	<i>Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)</i>
Avidin-Biotin-Komplex (ABC-Kit Elite)	<i>Vectastain, Camon Labor Service GmbH (Wiesbaden)</i>
Bench Mark Prestained	<i>Life Technologies (Karlsruhe)</i>
Beta-Mercaptoethanol	<i>Biorad (München)</i>
Bradford-Reagenz	<i>Biorad (München)</i>

## Material

---

Bromphenolblau	<i>Biorad (München)</i>
BSA ( <i>bovine serum albumin</i> )	<i>Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)</i>
Diaminobenzidin-Substrat (DAB)	<i>Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)</i>
Dithiothreitol (DTT)	<i>Biorad (München)</i>
Dimethylsulfoxid (DMSO)	<i>ICN Biochemicals (Cleveland, Ohio, USA)</i>
<i>Dulbecco's Eagle's</i> (DMEM) Medium	<i>Gibco BRL Life Technologies (Karlsruhe)</i>
dNTP	<i>Amersham (Braunschweig)</i>
ECL-Reagenzien	<i>Amersham (Braunschweig)</i>
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	<i>Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)</i>
Essigsäure	<i>Calbiochem (Darmstadt)</i>
Ethanol, 70%	<i>Apotheke des Universitätsklinikums der RWTH Aachen (Aachen)</i>
Ethidiumbromid	<i>Calbiochem (Darmstadt)</i>
Fetales Kälberserum (FKS)	<i>Life Technologies (Karlsruhe)</i>
<i>First strand buffer</i>	<i>Life Technologies (Karlsruhe)</i>
Glyzin	<i>Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)</i>
HEPES	<i>Roth (Karlsruhe)</i>
Histokit	<i>Roth (Karlsruhe)</i>
Immu-Mount	<i>Shandon (Pittsburgh, USA)</i>
Isofluran Florene®	<i>Abott (Wiesbaden)</i>
Kaliumchlorid	<i>Calbiochem (Darmstadt)</i>
Magnesiumchlorid	<i>Calbiochem (Darmstadt)</i>
Mayers Hämalaun-Färbelösung	<i>Calbiochem (Darmstadt)</i>
Methanol	<i>Apotheke des Universitätsklinikums der RWTH Aachen (Aachen)</i>
Methylgrün	<i>Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)</i>
<i>Moloney murine leukemia virus</i> -Reverse	<i>Life Technologies (Karlsruhe)</i>
Transkriptase (M-MLV RT)	
Natriumacetat	<i>Calbiochem (Darmstadt)</i>
Natriumchlorid	<i>Calbiochem (Darmstadt)</i>
Natriumdodecylsulfat (SDS)	<i>Biorad (München)</i>
Natriumorthovanadat	<i>Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)</i>
Natronlauge (10N)	<i>Calbiochem (Darmstadt)</i>
Nickelchlorid	<i>Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)</i>

Nonidet P-40	<i>Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)</i>
<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)</i>	<i>Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)</i>
Paraffin	<i>Roth (Karlsruhe)</i>
Paraformaldehyd	<i>Applichem (Darmstadt)</i>
Perjodsäure	<i>Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)</i>
Penicillin/Streptomycin	<i>Gibco BRL Life Technologies (Karlsruhe)</i>
Pikrinsäure	<i>Chroma Gesellschaft (Münster)</i>
Proteasen-Inhibitoren Complete Mini	<i>Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)</i>
<i>Random-primer</i>	<i>Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)</i>
RNasin	<i>Promega (Mannheim)</i>
RPMI 1640 Medium, mit L-Glutamin	<i>Gibco BRL Life Technologies (Karlsruhe)</i>
Salzsäure (HCl) 1N	<i>Applichem (Darmstadt)</i>
Siriusred F3BA	<i>Chroma Gesellschaft (Münster)</i>
Sodium-Orthovanadat	<i>Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)</i>
TissueTek OCT	<i>Sakura (Staufen)</i>
N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED)	<i>Biorad (München)</i>
TransIT-LT transfection reagent	<i>Mirus (Madison, USA)</i>
Triton X-100	<i>Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)</i>
Tris-HCl	<i>Roth (Karlsruhe)</i>
Tris	<i>Biorad (München)</i>
Trizol	<i>Life Technologies (Karlsruhe)</i>
Trypsin-EDTA (0,25% Trypsin, 1mM EDTA)	<i>Gibco BRL, Life Technologies (Karlsruhe)</i>
Tween-20	<i>Biorad (München)</i>
Wasserstoffperoxid [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%)]	<i>Calbiochem (Darmstadt)</i>
Xylol	<i>Roth (Karlsruhe)</i>
1kb-ladder	<i>Life Technologies (Karlsruhe)</i>
100bp-ladder	<i>Life Technologies (Karlsruhe)</i>

## 2.4 Inhibitoren und Stimulanzen

TGF beta	<i>R&amp;D systems (Minneapolis, USA)</i>
rhJagged-1/Fc	<i>R&amp;D systems (Minneapolis, USA)</i>
rhIgG <sub>1</sub> /Fc	<i>R&amp;D systems (Minneapolis, USA)</i>

## 2.5 Reaktionskits

DuoSet ELISA RANTES Development Kit	<i>R&amp;D systems (Minneapolis, USA)</i>
Rneasy™ Mini Kit	<i>QIAGEN (Hilden)</i>
QIAprep® Spin-Maxi-Prep Kit (250)	<i>QIAGEN (Hilden)</i>
Vectastain® ABC-Kit	<i>Vector Laboratories (Burlingame, USA)</i>
Sircol soluble collagen assay	<i>Biocolor (Carrickfergus, UK)</i>
In situ cell death detection Kit	<i>Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)</i>

## 2.6 Primer und Sonden

Die verwendeten Sonden und Primer für die quantitative *real time* PCR sind Produkte der Firma *Applied Biosystems (Darmstadt)*. Die Sonden tragen an ihrem 5'-Ende den Fluoreszenzfarbstoff FAM. An ihrem 3'-Ende sind sie mit einem nicht-fluoreszierenden *Quencher* (NFQ) markiert und enthalten einen *minor groove binder* (MGB).

18S rRNA	(Hs99999901)
Notch-3	(Mn01345646)
Notch-1	(Mn00435249)
Jagged-1	(Mn00496902)
Hes-2	(Mn00456108)
Hes-5	(Mn00439311)
Hey-L	(Mn00516555)
Collagen Ia1	(Mn01302043)
Collagen IIIa1	(Mn01254476)
CCL2 (MCP-1)	(Mn99999056)
CCL5 (RANTES)	(Mn01302428)
YB-1	(Hs02742754)

Die Primerpaare für die RT-PCR wurden selbst entworfen und von *Invitrogen* synthetisiert. Sie haben folgende Sequenzen (5' zu 3'):

Notch-3 (forw.):	GGTGGGCATTTCCGCTGCGT
Notch-3 (rev.):	GCTGCGGAAGGGGTCTCACAAC
GAPDH (forw.):	ACCACAGTCCATGCCATCAC
GAPDH (rev.):	TCCACCACCCTGTTGCTGTA

## 2.7 Antikörper

### Primärantikörper

Für die Immunhistologie verwendete Primärantikörper:

<b>Antigen</b>	<b>Blockierung</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Sekundär-AK</b>
$\alpha$ -SMA HRP	Peroxidaseblock	1:300	Sigma-Aldrich	-
Fibronectin	Peroxidaseblock	1:1000	Millipore	Anti-Kaninchen
F4/80	Peroxidaseblock	1:600	Serotec GmbH	Anti-Ratte
	Avidin-Biotinblock			
Kollagen I	Peroxidaseblock	1:200	Monosan	Anti-Kaninchen
Kollagen III	Peroxidaseblock	1:400	Southern Biotech	Anti-Ziege
Notch-3	Peroxidaseblock	1:50	Santa Cruz	Anti-Ziege
	Avidin-Biotinblock			
PCNA Biotin	Peroxidaseblock	1:50	Biotrend	-
	Avidin-Biotinblock			

Für die Immundetektion verwendete Primärantikörper:

<b>Antigen</b>	<b>Blockierung</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Sekundär-AK</b>
Cyclin D1	BSA-block	1:1000	Santa Cruz	Anti-Kaninchen
Fibronectin	BSA-block	1:1000	Millipore	Anti-Kaninchen
GAPDH	BSA-block	1:5000	Novus biologicals	Anti-Maus-IgG
Notch-1	BSA-block	1:1000	abcam	Anti-Kaninchen
Notch-3	BSA-block	1:1000	Upstate	Anti-Kaninchen
SMAD2	BSA-block	1:1000	Cell signaling	Anti-Kaninchen
pSMAD2	BSA-block	1:1000	Cell signaling	Anti-Kaninchen



## Sekundärantikörper

Für die Immunhistologie verwendete Sekundärantikörper:

Antigen	Verdünnung	Hersteller
Biotinyliertes Ziegen Anti-Kaninchen IgG	1:600	Vector laboratories
Biotinyliertes Kaninchen Anti-Ziegen IgG	1:600	Vector laboratories
Biotinyliertes Kaninchen Anti-Ratten IgG	1:600	Vector laboratories

Für die Immundetektion verwendete Sekundärantikörper:

Antigen	Verdünnung	Hersteller
Peroxidase-gekoppeltes Ziegen Anti-Kaninchen IgG	1:10000	Dako
Peroxidase-gekoppeltes Kaninchen Anti-Ziegen IgG	1:10000	Dako
Peroxidase-gekoppeltes Anti-Maus IgG	1:5000	Amersham

## 2.8 Plasmide

### pcDNA3

Das pcDNA3-Plasmid dient als Kontrollvektor. Es enthält *Enhancer*- und Promotor-Sequenzen des humanen Zytomegalievirus, ein Poly-A-Signal und den SV40 „*origin of replication*“ zur episomalen Replikation in Zelllinien, die mit dem SV40 T-Antigen transformiert sind.

### ICN3-HA

Das Plasmid enthält eine für die intrazelluläre Domäne des Notch-3 Rezeptors kodierende Sequenz. Das Genprodukt ist N-terminal mit einem HA-*Taq* versehen.

## 2.9 Zelllinien

### Humane Mesangialzellen (hMC)

Die Mesangialzellen werden aus den Glomeruli humaner Biopsate gewonnen und als Primärkultur gezüchtet. Bei dieser Primärkultur handelt es sich um eine Mosaikkultur,

bestehend aus Mesangialzellen, Endothelzellen und Epithelzellen. Unter den gewählten Kulturbedingungen wachsen vornehmlich Mesangialzellen aus. Die Zellen sind adhärent und werden in DMEM-Medium mit 10 % FKS und 60 mg/l Penicillin und 100 mg/l Streptomycin kultiviert.

### **NRK52E-Zellen**

Bei den NRK52E-Zellen handelt es sich um Tubuluszellen, die aus Ratten-Nieren isoliert wurden. Sie werden in DMEM-Medium mit 10 % FKS, 60 mg/l Penicillin und 100 mg/l Streptomycin kultiviert.

## **2.10 Bakterienstämme**

### ***E.coli* XL-Blue**

*E.coli* XL-Blue ist ein Bakterienstamm, der sich effizient mit Plasmid-DNA transformieren lässt. Aus diesem Grund wurde er zur Vervielfältigung der unter 2.8 genannten Plasmide verwendet.

## **2.11 Software**

ABI Prism 7300 Sequence Detection	<i>Applied Biosystems (Darmstadt)</i>
Adobe Photoshop CS 8.0.1	<i>Adobe (San José, USA)</i>
Magellan Version 6	<i>Tecan (Newcastle, UK)</i>
Microsoft Office 2008	<i>Microsoft Corporation (Redmond, USA)</i>
Scion Image 4.03	<i>Scion Corporation (Frederick, USA)</i>
AnalySIS Pro V.3.2	<i>Soft Imaging System GmbH (Münster)</i>
Kamera Color View II	<i>Soft Imaging System GmbH (Münster)</i>

### **3. Methoden**

#### **3.1 Zellbiologische Methoden**

##### **3.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen**

Die Kultivierung der Zellen erfolgt bei 37 °C in einer Atmosphäre mit 5%-igem Kohlenstoffdioxid-Gehalt und gesättigter Luftfeuchtigkeit in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen. Für die Subkultivierung werden 1/5 bis 1/20 des Volumens der adhärennten Zellen etwa alle 3-4 Tage in eine neue Flasche überführt und mit frischem Medium versehen. Die Langzeitlagerung von Zellen erfolgt in Medium mit 30 % FKS und 20 % DMSO. Die Zellen werden bei –80 °C eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert.

##### **3.1.2 Transiente Transfektion von NRK52E Zellen mit TransIT-LT1**

Einen Tag vor der Transfektion werden  $2 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung in 6-Lochplatten mit jeweils 3 ml FKS-haltigem Medium ausgesät. Am Tag der Transfektion wird das Medium abgesaugt und durch 2,5 ml frisches FKS-haltiges Medium ersetzt.

Pro Transfektionsansatz werden 7,5 µl Transfektionsreagenz in 250 µl FKS-freies Medium gegeben und 2,5 µl Plasmid-DNA (1 µg/µl) hinzugefügt. Das Gemisch wird 15 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 24-48 Stunden haben die Zellen die DNA aufgenommen und können für nachfolgende Experimente verwendet werden.

##### **3.1.3 Proliferations-Bestimmung**

24-Lochplatten werden mit 5 µg/ml in PBS gelösten rekombinanten Jagged-1 Protein (rhJagged-1/Fc), welches an ein Immunglobulinfragment gekoppelt ist, versetzt und für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Als Kontrollen wird PBS allein oder ein rekombinantes Immunglobulin G<sub>1</sub> Protein (rhIgG<sub>1</sub>/Fc) verwendet. Anschließend werden unspezifische Bindungen mit 5 %-iger BSA-Lösung für 2 Stunden bei Raumtemperatur blockiert. Die Platte wird darauffolgend drei Mal mit PBS gewaschen.  $2,4 \times 10^4$  NRK52E Zellen in 500 µl DMEM-Medium werden in jedes Loch gegeben. Nach 24, 48 und 72 Stunden wird die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dabei liegt jeder Ansatz als Triplet vor.

Um einen spezifischen Einfluss des Rezeptors Notch-3 auf die Proliferation zu untersuchen, werden NRK52E Zellen mit einem Notch-3 Expressionsplasmid transfiziert. Die transfizierten Zellen exprimieren konstitutiv die aktive, intrazelluläre Domäne des Notch-3

Rezeptors. Die Zellen werden durch 24-stündigen FKS-Entzug in einem Wachstumsarrest gebracht. Anschließend wird die Zellzahl mittels Neubauerkammer bestimmt und FKS (10 %) wieder hinzugefügt. Die Zellzahl wird im weiteren Wachstumsverlauf in Intervallen von jeweils 24 Stunden ermittelt.

## **3.2 Mikrobiologische Methoden**

### **3.2.1 Kultivierung und Lagerung von Bakterienkulturen**

Bakteriensuspensionen werden in 300 ml flüssigem Luria-Bertani-(LB)-Medium mit Antibiotikazusatz (Ampicillin 100 µg/ml) bei 37 °C unter Schütteln bei 200 rpm über Nacht kultiviert. Für die Langzeitlagerung von Bakterienkulturen werden 800 µl Bakteriensuspension und 200 µl Glycerin in ein Kryoröhrchen gegeben, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

#### LB-Medium:

NaCl	1,0 % (w/v)
Pepton	1,0 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)

### **3.2.2 Herstellung Hitzeschock-kompetenter *E.coli***

Zur Herstellung Hitzeschock-kompetenter *E.coli* werden 25 ml LB-Medium mit dem nativen *E.coli*-Stamm (XL-Blue) angeimpft und über Nacht kultiviert. Anschließend werden 5 ml der Vorkultur in 500 ml LB-Medium überführt und solange bei 37 °C unter Schütteln inkubiert bis eine optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm von 0,5 erreicht ist. Die Bakteriensuspension wird mit 230 ml SOB-Medium versetzt und bei Raumtemperatur unter Schütteln bis zu einer optischen Dichte von 0,94 inkubiert. Danach wird die Bakteriensuspension bei 4000 rpm für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und das Sediment umgehend in 80 ml eiskaltem Transformationspuffer resuspendiert. Das Gemisch wird für 10 Minuten auf Eis gekühlt und darauffolgend erneut zentrifugiert (4000 rpm, 10 Minuten, 4 °C). Die sedimentierten Bakterien werden in 20 ml eiskaltem Transformationspuffer, der 7 % DMSO enthält, unter Mischen gelöst und für 10 Minuten auf Eis gestellt. Zum Schluss werden die Bakterien in 200 µl-Fractionen in vorgekühlte Eppendorfgeläße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zum Gebrauch gelagert.

SOB-Medium:

Trypton	0,2 %	(w/v)
Hefeextrakt	0,5 %	(w/v)
NaCl	10	mM
KCl	2,5	mM

Transformationspuffer :

HEPES	10	mM
CaCl <sub>2</sub>	15	mM
KCl	250	mM
MnCl <sub>2</sub>	55	mM

### 3.2.3 Hitzeschock-Transformation von *E.coli*

100 µl Transformations-kompetente Bakterien werden auf Eis aufgetaut und mit 1 µg Plasmid-DNA versetzt. Die Bakteriensuspension wird für 45 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt der Hitzeschock bei 42 °C für 90 Sekunden. Die Bakterien werden erneut für 10 Minuten auf Eis plaziert und nachfolgend in 1 ml LB-Medium ohne Antibiotikum aufgenommen. Zur Ausbildung der Antibiotika-Resistenz, die mit dem transformierten Plasmid ebenfalls in die Bakterien eingebracht wird, werden die Zellen für 45 Minuten unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden 10 µl bzw. 100 µl Suspension auf einer entsprechend Antibiotika enthaltenden LB-Mediumplatte ausgestrichen. Die Agarplatten werden über Nacht bei 37 °C inkubiert und die Bakterienkolonien nachfolgend analysiert.

### 3.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Plasmidisolierung im großen Maßstab erfolgt nach Herstellerangaben des QIAGEN *HISPEED Plasmid Purification* Kit (Qiagen, Hilden). Hierzu werden 300 ml einer Übernachtskultur verwendet. Die alkalische Lyse ist hierbei modifiziert und wird gefolgt von einer Bindung der Plasmid-DNA an eine Anionenaustauscher-Säule unter geeigneten Pufferbedingungen mit niedriger Salzkonzentration. Zellrestverunreinigungen, RNA und Proteine werden anschließend durch höher konzentrierte Salzpuffer entfernt. Die DNA wird mit hochkonzentriertem Salzpuffer eluiert und mittels Isopropanolfällung gereinigt und aufkonzentriert.

### 3.3 Molekularbiologische Methoden

#### 3.3.1 RNA-Isolation aus eukaryotischen Zellen

Die Gewinnung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen erfolgt nach Anleitung des *RNeasy™ Mini Kit* (Qiagen, Hilden). Die Zellen werden durch Zugabe von RLT-Puffer lysiert und zur Homogenisierung wird eine *QIAshredder™spin* Säule verwendet. Der Durchfluss wird mit 70 %-igem Ethanol versetzt und auf eine *RNeasy mini* Säule gegeben und durch weitere Waschschriffe mit RW- und RPE-Puffern von DNA-, Protein- und Zellrestverunreinigungen befreit. Die gereinigte RNA wird mit 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Anschließend wird die Konzentration der RNA photometrisch bestimmt. Die RNA wird bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### 3.3.2 Herstellung von komplementärer DNA (*complementary DNA, cDNA*)

Die Herstellung von komplementärer DNA (cDNA) anhand einer RNA-Matrize erfolgt nach dem Prinzip der reversen Transkription. Zur Umschreibung wird die M-MLV (*moloney-monkey leukemia virus*)-Reverse Transkriptase verwendet. Die RNA aus Zellen oder Gewebe wird auf Eis aufgetaut. 1 µg RNA wird in 20 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die gelöste RNA wird für 10 Minuten bei 75 °C hitzedenaturiert, um Sekundärstrukturen aufzulösen. Danach wird sie sofort auf Eis gekühlt, um eine erneute Ausbildung von Sekundärstrukturen zu verhindern. Die RNA wird mit folgendem Reaktionsansatz versetzt:

##### Reaktionsansatz

dNTPs (10 mM)	1,5 µl
<i>Random primer</i> (250 ng/µl)	1 µl
5 x Erststrang-Puffer	6 µl
RNAsin (30 U)	0,7 µl
M-MLV Reverse Transkriptase (200 U)	1 µl

Anschließend wird das Reaktionsgemisch für 10 Minuten bei 25 °C inkubiert, gefolgt von einer 60-minütigen Inkubation bei 42 °C. Bis zur weiteren Verwendung wird die cDNA bei -80 °C gelagert.

### 3.3.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung von Nukleinsäuren erfolgt durch Messung der Extinktion mit dem Spektrophotometer BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass die gelösten Nukleinsäuren Licht mit einer Wellenlänge von 260 nm absorbieren. Je höher die Nukleinsäurekonzentration in der Lösung ist, desto mehr Licht wird absorbiert. Die Nukleinsäuren werden 1:300 mit A. dest verdünnt. Vor der Messung wird das Spektrophotometer mit dem jeweiligen Lösungsmittel kalibriert. Zur Konzentrationsbestimmung werden folgende Werte zugrundegelegt:

DNA (doppelsträngig)	OD <sub>260</sub> =1 entspricht 50 µg/ml
RNA	OD <sub>260</sub> =1 entspricht 40 µg/ml

Die Reinheit der Nukleinsäuren kann spektrometrisch über das Verhältnis Nukleinsäure-Absorption zur Protein-Absorption bestimmt werden. Das Absorptionsmaximum für Proteine liegt, basierend auf der Absorption der aromatischen Aminosäurereste, bei 280 nm. Das Verhältnis der OD<sub>260</sub> zur OD<sub>280</sub> zeigt an, wie stark eine DNA-Lösung noch durch Alkohol oder Proteinreste verunreinigt ist. Ein Verhältnis von 1,8 spricht für eine reine DNA-Isolierung, ein Verhältnis von 2,0 für eine reine RNA-Isolierung. Sind die isolierten Nukleinsäuren mit Proteinen oder Phenol kontaminiert, so ist der Wert signifikant kleiner.

### 3.3.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (*reverse transcription*, RT-PCR)

Bei der RT-PCR wird zunächst mittels einer reversen Transkriptase RNA in cDNA umgeschrieben, die anschließend in der eigentlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert wird. Der Reaktionsansatz wird wie nachfolgend beschrieben angesetzt.

#### Reaktionsansatz:

cDNA (100 ng)	2	µl
GoTaq Puffer	11	µl
MgCl <sub>2</sub>	2	µl
dNTPs	1	µl
Primer A	1	µl
Primer AS	1	µl
TaqPolymerase	0,5	µl
A.dest	29,5	µl

PCR-Programm (30 Zyklen):

Erste Denaturierung	95 °C, 5 min
Denaturierung	95 °C, 30 sec
<i>Annealing</i>	57 °C, 30 sec
Extension	68 °C, 1 min
finale Extension	72 °C, 7 min

Die PCR-Proben werden bei 4 °C gelagert und anschließend im Ethidiumbromid-Agarose-Gel analysiert.

**3.3.5 Echtzeit-Polymerase-Ketten-Reaktion (*quantitative real time PCR*, qRT-PCR)**

Die quantitative *real time PCR* ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die gleichzeitig eine Quantifizierung während eines PCR-Zyklus zulässt. Für die Quantifizierung wird zu den Proben zusätzlich zum *forward* und *reverse* Primer eine Sonde gegeben, die an ihrem 5' Ende einen *quencher* (TAMRA) und am 3' Ende einen Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (FAM) enthält.

Die qRT-PCR wird mittels des *ABI Prism 7300 sequence detection system* (Applied Biosystems) durchgeführt. Die verwendeten *Gene Expression Assays* (Applied Biosystems) sind hochspezifisch für die zu amplifizierenden Produkte. Als interner Standard wird die 18S rRNA genutzt. Für jede Reaktion wird folgender Ansatz pipettiert:

Reaktionsansatz:

<i>Gene Expression Assay</i>	1	µl
PCR Master Mix	10	µl
cDNA (70-100 ng) in A.dest	9	µl

PCR-Programm (40 Zyklen):

Erste Denaturierung	95 °C, 2 min
Denaturierung	95 °C, 15 sec
<i>Annealing</i> und Extension	60 °C, 1 min



### 3.4 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.4.1 Herstellung von Zelllysaten

Die adhärennten Zellen werden mittels Zellschaber von der Zellkulturflasche abgelöst, pelletiert und anschließend mit PBS gewaschen. Zur Lyse wird das Pellet in 300-500  $\mu$ l Lysepuffer resuspendiert. Zusätzlich zur chemischen Lyse werden die Zellen dreimal für 15 Sekunden ins Ultraschallwasserbad gesetzt. Zwischenzeitlich werden die Lysate auf Eis gekühlt. Anschließend werden die Proben für 15 min im Überkopfschüttler bei 4 °C inkubiert. Die Abtrennung der Membranbestandteile erfolgt durch eine hochtourige Zentrifugation bei 14000 rpm und 4 °C für 15 Minuten. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die Proteinkonzentration mittels Bradfordreagenz bestimmt und anschließend werden 30  $\mu$ g Gesamtprotein in die SDS-PAGE eingesetzt. Die Lagerung der Proben erfolgt bei -80 °C.

##### Lysepuffer:

RIPA-Puffer	10	ml
Proteinase-Inhibitor	1	Tablette
Natriumorthovanadat	1	mM
Phosphostop	1	Tablette

##### RIPA-Puffer:

Tris-HCl, pH 7,4	50	mM
Nonidet P-40	150	mM
Natriumdeoxycholat	1	mM
EDTA	1	mM

#### 3.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Proteinanalyse werden Zell- oder Gewebelysate in einem denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gel mittels Elektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Die SDS-PAGE wird mit einem Biorad-Gelelektrophorese System und den TGX Precast-Fertiggelen oder mit selbst gegossenen Gelen durchgeführt. Je 30  $\mu$ g Gesamtprotein wird mit reduzierenden Probenpuffer versetzt, für 5 min und 95 °C im Thermomixer erhitzt und anschließend in die Probenaschen des Gels gefüllt. Als Längenstandard werden 4  $\mu$ l *Bench Mark Prestained* aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei 100-150 V für etwa eineinhalb Stunden.

2 Trenngele (10%)

A.dest	4	ml
Trenngelpuffer	2,5	ml
SDS 10%	100	µl
Acryl-/Bisacrylamid	3,4	ml
TEMED	10	µl
APS 10%	100	µl

2 Sammelgele:

A.dest	2,4	ml
Sammelgelpuffer	1	ml
SDS 10%	40	µl
Acryl-/Bisacrylamid	520	µl
TEMED	5	µl
APS 10%	50	µl

Reduzierender Probenpuffer (2x):

Tris-HCl	500	mM
Glyzerin	20 %	(w/v)
SDS	10 %	(w/v)
EDTA	500	mM
Bromphenolblau	1 %	(w/v)
β-Mercaptoethanol	10 %	(w/v)

Laufpuffer (10x):

Glyzin	2	M
Tris	250	mM
SDS	50	mM

**3.4.3 Transfer auf Nitrozellulosemembran**

Nach der Elektrophorese werden die Proteine zur spezifischen Detektion mittels Antikörper auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Transfer erfolgt in gekühltem Transferpuffer bei 100 V für 50 Minuten. Anschließend wird die Membran in 2%-iger BSA-Lösung bei 37 °C für 1 Stunde inkubiert und anschließend 5 Mal für jeweils 5 Minuten in TTBS-Puffer

gewaschen. Der Primärantikörper wird in TTBS-Puffer verdünnt, auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgt die Inkubation der Membran mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper in TTBS-Puffer für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Im Anschluss wird die Membran zur Immundetektion vorbereitet, indem sie abermals in TTBS-Puffer gewaschen (5 Mal für jeweils 5 Minuten) wird.

### **3.4.4 Immundetektion**

Die Entwicklung der Membran erfolgt mit Hilfe des ECL-Systems. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (HRP) setzt dabei das in der ECL-Lösung enthaltene Substrat in einer Chemilumineszenzreaktion um. Die Membran wird blasenfrei in Folie eingeschweißt und auf einem Röntgenfilm gelegt. Die Expositionszeiten betragen zwischen 10 Sekunden und 30 Minuten.

## **3.5 Tierexperimentelle Methodik**

### **3.5.1 Tierhaltung**

Alle Tierexperimente werden an 20-24 Wochen alten 18 g bis 22 g schweren, weiblichen Mäusen durchgeführt. Bei den Versuchstieren handelt es sich um Notch-3 defiziente Mäuse (C57Bl/6J Hintergrund), die freundlicherweise von Prof. C. Chatziantoniou (Inserm UMR702, Paris) zur Verfügung gestellt wurden. Als Kontrolltiere werden Wildtyp-Mäuse mit gleichem genetischen Hintergrund (Geschwistertiere) verwendet. Der Gesundheitszustand der Tiere entspricht den FELASA Richtlinien (*Federation of European Laboratory Animal Science Association*). Die Tiere werden in Macrolon Typ III Käfigen mit Weichholzgranulat gehalten und haben *ad libitum* Zugang zu Wasser und Futter. Die Tierhaltung erfolgt in einem 12 Stunden-Tag-/Nachtzyklus bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 40-60 % und einer Raumtemperatur von  $20 \pm 2$  °C.

### **3.5.2 Induktion der Glomerulonephritis**

Als glomeruläres Schädigungsmodell der Niere wird die nephrotoxische Nephritis (NTN) gewählt. Zur Herstellung des nephrotoxischen Serums werden zunächst Glomeruli aus der Mausniere isoliert. Anschließend werden diese zur Immunisierung von Schafen appliziert. Das aus diesen Schafen gewonnene Serum enthält Antikörper, die gegen die Mausglomeruli

gerichtet sind. Das nephrotoxische Serum wurde von Prof. Chatziantoniou (Inserm UMR702, Paris) zur Verfügung gestellt.

Zur Induktion der nephrotoxischen Nephritis werden am ersten Tag jeweils 100 µl des nephrotoxischen Serums retroorbital injiziert. Am folgenden Tag wird die Dosis auf 250 µl erhöht. Am dritten Tag erfolgt die finale Injektion. Hierzu wurden 23 µl Serum pro Gramm Körpergewicht abzüglich der zuvor injizierten 350 µl verwendet. Als Kontrolle einer erfolgreichen Induktion wird vor und nach Serumgabe jeden zweiten Tag Spontanurine entnommen und die Protein/Kreatinin-Ratio bestimmt.

### **3.5.3 Einseitige Ureter Ligatur**

Die Mäuse werden zunächst durch intraperitoneale Narkosemittelapplikation betäubt, rasiert und desinfiziert. Anschließend wird der Bauch mittels medianer Laparotomie geöffnet. Die linke Niere wird durch vorsichtiges Eventrieren der Darmschlingen dargestellt und der linke Ureter aufgesucht. Der Ureter wird mittels chirurgischer Diathermie durchtrennt. Die kontralaterale Niere bleibt dabei unversehrt und voll funktionsfähig. Der Darm wird zurückgelagert, das Operationsfeld mit isotoner NaCl-Lösung gespült und die Wunde zweischichtig verschlossen. Die Analgesie erfolgt durch die Gabe von Buprenorphin alle 8 Stunden über 72 Stunden.

### **3.5.4 Urinanalyse**

Die Bestimmung von Protein- und Kreatininkonzentrationen erfolgt in Spontanurinen. Diese werden jeden zweiten Tag bzw. im UUO Versuch am letzten Tag gesammelt und bis zur Bestimmung bei -20 °C gelagert. Die Analyse erfolgt mittels Auto-Analyser im Zentrallabor des Instituts für Versuchstierkunde (Aachen).

### **3.5.5 Serumanalyse**

Die Blutentnahme zur Gewinnung von Serum erfolgt kurz vor der Tötung der Tiere in Isofluran-Narkose aus dem retrobulbären Venenplexus mittels Sodagaskapillaren. Das in Serumröhrchen entnommene Blut wird bei 3500 Umdrehungen pro Minute für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C bis zur weiteren Analyse gelagert.

Die klinische Analyse zur Bestimmung von Serumkreatinin und -harnstoff erfolgt wie die Urinanalyse im Zentrallabor des Instituts für Versuchstierkunde (Aachen).

### 3.5.6 Gewebe-Entnahme und Fixation

Nach Tötung der Tiere durch zervikale Dislokation wird der Abdomen mittels Längslaparotomie geöffnet, beide Nieren entnommen und entkapselt. Von jeder Niere wird ein Drittel des Gewebes in flüssigen Stickstoff zur RNA-/Proteingewinnung, ein Drittel in Methacarn und ein Drittel in TissueTek gegeben. Bei dem für die RNA-/Proteingewinnung vorgesehenen Gewebe wird zusätzlich die Medulla vom Nierenkortex entfernt, so dass im weiteren Verlauf die Gen- und Proteinexpression nur in diesem Bereich der Niere analysiert wird.

#### Methacarn:

Chloroform	30 % (w/v)
Eisessig	10 % (w/v)
Methanol	60 % (w/v)

### 3.5.7 RNA-Isolation aus Gewebe

Die RNA-Isolation aus schockgefrorenem Mausgewebe erfolgt mittels Trizol-Reagenz. Hierzu werden etwa 3 mm<sup>2</sup> große Gewebestücke aus dem Nierenkortex mit 1 ml Trizol-Reagenz versetzt und im Homogenisator mechanisch zerkleinert. Die Nierenlysate werden anschließend 3 Mal für jeweils 10 Sekunden zum Zellaufschluss in ein Ultraschallwasserbad gesetzt. Zwischen den einzelnen Ultraschallbehandlungen werden die Proben auf Eis gekühlt. Damit Zelltrümmer und Gewebereste sich absetzen können, werden die Lysate für 3 Minuten bei RT inkubiert. Die so entstandenen Überstände werden in neue Reaktionsgefäße überführt und mit 300 µl Chloroform zur Proteinfällung versetzt. Durch vorsichtiges Kippen der Reaktionsgefäße werden die Proben gemischt und danach für 3 Minuten bei RT inkubiert. Das Gemisch wird bei 10000 rpm und 4 °C für 15 min abzentrifugiert. Die entstandene obere Phase enthält die RNA und wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt, wobei sorgsam darauf geachtet wird, dass die Interphase, welche die Proteine enthält, nicht mit abgenommen wird. Durch Zugabe von 500 µl eisgekühltem Isopropanol wird die RNA gefällt und kann nach 10-minütiger Inkubation auf Eis pelletiert werden (10000 rpm, 4 °C, 10 Minuten). Das Pellet wird nachfolgend in 70 %-igem Ethanol (mit DEPC-Wasser angesetzt) gewaschen und abschließend in 30 µl DEPC-Wasser gelöst. Nach Bestimmung der RNA-Konzentration werden die Proben bei -80 °C gelagert.

### 3.5.8 Lysatherstellung aus Gewebe

Zur Lysatherstellung werden ebenfalls 3 mm<sup>2</sup> große, schockgefrorene Gewebestücke des Nierenkortex verwendet. Diese werden auf Eis aufgetaut und mit 500 µl Lysepuffer versetzt. Anschließend erfolgt der Zellaufschluss im Homogenisator. Die Nierenlysate werden 3 Mal für jeweils 10 Sekunden mit Ultraschall behandelt. Die Proben werden in einem letzten Schritt bei 14000 rpm bei 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert und die Überstände in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach der Proteinkonzentrationsbestimmung werden die Lysate bei -80° C eingefroren.

## 3.6 Histologische Methoden

### 3.6.1 Herstellen der Gewebeschnitte

Die Gewebeschnitte werden auf einem Rotationsmikrotom der Firma SLEE angefertigt. Die 1 µm dünnen Paraffinschnitte werden zunächst auf der Oberfläche eines Wasserbades (42 °C) abgelegt und von dort auf Superfrost Objektträger überführt. Die Schnitte werden über Nacht im Wärmeschrank bei 50 °C getrocknet und anschließend bei Raumtemperatur in Aufbewahrungsboxen gelagert.

### 3.6.2 Entparaffinieren der Gewebeschnitte

Zum Entparaffinieren werden die Schnitte dreimal für jeweils 10 Minuten in Xylol gegeben. Anschließend werden die Schnitte langsam gewässert, indem sie in eine absteigende Alkoholreihe und zuletzt in Wasser getaucht werden.

Ethanol, 100 %	3x 2 Minuten
Ethanol, 96 %	2x 2 Minuten
Ethanol, 70 %	1x 5 Minuten
A.dest	1x 5 Minuten

### 3.6.3 PAS-Färbung

Die *Periodic-Acid-Schiff* (PAS)-Reaktion ist eine zytochemische Reaktion zum Nachweis von Glykogen. Die Perjodsäure oxidiert die Glykolgruppen zu Aldehydgruppen. Das Schiffsche Reagenz enthält eine fuchsinschwefelige Säure (farblos), die durch die Bindung an

Aldehydgruppen chromogene Eigenschaften erhält (magentarot). Durch eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin stellen sich die Zellkerne blau dar.

Die Nierenschnitte werden zunächst wie zuvor beschrieben deparaffiniert. Die Oxidation erfolgt in 2 %-iger Perjodsäure für einen Zeitraum von 30 Minuten. Nach einmaligem Waschen der Schnitte für 5 Minuten in destilliertem Wasser werden diese für 60 Minuten ins Schiffsche Reagenz gestellt. Anschließend werden die Präparate für 5 Minuten unter fließendem Wasser gespült, 5 Minuten in Hämalaun inkubiert und schließlich dreimal in A. dest gewaschen. Darauffolgenden wurden die Träger zehnmal in TBS [pH 8,3] getaucht und danach in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol entwässert. Die Schnitte werden mit Histokit und Deckgläschen versehen und bei RT gelagert.

### 3.6.4 Siriusrot-Färbung

Siriusrot wird zur Quantifizierung von Kollagen im Gewebe genutzt. Der Farbstoff reagiert über seine sulfonischen Säuregruppen mit den basischen Gruppen des Kollagens.

Nach Entparaffinierung der Schnitte werden diese in 0,1 %-iger Siriusrot-Lösung für 10 Minuten inkubiert. Darauffolgend werden die Objektträger in 0,01 N HCl für 2 min eingetaucht. Nach einem 2-minütigen Waschschrift in destilliertem Wasser werden die Präparate mittels aufsteigender Alkoholreihe dehydriert und mit Histokit eingedeckt.

#### Siriusrot-Lösung:

Siriusrot	1 g
Wässrige Pikrinsäure	100 ml

### 3.6.5 TUNEL-Färbung

Das *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling* (TUNEL) wird auf 1 µm dicken Paraffinschnitten unter der Verwendung des *In situ cell death detection Kits* der Firma Roche durchgeführt. Dazu wird das Methacarn-fixierte Gewebe zunächst entparaffiniert und für 15 min bei 37 °C in Proteinase K-Lösung inkubiert. Anschließend werden die Schnitte dreimal für jeweils 5 Minuten in PBS gewaschen und dann für eine Stunde bei 37 °C mit dem TUNEL-Reagenz in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS erfolgt eine Gegenfärbung mit DAPI für 5 min bei RT, ebenfalls in der feuchten Kammer. Die Objektträger werden nach einmaligem Waschen

in PBS mit Immu-Mount eingedeckt. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse erfolgt mit einem Olympus Lichtmikroskop mit Fluoreszenzlampe.

Proteinase K-Lösung:

Proteinase K	20 µg
Tris-HCl pH 7,4 (10 mM)	200 ml

### 3.6.6 Immunhistologische Färbungen

Die in der Arbeit verwendeten immunhistologischen Färbemethoden basieren auf der Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-Methode. Hierzu werden die deparaffinierten Gewebeschnitte für 10 Minuten in 3%-iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung gestellt, um die endogene Peroxidase zu blockieren. Bei folgenden primären Antikörpern sind weitere Blockierungsschritte notwendig: anti-Notch-3, anti-PCNA, anti-F4/80. Bei diesen Antikörpern wird zusätzlich mit dem *Avidin-Biotin blocking kit* endogenes Avidin und Biotin blockiert. Zwischen den einzelnen Blockierungsschritten wird jeweils für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Der primäre Antikörper wird in PBS mit 1% BSA verdünnt, auf die Nierenschnitte gegeben und 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend erfolgen 3 Waschschrte in PBS für jeweils 5 Minuten. Der sekundäre Antikörper ist an ein Biotinmolekül gekoppelt und wird ebenfalls in BSA/PBS verdünnt. Die Schnitte werden 30 Minuten bei RT mit dem Sekundärantikörper inkubiert und im Anschluss abermals dreimal in PBS gewaschen. Als Label wurde dann ein Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex (ABC) eingesetzt, der sich mit seinen freien Avidin-Bindungsstellen an den biotinmarkierten Sekundärantikörper anlagern kann. Der AB-Komplex wird in PBS verdünnt und für 30 Minuten auf die Präparate geben. Als Peroxidase-Substrat wird eine Diaminobenzidin (DAB)-Lösung verwendet. Nach dem Waschen der Objektträger in PBS werden diese in die DAB-Lösung bei 37 °C gestellt. Die Färbereaktion wird unter dem Mikroskop kontrolliert und bei gewünschter Signalintensität wird die Reaktion durch Einbringen in destilliertes Wasser gestoppt. Nach 10 Minuten werden die Schnitte zur Gegenfärbung für 3 Minuten in Methylgrün gefärbt. Im Anschluss wird das Gewebe in der aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol dehydriert und mit Histokit eingedeckt.

Bei der Detektion von *α-smooth muscle* Aktin ( $\alpha$ -SMA) wird ein primärer Antikörper verwendet, der bereits biotinyliert vorliegt, so dass auf einen Sekundärantikörper verzichtet werden kann. Als Label wird in diesem Einzelfall das ABC-AP Kit von Vector verwendet, ansonsten wird die Färbung wie zuvor beschrieben durchgeführt.



DAB-Lösung:

DAB	4	ml
Tris-HCl pH7,4 (10 mM)	175	ml
NiCl <sub>2</sub> (8 %)	1	ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30 %)	100	µl

### 3.6.7 Morphometrische Auswertung

Die Färbungen für Kollagene Typ I und III,  $\alpha$ -SMA, F4/80 und Siriusrot werden morphometrisch ausgewertet. Die Behandlungsgruppenzugehörigkeit der Schnitte wird vor der Auswertung unkenntlich gemacht. Von jedem Schnitt werden 20 Aufnahmen innerhalb des Kortex' in 200-facher Vergrößerung angefertigt und mittels AnalySIS Pro Software quantifiziert. Hierbei wird der prozentuale Anteil der immunhistologisch gefärbten Fläche zur Gesamtfläche gemessen.

Für die Analyse der Siriusrot-Färbung wird zusätzlich ein Polarisationsfilter eingesetzt. Mit Hilfe des Filters wird neben dem Kollagen selbst auch die Dichte sichtbar gemacht. Die dichter angeordneten Fasern erscheinen im polarisierten Licht rot und die weniger dicht gepackten Kollagenfasern stellen sich grün dar.

### 3.6.8 Evaluation proliferierender und apoptotischer Zellen

Zur Beurteilung der Proliferation wird eine PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*)-Färbung durchgeführt. PCNA ist ein Marker für Zellen, die sich in der frühen G1 oder in der S Phase des Zellzyklus befinden. Zur Quantifizierung wird von jedem Tier ein Schnitt gefärbt und pro Schnitt 40 zufällig ausgewählte Gesichtsfelder (Vergrößerung: 200-fach) am Mikroskop beurteilt und die Zahl signalpositiver Zellen gezählt. Hierbei wird unterschieden, ob es sich um glomeruläre, tubuläre oder interstitielle Zellen handelt. Aus den 40 Einzelwerten eines Tieres wird der Mittelwert gebildet.

Apoptotische Zellen werden mittels TUNEL-Färbung dargestellt. Auch hier wird ein Schnitt pro Tier gefärbt und 40 zufällig ausgewählte Gesichtsfelder (Vergrößerung: 400-fach) ausgewertet. Da bei der TUNEL-Färbung eine Eigenfluoreszenz des Gewebes nicht vollständig unterbunden werden kann, wird zusätzlich zur Kontrolle eine Kernfärbung mittels DAPI durchgeführt und nur Zellkerne gewertet, die sowohl TUNEL- als auch DAPI-positiv sind.

Die Auswertungen erfolgen verblindet nach Überkleben der Identifikationsnummern.

## 4. Ergebnisse

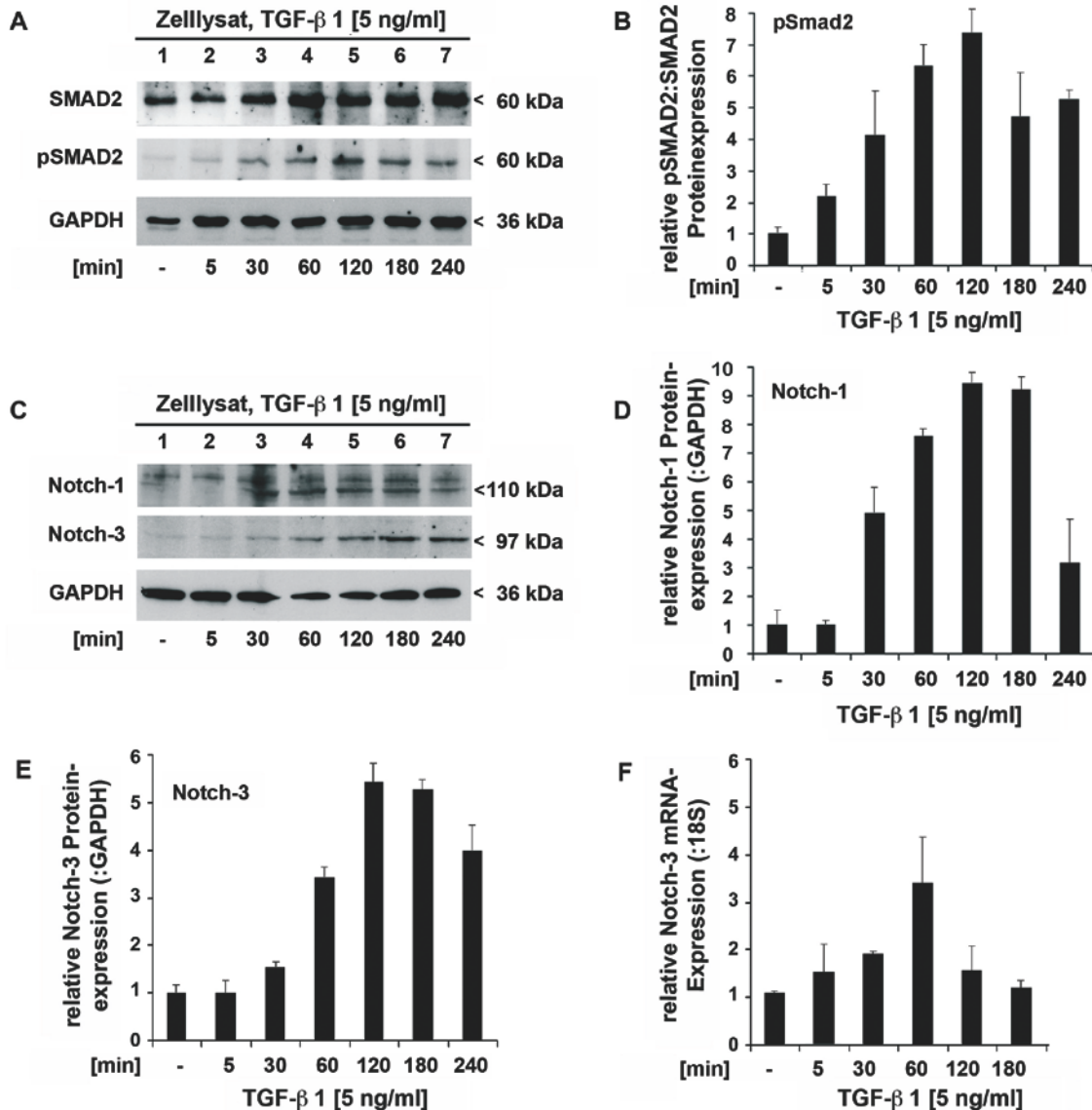
### 4.1 TGF- $\beta$ 1 als Induktor der Notch-Rezeptoren in Mesangialzellen

Über die Expression und Funktion von Notch-3 Rezeptoren in der adulten Niere ist bisher wenig bekannt. In eigenen Vorarbeiten konnten wir zeigen, dass Notch-3 in verschiedenen Zelllinien, u.a. in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293T), Tubuluszellen (HK-2) und humanen Mesangialzellen (hMC), exprimiert wird. Immunhistochemische Expressionsstudien zeigten, dass Notch-3 in der gesunden Rattenniere durch wenige Zellen exprimiert wird<sup>11</sup>. Hauptsächlich die glatten Muskelzellen der Gefäße und vereinzelte Tubulus- und Sammelrohrzellen waren Notch-3 immuno-positiv. Erst unter pathophysiologischen Bedingungen einer mesangioproliferativen Glomerulonephritis (Anti-Thy1.1) konnte eine verstärkte Notch-3 Rezeptor-Expression, vornehmlich in Mesangialzellen, detektiert werden.

Diese Vorarbeiten führten uns zu der Frage, wie die Expression von Notch-3 Rezeptoren unter pathophysiologischen Bedingungen reguliert wird. Morrisey et al beschrieben, dass eine Stimulation von epithelialen Nierenzellen mit dem *transforming growth factor* (TGF)- $\beta$ 1 die Expression von Jagged als Liganden und von Notch-Rezeptoren -1, -2 und -4 erhöht. Die Arbeitsgruppe um Susztak konnte dies für Jagged-1 und Notch-1 in Podozyten und in tubulären Epithelzellen ebenfalls nach TGF- $\beta$  Stimulation zeigen<sup>82, 84</sup>.

Aus diesen Gründen untersuchten wir zunächst die Notch-3 Rezeptor-Expression nach TGF- $\beta$ 1 Inkubation in primären humanen Mesangialzellen (hMC). Hierzu wurden jeweils  $2 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung in 6-Lochplatten ausgesät und mit 5 ng/ml TGF- $\beta$ 1 für jeweils 5, 30, 60, 120, 180 und 240 Minuten inkubiert. Anschließend wurde aus diesen Zellen sowohl die RNA isoliert, durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR analysiert, als auch Proteinlysate für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und anschließende Western Blot-Analyse hergestellt. Die Zellen wurden hierzu mittels RIPA-Puffer lysiert und der Proteingehalt mit Hilfe der Bradford-Methode quantifiziert. Um den Auftrag gleicher Proteinmengen zu gewährleisten, erfolgte ein Proteinabgleich mittels GAPDH. Die Bestimmung der Notch-1 und Notch-3 Rezeptor-Expression erfolgte mit spezifischen Antikörpern, die gegen die abgespaltenen intrazellulären Domänen der Rezeptoren gerichtet sind. Die Bandenintensität wurde anschließend mit dem Programm *Scion Image* gemessen und gegen GAPDH normalisiert. Um beurteilen zu können, inwiefern sich der Proteingehalt von Notch-1 und Notch-3 Rezeptoren in TGF- $\beta$ 1 stimulierten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen verändert, wurde bei der Quantifizierung die

Bandenintensität der unstimulierten Kontrollzellen mit 1 angesetzt und die relativen Bandenintensitäten der anderen Proben darauf bezogen (Abbildung 5 B, D und E). Bei der Expressionsanalyse auf mRNA-Ebene wurde 18S rRNA als interne Referenz zur Normalisierung verwendet. Als Kontrolle für eine erfolgreiche TGF- $\beta$ 1 Stimulation wurde der Phosphorylierungsstatus von SMAD2 nachgewiesen.

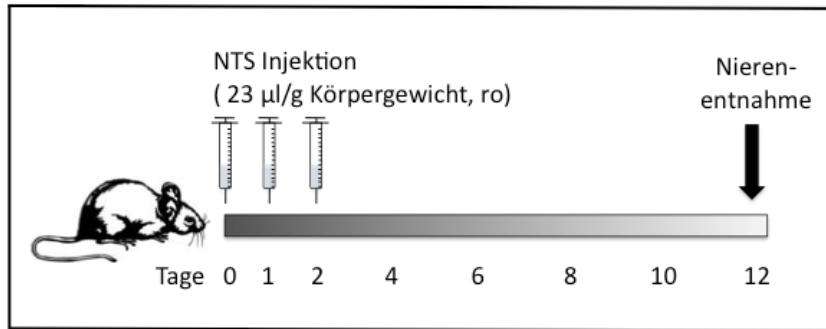


**Abbildung 5: Notch-3 Expression in humanen Mesangialzellen nach Inkubation mit TGF- $\beta$ 1.** Western Blot und qRT-PCR Analyse humaner Mesangialzellen nach unterschiedlicher Stimulationsdauer mit 5 ng/ml TGF- $\beta$ 1. (A) Als Stimulationkontrolle wurde die Expression und Phosphorylierung von SMAD2 betrachtet. (C) Notch-Rezeptoren wurden mit einem spezifisch gegen die abgespaltene intrazelluläre Domäne gerichteten Antikörper quantifiziert. Zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge wurde ein Proteinabgleich mit GAPDH durchgeführt. (B, D, E) Zur Bestimmung des relativen Proteingehalts wurden die Bandenintensitäten mittels *Scion Image* bestimmt und gegen GAPDH normalisiert. (F) Zusätzlich wurde aus den Zellen die RNA extrahiert und diese für die quantitative *real time* PCR-Analyse in cDNA umgeschrieben. Die Normalisierung der relativen Expression erfolgte gegen 18S rRNA als interne Referenz. Der Wert der unstimulierten Kontrollzellen wurde gleich 1 gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Blot aus drei unabhängigen Experimenten. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen (SD).

Eine Aktivierung der TGF- $\beta$  Signalkaskade konnte schon nach 30 Minuten auf Grund der SMAD2-Phosphorylierung nachgewiesen werden (Abbildung 5 A und B). Während die Expression von SMAD2 annähernd gleich blieb, stieg der Gehalt an pSMAD2 in den ersten 120 Minuten stetig an und fiel bis 4 Stunden nach TGF- $\beta$  Zugabe gering ab. In unstimulierten Zellen waren sowohl Notch-1 als auch Notch-3 Rezeptoren nur schwach oder nicht detektierbar. Nach TGF- $\beta$  Exposition konnte eine verstärkte Rezeptor-Expression/Aktivierung beobachtet werden, die eine ähnliche Kinetik wie die SMAD2-Phosphorylierung aufwies. Für beide Rezeptoren war eine Akkumulation der intrazellulären Domäne innerhalb von 120 Minuten detektierbar, die anschließend wieder abnahm (Abbildung 5 C-E). In Korrelation dazu stieg auch die Notch-3 Transkriptzahl nach TGF- $\beta$  Stimulation auf das 3,5-fache an (Abbildung 5 F).

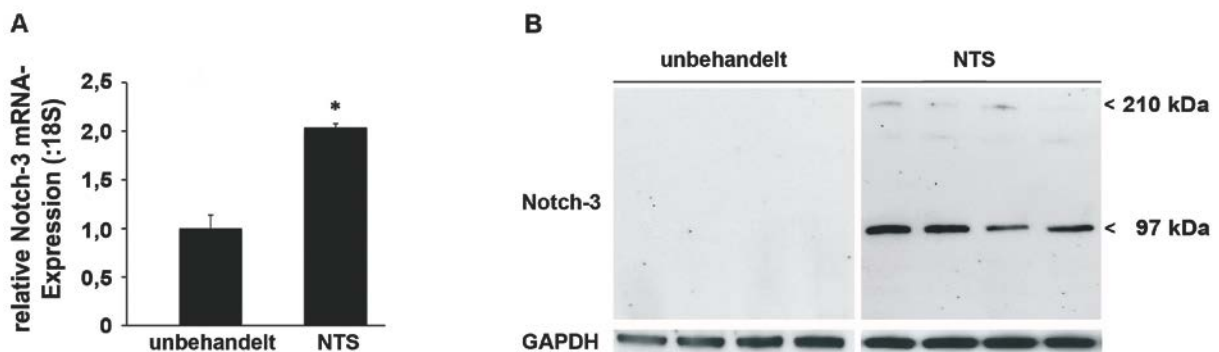
#### **4.2 Notch-3 Rezeptor-Expression bei der nephrotoxischen Nephritis (NTN)**

Die Arbeitsgruppe von Susztak zeigte, dass Notch-1 Rezeptoren eine Rolle bei der Entstehung von glomerulären Erkrankungen wie der diabetischen Nephropathie und der fokal segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) übernimmt<sup>82, 83</sup>. Wir wiesen eine gesteigerte Notch-Rezeptor Expression in einem glomerulären Schädigungsmodell nach<sup>86</sup>. Um die Relevanz einer Proteinexpression im pathophysiologischen Geschehen zu untersuchen, können verschiedene Ansätze gewählt werden. Eine pharmakologische Inhibition der Notch-Signaltransduktion ist mit Hilfe eines  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitors (GSI) möglich, allerdings können dabei die individuellen Rezeptorhomologe nicht spezifisch in ihrer Aktivierbarkeit gehemmt werden. Daher entschieden wir uns für den Einsatz Notch-3 defizienter Mäuse (Notch-3 KO). Diese wurden uns von Prof. Joutel und Prof. Chatziantoniou (beide: Inserm, Paris) zur Verfügung gestellt. Notch-3 *knockout*-Mäuse entwickeln sich normal und weisen keinen erkennbaren pathologisch auffälligen renalen Phänotyp auf<sup>20</sup>. Da bisher das Modell der mesangioproliferativen Nephritis nur für Ratten etabliert ist, haben wir ein alternatives glomeruläres Schädigungsmodell in Mäusen, die nephrotoxische Nephritis (NTN), durchgeführt. Abbildung 6 zeigt schematisch das experimentelle Design des NTN-Versuchs.



**Abbildung 6: Studiendesign zur Behandlung von Mäusen mit nephrotoxischem Serum.** Induktion der nephrotoxischen Nephritis (NTN) durch retroorbitale (ro) Injektion von 23 µl pro Gramm Körpergewicht des nephrotoxischen Schafserums (NTS) auf drei aufeinander folgenden Tagen. Urinentnahme an den angegebenen Tagen. Nieren- und Serumentnahme erfolgte an Tag 12 nach NTN-Induktion.

Hierzu wurden 24 Wochen alten weiblichen C57Bl/6J Wildtyp-Mäusen an drei aufeinander folgenden Tagen retroorbital (ro) 23 µl pro Gramm Körpergewicht nephrotoxisches Schafserum injiziert (NTN, n=5). Als Kontrollgruppe wurden unbehandelte Wildtyp-Mäuse (Geschwistertiere, n=5) verwendet. 12 Tage nach NTN-Induktion wurden aus dem Kortex der Nieren RNA und Gewebelysate gewonnen und auf ihre Notch-3 Expression untersucht. Die Gesamt-RNA wurde durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und die Notch-3 Transkripte in der qRT-PCR analysiert. Zusätzlich wurde ein Teil des Gewebes in RIPA-Puffer homogenisiert und mit Ultraschall behandelt. Nach Zentrifugation wurde die Proteinkonzentration in den Lysaten bestimmt und anschließend in der Western Blot-Analyse eingesetzt. Der Notch-3 Proteingehalt wurde wie zuvor mit einem gegen die intrazelluläre Domäne gerichteten Antikörper untersucht.



**Abbildung 7: Notch-3 Expression nach NTN-Induktion.** (A) qRT-PCR-Analyse der kortikalen mRNA von unbehandelten und NTS-behandelten Wildtyp-Mäusen. Die Normalisierung der relativen Expression erfolgte gegen 18S rRNA als interne Referenzkontrolle. Der Mittelwert der unbehandelten Tiere wurde gleich 1 gesetzt und der Wert nach NTN-Induktion darauf bezogen. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SD (n=5). \* p<0,05. (B) Western Blot-Analyse der Nierenlysate nach NTN-Induktion. Notch-3 wurde mit einem gegen die intrazelluläre Domäne gerichteten Antikörper detektiert. Der Proteinabgleich erfolgte mittels GAPDH.

In der quantitativen *real time* PCR-Analyse zeigte sich, dass 12 Tage nach der ersten NTS-Injektion der Notch-3 mRNA-Gehalt im Nierenkortex signifikant um das 2-fache anstieg

(Abbildung 7 A). Die Western Blot-Analyse verdeutlichte, dass in unbehandelten adulten Tieren keine Notch-3 Expression/Aktivierung vorliegt (Abbildung 7 B links). Erst nach Gabe des nephrotoxischen Serums waren die abgespaltene intrazelluläre Domäne (97 kDa) und der Vollängen-Rezeptor (210 kDa) detektierbar (Abbildung 7 B rechts). Zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmengen wurde ein Proteinabgleich mit GAPDH durchgeführt (Abbildung 7 B unten). Dargestellt sind jeweils vier repräsentative Tiere aus den beiden Gruppen.

### 4.3 Vergleich der durch NTN-induzierten Schädigung in Notch-3 KO und Wildtyp-Mäusen

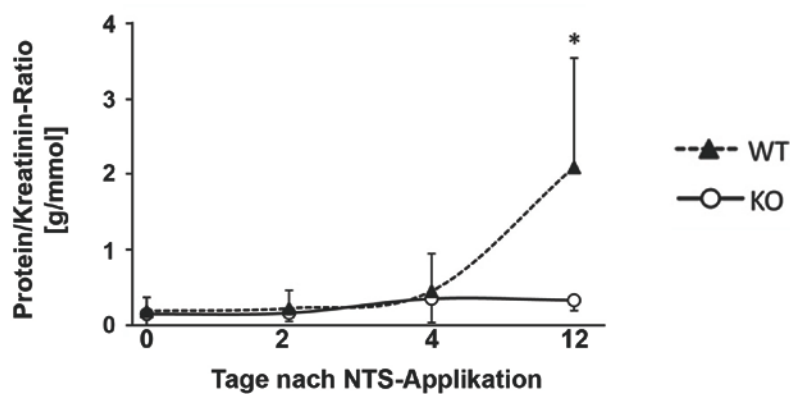
Da nach Induktion der nephrotoxischen Nephritis die Notch-3 Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene signifikant anstieg, sollte darauffolgend die NTN-induzierte Schädigung in Wildtyp-Mäusen mit der in Notch-3 *knockout*-Mäusen verglichen werden. Hierzu wurden in einem ersten Ansatz 11 Wildtyp-Mäuse und 12 Notch-3 KO Mäuse wie zuvor beschrieben mit dem nephrotoxischen Serum behandelt. Der Verlauf der nephrotoxischen Nephritis wurde durch regelmäßige Entnahme von Spontanurin und Messung des Körpergewichtes beobachtet. Abbildung 6 zeigt schematisch die Tage, an denen der Urin entnommen und das Körpergewicht gemessen wurde.

Gruppe	Körpergewicht [g]				
	Tage				
	0	2	4	8	12
Wildtyp (n=11)	21±1	22±2	22±2	23±3	25±3
Notch-3 <i>knockout</i> (n=11)	21±2	21±1	22±1	22±2	23±3

**Tabelle 3: Gewichtsveränderungen nach NTS-Gabe bei Wildtyp- und Notch-3 *knockout*-Mäusen.** Das Körpergewicht der Wildtyp- und Notch-3 *knockout*-Mäuse wurde vor der ersten Injektion und im Verlauf gemessen. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte ± SD.

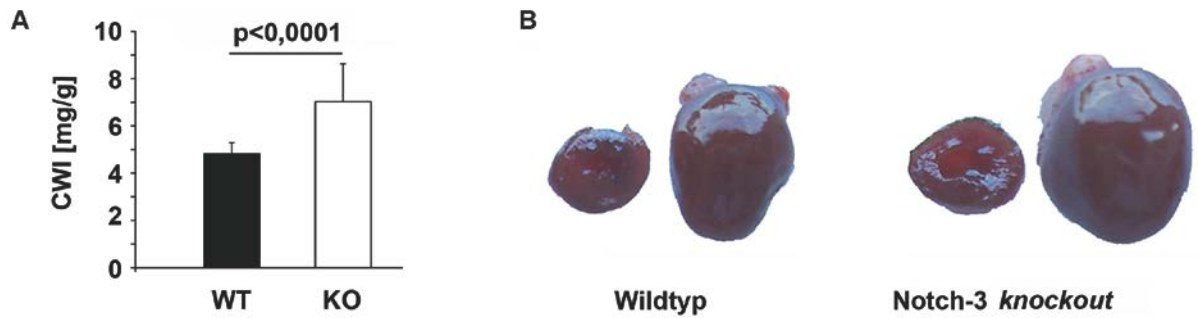
Durch Verlust der Nierenfunktion und der damit verbundenen Einlagerung von Wasser nahm das Körpergewicht sowohl bei den Wildtyp-Mäusen als auch bei den Notch-3 defizienten Mäusen zu. Es waren jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen messbar (Tabelle 3). Im Spontanurin wurde die Proteinkonzentration und der Kreatiningehalt gemessen. Bei Betrachtung des Protein/Kreatinin-Quotienten zeigte sich, dass dieser 12 Tage nach NTS-Applikation bei den Wildtyp-Mäusen signifikant um das 10-fache anstieg, während

er bei den Notch-3 defizienten Mäusen nur leicht anstieg (Abbildung 8). Auffällig war jedoch die große Varianz innerhalb der Wildtyp-Gruppe. Dies ist vermutlich auf Unterschiede in der Krankheitsentwicklung zurückzuführen, da zu diesem frühen Zeitpunkt noch nicht alle Tiere eine Nephritis entwickelt haben und zudem das NTN-Modell abhängig von den verwendeten Mausstämmen ist. Aus Erfahrung sind Mäuse mit Bl6-Hintergrund gegenüber renalen Schädigungen weniger empfindlich. Bei diesen Tieren sind 12 Tage nach NTS-Applikation eher geringe Effekte in der Niere zu erwarten. Wir mussten den Versuch an diesem Tag abbrechen, da sich die Notch-3 *knockout*-Mäuse in einem schlechten Gesundheitszustand befanden. Während des Experiments verstarb eine Maus vorzeitig am sechsten Tag. Der schlechte Allgemeinzustand der Tiere kontrastierte zu der fehlenden oder geringen Proteinurie.



**Abbildung 8: Verlauf der Protein/Kreatinin-Ratio im Spontanurin nach NTN-Induktion.** Bei den angegebenen Werte handelt es sich um Mittelwerte  $\pm$ SD (n=11). WT= Wildtyp, KO= Notch-3 *knockout*. \*p<0,05

Der Versuch wurde ein weiteres Mal wiederholt und musste ebenfalls, diesmal nach 10 Tagen, aus den gleichen Gründen abgebrochen werden. Bei der Sektion der Tiere zeigte sich, dass die Nieren der Notch-3 *knockout*-Mäuse einen gesunden rosa-roten Farbton aufwiesen, während sich die Nieren der Wildtyp-Mäuse teilweise nur noch blass rosa darstellten. Dies kann als makroskopisches Indiz für eine Nierenschädigung gewertet werden. Da die Nieren der Notch-3 defizienten Mäuse unauffällig erschienen und somit die physiologisch schlechte Verfassung der Tiere nicht erklären konnten, wurden die anderen Organe zunächst makroskopisch untersucht.

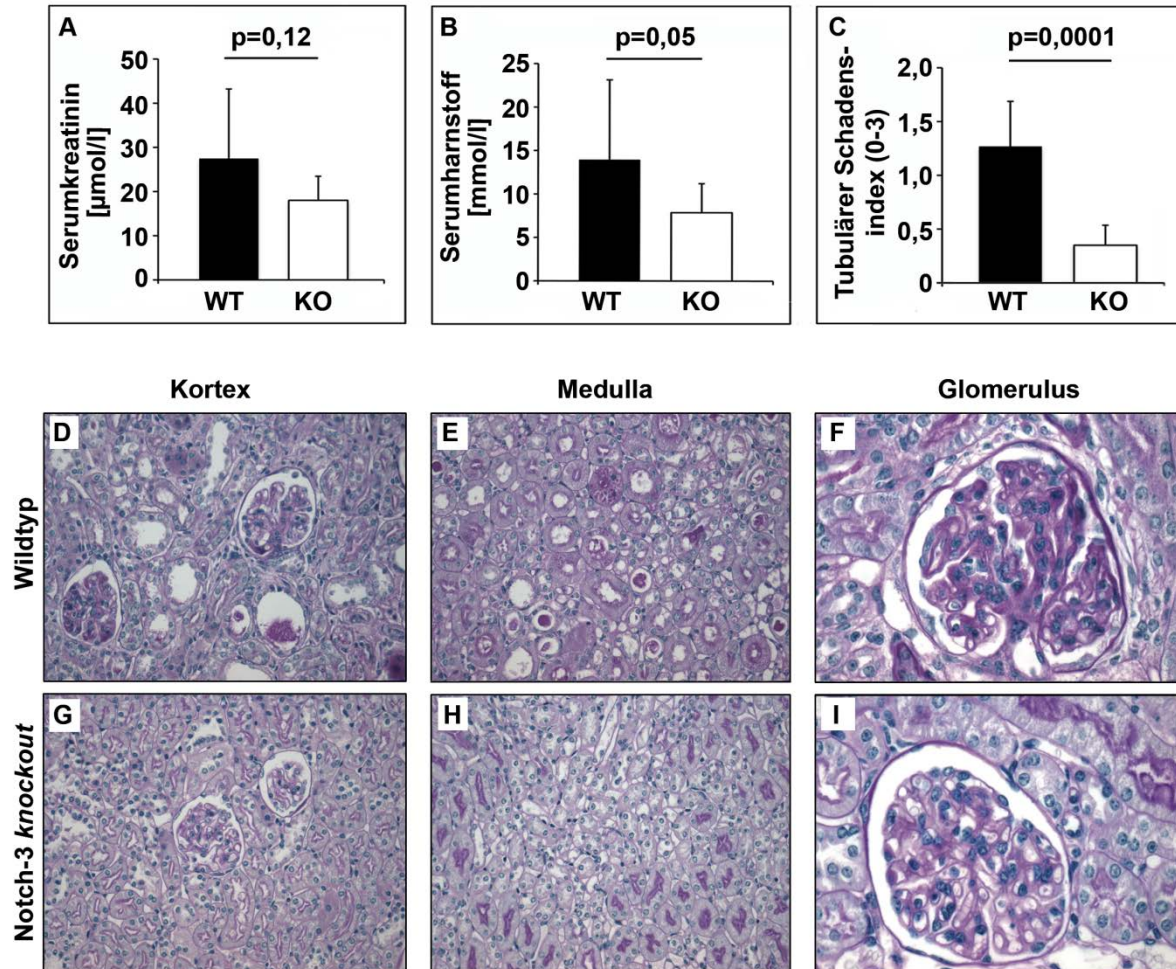


**Abbildung 9: Herzen nach NTS-Gabe.** (A) *Cardiac weight index* (CWI) wurde aus dem Verhältnis von Körper- zu Herzgewicht ermittelt. WT= Wildtyp; KO= Notch-3 *knockout*. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SD (n=11). (B) Querschnitt und Frontalansicht der Herzen von Wildtyp- (links) und Notch-3 *knockout*-Mäusen (rechts).

Auffällig verändert war dabei die Herzgröße. Das Herz der Notch-3 *knockout*-Mäuse war im Vergleich zu denen der Wildtyp-Tiere stark vergrößert. Wir entnahmen zusätzlich zu den Nieren auch die Herzen der Mäuse und ermittelten deren Gewicht. Die Herzen der Notch-3 defizienten Mäuse waren nicht nur optisch größer, sondern auch fast doppelt so schwer wie die Herzen der Wildtyp-Geschwistertiere. Der ermittelte *cardiac weight index* (CWI) war bei den Notch-3 defizienten Mäusen signifikant erhöht (Abbildung 9 A). Abbildung 9 B zeigt links den Querschnitt und die Frontalansicht eines repräsentativen Wildtyp-Tiers. Im Vergleich dazu ist rechts das Herz einer Notch-3 *knockout*-Maus abgebildet.

Der Versuch wurde aufgrund der unerwarteten Herzprobleme frühzeitig abgebrochen, jedoch wurden die Nieren und Blut entnommen und weiter analysiert. Eine Niere pro Maus wurde über Nacht in Methacarn fixiert und anschließend in Paraffin für histologische Untersuchungen eingebettet. Aus dem Vollblut wurde mittels Zentrifugation Serum gewonnen und im Zentrallabor des Instituts für Versuchstierkunde der RWTH Aachen untersucht. Der Kreatinin-Gehalt im Serum der Wildtyp-Mäuse (WT) war im Vergleich zu den Notch-3 defizienten Mäusen (KO) leicht erhöht (Abbildung 10 A). Ein signifikanter Unterschied konnte jedoch bei Bestimmung des Serumharnstoffes festgestellt werden. Der Harnstoffgehalt war in der Wildtyp-Gruppe nach NTS-Applikation fast doppelt so hoch wie in der Notch-3 *knockout*-Gruppe (Abbildung 10 B).

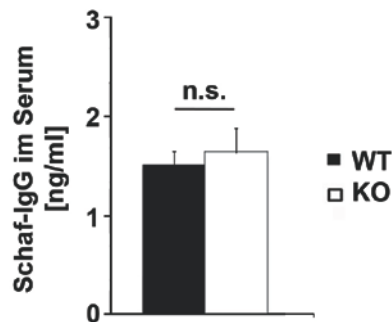




**Abbildung 10: Funktionelle und histologische Parameter nach NTS-Gabe.** (A) Serumkreatinin- und (B) Serumharnstoff-Werte 10 Tage nach NTN-Induktion. WT= Wildtyp; KO= Notch-3 *knockout*. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SD (n=11). (C) Tubulärer Schadensindex: 0=kein tubulärer Schaden, 1= Tubulusdilatation, 2= Verlust des Bürstensaums, 3= Verlust des Bürstensaums und Apoptose tubulärer Zellen. Ausgewertet wurden 200 Tubuli pro Tier. PAS-Färbung der NTS-behandelten Wildtyp (D-F) und Notch-3 defizienten Mäuse (G-I).

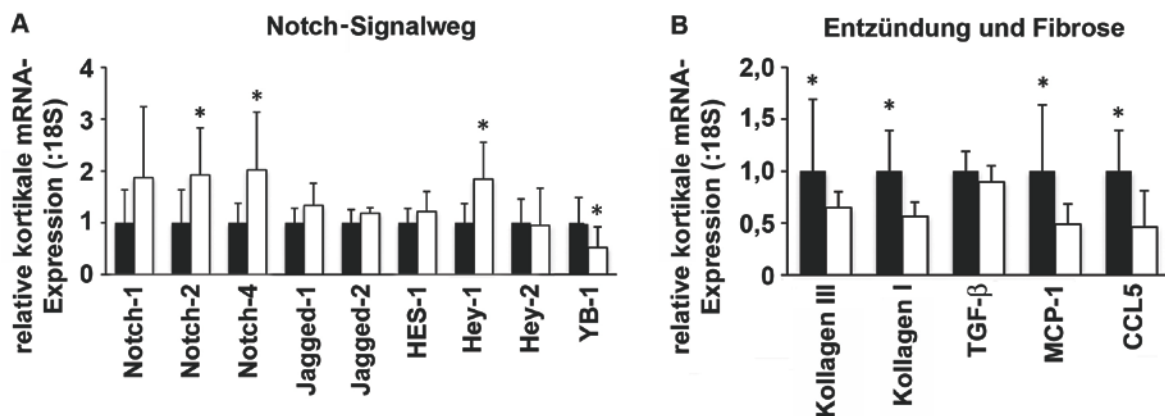
Neben den funktionellen Nierenparametern wurde die Nierenmorphologie betrachtet. In der PAS-Färbung zeigte sich, dass bei den Wildtyp-Mäusen nach Gabe des nephrotoxischen Serums vor allem tubuläre Schäden auftraten (Abbildung 10 D-E), während die Glomeruli weitestgehend unbeschädigt blieben (Abbildung 10 D, F). Dies ist ein weiteres Indiz für eine relativ kurze Versuchsdauer hinsichtlich der Nierenschädigung. Im Verlauf der NTN entstehen erst tubuläre Schäden, dann kommt es zur Glomerulosklerose und zur Ausbildung einer sogenannten Halbmondformation (*crescent*) durch Proliferation der Epithelzellen in den Bowman'schen-Kapselraum. Die Notch-3 *knockout*-Mäuse zeigten morphologisch keine Auffälligkeiten (Abbildung 10 G-I). Zur genauen Quantifizierung wurde ein tubulärer Schadensindex ermittelt. Hierzu wurden pro Maus 200 Tubuli betrachtet und entsprechend folgender Kriterien bewertet: 0= kein tubulärer Schaden, 1= Dilatation des Tubulus, 2= Verlust des Bürstensaums, 3= Verlust des Bürstensaums mit Verlust (Apoptose/Nekrose)

tubulärer Zellen. Die Anzahl der Tubuli wurde mit dem jeweiligem Status (0-3) multipliziert und daraus der Mittelwert gebildet. Während die Notch-3 *knockout*-Mäuse einen tubulären Schadensindex von nur 0,4 aufwiesen, betrug dieser bei den Wildtyp-Tieren 1,25 und war somit drei Mal so hoch wie der Wert der *knockout*-Mäuse (Abbildung 10 C).



**Abbildung 11: Konzentration des Schafs-IgG im Serum.** Die Schaf-IgG Konzentration wurde mittels ELISA im Mausserum 10 Tage nach NTN-Induktion ermittelt. Werte sind Mittelwerte  $\pm$ SD (n=11); WT= Wildtyp; KO= Notch-3 *knockout*; n.s.= nicht signifikant

Als Applikationskontrolle wurde die Konzentration des Schaf-IgGs in den Mausseren 10 Tage nach Beginn der NTN-Induktion bestimmt. Es zeigte sich, dass die Injektion des nephrotoxischen Serums bei beiden Gruppen erfolgreich war und es keine signifikanten Unterschiede in der Konzentration des Schaf-IgGs in den Seren beider Gruppen gab (Abbildung 11).

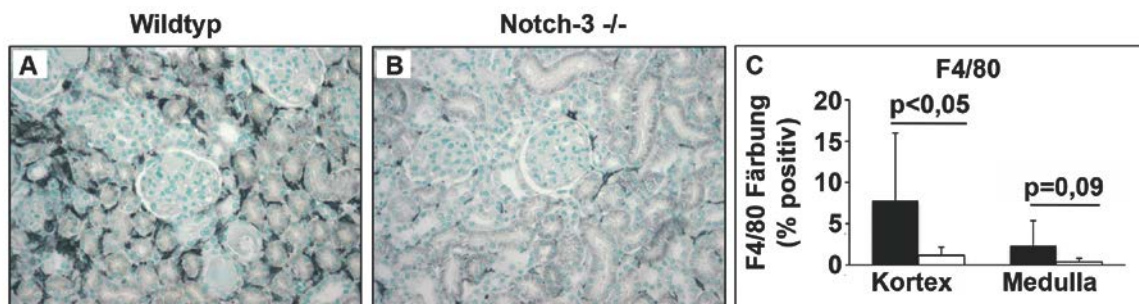


**Abbildung 12: Expression Entzündungs- und Fibrose-assoziiierter Gene 10 Tage nach NTS-Applikation.** Die Gesamt-RNA wurde aus kortikalem Nierengewebe isoliert und für die qRT-PCR-Analyse in cDNA umgeschrieben. Die Normalisierung der relativen Expression erfolgte gegen 18S rRNA als interne Referenzkontrolle. Der Wert der Wildtyp-Mäuse wurde gleich 1 gesetzt und die Werte der Notch-3 defizienten Mäuse darauf bezogen. Untersucht wurden Gene der Notch-Signaltransduktion (A) und Entzündungs- und Fibrose-assoziierte Gene (B). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD (n=11). Wildtyp ■ Notch-3 *knockout* □ \*p<0,05

Darauffolgend wurde die mRNA-Expression weiterer Mitglieder der Notch-Signaltransduktion untersucht. Hierzu wurde die Gesamt-RNA aus kortikalem Nierengewebe isoliert und für die qRT-PCR-Analyse in cDNA umgeschrieben. In den NTS-behandelten Mäusen führte die Notch-3 Depletion zu einer verstärkten Expression der anderen Notch-

Rezeptoren (-1, -2, -4). Die Liganden Jagged-1 und -2 waren dagegen in den Notch-3 *knockout*-Mäusen ähnlich stark exprimiert wie in den Wildtyp-Mäusen (Abbildung 12 A).

Von den untersuchten Notch-Zielgenen konnte eine signifikant veränderte Expression nur für Hey-1 gezeigt werden. Hier war die Transkriptzahl in den Notch-3 defizienten Mäusen fast verdoppelt. Im Gegensatz dazu war ein Notch-3 Interaktionspartner, das Y-box Protein-1 (YB-1), in den Notch-3 *knockout*-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen stark herunterreguliert. Des Weiteren wurde die Expression von Genen, die in der Fibrose oder Entzündung hochreguliert sind, untersucht. Auch hier zeigte sich, dass eine Notch-3 Depletion einen Einfluss auf diese Marker hat. Die Transkripte für Kollagen I und III waren in den Notch-3 defizienten Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen in der nephrotoxischen Nephritis signifikant reduziert. Auch Chemokine wie MCP-1 (CCL2) oder RANTES (CCL5) waren in den Wildtyp-Mäusen verstärkt exprimiert (Abbildung 12 B).



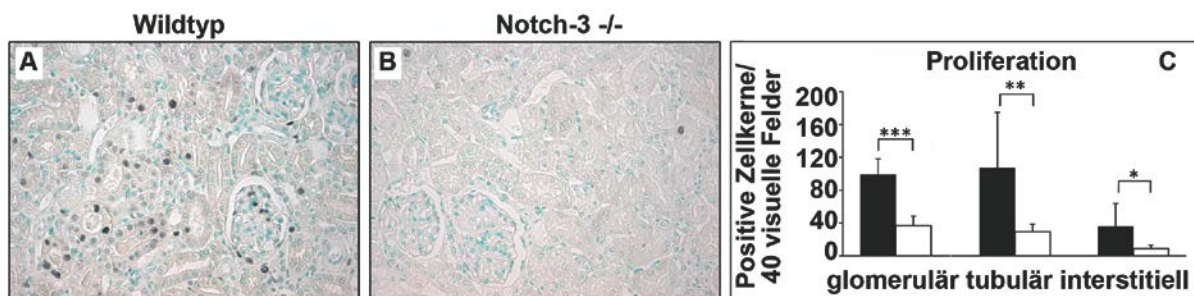
**Abbildung 13: Infiltration inflammatorischer Zellen nach NTN-Induktion.** Immunhistologische Färbung der kortikalen Monozyten/Makrophagen-Infiltration bei (A) Wildtyp- und (B) Notch-3 *knockout*-Mäusen 10 Tage nach Krankheitsinduktion. (C) Die Färbung wurde morphometrisch mit der AnalySIS Pro Software ausgewertet. Dabei wurde der prozentuale Anteil der immunhistologisch gefärbten Fläche zur Gesamtfläche gemessen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$ SD (n=11). n.s.= nicht signifikant. Wildtyp ■ Notch-3 *knockout* □ .

Parallel wurde die Infiltration von Monozyten/Makrophagen in das Nierengewebe untersucht. Hierzu wurden in Paraffin eingebettete Nierenschnitte immunhistologisch für F4/80, einen spezifischen Marker für Monozyten/Makrophagen, gefärbt. In Abbildung 13 A ist ersichtlich, dass in Wildtyp-Mäusen ein starker Influx inflammatorischer Zellen durch die Applikation des nephotoxischen Serums induziert ist. In den Notch-3 defizienten Mäusen waren nur vereinzelte F4/80-positive Zellen detektierbar (Abbildung 13 B). Die morphometrische Auswertung verdeutlicht, dass fast siebenmal mehr Monozyten/Makrophagen in den Nieren der Wildtyp-Mäuse eingewandert sind als in den Notch-3 *-/-* Mäusen. Die inflammatorischen Zellen waren vor allem im Nierenkortex nachweisbar (Abbildung 13 C).



**Abbildung 14: Kollagenexpression nach NTN-Induktion.** Siriusrot-Färbung der Nierenschnitte von (A) Wildtyp- und (B) Notch-3 *knockout*-Mäusen 10 Tage nach Krankheitsinduktion. (C) Die Färbung wurde morphometrisch mit der AnalySIS Pro Software ausgewertet. Dabei wurde der prozentuale Anteil der immunhistologisch gefärbten Fläche zur Gesamtfläche gemessen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$ SD (n=11). WT= Wildtyp; KO= Notch-3 *knockout*.

Auch Unterschiede der Kollagenexpression konnten in der Histologie bestätigt werden. Die Gesamtkollagenexpression wurde mittels Siriusrot-Färbung in den Nierenschnitten dargestellt und im polarisierten Licht betrachtet. In den Wildtyp-Mäusen konnte im Tubulointerstitium und um Glomeruli Kollagenfibrillen detektiert werden (Abbildung 14 A). Die Notch-3 *-/-* Mäuse wiesen dagegen nur eine schwache Siriusrot-Färbung auf (Abbildung 14 B). Die Färbung wurde zusätzlich morphometrisch ausgewertet. Dabei zeigte sich in Übereinstimmung mit den mRNA-Daten, dass die Notch-3 *knockout*-Mäuse eine um etwa 30 % reduzierte Kollagenexpression aufweisen (Abbildung 14 C).

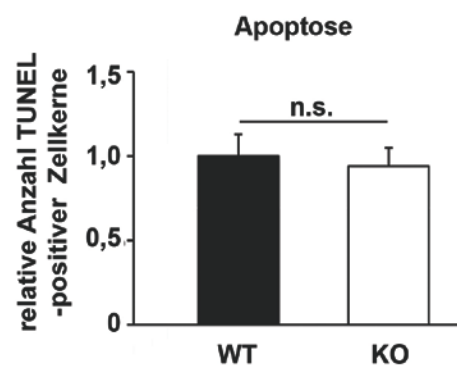


**Abbildung 15: Proliferation nach NTN-Induktion.** Immunhistologische Färbung von in Paraffin eingebetteten Nierenschnitte von (A) Wildtyp- und (B) Notch-3 *-/-* Mäusen für PCNA, einen Marker für Zellproliferation 10 Tage nach NTS-Applikation. Zur quantitativen Analyse wurde die Anzahl PCNA-positiver Zellkerne in 40 zufällig ausgewählten visuellen Feldern (Vergrößerung: 200-fach) ermittelt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$ SD (n=11). \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001. Wildtyp ■ Notch-3 *knockout* □ .

Als nächstes wurde die Zellproliferation in Nierenschnitten von Wildtyp-Mäusen und Notch-3 *knockout*-Mäusen 10 Tage nach der ersten NTS-Injektion verglichen. Hierzu wurde das Gewebe immunhistologisch auf *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA)-Positivität untersucht. PCNA ist ein Markerprotein für die Zellproliferation. Es wird in der frühen G1- oder in der S-Phase des Zellzyklus exprimiert und liegt nukleär vor. Zur quantitativen Analyse wurden pro Tier bei 200-facher Vergrößerung 40 Gesichtsfelder ausgewertet. Dabei wurde darauf geachtet, dass jedes Gesichtsfeld im Kortex lag und 1-2 Glomeruli enthielt. Die

Anzahl PCNA-positiver Kerne wurde in drei unterschiedlichen Kompartimenten der Niere ausgezählt, in den Glomeruli, den Tubuli und im Tubulointerstitium.

In den Wildtyp-Mäusen konnte im Vergleich zu den Notch-3 defizienten Mäusen eine hohe Proliferationsrate detektiert werden (Abbildung 15 A). Diese war in allen drei Nierenkompartimenten etwa dreimal höher als in den Notch-3 defizienten Mäusen (Abbildung 15 C). Besonders stark proliferierten tubuläre und glomeruläre Zellen in den Wildtyp-Tieren. Im Nierengewebe der Notch-3 *knockout*-Mäuse waren nur vereinzelte Zellen PCNA-positiv (Abbildung 15 B). Hier wiesen hauptsächlich die Parietalzellen im Glomerulus eine PCNA-Positivität auf.



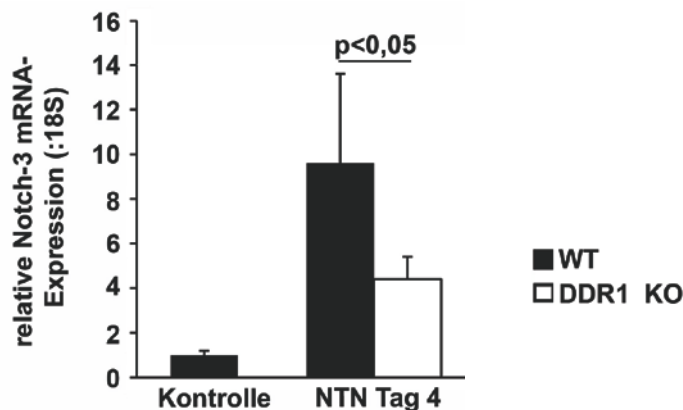
**Abbildung 16: Apoptose nach NTN-Induktion.** TUNEL-Färbung von Methacarn-fixierten Nierengewebe 10 Tage nach NTS-Applikation. Zur quantitativen Analyse wurde die Anzahl TUNEL-positiver Zellkerne in 40 visuellen Feldern (Vergrößerung: 400-fach) ermittelt. Der Wert der Wildtyp-Mäuse wurde gleich 1 gesetzt und die Werte der Notch-3 defizienten Mäuse darauf bezogen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$ SD (n=11). n.s.= nicht signifikant. Wildtyp (WT) ■ Notch-3 *knockout* (KO) □ .

Anschließend wurde die Apoptoserate in Wildtyp- und Notch-3 defizienten Mäusen in der nephrotoxischen Nephritis untersucht. Hierzu wurde das *In situ cell death detection kit* von Roche verwendet. Entparaffinierte Nierenschnitte wurden nach Behandlung mit Proteinase K mit terminaler Deoxynucleotidyl-Transferase und Fluorescein-markiertem Deoxyuridin-Triphosphat inkubiert. Zur quantitativen Analyse wurden pro Tier bei 400-facher Vergrößerung 40 zufällig ausgewählte und nicht überlappende Gesichtsfelder ausgewertet. Dabei wurden nur TUNEL-positive Zellkerne ausgewertet, die auch in der DAPI-Färbung positiv waren. Somit konnten falsch positive TUNEL-Färbungen ausgeschlossen werden. Die Analyse der TUNEL-Färbung ergab keine signifikanten Unterschiede in der Apoptoserate zwischen den Wildtyp-Mäusen und den Notch-3 *knockout*-Mäusen (Abbildung 16).

#### 4.4 Expression des Rezeptors Notch-3 nach NTN in DDR1 *knockout*-Mäusen

Da Induktion und Verlauf der Serum-vermittelten nephrotoxischen Nephritis vom Mausstamm abhängig sind und sich Mäuse mit C57Bl6/J-Hintergrund als resistent gegenüber verschiedenen Nierenerkrankungs-Modellen erwiesen haben, testeten wir einen weiteren

Mausstamm, nämlich SV129-Mäuse, auf NTN-Sensitivität hin. In diesen Tieren zeigte sich schon 4 Tage nach NTN-Induktion eine Protein/Kreatinin-Ratio von einem Ausmaß das wir in C57Bl6/J-Tieren erst 10 Tage nach NTN-Induktion beobachten konnten. Wir entnahmen die Nieren aus den NTS-behandelten SV129-Mäusen 4 Tage nach der ersten NTS-Applikation und konnten eine um das 10-fache erhöhte Notch-3 Expression im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren detektieren (Abbildung 17). Parallel induzierten wir die nephrotoxische Nephritis in *Discoïdin domain* Rezeptor (DDR)1 *knockout*-Mäusen. DDR1 gehört zu der Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen. Hierbei handelt es sich um ein Transmembranprotein mit Funktionen bei der Zellteilung, Zelldifferenzierung und dem Metabolismus. DDR1 findet man unter anderem in Epithelzellen des Gehirns, der Milz, der Lunge, der Niere und der Brustdrüse<sup>87</sup>. 1997 wurde Kollagen als Ligand für DDR1 entdeckt<sup>88</sup>. DDR1 kann von jedem bisher getesteten Kollagen (Typ I-VI und VIII) aktiviert werden<sup>89</sup>. Neueste Untersuchungen von Kim et al. ergaben, dass Notch-1 über DDR1 aktiviert werden kann<sup>90</sup>.



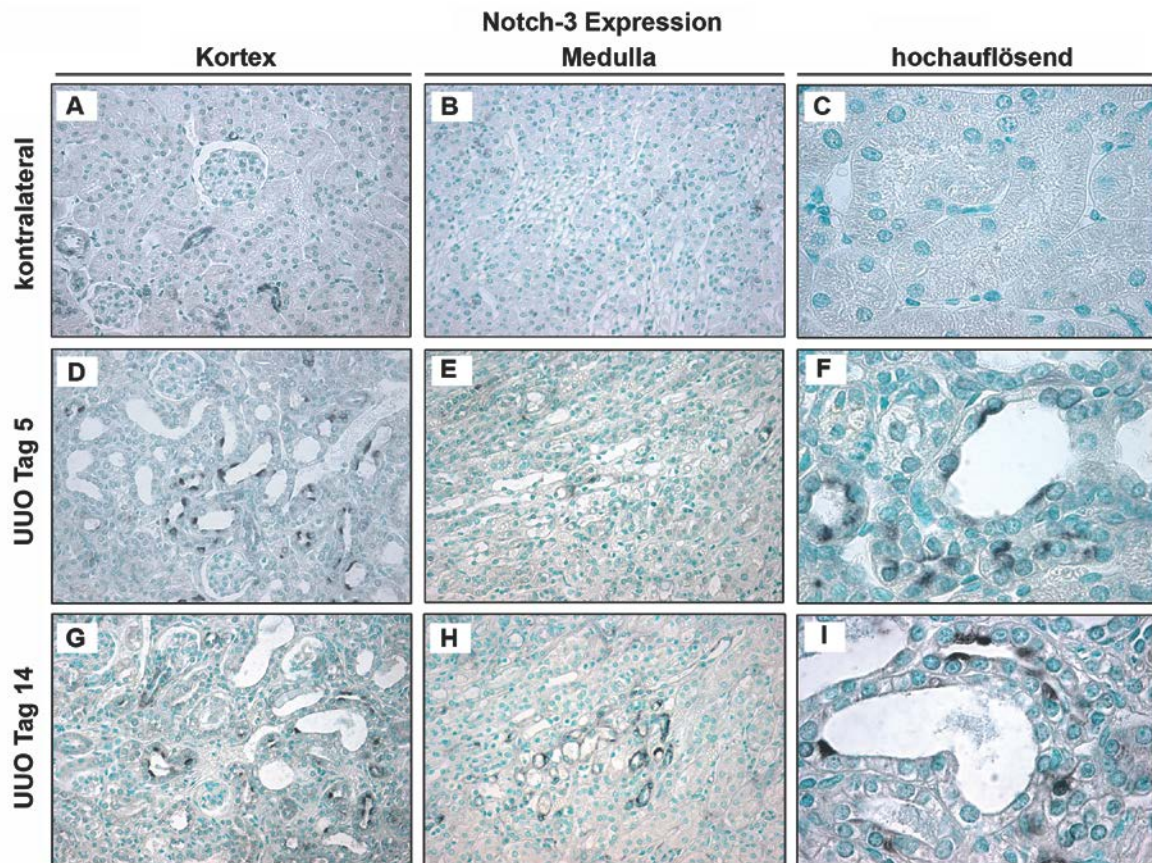
**Abbildung 17: Notch-3 mRNA Expression nach NTN-Induktion in DDR1 *knockout*-Mäusen.** qRT-PCR-Analyse der Mausnieren 4 Tag nach NTN-Induktion. Die Normalisierung der relativen Expression erfolgt gegen 18S rRNA als interne Referenzkontrolle. Der Wert der unbehandelten Wildtyp-Mäuse wurde gleich 1 gesetzt und die anderen darauf bezogen. WT= Wildtyp; KO= DDR1 *knockout*

Wir untersuchten die Expression von Notch-3 in DDR1 *knockout*-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Geschwistertieren (SV129) nach NTS-Gabe. Es zeigte sich nach 4 Tagen NTN eine um 50 % reduzierte Expression des Notch-3-Rezeptors in den DDR1-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen.

#### 4.5 Expression des Rezeptors Notch-3 nach unilateraler Ureterobstruktion (UUO)

Da in den zuvor beschriebenen experimentellen Mausmodellen unerwartete Probleme im kardiovaskulären System der Notch-3 defizienten Mäuse auftraten, entschieden wir uns ein weiteres Mausmodell bezüglich seiner renalen Schädigung auszutesten. Wir wählten hierzu

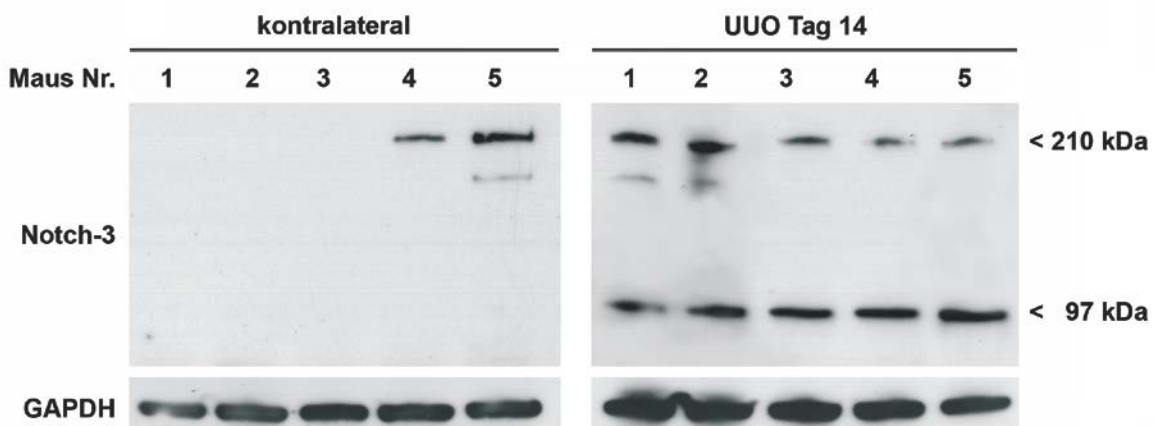
die unilaterale Ureterobstruktion (UUO), da in diesem Modell nur eine Niere funktional beeinträchtigt wird, während die kontralaterale Niere funktionstüchtig bleibt. Somit können Veränderungen in der Hämodynamik der Tiere vermindert werden, die eventuell für die Herzerkrankung zuvor verantwortlich sein könnten. Zudem ist die UUO ein gut etabliertes Modell, welches gut reproduzierbar ist und in kürzester Zeit einen deutlichen, hauptsächlich tubulären Schaden hervorruft.



**Abbildung 18: Notch-3 Expression nach unilateraler Ureterobstruktion (UUO) im Verlauf.** (A-C) Immunhistologische Färbung für den Rezeptor Notch-3. Repräsentative Bilder von obstruierten und kontralateralen Nieren von Wildtyp-Mäusen an (D-F) Tag 5 und (G-I) 14.

Zunächst wurden die linken Ureteren von zehn C57Bl6/J Wildtyp-Mäusen mit Hilfe chirurgischer Diathermie durchtrennt. Nach Induktion der UUO erholten sich alle Tiere postoperativ recht schnell und zeigten im weiteren Beobachtungszeitraum im Hinblick auf Bewegung und Futteraufnahme ein normales Verhalten. 5 und 14 Tage nach durchgeführter UUO wurden die Mäuse (je n=5) getötet und beide Nieren entnommen. Alle linken Nieren wiesen eine deutliche Hydronephrose auf, so dass von einer erfolgreichen Obstruktion ausgegangen werden konnte. Die entnommenen Nieren wurden für immunhistologische, proteinbiochemische und molekularbiologische Analysen wie im vorangegangenen Modell aufgearbeitet.

In den „gesunden“ kontralateralen Nieren zeigte sich in der Immunhistologie nur eine geringe Notch-3 Expression ausschließlich in den glatten Muskelzellen der Gefäße (Abbildung 18 A-C). Fünf Tage nach durchgeführter UUO konnte eine verstärkte Notch-3 Expression/Aktivierung in den obstruierten Nieren nachgewiesen werden (Abbildung 18 D-F). Notch-3 wurde nach UUO hauptsächlich in dilatierten Tubuli und vereinzelt in interstitiellen Zellen exprimiert. Die Notch-3 positiven tubulären Zellen befanden sich überwiegend an der Grenze zum tubulären Lumen. Immunhistologische Untersuchungen der Nieren 14 Tage nach Obstruktion wiesen ein ähnliches Notch-3 Expressionsmuster auf (Abbildung 18 G-I). Im Vergleich zu den Nieren 5 Tage nach UUO blieb die Expressionsstärke/Aktivierung des Rezeptors nach 14 Tagen gleich.



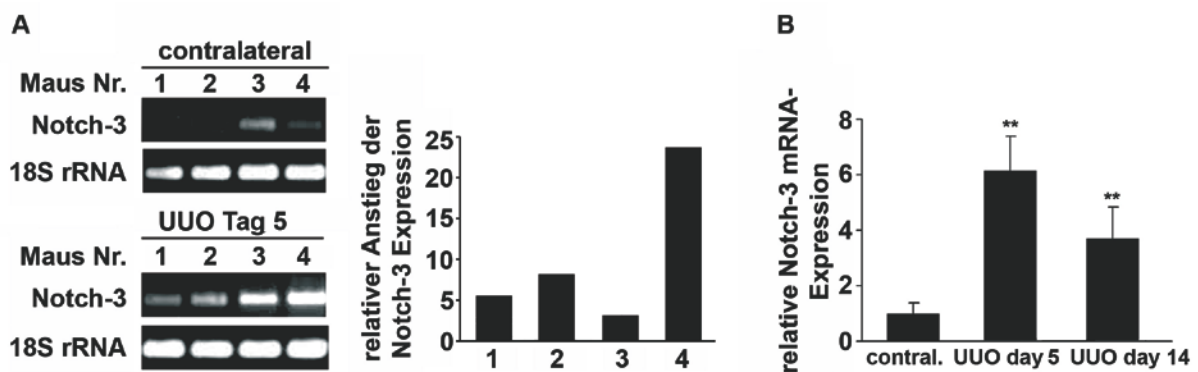
**Abbildung 19: Notch-3 Rezeptor-Expression nach 14 Tagen unilateraler Ureterobstruktion (UUO).** 14 Tage nach unilateraler Obstruktion wurde aus der obstruierten und der kontralateralen Niere Lysate hergestellt und in der Western Blot-Analyse eingesetzt. Notch-3 wurde mit einem gegen die intrazelluläre Domäne gerichteten Antikörper detektiert. Der Proteinabgleich erfolgte mittels GAPDH.

Die Western Blot-Analyse der Nierenlysate verdeutlichte die starke Aktivierung des Rezeptors Notch-3 nach UUO. Während in den unbehandelten Nieren der Wildtyp-Mäuse nur in zwei der fünf untersuchten Mäuse der Vollängen-Rezeptor (210 kDa) detektiert werden konnte, war die abgespaltene intrazelluläre Domäne und somit eine Rezeptor-Aktivierung hier nicht nachweisbar (Abbildung 19 links). In den entsprechenden obstruierten Nieren war neben dem Vollängen-Rezeptor auch die intrazelluläre Domäne (97 kDa) in allen Mäusen deutlich sichtbar (Abbildung 19 rechts). Ein Auftrag gleicher Proteinmengen wurde durch die Normalisierung gegen GAPDH gewährleistet.

Neben der Notch-3 Proteinexpression wurde auch die Transkriptzahl untersucht. Hierzu wurde die Gesamt-RNA aus dem Nierenkortex isoliert, in cDNA umgeschrieben und in die reverse Transkriptase-PCR eingesetzt. Die Analyse der PCR-Produkte in einem 0,8 %-igen Ethidiumbromid-Agarosegel zeigte, dass Notch-3 Rezeptoren auch auf Transkript-Ebene nur



gering in den kontralateralen Nieren exprimiert werden (Abbildung 20 A links). Die dazugehörigen obstruierten Nieren wiesen dagegen mehr Notch-3 Transkripte auf. Als interne Referenzkontrolle wurde 18S rRNA verwendet. Die Bandenintensitäten wurden mit *Scion Image* quantifiziert und anschließend das Verhältnis von obstruierten zu kontralateralen Nieren gebildet (Abbildung 20 A rechts). Im Vergleich zu den kontralateralen Nieren stieg die Notch-3 Transkriptzahl in den erkrankten Nieren aller Mäuse an, jedoch war der Anstieg unterschiedlich ausgeprägt und schwankte um das 3- bis 25-fache. Dies veranlasste uns, die cDNA zusätzlich in der *real time* PCR zu untersuchen. Wie zuvor konnte ein signifikanter Anstieg der Notch-3 Rezeptor-Transkriptzahl nach UUO nachgewiesen werden (Abbildung 20 B). Während der Notch-3 Proteingehalt nach 5 und 14 Tagen UUO annähernd gleich blieb, nahm die Transkriptzahl im zeitlichen Verlauf ab.

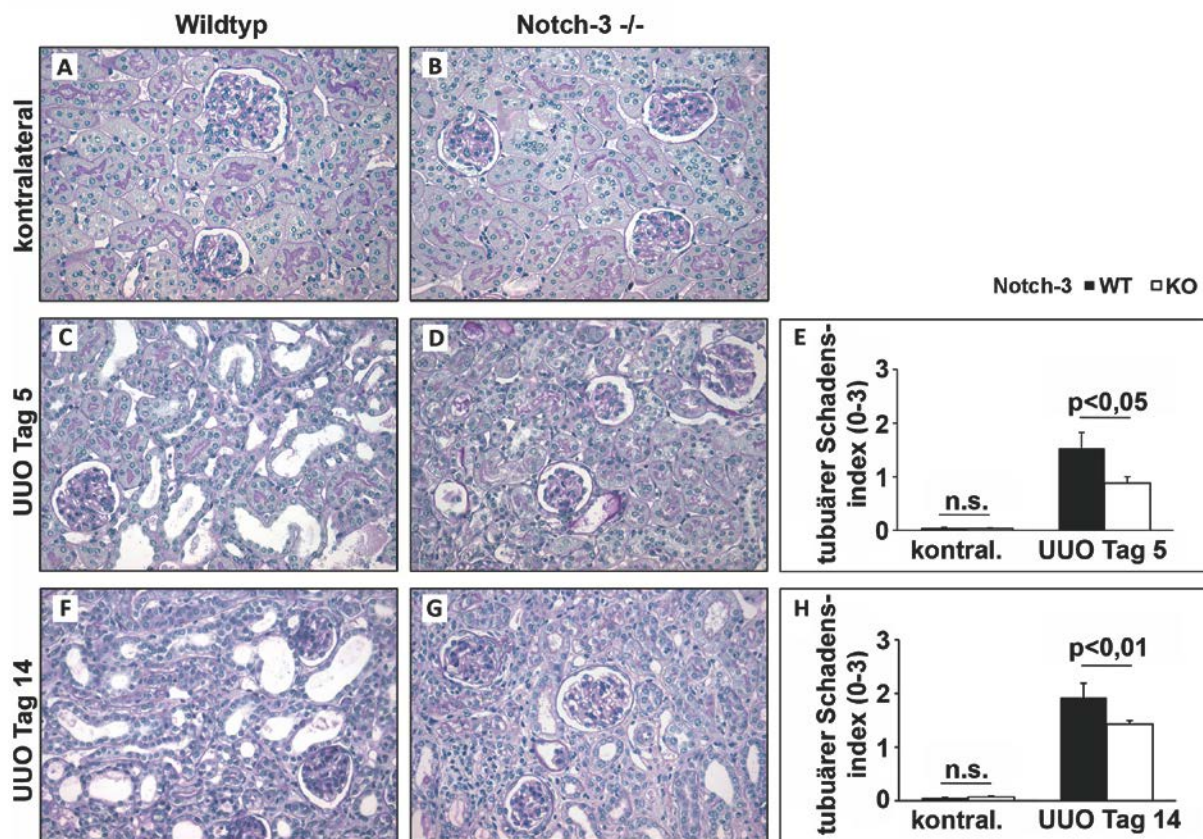


**Abbildung 20: Receptor Notch-3 Transkripte nach unilateraler Ureterobstruktion (UUO).** (A) Die Gesamt-RNA wurde aus dem Kortex der obstruierten und kontralateralen Nieren isoliert, in cDNA umgeschrieben und in der RT-PCR eingesetzt. Als interne Referenzkontrolle wurde 18S rRNA verwendet. Die entstandenen PCR-Produkte wurden in einem 0,8 %-igen Ethidiumbromid-Agarosegel untersucht. Die Bandenintensitäten wurden mittels *Scion Image* bestimmt. Die Bandenintensitäten der obstruierten Nieren wurden ins Verhältnis zu denen der kontralateralen Nieren gesetzt und so relative Änderungen bestimmt. (B) Des Weiteren wurde die cDNA in der *real time* PCR Analyse eingesetzt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$ SD (n=5). Die Normalisierung der relativen Expression erfolgte gegen 18S rRNA als interne Referenzkontrolle. Der Wert der kontralateralen Nieren wurde gleich 1 gesetzt und die Werte der obstruierten Nieren darauf bezogen. \*\*p<0,01.

#### 4.6 Receptor Notch-3 Depletion wirkt renoprotektiv bei UUO-induzierter Schädigung

Die vorangegangenen Daten weisen auf eine Regulation des Rezeptors Notch-3 während der unilateralen Ureterobstruktion hin. Um Einblicke in die Funktion des Rezeptors in diesem Kontext zu erhalten, wurde der Versuch zusätzlich mit Notch-3 defizienten Mäusen durchgeführt. Die entnommenen kontralateralen sowie obstruierten Nieren wurden zunächst auf ihre Morphologie in der PAS-Färbung untersucht. Die unbehandelten Nieren der Notch-3 *knockout*-Mäuse ließen im Vergleich zu den kontralateralen Nieren der Wildtyp-Mäuse keine ersichtliche Dysontogenese oder einen spontanen Phänotyp erkennen (Abbildung 21 A *versus* B). Nach 5 Tagen waren in den Wildtyp-Mäusen UUO-induzierte Schäden wie tubuläre Atrophie und Dilatation der Tubuli, tubuläre Proteinzyylinder und interstitielle Fibrose

vorhanden (Abbildung 21 C). Die tubulären Schäden wurden mit dem beschriebenen Bewertungssystem quantifiziert und der mittlere tubuläre Schadensindex ermittelt. Dieser hatte bei den Wildtyp-Mäusen einen Wert von 1,5, während er bei den Notch-3  $-/-$  Mäusen lediglich 0,9 betrug (Abbildung 21 E). In der PAS-Färbung ist ein renoprotektiver Effekt der Rezeptor Notch-3 Depletion (Abbildung 21 D) gut erkennbar. Nach 14 Tagen UUU nahm der tubuläre Schaden in beiden Gruppen, Wildtyp und Notch-3 *knockout*, zu. Er war jedoch weiterhin in den Notch-3 defizienten Mäusen signifikant niedriger als in den Wildtyp-Mäusen (Abbildung 21 H).

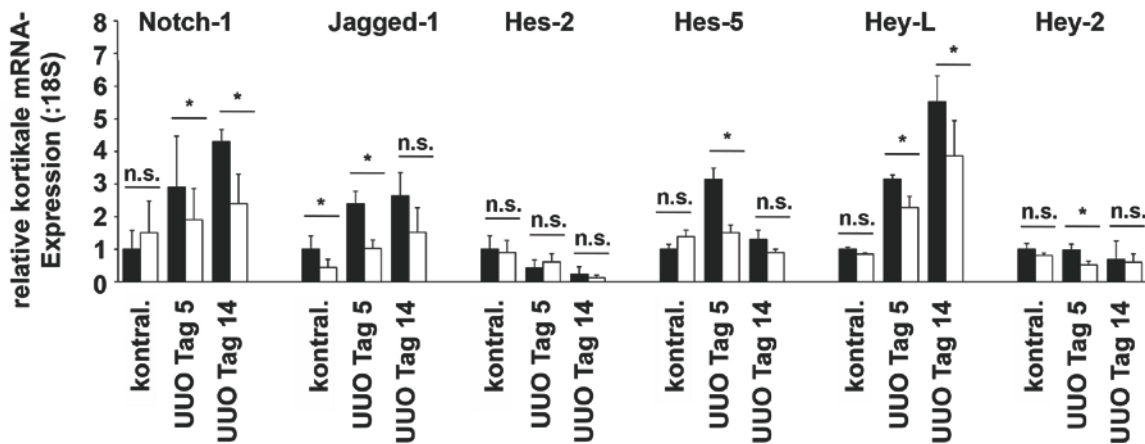


**Abbildung 21: Tubulärer Schaden nach unilateraler Ureterobstruktion (UUO).** (A-B) PAS-Färbung der kontralateralen Nieren von Wildtyp und Notch-3  $-/-$  Mäusen, sowie der obstruierten Nieren nach (C-D) 5 bzw. (E-G) 14 Tagen. Tubulärer Schadensindex: 0= keine tubulären Schäden, 1= Tubulusdilatation, 2= Verlust des Bürstensaums, 3= Verlust des Bürstensaums und Apoptose tubulärer Zellen. Ausgewertet wurden 200 Tubuli pro Tier (E und H). WT= Wildtyp; KO= Notch-3 *knockout*.; n.s.= nicht signifikant. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SD (n=5).

#### 4.7 Expression weiterer Komponenten der Notch-Signaltransduktion nach UUO

Es ist bekannt, dass der Rezeptor Notch-1 in verschiedenen experimentellen Fibrose-Modellen hochreguliert wird<sup>84</sup>. Eine spezifische Depletion von Notch-1 bzw. eine unspezifische Inhibition aller Notch-Rezeptoren mittels  $\gamma$ -Sekretase-Hemmer wirken anti-fibrotisch. Bisher wurde die Wechselwirkung der Rezeptoren in der Nierenfibrose nicht näher untersucht. Aus diesem Grund wurde die Expression des Rezeptors Notch-1 und weiterer

Mitglieder der Notch-Signaltransduktion in Wildtyp-Mäusen mit der Expression in Notch-3 defizienten Mäusen verglichen. Die Gesamt-RNA wurde aus dem Nierenkortex von obstruierten und nicht-obstruierten Nieren gewonnen, in cDNA umgeschrieben und in die qRT-PCR eingesetzt.



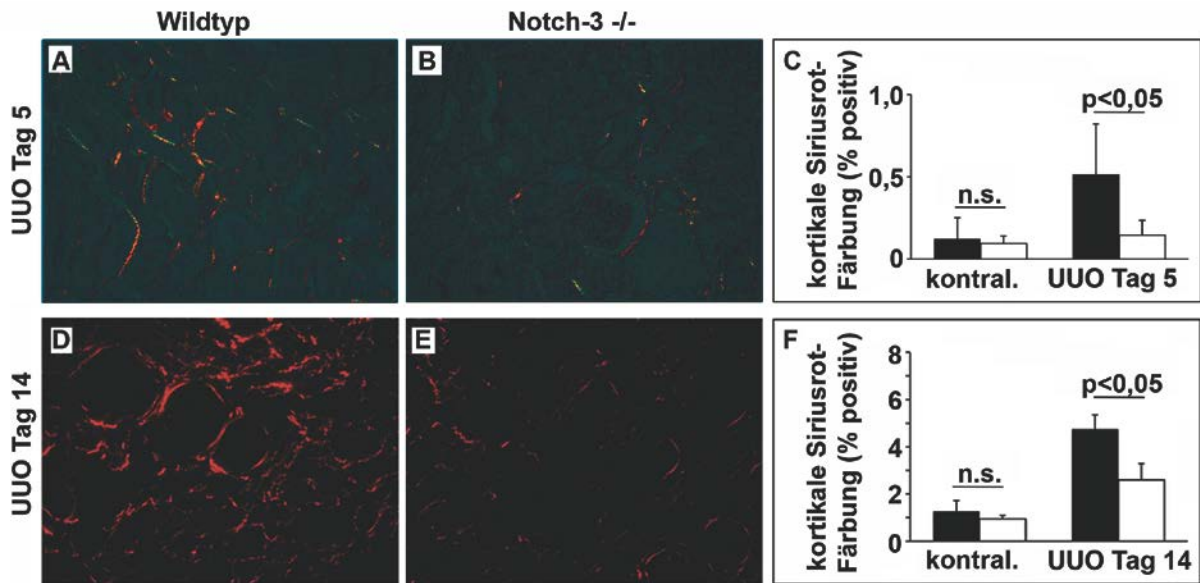
**Abbildung 22: mRNA-Expression verschiedener Notch-Signalwegkomponenten nach unilateraler Ureterobstruktion (UUO).** Aus nicht-obstruierten und obstruierten Nieren wurde die kortikale RNA extrahiert und für quantitative *real time* PCR-Analysen in cDNA umgeschrieben. Die Normalisierung der relativen Expression erfolgte gegen 18S rRNA als interne Referenzkontrolle. Der Wert der nicht-obstruierten Nieren wurde gleich 1 gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$ SD (n=5). \*p<0,05; \*\*p<0,01. Wildtyp ■ Notch-3 *knockout* □

Die Expression der Zielgene HES-2, -5 sowie Hey-2, -L waren in den kontralateralen Nieren der Notch-3 defizienten Mäusen im Vergleich zu den kontralateralen Nieren der Wildtyp-Mäuse nicht verändert (Abbildung 22). In den Notch-3 *knockout*-Mäusen war tendenziell der Notch-1 Rezeptor stärker exprimiert. Signifikante Unterschiede waren dagegen in der Jagged-1 Expression detektierbar. In unbehandelten Nieren führte eine genetische Notch-3 Rezeptor-Depletion zu einer stark reduzierten Liganden-Expression. Nach durchgeführter Ureterligatur konnte eine signifikante Änderung der mRNA-Expression in fast allen untersuchten Signalweg-Komponenten gezeigt werden, einzig das Notch-Zielgen Hey-2 wurde im Verlauf der UUO nicht reguliert. Die Notch-1 Transkriptzahl stieg in den Wildtyp-Mäusen nach 5 Tagen UUO auf das 3-fache, nach 14 Tagen auf das 4,5-fache an, während sie in den Notch-3 *-/-* Mäusen nur auf das 2,5-fache anstieg. Ein ähnlicher Verlauf konnte bei den Jagged-1 Transkripten beobachtet werden. Hier verdoppelte sich die Zahl nach 5 Tagen UUO in den Wildtyp-Mäusen und stieg nach 14 Tagen weiter an. In den Notch-3 *knockout*-Mäusen verstärkte sich die Jagged-1 Expression ebenfalls, blieb aber jeweils unter dem Expressionsniveau derjenigen in den Wildtyp-Mäusen. Das Zielgen HES-2 wurde nach Durchführung der UUO in beiden Gruppen herunterreguliert, zwischen den beiden Mauslinien gab es jedoch keine signifikanten Unterschiede. Die Expression des HES-5

Zielgens blieb in den Notch-3 defizienten Mäusen im Verlauf der UUO annähernd gleich, während es in den Wildtyp-Mäusen an Tag 5 nach Ureterligation auf das 3-fache anstieg. Nach 14 Tagen UUO war die HES-5 Transkriptzahl wieder auf das Niveau der kontralateralen Niere gesunken. Hey-L wurde von den untersuchten Notch-Zielgenen am stärksten im Verlauf der UUO reguliert. Nach 5 und 14 Tagen UUO waren die Transkriptzahlen in den Wildtyp-Tieren deutlich erhöht. In den Notch-3  $-/-$  Mäusen nahm die Hey-L mRNA-Expression zwar auch zu, blieb aber merklich unterhalb der Wildtyp-Expression.

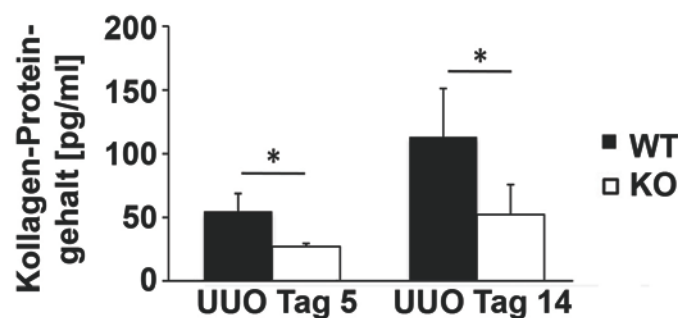
#### **4.8 Vergleich der durch UUO-induzierten Fibrose in Notch-3 $-/-$ und Wildtyp-Mäusen**

Die bisherigen Daten zeigten, dass eine Notch-3 Depletion nicht nur einen Effekt auf die mRNA-Expression anderer Notch-Signalweg-Zielgene hatte, sondern auch renoprotektiv wirkt. Daher stellten wir uns als nächstes die Frage, auf welchem Weg eine Notch-3-Depletion einen protektiven Effekt vermitteln kann. Hierzu untersuchten wir phänotypische Veränderungen, wie Matrixdeposition und Infiltration inflammatorischer Zellen, in Abhängigkeit von der Notch-3 Expression mit Hilfe der Immunhistochemie. Zu den Matrixproteinen gehören Kollagene und Fibronectin. Die veränderte ECM unterscheidet sich quantitativ und qualitativ in der Zusammensetzung bei Erkrankungen<sup>91, 92</sup>. Bei der renalen Fibrose sind Bestandteile der ECM wie Kollagen I, III, IV, V, VII und Fibronectin im Überschuss vorhanden. Hierbei gilt Fibronectin als einer der frühesten Marker für fibrotische Veränderungen<sup>93</sup>. Wir untersuchten zunächst die Expression des Gesamtkollagens mittels Siriusrot-Färbung. Die Siriusrot-Färbung wurde unter polarisiertem Licht betrachtet. Die Kollagenfasern erscheinen dadurch je nach Dicke der Fasern grün/gelb oder rot. Nach 5 Tagen unilateraler Ureterobstruktion konnte bei den Wildtyp-Mäusen ein signifikanter Anstieg der Kollagen-Expression beobachtet werden (Abbildung 23 A-C). Die Rezeptor Notch-3 defizienten Mäuse wiesen dagegen nur eine schwache Färbung auf. Erst am Tag 14 nach Ureterobstruktion konnte in dieser Gruppe eine verstärkte Kollagen-Expression detektiert werden. Bei den Wildtyp-Mäusen zeigte sich in diesem Zeitraum im Vergleich zu den Notch-3  $-/-$  Mäusen eine deutliche Zunahme an Kollagenfibrillen innerhalb des Tubulointerstitiums (Abbildung 23 D-F).



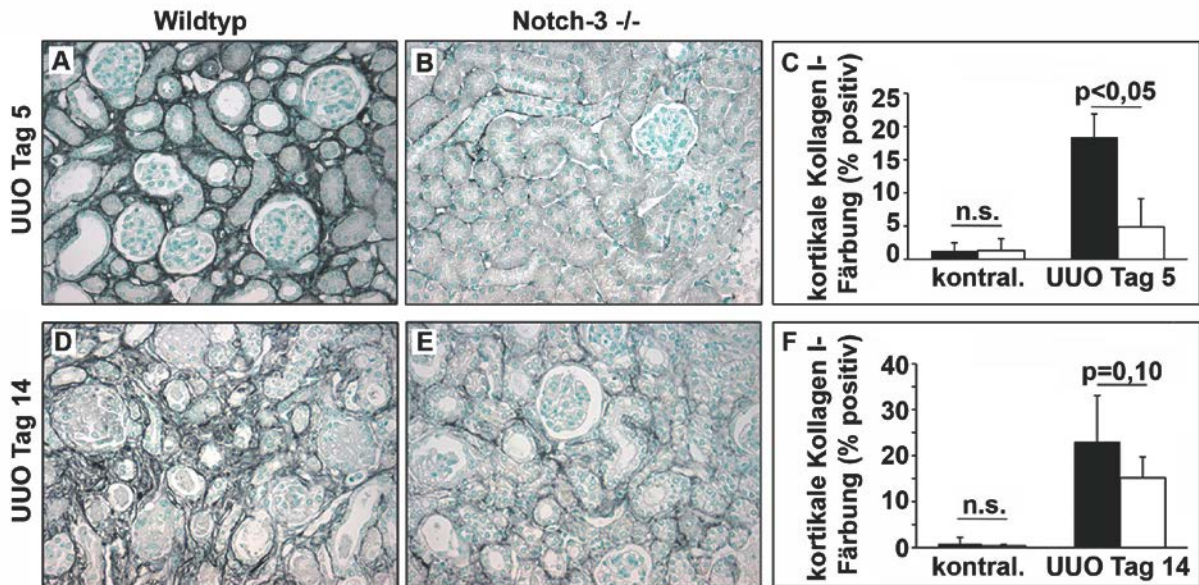
**Abbildung 23: Siriusrot-Färbung nach unilateraler Ureterobstruktion (UUO).** Siriusrot-Färbung der obstruierten Nieren von (A, D) Wildtyp- und (B, E) Notch-3<sup>-/-</sup> Mäusen nach (A-B) 5 bzw. (D-E) 14 Tagen. Die Färbung wurde morphometrisch mit der AnalySIS Pro Software ausgewertet. Dabei wurde der prozentuale Anteil der immunhistologisch gefärbten Fläche zur Gesamtfläche gemessen (C, F). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte ±SD (n=5). n.s.= nicht signifikant. Wildtyp ■, Notch-3 knockout □

Zusätzlich wurde der Kollagen-Proteingehalt in Nierenlysaten bestimmt. Dazu wurde Kortextgewebe der fibrotischen Nieren von Wildtyp und Notch-3 defizienten Mäusen in RIPA-Puffer lysiert und im Sircol-Assay eingesetzt. Der Farbstoff des Sircol-Assays, bestehend u.a. aus Siriusrot, bindet an die Kollagene Typ I bis V. Analog zur Siriusrot-Färbung konnte gezeigt werden, dass der Kollagengehalt im zeitlichen Verlauf der UUO in beiden Gruppen zunahm, der Anstieg in den Notch-3 *knockout*-Mäusen jedoch nur halb so groß war (Abbildung 24).



**Abbildung 24: Kollagen-Proteingehalt in Nierenlysaten nach unilateraler Ureterobstruktion (UUO).** Aus den obstruierten Nieren wurde nach 5 und 14 Tagen UUO Lysate hergestellt und im Sircol-Assay eingesetzt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ±SD (n=5). \*p<0,05; WT= Wildtyp, KO= Notch-3 *knockout*

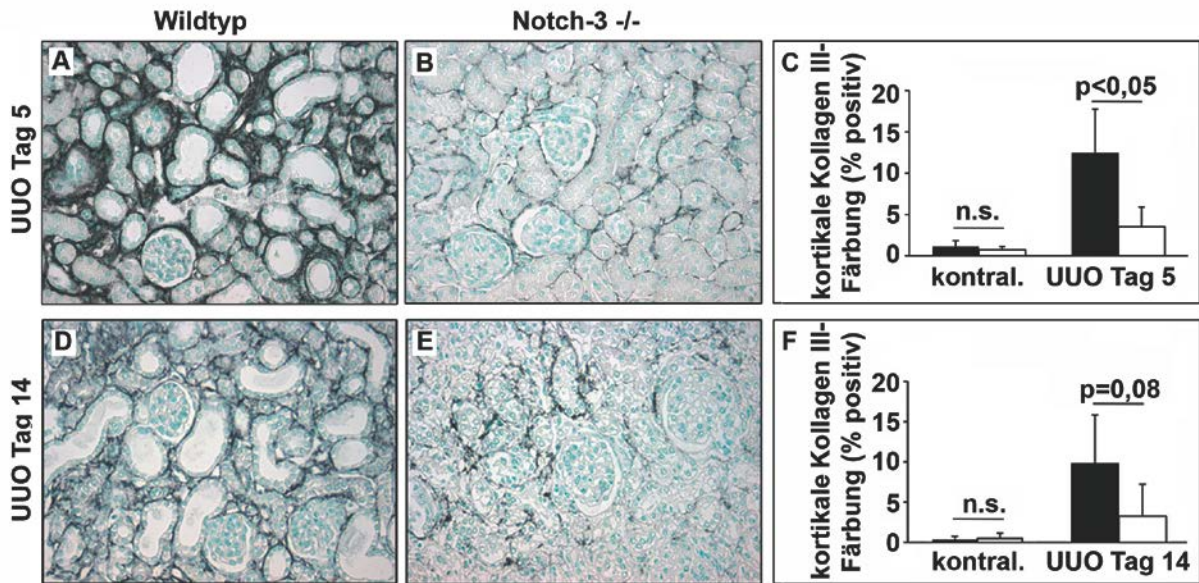
Da es Unterschiede in der Gesamtkollagen-Expression nach UUO gab, wurde nun mit spezifischen Antikörpern die Expression verschiedener Kollagentypen untersucht. Die Wahl fiel zunächst auf Kollagen Typ I.



**Abbildung 25: Kollagen Typ I-Färbung nach unilateraler Ureterobstruktion (UUO).** Kollagen I-Färbung der obstruierten Nieren von Wildtyp- (A, D) und Notch-3<sup>-/-</sup> (B, E) Mäusen nach 5 (A-B) bzw. 14 (D-E) Tagen. Die Färbung wurde morphometrisch mit der AnalySIS Pro Software ausgewertet. Dabei wurde der prozentuale Anteil der immunhistologisch gefärbten Fläche zur Gesamtfläche gemessen (C, F). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$ SD (n=5). n.s.= nicht signifikant. Wildtyp ■ Notch-3 *knockout* □

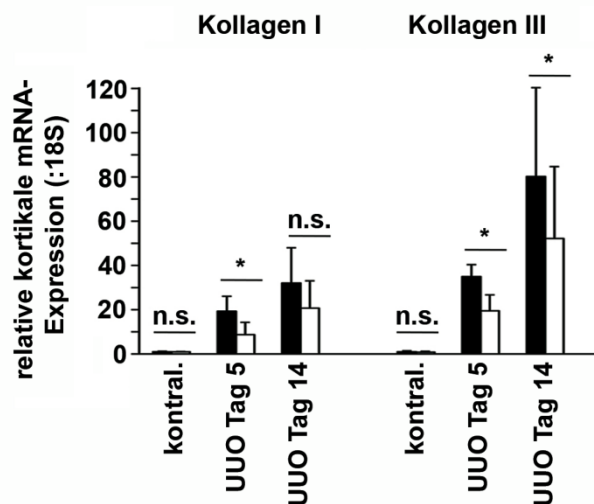
Eine vermehrte Produktion von Kollagen Typ I konnte sowohl in Wildtyp- als auch in Notch-3 defizienten Mäusen bereits nach 5 Tagen UUO detektiert werden (Abbildung 25 A und B). Dabei war der relative Anstieg der Kollagen-Expression in den Wildtyp-Tieren dreimal stärker als in den Notch-3 *knockout*-Mäusen (Abbildung 25 C). Im weiteren Verlauf der UUO kam es nur noch zu einem geringen weiteren Anstieg in den Wildtyp-Mäusen (Abbildung 25 D, E).

Neben Kollagen Typ I wurde des Weiteren die Expression von Kollagen Typ III in der UUO-induzierten Fibrose untersucht. Die immunhistochemische Anfärbung von interstitiell abgelagertem Kollagen Typ III war in Notch-3 *knockout*-Mäusen nach 5 Tagen UUO deutlich geringer (~ 69 %) als in Wildtyp-Mäusen. Die ermittelten gefärbten Flächenwerte lagen bei 13 versus 4 % (Abbildung 26 A-C). Nach 14 Tagen UUO war in beiden Gruppen kein weiterer Expressionsanstieg nachweisbar. Während die Expression von Kollagen Typ I in den Notch-3 *knockout*-Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen zeitlich verzögert hochreguliert wurde, blieb Kollagen Typ III auf einem niedrigen Expressionslevel (Abbildung 26 D-E).



**Abbildung 26: Kollagen Typ III-Färbung nach unilateraler Ureterobstruktion (UUO).** Kollagen Typ III-Färbung der obstruierten Nieren von (A, D) Wildtyp- und (B, E) Notch-3<sup>-/-</sup> Mäusen nach (A-B) 5 bzw. (D-E) 14 Tagen. Die Färbungen wurden morphometrisch mit der ANALYSIS Pro Software ausgewertet. (C, F) Dabei wurde der prozentuale Anteil der immunhistologisch gefärbten Fläche zur Gesamtfläche gemessen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$ SD (n=5). n.s.= nicht signifikant. Wildtyp ■ Notch-3 *knockout* □

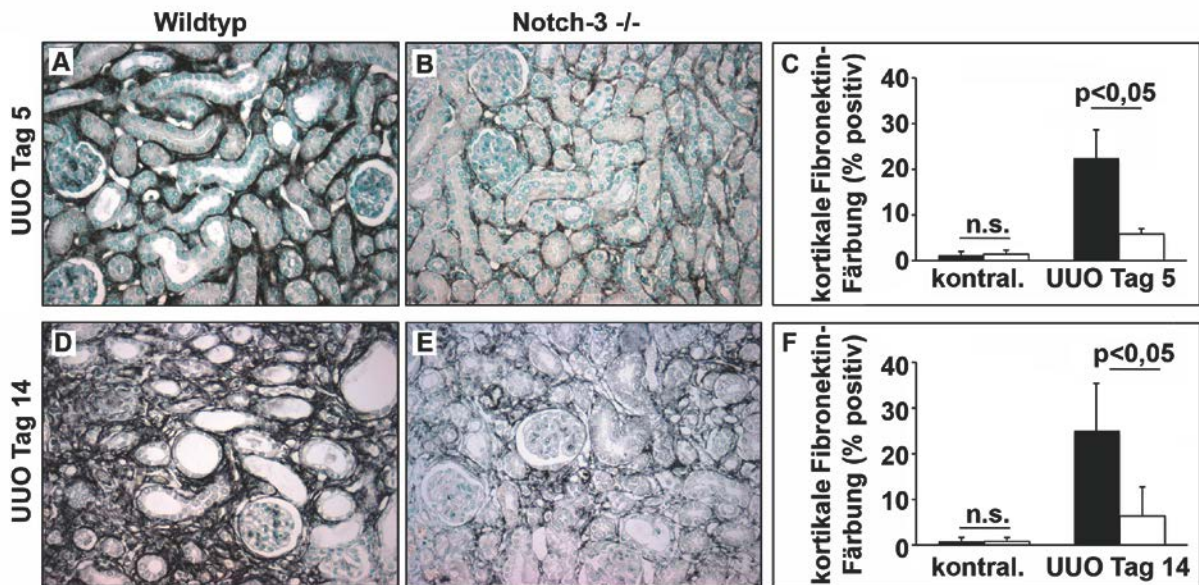
Auch auf Transkriptebene konnte im zeitlichen Verlauf der UUO eine verstärkte Kollagen-Produktion in Wildtyp- und Notch-3 defizienten Mäusen detektiert werden (Abbildung 27). In den Notch-3 *knockout*-Mäusen waren deutlich niedrigere Kollagen-Transkriptzahlen messbar.



**Abbildung 27: Kollagen-Transkripte in der unilateralen Ureterobstruktion (UUO).** Aus nicht-obstruierten und obstruierten Nieren wurde die kortikale RNA aufgereinigt und für die quantitative *real time* PCR-Analyse in cDNA umgeschrieben. Die Normalisierung der relativen Expression erfolgte gegen 18S rRNA als interne Referenzkontrolle. Der Wert der nicht-obstruierten Nieren wurde gleich 1 gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$ SD (n=5). n.s.= nicht signifikant. \*p < 0,05. Wildtyp ■ Notch-3 *knockout* □

Ein weiterer Bestandteil der extrazellulären Matrix ist Fibronektin. Daher wurde die Fibronektin-Expression der Wildtyp-Mäuse in der Immunhistochemie untersucht und mit der von Notch-3<sup>-/-</sup> Mäusen verglichen. Die Immunhistochemie konnte eine starke Zunahme der

Fibronektin-Expression in den Wildtyp-Tieren im Verlauf der UOU bestätigen (Abbildung 28 A und D). In den Notch-3 defizienten Mäusen war abermals eine verminderte Expressionsrate sichtbar (Abbildung 28 D und E). Der prozentuale Anteil der gefärbten Fläche betrug nach 5 Tagen UOU 21 % bei den Wildtyp-Tieren und 3,6 % bei den Notch-3  $-/-$  Mäusen (Abbildung 28 C). Im weiteren Verlauf zeigte sich ähnlich zu der Kollagen Typ III Expression kein Anstieg der Fibronektin-Expression in beiden Gruppen.



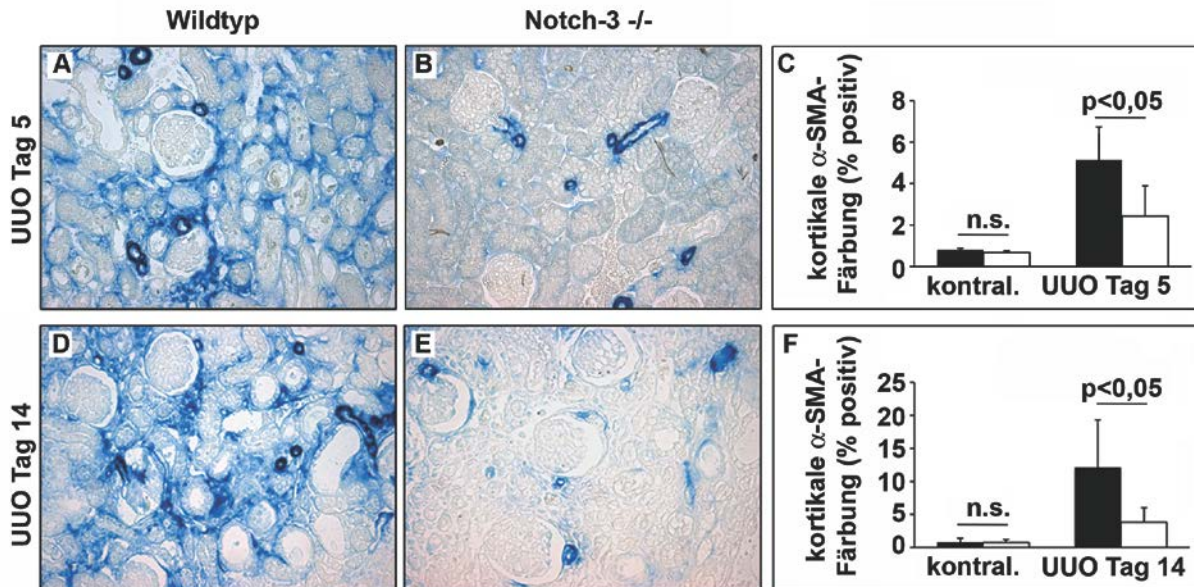
**Abbildung 28: Fibronektin-Färbung nach unilateraler Ureterobstruktion (UOU).** Fibronektin-Färbung der obstruierten Nieren von (A, D) Wildtyp- und (B, E) Notch-3  $-/-$  Mäusen nach (A-B) 5 bzw. (D-E) 14 Tagen. Die Färbungen wurden morphometrisch mit der AnalySIS Pro Software ausgewertet. (C, F) Der prozentuale Anteil der immunhistologisch gefärbten Fläche zur Gesamtfläche wurde gemessen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$ SD (n=5). n.s.= nicht signifikant. Wildtyp ■ Notch-3 *knockout* □

#### 4.9 Einfluss der Notch-3 Defizienz auf die epithelial-mesenchymale Transition

Die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet den phänotypischen Übergang von Epithelzellen zu Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften. In den 1990er Jahren führten *in vitro* Beobachtungen zu der Annahme, dass tubuläre Epithelzellen sich in interstitielle Myofibroblasten umwandeln und unverhältnismäßig viel Matrix produzieren. Die EMT ist charakterisiert durch einen Verlust der Zelladhäsion und einer verstärkten Zellmigration und Invasion. E-cadherin ist ein in Epithelien vorkommendes Adhäsionsmolekül. Bei der EMT und somit auch bei der Fibrogenese kommt es zu einem Verlust von E-cadherin und einer Steigerung der mesenchymalen Marker wie Vimentin und Fibronektin. Diese wiederum werden durch eine verstärkte Expression der Transkriptionsfaktoren Snail1, Slug und Twist reguliert.  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) ist ein klassischer Marker für Myofibroblasten, wie z.B. vaskuläre glatte Muskelzellen der Arteriolen. In nicht-obstruierten Nieren sind neben



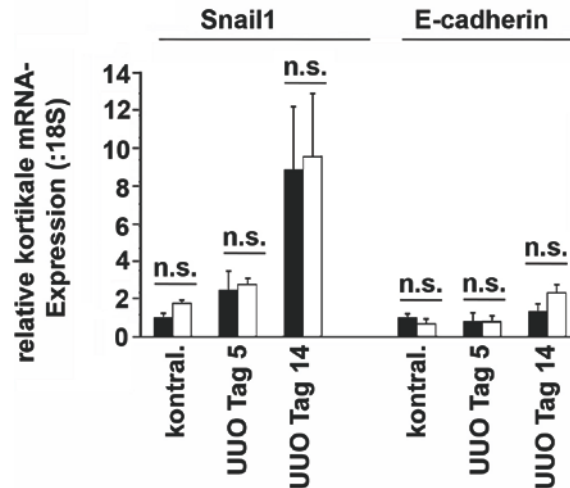
den Gefäßen keine zusätzlichen Zellen  $\alpha$ -SMA positiv. Bei fibrotisch geschädigten Nieren sind interstitielle Zellen mit myofibroblastischem Phänotyp und  $\alpha$ -SMA Expression nachweisbar<sup>94</sup>.



**Abbildung 29:**  $\alpha$ -smooth muscle actin-Färbung nach unilateraler Ureterobstruktion (UUO).  $\alpha$ -SMA Färbung der obstruierten Nieren von (A, D) Wildtyp- und (B, E) Notch-3<sup>-/-</sup> Mäusen nach (A-B) 5 bzw. (D-E) 14 Tagen. Die Färbung wurde morphometrisch mit der AnalySIS Pro Software ausgewertet. (C, F) Der prozentuale Anteil der immunhistologisch gefärbten Fläche zur Gesamtfläche wurde gemessen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$ SD (n=5). n.s.= nicht signifikant. Wildtyp ■ Notch-3 knockout □

Die Wildtyp-Mäuse wiesen nach 5 Tagen UUO eine Vielzahl  $\alpha$ -SMA positiver tubulointerstitieller Zellen auf (Abbildung 29 A). Die Anzahl  $\alpha$ -SMA positiver Zellen nahm im zeitlichen Verlauf zu (Abbildung 29 D). In den Notch-3 defizienten Mäusen waren dagegen nur vereinzelt  $\alpha$ -SMA positive Zellen im Tubulointerstitium nachweisbar (Abbildung 29 B). In den Diagrammen der Abbildung 29 C und F sind die morphometrischen Auswertungen der  $\alpha$ -SMA Färbung dargestellt. In den nicht-obstruierten Nieren war kein Unterschied in der  $\alpha$ -SMA Expression nachweisbar. Nach 5 Tagen UUO stieg der Gehalt an  $\alpha$ -SMA in den Wildtyp-Mäusen um das 5-fache, nach 14 Tagen sogar um das 12-fache an. In den Rezeptor Notch-3 *knockout*-Mäusen war dieser Anstieg um 50 bzw. 66 % geringer.

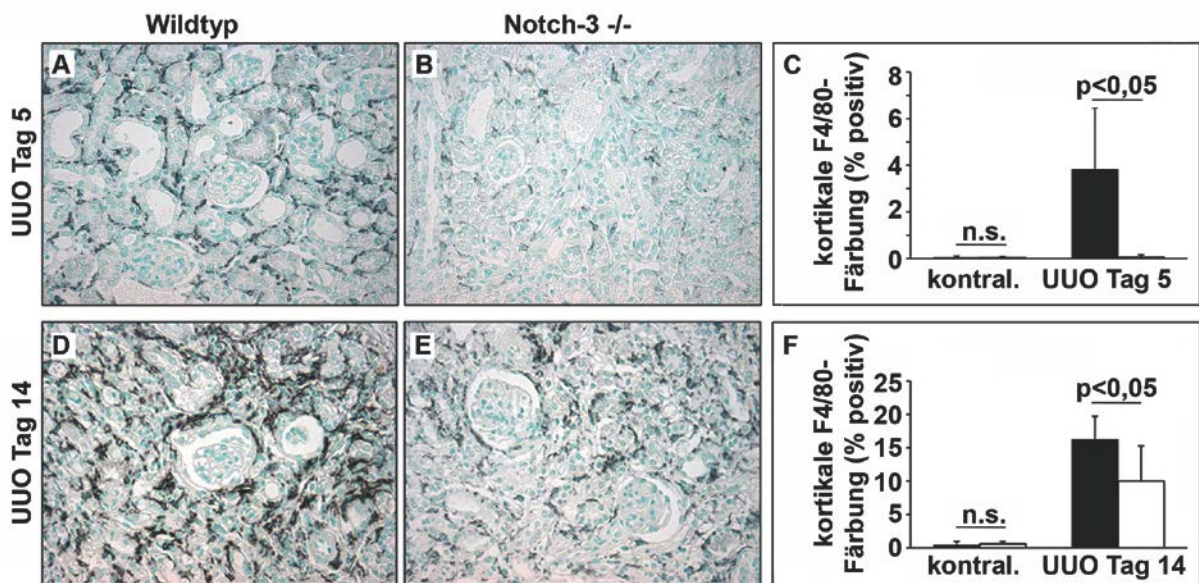
Analysen der mRNA-Expression der EMT-Marker E-cadherin und Snail1 mittels qRT-PCR ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und Notch-3<sup>-/-</sup> Mäusen (Abbildung 30). In beiden Mausstämmen wurde der Transkriptionsfaktor Snail1 im Verlauf der UUO erwartungsgemäß verstärkt exprimiert. Eine Abnahme der E-cadherin Expression konnte jedoch nicht beobachtet werden. Nach 5 Tagen UUO war noch keine veränderte E-cadherin Expression nachweisbar, während sie nach 14 Tagen UUO zunahm.



**Abbildung 30: EMT-Marker nach unilateraler Ureterobstruktion (UUO).** Aus nicht-obstruierten und obstruierten Nieren wurde die kortikale RNA extrahiert und für die quantitative *real time* PCR-Analyse in cDNA umgeschrieben. Die Normalisierung der Transkriptzahlen erfolgte gegen 18S rRNA als interne Referenzkontrolle. Der Wert der nicht-obstruierten Nieren wurde gleich 1 gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$ SD (n=5). n.s.= nicht signifikant. Wildtyp ■ Notch-3 *knockout* □

#### 4.10 Rezeptor Notch-3 Defizienz reduziert die interstitielle Fibrose und die Einwanderung inflammatorischer Zellen nach UUO

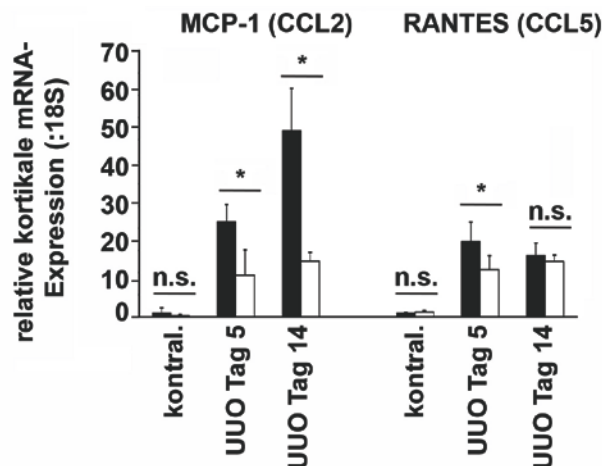
Monozyten und Makrophagen wandern bei entzündlichen Prozessen in das betroffene Gewebe ein und treten auch bei renalen fibrotischen Prozessen vermehrt auf. Nach Induktion einer unilateralen Ureterobstruktion infiltrieren sie innerhalb weniger Stunden das Nierengewebe. Ein häufig verwendeter Marker für Monozyten/Makrophagen ist F4/80.



**Abbildung 31: Infiltration nach unilateraler Ureterobstruktion (UUO).** F4/80-Färbung der obstruierten Nieren von (A, D) Wildtyp- und (B, E) Notch-3  $-/-$  Mäusen nach (A-B) 5 bzw. (D-E) 14 Tagen. Die Färbung wurde morphometrisch mit der AnalySIS Pro Software ausgewertet. (C, F) Der prozentuale Anteil der immunhistologisch gefärbten Fläche wurde zur Gesamtfläche gemessen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$ SD (n=5). n.s.= nicht signifikant. Wildtyp ■ Notch-3 *knockout* □

5 Tage nach Ligatur des Ureters waren inflammatorische Zellen vermehrt in die Nieren der Wildtyp-Mäuse eingewandert (Abbildung 31 A). Im Vergleich dazu waren in den Nieren der Rezeptor Notch-3 defizienten Mäuse nur vereinzelt Immunzellen detektierbar (Abbildung 31 B). Die Expression unterschied sich dabei kaum von der der kontralateralen Nieren (Abbildung 31 C). Die Betrachtung des späteren Zeitpunktes (14 Tage UUU) ergab einen weiteren Influx von Immunzellen in den Nierenkortex (Abbildung 31 D). Bei den Wildtyp-Mäusen stieg der ermittelte Flächenwert von 4 auf 17 % an. Nach 14 Tagen Induktion der UUU konnte auch in den Rezeptor Notch-3 *knockout*-Mäusen eine Infiltration monozytärer Zellen detektiert werden (Abbildung 31 E). Die morphologische Analyse ergab einen Anstieg auf 10 % (Abbildung 31 F).

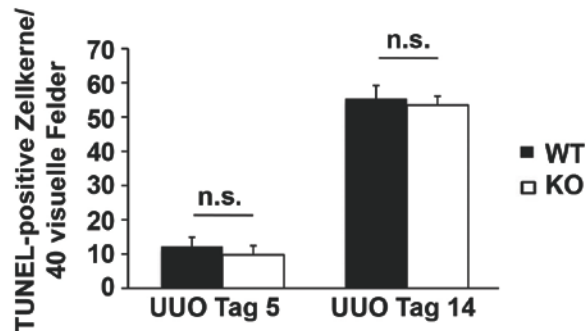
Während der Entzündung werden Chemokine freigesetzt, über die Immunzellen angelockt werden. Die qRT-PCR-Analyse für die Chemokine MCP-1 (CCL2) und RANTES (CCL5) ergab, dass beide Chemokine nach Induktion der UUU verstärkt exprimiert werden (Abbildung 32). Während die Expression von CCL2/MCP-1 nach 14 Tagen UUU weiter ansteigt, nimmt die CCL5/RANTES Expression wieder ab. Die Notch-3 *knockout*-Mäuse wiesen im Vergleich zu den Wildtypen eine deutlich verminderte MCP-1 Expression auf. Auch die RANTES Expression war an Tag 5 geringer.



**Abbildung 32: mRNA-Expression der Chemokine CCL2/MCP-1 und CCL5/RANTES.** Aus nicht-obstruierten und obstruierten Nieren wurde die kortikale RNA extrahiert und für die quantitative *real time* PCR-Analyse in cDNA umgeschrieben. Die Normalisierung der relativen Expression erfolgte gegen 18S rRNA als interne Referenzkontrolle. Der Wert der nicht-obstruierten Nieren wurde gleich 1 gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$ SD (n=5). n.s.= nicht signifikant; \*p<0,05 Wildtyp ■ Notch-3 *knockout* □

#### 4.11 Notch-3 beeinflusst sowohl *in vivo* als auch *in vitro* die Zellproliferation

Um die Funktionen des Notch-3 Rezeptors in der tubulointerstitiellen Fibrose zu verstehen, betrachteten wir im Folgenden zwei weitere mit Fibrose einhergehende Prozesse: Zellproliferation und Apoptoserate.

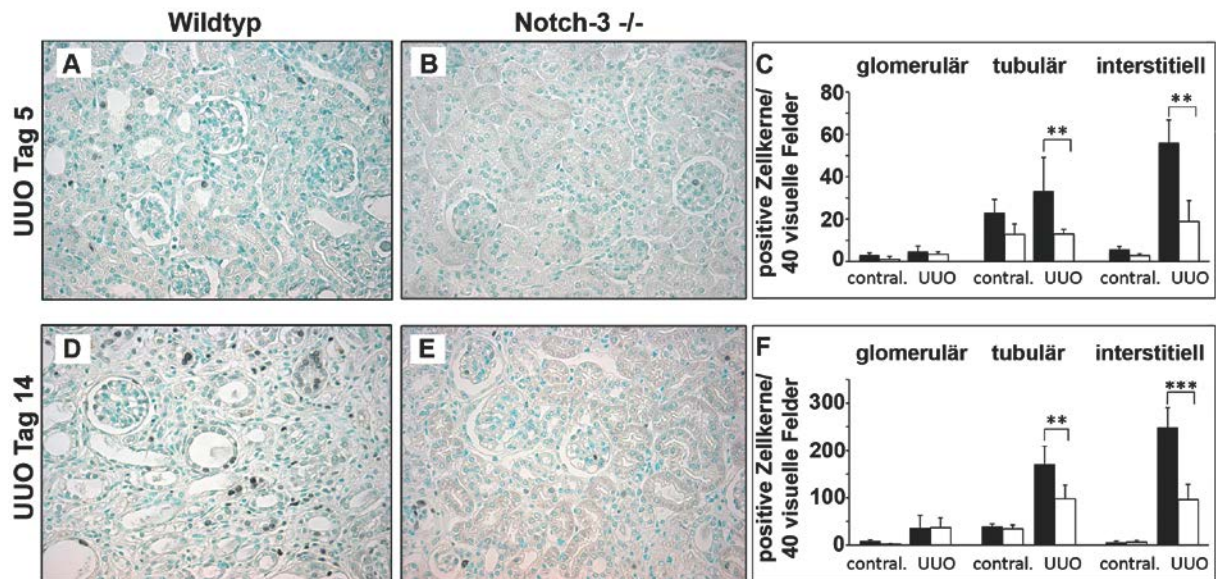


**Abbildung 33: Apoptose nach unilateraler Ureterobstruktion.** 5 und 14 Tage nach UUO wurde die Apoptoserate mittels TUNEL-Färbung quantifiziert. Zur quantitativen Auswertung wurde die Anzahl TUNEL-positiver Zellkerne in 40 zufällig ausgewählten visuellen Feldern ermittelt (Vergrößerung: 400-fach). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$ SD (n=5). n.s.=nicht signifikant. Wildtyp ■ Notch-3 *knockout* □

Die Anzahl apoptotischer Zellen wurde unter Verwendung des *In situ cell death detection kit* ermittelt. Hierzu wurden die TUNEL- und DAPI-positiven Zellkerne in 40 zufällig ausgewählten visuellen Feldern bei 400-facher Vergrößerung pro Tier ausgezählt. In den kontralateralen Nieren sind nur vereinzelte apoptotische Zellen vorhanden. Nach Durchführung der UUO stieg die Anzahl apoptotischer Zellen sowohl in Wildtyp-Tieren, als auch in Notch-3 defizienten Mäusen signifikant an. Nach 14 Tagen waren eine Vielzahl an Zellen TUNEL-positiv. Dabei zeigte sich bei Rezeptor Notch-3 depletierten Tieren kein Unterschied hinsichtlich der Apoptoserate (Abbildung 33).

Die Zellproliferation wurde mittels PCNA-Färbung untersucht. PCNA-positive Zellkerne wurden im Nierenkortex in 40 Gesichtsfeldern bei einer 200-fachen Vergrößerung ausgezählt. Dabei wurde unterschieden, ob sich die PCNA-positiven Zellen im Glomerulus, Tubulus oder Tubulointerstitium befanden. Während nach Induktion der NTN hauptsächlich glomeruläre Zellen proliferierten, zeigte sich nach UUO die stärkste Proliferation im Tubulointerstitium und in den Tubuli (Abbildung 34). In den Glomeruli war im Vergleich zu den kontralateralen Nieren eine erhöhte Proliferationsrate in beiden Versuchsgruppen nachweisbar, zwischen den Gruppen gab es jedoch keine Unterschiede. In den tubulären und interstitiellen Zellen bewirkte die Notch-3 Depletion eine stark verminderte Proliferationsrate im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. Während bei den Wildtyp-Tieren nach 5 Tagen UUO in den ausgewerteten Sichtfeldern im Durchschnitt 45 tubuläre Zellen PCNA-positiv waren, waren es in den Rezeptor Notch-3 *-/-* Mäusen nur 17 Zellen (Abbildung 34 C). Bei den interstitiellen Zellen

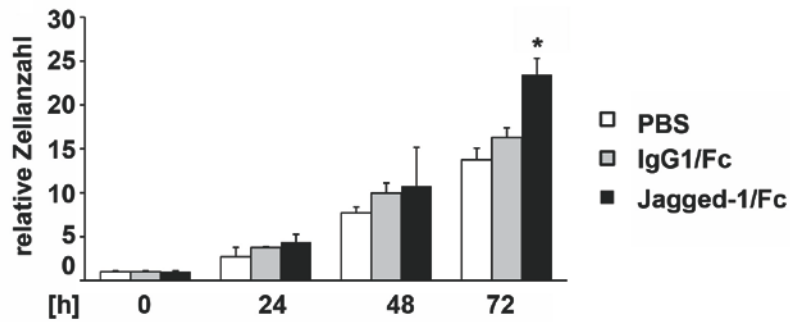
war der Unterschied noch größer (58 *versus* 20 PCNA-positive Zellen). Im zeitlichen Verlauf konnte eine verminderte Proliferation in den Notch-3 defizienten Mäusen festgestellt werden (Abbildung 34 F).



**Abbildung 34: Proliferation nach unilateraler Ureterobstruktion.** Immunhistologische Färbung von in Paraffin eingebetteten Nierenschnitten von (A, D) Wildtyp- und (B, E) Notch-3 -/- Mäusen für PCNA, einem Marker für Zellproliferation (A-C) 5 und (D-F) 14 Tage nach UUO. Zur quantitativen Analyse wurde die Anzahl PCNA-positiver Zellkerne in 40 zufällig ausgewählten visuellen Feldern (Vergrößerung: 200-fach) ermittelt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$ SD (n=11). \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001. Wildtyp ■ Notch-3 knockout □

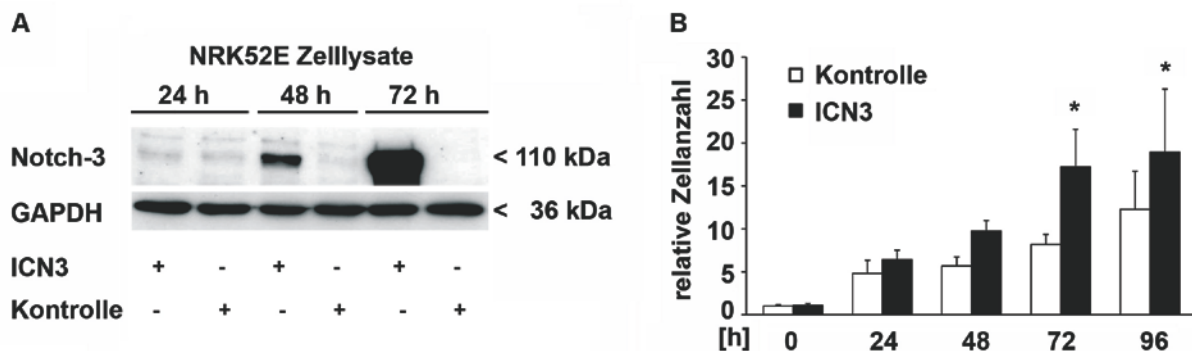
Um den Zusammenhang zwischen dem Notch-3 Rezeptor und der Zellproliferation genauer zu untersuchen, führten wir *in vitro* Experimente durch. Hierzu wurde eine 12-Lochplatte mit den rekombinanten Fusionproteinen Jagged-1/Fc, IgG1/Fc oder PBS versehen und mit  $1 \times 10^4$  Ratten-Tubuluszellen (NRK52E) pro Vertiefung inkubiert. Die Zellen wurden durch Inkubation in FKS-freiem Medium für 24 Stunden in einen Wachstumsarrest gebracht. Die Induktion der Zellproliferation erfolgte durch Zugabe von FKS (10 %). Die Zellzahl wurde vor FKS-Zugabe und nach jeweils 24, 48 und 72 Stunden mit Hilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt.

Nach FKS-Zugabe war eine deutliche Zunahme der Zellzahl unter allen drei Versuchsbedingungen sichtbar (Abbildung 35). 24 und 48 Stunden nach Stimulation konnten noch keine Unterschiede in der Proliferation durch eine Notch-Rezeptor Aktivierung detektiert werden. Nach 72 Stunden Inkubation mit FKS nahm die Proliferationsrate in Anwesenheit des Notch-Liganden Jagged-1 im Vergleich zu den Kontrollbedingungen signifikant zu.



**Abbildung 35: Zellproliferation nach Notch Rezeptor-Aktivierung.** Zellzahlen im zeitlichen Verlauf nach Notch-Aktivierung. NRK52E Zellen wurden in Anwesenheit von Jagged- oder unspezifischen-Liganden durch FKS-Entzug in einen Wachstumsarrest gebracht und anschließend mit 10 % FKS stimuliert. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$ SD (n=3). \*p<0,05.

Da Jagged-1 ein Ligand für alle vier Notch-Rezeptoren darstellt, wurde in einem weiteren Experiment der spezifische Effekt von Notch-3 auf die Zellproliferation untersucht. Hierzu wurden  $1 \times 10^4$  NRK52E Zellen in jede Vertiefung einer 6-Lochplatte gegeben und mit einem Kontroll bzw. ICN3-HA-Expressionsplasmid transfiziert. Dieses Plasmid enthält nur die aktive, intrazelluläre Domäne des Notch-3 Rezeptors, welche mit einem HA-*Taq* versehen ist. Zur Transfektionskontrolle wurden die Zellen 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion lysiert und in der Western Blot-Analyse eingesetzt. Die ICN3-Expression wurde mit einem spezifischen gegen HA gerichteten Antikörper detektiert. Parallel zu diesem Ansatz wurden die transfizierten Zellen 24 Stunden nach Transfektion in FKS-freies Medium überführt. Nach weiteren 24 Stunden wurde die Proliferation durch Zugabe von FKS angeregt und die Zellzahl mittels Neubauer Kammer bestimmt.



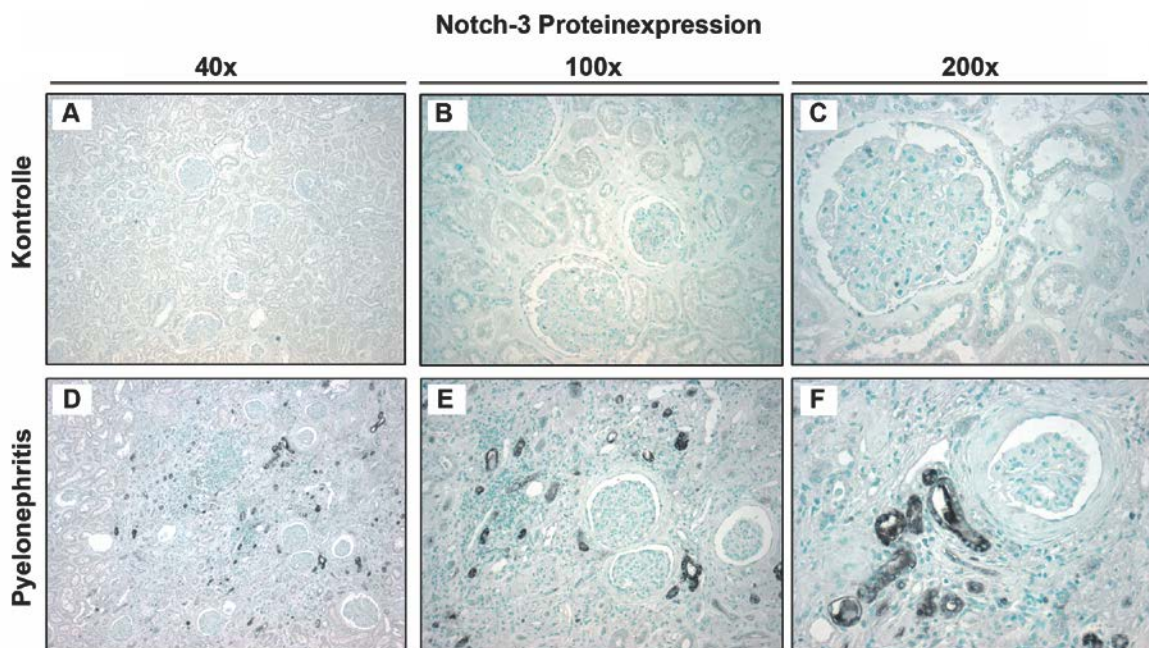
**Abbildung 36: Proliferation nach ICN3-Überexpression.** NRK52E Zellen wurden mit einem ICN3-HA- bzw. Kontroll-Konstrukt transfiziert und anschließend im Western Blot analysiert. Die überexprimierte intrazelluläre Domäne wurde mit einem gegen den HA-*Taq* gerichteten Antikörper detektiert. Zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge wurde ein Proteinabgleich mit GAPDH durchgeführt (A). Die Proliferationsrate im zeitlichen Verlauf wurde durch Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer Kammer bestimmt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$ SD (n=3). \*p<0,05.

Die Western Blot-Analyse der Zelllysate verdeutlichte eine gelungene Transfektion der intrazellulären Notch-3 Rezeptor Domänen (Abbildung 36 A). 24 Stunden nach Transfektion konnte ICN3-HA noch nicht in den NRK52E Zellen nachgewiesen werden, beginnend nach

48 und deutlich nach 72 Stunden. Die verstärkte Expression von ICN3 spiegelte sich in Änderungen der Wachstumsrate wieder. In den ersten 48 Stunden nach Stimulation mit FKS waren nur tendenzielle Unterschiede zwischen den ICN3 überexprimierenden und Kontrollzellen sichtbar (Abbildung 36 B). Nach weiteren 24 Stunden zeigten sich dann deutliche Unterschiede im Wachstumsverhalten der Zellen. Während die Notch-3 Rezeptor-Depletion *in vivo* zu einer verminderten Proliferation führte, ergab diese Intervention mit Überexpression der intrazellulären Notch-3 Domäne eine signifikant erhöhte Proliferationsrate.

#### 4.12 Expression von Notch-Rezeptoren und Liganden in entzündlichen glomerulären und tubulointerstitiellen humanen Erkrankungen

Im Tiermodell der nephrotoxischen Nephritis und der unilateralen Ureterobstruktion zeigte sich eine verstärkte Notch-3 Rezeptor-Expression auf Transkript- und Proteinebene. Vor diesem Hintergrund betrachteten wir im Folgenden die Notch-3 Rezeptor-Expression in Biopsieproben von Patienten mit einer entzündlichen tubulointerstitiellen Erkrankung. Die Biopsate wurden freundlicherweise von Dr. Boor aus dem Institut für Pathologie (Aachen) zur Verfügung gestellt. Die Notch-3 Rezeptor-Expression wurde anhand einer immunhistologischen Färbung in Biopsaten von Patienten vergleichend zu gesunden Lebendspendern analysiert.



**Abbildung 37: Notch-3 Expression in Biopsaten von Patienten mit tubulointerstitiellen Entzündung.** Repräsentative Bilder der immunhistologischen Färbung für Notch-3 in Nierenbiopsaten von (A-C) Lebendspendern und (D-F) Patienten mit tubulointerstitiellen Entzündung. Notch-3 wurde mit einem gegen die intrazelluläre gerichteten Antikörper detektiert.

Wie in Abbildung 37 ersichtlich konnten in den Nieren der Lebendspender nur vereinzelte Notch-3 positive Zellen detektiert werden. In diesen glomerulären und tubulären Zellen war Notch-3 nukleär lokalisiert (Abbildung 37 A-C). In den Nieren der Patienten war hingegen eine deutliche Notch-3 Rezeptor-Expression nachweisbar. Hier waren hauptsächlich tubuläre Zellen für Notch-3 positiv (Abbildung 37 D-F). Interessanterweise wiesen vor allem Tubuli, die von monozytären Infiltraten umgeben waren, eine gesteigerte Notch-3 Rezeptor-Expression auf.

Da die dargestellten Ergebnisse auf eine Rolle der Notch-3 Rezeptoren im fibrotischen und entzündlichen Geschehen hinweisen und eine Notch-3 Depletion im Tiermodell renoprotektiv wirkt, untersuchten wir die Notch-3 Rezeptor-Expression in humanen Nierenbiopsaten von Patienten mit unterschiedlichen glomerulären und tubulointerstitiellen Erkrankungen. In Kooperation mit der *European renal cDNA bank* (ERCB) in Zürich wurde zunächst mittels *Gene-Array* eine *heatmap* erstellt, indem die mRNA-Expression aller Notch-Rezeptoren in Patienten mit IgA-Nephritis (IgA), Lupus-Nephritis (Lupus) und membranöser Glomerulonephritis (MGN) im Vergleich zu Lebendspendern analysiert wurde.

Gen-Symbol	MGN	SLE	IgA
JAG2			
NOTCH1			
NOTCH2			
NOTCH3			
NOTCH4			
YBX1			

Expression:



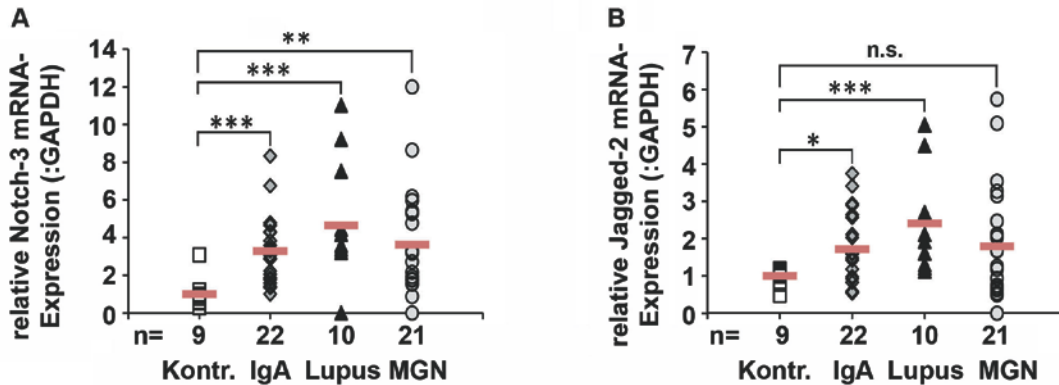
**Abbildung 38: Heatmap für Notch-Rezeptoren in humanen Biopsaten.** MGN= membranöse Glomerulonephritis; SLE= systemischer Lupus erythematodes; IgA= IgA Nephritis

Es zeigte sich, dass eine erhöhte Notch-1 Rezeptor-Expression hauptsächlich in IgA-Nephritis Patienten vorlag (Abbildung 38). Der Rezeptor Notch-2 dagegen wurde in allen drei Erkrankungen im Vergleich zu den gesunden Kontrollen schwächer exprimiert. Notch-3 war am deutlichsten hochreguliert. Sowohl in Nieren von IgA- als auch von Lupus-Nephritis Patienten betrug die relative Expression mehr als den 1,5-fachen Wert. Verglichen mit Lebendspender-Gewebe wiesen die erkrankten Patienten zudem eine stärkere Notch-4 mRNA-Expression auf. Auch in diesem Fall waren bevorzugt Menschen mit Lupus-Nephritis betroffen. Im Weiterem wurde die Expression zweier Notch-Rezeptorliganden, Jagged-2 und



YB-1, untersucht. Eine Regulation der mRNA-Expression konnte für beide Liganden nachgewiesen werden.

Darauffolgend untersuchten wir die renale mRNA-Expression von Notch-3 und den Liganden Jagged-1 und -2 mittels quantitativer *real time* PCR.



**Abbildung 39: Notch-3 und Jagged-2 Expression in humanen Biopsaten.** qRT-PCR Analyse der aus humanen Nierenbiopsaten gewonnenen cDNA von Patienten mit diversen glomerulären und tubulointerstitiellen Erkrankungen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$ SD. IgA= IgA-Nephritis; Lupus= Lupus-Nephritis; MGN= membranöse Glomerulonephritis. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$

Der Notch-3 Rezeptor war in allen untersuchten humanen Erkrankungen verstärkt exprimiert. Besonders bei Patienten mit einer Lupus-Nephritis konnte eine signifikante Hochregulation von Notch-3 Rezeptoren detektiert werden (Abbildung 39 A). Unterschiede in der Jagged-1 Transkriptzahl zeigten sich dagegen nicht. Ebenfalls stärker exprimiert war der Notch-Rezeptorligand Jagged-2 (Abbildung 39 B). Auffällig war auch in diesem Fall die starke Hochregulation der Genexpression in den renalen Biopsieproben der Lupus-Patienten. Die gezeigten Ergebnisse wiesen auf eine gleichsinnige Regulation von Notch-3 Rezeptoren und Jagged-2 Liganden in der IgA-, Lupus- und MG-Nephritis hin.

## 5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Bedeutung der Notch-3 vermittelten Signaltransduktion in der renalen Inflammation und Entwicklung tubulointerstitieller Fibrose. Hierzu wurden Untersuchungen in zwei murinen renalen Schädigungsmodellen durchgeführt, einem proteinurischen Entzündungsmodell, der nephrotoxischen Nephritis (NTN), und in einem nicht-proteinurischen Fibrosemodell, der unilateralen Ureterobstruktion (UUO). Wir konnten zeigen, dass neben Notch-1 auch Notch-3 Rezeptoren bei Patienten mit tubulären und glomerulären Erkrankungen sowie in beiden untersuchten Mausmodellen vermehrt exprimiert und aktiviert werden und eine funktionelle Rolle in der Fibroseentwicklung spielen.

Die Beteiligung der Notch-Signaltransduktion in der Ontogenese und speziell in der Nephrogenese wurde in den letzten Jahren intensiv untersucht. Der auffällige Nephron-Phänotyp von Mäusen mit gestörtem Notch-Signalweg weist auf eine wichtige Funktion bei der Spezifikation und Aufteilung innerhalb der glomerulären und tubulären Strukturen hin<sup>80, 95, 96</sup>. Notch-2 Rezeptor *knockout* Mäuse weisen Glomeruli ohne Podozyten oder fehlende Glomeruli und proximale tubuläre Strukturen auf<sup>95</sup>. Dagegen werden Notch-1 Rezeptoren in distalen Tubuli und Mesangialzellen exprimiert<sup>97</sup>. Die genetische Depletion des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes, eine Schlüsselkomponente der Notch-Signaltransduktion, führt zu schweren Defekten in der Nephrogenese und dem nahezu kompletten Verlust von *comma-* und *S-shaped bodies* und Glomeruli<sup>98</sup>. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der Notch-Signalweg eine wichtige Rolle bei der Zell-Zell-Kommunikation, der asymmetrischen Zellteilung und bei Entscheidungen des weiteren Zellschicksals spielt. Von besonderem Interesse ist hierbei die jeweils unterschiedliche Beteiligung der verschiedenen Notch-Rezeptoren an diesen Phänotypen. Die in dieser Arbeit untersuchten Notch-3 *knockout* Mäuse weisen keine sichtbare Dysontogenese der Niere auf<sup>99</sup>. Bei Säugern wird Notch-3 in den glatten Muskelzellen der Gefäße exprimiert und Mutationen in diesem Rezeptortyp führen beim Menschen zu einer genetischen Fehlfunktion, dem CADASIL-Syndrom<sup>66, 100</sup>. Vor kurzem konnten wir in Kooperation mit Prof. Chatziantoniou die wichtige Funktion von Notch-3 bei der renalen Hämodynamik und der adaptiven vaskulären Antwort auf vasoaktive Substanzen wie Angiotensin II und Norepinephrin nachweisen<sup>99</sup>. In einem Modell der mesangioproliferativen Nephritis konnten wir zudem zeigen, dass der Notch-3 Rezeptor im mesangialen Kompartiment verstärkt exprimiert wird<sup>11</sup>. Überdies waren zum Beginn dieser Arbeit keine Funktionen des Notch-3 Rezeptors als Entzündungs- und Fibrosemediator beschrieben.

In den vergangenen drei Jahren wurde jedoch zunehmend die wichtige Rolle der Notch-Signaltransduktion in glomerulären Erkrankungen erkannt. Hierbei fokussierten sich die meisten Studien auf die Notch-1 und -2 Rezeptor-Expression in Glomerulopathien und proteinurischen Erkrankungen. Im Jahr 2008 konnte die Arbeitsgruppe um Katalin Susztak zeigen, dass im Tiermodell der diabetischen Nephropathie (DNP) bzw. der fokal segmentaler Glomerulosklerose (Streptozotocin-induzierte diabetische Nephropathie und Puromycin-induzierte FSGS) eine Aktivierung des Rezeptors Notch-1 in Podozyten zu einer Glomerulosklerose führt. In Nierenbiopsaten von Patienten mit DNP und FSGS werden Notch-1 Rezeptoren vor allem in den Glomeruli verstärkt exprimiert<sup>82</sup>. Parallel zu diesen Daten konnten Waters et al. demonstrieren, dass eine podozytäre, konstitutive Expression der intrazellulären Notch-1 Domäne schon nach wenigen Wochen zu einer Glomerusklerose in transgenen Mäusen führt<sup>79</sup>. Zudem vermitteln Notch-Rezeptoren die Balance zwischen Apoptose der Podozyten und Regeneration durch renale Progenitorzellen und nehmen somit entscheidenden Einfluss auf den Schweregrad glomerulärer Erkrankungen<sup>101</sup>. In einem Mausmodell der FSGS konnten nach 7 Tagen in Podozyten neben Notch-1 auch Notch-3 Rezeptoren detektiert werden. Im weiteren Krankheitsverlauf blieb die Expression beider Rezeptoren podozytär bestehen, zusätzlich konnten Notch-3 Rezeptoren jedoch auch in Progenitorzellen nachgewiesen werden. Eigene Vordaten belegen eine Hochregulation von Notch-3 Rezeptoren in einem Rattenmodell der mesangioproliferativen Nephritis (Anti-Thy1.1), so dass davon auszugehen ist, dass neben Notch-1 auch Notch-3 Rezeptoren eine wichtige Rolle bei glomerulären Erkrankungen spielen<sup>11</sup>. In der vorliegenden Arbeit sollte dieser Aspekt weiterführend untersucht werden. Als Mausmodell einer glomerulären Erkrankung wurde die nephrotoxische Nephritis (NTN) gewählt. Die pathophysiologischen Prozesse, die durch Gabe des nephrotoxischen Serums und der darin enthaltenen anti-GBM Antikörper induziert werden, sind in diesem Mausmodell gut untersucht. Der Verlauf entspricht einer rasch progredienten Glomerulonephritis<sup>102</sup>. Es kommt zur Sklerosierung der Glomeruli und durch Proliferation des Kapselepithels zur Bildung sogenannter Halbmonde (*crescents*), zur podozytären Degeneration und Ablösung der Podozyten von der glomerulären Basalmembran (GBM), Verdichtung der mesangialen Matrix, sowie zur tubulointerstitiellen Fibrose. Im durchgeführten Vorversuch mit Wildtyp-Mäusen konnte eine signifikant höhere Anzahl an Rezeptor Notch-3 Transkripten detektiert werden. Aus diesem Grund wurde dieses Modell weiter verwendet und zusätzlich in Notch-3 Rezeptor -/- Mäusen induziert. Der Verlauf der aus der Entzündung resultierenden Proteinurie wurde überwacht und sollte über den Tag der Nierenentnahme entscheiden. Eine gelungene Injektion des nephrotoxischen

Serums wurde durch Konzentrationbestimmung des Schafs-IgG im Serum sichergestellt. Die Protein:Kreatinin-Ratio stieg bei den Wildtyp-Mäusen erwartungsgemäß an und ließ Rückschlüsse auf die Schwere des Krankheitsstadiums zu. Die Streuung innerhalb der Wildtyp-Gruppe war bei der Protein:Kreatinin-Ratio zwar recht groß, aber alle Werte lagen deutlich über denen der Notch-3 defizienten Mäusen. Aufgrund unerwarteter Herzprobleme bei den Notch-3 Rezeptor-defizienten Mäusen musste der Versuch jedoch frühzeitig abgebrochen werden, so dass die Nieren nur in einem frühen Krankheitsstadium begutachtet werden konnten.

In myokardialem Gewebe und in Kardiomyozyten sind alle vier Notch-Rezeptoren nachweisbar. In Patienten mit akutem Herzversagen sind jedoch vor allem Notch-3 und Notch-4 Rezeptoren verstärkt exprimiert <sup>103</sup>. So wird vermutet, dass die Expressionsstärke und das Verhältnis der einzelnen Notch-Rezeptoren zueinander auch hier von entscheidender Bedeutung sind. Weiterhin ist beschrieben, dass in Mäusen eine Notch-1 Rezeptor-Defizienz im Herzen zu Hypertrophie, Fibrose und einer erhöhten Mortalitätsrate führt <sup>104</sup>. Über mögliche Effekte einer Notch-3 Rezeptor-Defizienz auf das Herz-Kreislaufsystem war bisher jedoch nichts bekannt. In der basalen Hämodynamik zeigen sich keine Unterschiede zwischen Notch-3 -/- und Wildtyp-Tieren. In weiterführenden Studien konnten wir jedoch zeigen, dass die Notch-3 Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der Adaptation kardialer und renaler Funktionen bei Bluthochdruck ausüben. Notch-3 -/- Mäuse weisen nach Angiotensin II-Gabe einen geringeren Anstieg des Blutdrucks auf als Wildtyp-Mäuse, die Mortalitätsrate lag jedoch bei 65% <sup>99</sup>. Zum jetzigen Zeitpunkt ist noch nicht geklärt, welche Funktion der Rezeptor Notch-3 im Herzen ausübt und was zum Tod der Tiere führt. Immunhistologische Untersuchungen der Herzen und Studien über Veränderungen des Blutdrucks nach NTN-Induktion werden diese Fragen zukünftig klären.

Um renale Effekte einer Notch-3 Defizienz unabhängig von hämodynamischen Veränderungen untersuchen zu können, zogen wir zusätzlich ein Mausmodell der tubulären Fibrose mit sekundärer Nephritis, die unilaterale Ureterobstruktion (UUO), in Betracht. Generell tritt die tubulointerstitielle Fibrose als homogene Endstrecke bei den meisten progressiven Nierenerkrankungen auf. Es kommt zu narbigen Veränderungen, die zum Untergang des ursprünglichen Gewebes und folglich zum Funktionsverlust des Organs führen können. Somit ist in vielen Fällen die Dialyse als Nierenersatztherapie oder eine Organtransplantation die letzte Möglichkeit. Als initiale Auslöser fungieren hierbei Infektionen, Toxine, mechanische Verletzungen oder autoimmun vermittelte Reaktionen. Die Pathogenese der Nierenfibrose lässt sich grob in vier Phasen einteilen <sup>92</sup>: Zunächst kommt es

zur *Schädigung und Zellaktivierung*. Tubuluszellen werden aktiviert, die peritubulären Kapillaren rarefiziert und mononukleäre Zellen wandern in das Interstitium, wo sie zu Makrophagen differenzieren. Zu diesem Zeitpunkt sind zudem aktivierte Fibroblasten und Myofibroblasten nachweisbar. In der zweiten Phase, der *entzündungsbedingten Signalphase mit Fibrogenese*, werden fibrosefördernde Wachstumsfaktoren und Zytokine wie TGF- $\beta$ , CTGF, Angiotensin II, EGF, Endothelin (ET)-1, PDGF, bFGF, TNF- $\alpha$  und IL-1 durch residente und einwandernde Zellen freigesetzt. Bedingt durch Proliferation der matrixproduzierenden Zellen und die daraus resultierende gesteigerte Synthese sowie dem verminderten Abbau der extrazellulären Matrix (EZM), kommt es zur Akkumulation von EZM, der sogenannten *Fibrosierung*. Der fortschreitende Vernarbungsprozess führt zur irreversiblen *Zerstörung der Nierenarchitektur- und funktion*. Dabei korreliert das Ausmaß der tubulointerstitiellen Schädigung mit der Funktionsabnahme der Niere und ist somit von bedeutendem prognostischen Wert <sup>105-107</sup>. Der Fibrosierungsprozess wird von zahlreichen Faktoren beeinflusst, daher sind ein besseres Verständnis und eine mögliche Inhibition dieses Prozesses von hoher klinischer Relevanz.

Zu den wichtigsten Zytokinen der inflammatorischen Matrixproduktion gehören Angiotensin II und TGF- $\beta$ 1. Angiotensin II stimuliert Tubulusepithelzellen und Fibroblasten zur Kollagensynthese und TGF- $\beta$ 1 Sekretion <sup>108</sup>. TGF- $\beta$  gilt als eines der wichtigsten profibrotischen Zytokine. Auf Fibroblasten wirkt es chemotaktisch und unterstützt zudem die Transformation zu Myofibroblasten und somit die verstärkte Expression extrazellulärer Matrixproteine wie Fibronectin und Kollagen I. In transgenen Mäusen führt die Überexpression von TGF- $\beta$  zur interstitiellen Fibrose und zur raschen Entwicklung einer Glomerulosklerose. Nach Bindung und Aktivierung seines membranständigen Rezeptors erfolgt die intrazelluläre Signalweiterleitung von TGF- $\beta$ 1 über Phosphorylierung der SMAD-Proteine. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Hochregulation von Mitgliedern der Notch-Rezeptorfamilie in renalen Erkrankungen TGF- $\beta$ -abhängig ist. So hat eine Stimulation von tubulären Zellen mit TGF- $\beta$ 1 eine gesteigerte mRNA-Expression des Notch-1 Rezeptors und des Liganden Jagged-1 zur Folge <sup>81</sup>. Die Aktivierung des Notch-1 Rezeptors nach TGF- $\beta$ 1-Gabe konnte neben tubulären Zellen, auch in Podozyten nachgewiesen werden <sup>82, 84</sup>. In primären Rattenmesothelzellen (pRMC) führte TGF- $\beta$ 1 ebenfalls zu einer Notch-1 Aktivierung und einer verstärkten Expression von Jagged-1 und des Notch-Zielgens HES-1 <sup>109</sup>. Bisher war jedoch nur eine Arbeit bekannt, in der ein Effekt von TGF- $\beta$ 1 auf die Notch-3 Expression untersucht worden war. Kennard et al. zeigten, dass eine Stimulation von murinen Fibroblasten mit TGF- $\beta$ 1 zu einer Repression von Notch-3 führt <sup>110</sup>. Hierbei ist anzumerken,

dass schon die unstimulierten Zellen Notch-3 auf mRNA- und Proteinebene exprimieren. In eigenen Vorarbeiten konnten wir *in vivo* zeigen, dass Mesangialzellen erst nach Krankheitsinduktion den Notch-3 Rezeptor exprimieren<sup>86</sup>. In der vorliegenden Arbeit konnte dies *in vitro* belegt werden. Zudem konnten wir erstmalig zeigen, dass eine TGF- $\beta$ 1 Stimulation von primären, humanen Mesangialzellen (hMC) zu einer simultanen Aktivierung von Notch-1 und Notch-3 Rezeptoren führt.

Eines der am besten untersuchten tierexperimentellen Modelle der interstitiellen Nierenfibrose ist die UUO. Gibt man die Begriffe „*ureteral obstruction*“ und „*mice*“ in die Suchmaschinen „Pubmed“ ein, erhält man allein für die letzten zehn Jahre 312 Publikationen. Die UUO bietet gegenüber Modellen mit einem Einsatz tubulotoxischer Substanzen den Vorteil der schnelleren Ausbildung der Nierenfibrose sowie der besseren Reproduzierbarkeit<sup>111, 112</sup>. Bereits 3 Tage nach Ligatur ist in diesem Modell eine vermehrte mRNA-Expression und Ablagerung von Kollagen Typ I, III und IV sowie Fibronectin nachweisbar<sup>113</sup>. Hervorgerufen durch die Harnstauung ähneln histopathologische Bilder und pathophysiologische Prozesse der UUO denen der tubulointerstitiellen Fibrose als Endstrecke chronischer Nierenerkrankungen. Es kommt zunächst zur Invasion entzündlicher Zellen mit nachfolgender Proliferation tubulointerstitieller Zellen. Diesen Vorgängen folgt eine Akkumulation extrazellulärer Matrixproteine, vermehrter Expression von Chemokinen, vaskulären Zelladhäsionsmolekülen sowie TGF- $\beta$ 1 und *fibroblast-derived growth factor* (FGF). Schließlich kommt es zur tubulären Atrophie.

Es sind zwei Arbeiten publiziert, die sich mit der Expression von Komponenten des Notch-Signalweges in der UUO beschäftigen. Morrissey et al. zeigten, dass Jagged-1 nach UUO TGF- $\beta$ 1-abhängig in Tubuli verstärkt exprimiert wird<sup>81</sup>. Diese Ergebnisse werden durch die Arbeit von Bielez et al. bestätigt. Zusätzlich konnten sie einen Anstieg der Notch-1, HES-1 und Hey-L mRNA nachweisen<sup>84</sup>. In einem weiteren Mausmodell der tubulointerstitiellen Fibrose, die durch Folsäure (FA) induziert wird, zeigten sie, dass der Rezeptor Notch-3 stärker reguliert wird als die Rezeptoren Notch-1 und Notch-2. In der hier vorliegenden Arbeit konnte nach 5- und 14-tägiger Ureterligatur in Wildtyp-Mäusen eine vermehrte mRNA-Expression von Notch-3 Rezeptoren detektiert werden. Eine Aktivierung der Rezeptoren wurde in der Western Blot-Analyse und in der Immunhistochemie nachgewiesen. Hierbei zeigte sich, dass nicht nur der Rezeptor Notch-1, sondern auch der Rezeptor Notch-3 durch tubuläre Zellen exprimiert wird. Aus diesem Grund erschien es sinnvoll neben der NTN auch die UUO mit Notch-3 defizienten Mäuse durchzuführen und die Nieren beider

Experimente weiterführend auf Inflammation und tubulointerstitielle Fibrose hin zu untersuchen.

In beiden Tiermodellen war besonders die Nierenmorphologie auffällig, die mit Hilfe der PAS-Färbung dargestellt wurde. Sowohl nach NTS-Gabe, als auch nach Ligatur war der tubuläre Schaden in den Notch-3 *-/-* Mäusen weniger ausgeprägt als in den entsprechenden Wildtyp-Mäusen. Die Nieren beider Stämme wiesen nach Ligatur eine ausgeprägte Hydronephrose auf, was die erfolgreiche Harnstauung belegt. Jedoch zeigte sich erst nach 14 Tagen UUO auch in den Notch-3 *knockout* Mäusen ein ausgeprägter tubulointerstitieller Schaden.

Als Marker der renalen Fibrose betrachteten wir in der vorliegenden Arbeit die Aktivierung der Fibroblasten, die EMT und die Ablagerung von extrazellulären Matrixproteinen. Das Ausmaß der Matrixakkumulation wurde mit Hilfe der immunhistologischen Detektion der Kollagenablagerung, mittels Siriusrot-Färbung, Sircol-Assay und *real time* PCR-Analyse untersucht. Am Tag 5 nach Ureterligatur war neben den deutlich sichtbaren tubulären Schäden eine verstärkte Matrixproduktion sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteine-Ebene, in den Wildtyp-Mäusen sichtbar. Eine im zeitlichen Verlauf zunehmende Akkumulation des Kollagens in den obstruierten Nieren war zumeist nachweisbar. Das Ausmaß der Matrixexpansion war vergleichbar mit dem anderer Arbeiten<sup>114</sup>. In den Rezeptor Notch-3 *-/-* Mäusen wurden mit allen Auswertemethoden signifikant geringere Anstiege der kortikalen Kollagensynthese detektiert. Auch am Tag 14 nach UUO waren diese Effekte in den Notch-3 defizienten Mäusen reduziert, jedoch waren die Unterschiede im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren schwächer ausgeprägt als an Tag 5. Nach 14 Tagen ist die renale Schädigung weit fortgeschritten und eine Vielzahl der in der renalen Fibrose involvierten biologischen Systeme sind aktiv, so dass die Effekte der Notch-3 Defizienz vermutlich überlagert wurden<sup>115</sup>. Nach NTN-Induktion konnte ebenfalls eine verminderte Kollagen-Expression auf mRNA- und Proteinebene in Notch-3 *-/-* Tieren detektiert werden. Aktuelle Studien mit dermalen Fibroblasten belegen, dass die Hemmung der Notch-Signaltransduktion mittels  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor die Kollagenfreisetzung reduziert<sup>116, 117</sup>. Eine Stimulation mit den Notch-Liganden Jagged-1 bewirkte dagegen eine vermehrte Kollagenproduktion. Der Einsatz von  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren im Modell der unilateralen Ureterobstruktion und der FA-induzierten Fibrose bewirkte, ähnlich wie in den Fibroblasten, eine Verminderung der Kollagen Typ I und Typ III mRNA-Expression<sup>84</sup>. Bisher gibt es erst wenige Untersuchungen, die differenzielle Effekte der einzelnen Notch-Rezeptoren auf die Kollagensynthese betrachten. Ein tubulärer *knockout* des Notch-1 Rezeptors führte ebenfalls zu einer verminderten Kollagen I Expression in der

FA-induzierten Fibrose. Eine Überexpression der intrazellulären Notch-1 Domäne aktivierte dagegen die Kollagensynthese<sup>84</sup>. Unsere Ergebnisse weisen daraufhin, dass nicht nur Notch-1 Rezeptoren, sondern auch Notch-3 Rezeptoren einen entscheidenden Einfluss auf die Matrixproduktion ausüben.

An der EZM-Synthese beteiligt und ein Hauptcharakteristikum der tubulointerstitiellen Fibrose sind die Myofibroblasten. Als klassisches Merkmal für Myofibroblasten gilt die Expression von  $\alpha$ -SMA, weshalb diese Zellen morphologisch den glatten Muskelzellen ähneln<sup>106</sup>. Sie besitzen kontraktile Eigenschaften und die Fähigkeit zum Gewebeumbau. Im Tubulointerstitium von gesunden Nieren kommen sie selten vor und ihre Zahl nimmt im Verlauf der sich entwickelnden Fibrose zu. Ihr Ursprung wird kontrovers diskutiert. Hier werden im Wesentlichen folgende Möglichkeiten in Betracht gezogen: 1. Aktivierung residenter Fibroblasten 2. epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) 3. endotheliale-mesenchymale Transition (EndMT) oder 4. Differenzierung mesenchymaler Vorläuferzellen aus dem Knochenmark oder periadventitieller Zellen<sup>118</sup>.

Nach 5- und 14-tägiger UUO konnte mittels  $\alpha$ -SMA Färbung eine deutliche Zunahme an Myofibroblasten in den Wildtyp-Mäusen gezeigt werden, die bei den Notch-3 Rezeptor defizienten Mäusen wesentlich geringer ausfiel. Notch-Rezeptoren können in der Myofibroblasten-Differenzierung sowohl stimulierend als auch inhibierend wirken, was vom Zelltyp, Induktor und den vorhandenen Rezeptor abhängt<sup>119</sup>. Kennard et al demonstrierten einen inhibitorischen Effekt von Notch-3 Rezeptoren auf die TGF- $\beta$  induzierte  $\alpha$ -SMA Expression in 10T1/2 Zellen (Mausembryozellen). Die meisten anderen Arbeiten weisen auf eine Induktion der Myofibroblasten-Differenzierung durch Notch-Rezeptoren hin. Eine Hemmung der Notch-Signaltransduktion mit  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor führt in Lungenfibroblasten<sup>120</sup>, proximalen Tubulusepithelzellen<sup>121</sup>, Alveolarepithelzellen<sup>122</sup> und Myofibroblasten (C2C12-Zellen)<sup>123</sup> zu einer verminderten  $\alpha$ -SMA Expression. Eine verminderte Notch-3 Rezeptor-Expression durch spezifische siRNA führt in C2C12-Zellen (Myofibroblasten) zu einer verminderten  $\alpha$ -SMA Expression, die auch nach TGF- $\beta$  Stimulation nicht ansteigt. Ein gegenläufiger Effekt konnte dagegen mittels *knockdown* von Notch-2 Rezeptoren erzielt werden<sup>123</sup>. Bisher ist die Rolle von Notch-Rezeptoren in der EMT besonders gut in der Tumorgenese untersucht. Es gibt eine Vielzahl von Arbeiten, die demonstrieren, dass Notch-Rezeptoren die EMT positiv regulieren<sup>124</sup>. Zhang et al. konnten zeigen, dass in Tumorzellen die Inhibition des Notch-3 Rezeptors zu einer reduzierten Expression von Snail1, Vimentin und Fibronectin führt, während die E-cadherin Expression unbeeinflusst bleibt<sup>125</sup>. Aktuelle Studien befassen sich mit der Rolle von Notch-Rezeptoren



in der EMT in Nierentubuluszellen *in vitro* und belegen einen positiven Effekt von Notch-Rezeptoren auf die EMT<sup>121, 126, 127</sup>. Bielez et al. konnten keinen *in vivo* relevanten Zusammenhang zwischen Notch-1 und EMT-Markern feststellen<sup>84</sup>. Dies bestätigte sich in der vorliegenden Arbeit für die EMT-Marker Snail1 und E-cadherin. Zudem konnten wir beobachten, dass E-cadherin im Verlauf der UO verstärkt exprimiert wird. Zur Zeit gibt es eine Vielzahl von Arbeiten, die dieses Phänomen beschreiben und die Eignung von E-cadherin als EMT-Marker *in vivo* anzweifeln<sup>128</sup>.

Die verstärkte Matrixakkumulation kann auf einen direkten Einfluss des Notch-3 Rezeptors auf die Kollagensynthese zurückzuführen sein. Hierbei könnte die Interaktion von Notch-Rezeptoren mit dem Kollagenrezeptor DDR1 eine Rolle spielen und zu einem autoregulatorischen *feedback loop* beitragen. Zusätzlich beeinflussen Notch-3 Rezeptoren die Kollagensynthese indirekt durch Regulation der Proliferation tubulärer und tubulointerstitieller Zellen. Sowohl die *in vivo*, als auch die *in vitro* Daten weisen auf einen promotogenen Effekt nach Notch-3 Rezeptoraktivierung hin. Dies wird in einer Vielzahl von Arbeiten bestätigt<sup>84, 101, 129, 130</sup>.

Die Infiltration von Monozyten und Makrophagen ist für die Entstehung der tubulointerstitiellen Fibrose bedeutsam. Sie unterstützen durch Produktion von Zytokinen und Chemokinen die Fibroseentstehung<sup>131</sup>. Neben TGF- $\beta$  werden weitere chemotaktische Faktoren wie Osteopontin und MCP-1 (CCL2) in der UO hochreguliert. Die Bedeutung von MCP-1 zeigt eine Studie mit MCP-1 *knockout* Mäusen. Diese wiesen nach UO neben einer verminderter Makrophagen-Infiltration auch weniger Fibrose auf.

Notch-3 Rezeptoren werden während der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen verstärkt exprimiert<sup>132</sup>. Aktuelle Studien weisen auf eine Rolle von Notch-Rezeptoren in der Immunantwort und der T-Zellaktivierung hin<sup>133</sup>. Eigene Untersuchungen mittels *fluorescence activated cell sorting* (FACS)-Analyse zur Immunzellpopulation von Notch-3 defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtypen ergaben keine Unterschiede (unpublizierte Daten, Michele et al.). Shi et al. demonstrierten kürzlich, dass Notch-3 Rezeptor defiziente Mäuse im Gegensatz zu Notch-1 defizienten Mäusen nur einen milden Phänotyp in der Immunzellentwicklung aufweisen<sup>24</sup>.

Der Einsatz von  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor vermindert neben tubulären Schäden auch die Infiltration monozytärer Zellen nach Ischämie/Reperfusion<sup>134</sup>. Hierzu passend fanden wir in den obstruierten Nieren der Notch-3 defizienten Mäuse weniger tubulointerstitielle Makrophagen als bei den Wildtyp-Mäusen. In der nephrotoxischen Nephritis konnte ebenfalls eine verminderte Infiltration in den Notch-3 *knockout*-Mäusen detektiert werden. Die

größtenteils fehlende monozytäre Zellinfiltration in den Notch-3  $-/-$  Tieren ist vermutlich auf eine aufgehobene Chemokin-Synthese und -Freisetzung zurückzuführen, da in den Notch-3 defizienten Mäuse sowohl nach NTN-, als auch nach UUO-Induktion eine verminderte MCP-1 mRNA-Expression nachgewiesen werden konnte. Arbeiten anderer Arbeitsgruppen belegen einen Effekt von Notch-Rezeptoren auf die MCP-1 Expression. Stimuliert man Knochenmark ansässige Makrophagen mit LPS und Interferon- $\gamma$  steigt die MCP-1 Synthese an, welche jedoch mittels  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor gehemmt werden kann<sup>135</sup>.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass eine Notch-3 Rezeptor-Defizienz zu einer Verbesserung der renalen Morphologie in Schädigungsmodellen, zu einer Reduktion der renalen Fibrose und zu einer verminderten Entzündungsreaktion führt. Unsere Daten weisen eindeutig auf eine profibrogene, nicht-redundante Rolle von Notch-3 in der tubulointerstitiellen Entzündung hin.

Auffällig ist die verstärkte Expression des Rezeptors Notch-3 in vereinzelt tubulären und tubulointerstitiellen Zellen nach Ureterobstruktion. Daraus lässt sich schließen, dass die stattfindenden regulatorischen Ereignisse nur durch Zellsubpopulationen gesteuert werden. Dies könnte ein wichtiger Hinweis für die Bedeutung von Stammzellen zur Repopulation von Tubuli nach Schädigung und Nekrose sein. Da die Apoptose-Rate in Wildtyp-Tieren und Notch-3 defizienten Mäusen annähernd gleich war, könnte der verminderte tubuläre Schaden in Notch-3 *knockout*-Mäusen durch eine verminderte Nekrose und eine verstärkte Repopulation erklärt werden.

In diversen tubulären und glomerulären humanen Nierenerkrankungen konnte eine signifikant höhere Notch-3 Transkriptzahl nachgewiesen werden. Hierbei ist auffällig, dass in unserem Datensatz der relative Anstieg der Notch-3 Expression größer als der Anstieg anderer Notch-Rezeptoren ist. Bisher wurde kein *crossstalk* zwischen den Rezeptoren Notch-1 und Notch-3 beschrieben. Unsere Ergebnisse weisen jedoch auf einen solchen Mechanismus hin, da es in Notch-3 *knockout* Tieren zu einer veränderten Notch-1 Expression kommt. Die Aufklärung eines solchen Wechselspieles wird im Fokus zukünftiger Arbeiten stehen.

## 6. Zusammenfassung

Nierenerkrankungen sind eine große Bürde für die Betroffenen und belasten zudem das allgemeine Gesundheitssystem in hohem Maße. Allen chronischen Nierenerkrankungen ist in der Endstrecke die tubulointerstitielle Fibrose gemein. Diese ist charakterisiert durch verstärkte Akkumulation extrazellulärer Matrix, Immuzellinfiltration, Fibroblastenproliferation und -aktivierung, Verletzung des tubulären Epitheliums und Rarefizierung der peritubulären Mikrovaskulatur. In den letzten Jahren wurden Notch-Rezeptoren, die an der Nephron-Entwicklung beteiligt sind, zunehmend auch eine bedeutende Rolle bei der Entstehung diverser Nierenerkrankungen und so auch bei der tubulointerstitiellen Fibrose zugeschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Beteiligung des Rezeptors Notch-3 an der Immuzellantwort und der Gewebsvernarbung der Niere untersucht. Erste Hinweise auf eine Beteiligung des Notch-3 Rezeptors an der Fibrogenese ergaben *in vitro* Untersuchungen in kultivierten Nierenzellen. Die Stimulation mit dem zentralen profibrotischen Mediator TGF- $\beta$ 1 führte zur verstärkten Expression der Rezeptoren Notch-1 und Notch-3 und dies sowohl auf Transkriptions- als auch auf Proteinebene. Dies konnte *in vivo* in zwei unterschiedlichen renalen Tiermodellen, der nephrotoxischen Nephritis (NTN) und der unilateralen Ureterobstruktion (UUO), bestätigt werden. Die NTN ist ein primär entzündliches, glomeruläres und somit auch proteinurisches Modell, dessen Verlauf einer rasch progredienten Glomerulonephritis entspricht. Neben der glomerulären Schädigung kommt es zur tubulointerstitiellen Immuzellinfiltration und Fibrose. Das murine UUO Modell verursacht primär eine Schädigung der tubulären Strukturen und spiegelt ebenfalls die Hauptmerkmale einer tubulointerstitiellen Fibrose wider. In beiden Modellen konnte eine Aktivierung der Notch-3 Rezeptoren und die verstärkte Expression von Notch-Liganden und -Zielgenen nachgewiesen werden. Auffällig war hierbei, dass die gesteigerte Expression von Notch-3 zellspezifisch auftrat und so nach Ureterobstruktion nur in vereinzelten tubulären und tubulointerstitiellen Zellen nachweisbar war. Daraus lässt sich schließen, dass die durch Notch-3 vermittelten regulatorischen Ereignisse nur durch Subpopulationen von Zellen gesteuert werden. Wir stellten die Hypothese auf, dass Notch-3 eine funktionelle Relevanz bei der chemotaktischen Antwort zukommt. Daher untersuchten wir Tiere mit genetischer Depletion des Notch-3 Rezeptors nach UUO- und NTN-Induktion.

Es zeigte sich, dass Notch-3 *knockout* (Notch-3 KO)-Mäuse vor tubulärer Schädigung und tubulärem Zellverlust geschützt waren. Die Infiltration inflammatorischer Zellen war signifikant verringert und verzögert, was vermutlich auf eine aufgehobene Chemokin-

Synthese und -Freisetzung zurückzuführen ist. Die Notch-3 KO-Mäuse wiesen zudem eine signifikante und sehr deutliche Reduktion der Matrixakkumulation auf, die durch eine verminderte Proliferation interstitieller Zellen begründet ist.

Um einen direkten Einfluss von Notch-3 Rezeptoren auf die Zellproliferation zu untersuchen wurde ein Zellmodell etabliert, welches eine verstärkte Notch-3 Expression/Aktivierung simulierte. Die Überexpression der konstitutiv aktiven intrazellulären Notch-3 Domäne erhöhte die Proliferationsrate von renalen Tubuluszellen *in vitro*. Dieses Ergebnis konnte durch Inkubation der Zellen mit dem Notch-Liganden Jagged-1 bestätigt werden.

Neben den *in vivo*- und den *in vitro*-Untersuchungen korrelierten wir in einem dritten Ansatz die Expression von Mitgliedern der Notch-Rezeptorfamilie mit humanen Nierenerkrankungen. Humane Biopsate von Patienten mit tubulären und glomerulären Nierenerkrankungen wurden in einem *Gene array* hinsichtlich ihrer mRNA-Expression von Notch-Signalwegkomponenten untersucht und eine *heat map* erstellt. Hierbei zeigte sich, dass von allen Rezeptoren der Notch-Familie Notch-3 am stärksten exprimiert wurde.

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse, dass dem Notch-3 Rezeptor eine bedeutende Rolle bei der Orchestrierung der tubulointerstitiellen, inflammatorischen Antwort zukommt und insbesondere die monozytäre Zellinfiltration durch Notch-3 beeinflusst wird. Dies macht den Notch-Signalweg zu einem attraktiven Ziel für zukünftige therapeutische Interventionen, bei denen einer exzessiven Matrixdeposition und der damit einhergehenden Zerstörung der Gewebearchitektur entgegengewirkt werden soll.

---

## 7. Literaturverzeichnis

1. Simpson, P: Introduction: Notch signalling and choice of cell fates in development. *Semin Cell Dev Biol*, 9: 581-582, 1998.
2. Bray, SJ: Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7: 678-689, 2006.
3. Tanigaki, K, Nogaki, F, Takahashi, J, Tashiro, K, Kurooka, H, Honjo, T: Notch1 and Notch3 instructively restrict bFGF-responsive multipotent neural progenitor cells to an astroglial fate. *Neuron*, 29: 45-55, 2001.
4. Beatus, P, Lendahl, U: Notch and neurogenesis. *J Neurosci Res*, 54: 125-136, 1998.
5. Allman, D, Aster, JC, Pear, WS: Notch signaling in hematopoiesis and early lymphocyte development. *Immunol Rev*, 187: 75-86, 2002.
6. Ellisen, LW, Bird, J, West, DC, Soreng, AL, Reynolds, TC, Smith, SD, Sklar, J: TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell*, 66: 649-661, 1991.
7. Weinmaster, G, Roberts, VJ, Lemke, G: A homolog of Drosophila Notch expressed during mammalian development. *Development*, 113: 199-205, 1991.
8. Weinmaster, G, Roberts, VJ, Lemke, G: Notch2: a second mammalian Notch gene. *Development*, 116: 931-941, 1992.
9. Lardelli, M, Dahlstrand, J, Lendahl, U: The novel Notch homologue mouse Notch 3 lacks specific epidermal growth factor-repeats and is expressed in proliferating neuroepithelium. *Mech Dev*, 46: 123-136, 1994.
10. Uyttendaele, H, Marazzi, G, Wu, G, Yan, Q, Sassoon, D, Kitajewski, J: Notch4/int-3, a mammary proto-oncogene, is an endothelial cell-specific mammalian Notch gene. *Development*, 122: 2251-2259, 1996.
11. Rauen, T, Raffetseder, U, Frye, BC, Djudjaj, S, Muhlenberg, PJ, Eitner, F, Lendahl, U, Bernhagen, J, Dooley, S, Mertens, PR: YB-1 acts as a ligand for Notch-3 receptors and modulates receptor activation. *J Biol Chem*, 284: 26928-26940, 2009.
12. Artavanis-Tsakonas, S, Matsuno, K, Fortini, ME: Notch signaling. *Science*, 268: 225-232, 1995.
13. Artavanis-Tsakonas, S, Rand, MD, Lake, RJ: Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*, 284: 770-776, 1999.
14. Haines, N, Irvine, KD: Glycosylation regulates Notch signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4: 786-797, 2003.
15. Washburn, T, Schweighoffer, E, Gridley, T, Chang, D, Fowlkes, BJ, Cado, D, Robey, E: Notch activity influences the alphabeta versus gammadelta T cell lineage decision. *Cell*, 88: 833-843, 1997.
16. Bellavia, D, Campese, AF, Vacca, A, Gulino, A, Screpanti, I: Notch3, another Notch in T cell development. *Semin Immunol*, 15: 107-112, 2003.
17. Wilson, A, MacDonald, HR, Radtke, F: Notch 1-deficient common lymphoid precursors adopt a B cell fate in the thymus. *J Exp Med*, 194: 1003-1012, 2001.
18. Tanigaki, K, Han, H, Yamamoto, N, Tashiro, K, Ikegawa, M, Kuroda, K, Suzuki, A, Nakano, T, Honjo, T: Notch-RBP-J signaling is involved in cell fate determination of marginal zone B cells. *Nat Immunol*, 3: 443-450, 2002.
19. Han, H, Tanigaki, K, Yamamoto, N, Kuroda, K, Yoshimoto, M, Nakahata, T, Ikuta, K, Honjo, T: Inducible gene knockout of transcription factor recombination signal binding protein-J reveals its essential role in T versus B lineage decision. *Int Immunol*, 14: 637-645, 2002.
20. Krebs, LT, Xue, Y, Norton, CR, Sundberg, JP, Beatus, P, Lendahl, U, Joutel, A, Gridley, T: Characterization of Notch3-deficient mice: normal embryonic development and absence of genetic interactions with a Notch1 mutation. *Genesis*, 37: 139-143, 2003.

21. Krebs, LT, Xue, Y, Norton, CR, Shutter, JR, Maguire, M, Sundberg, JP, Gallahan, D, Closson, V, Kitajewski, J, Callahan, R, Smith, GH, Stark, KL, Gridley, T: Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes Dev*, 14: 1343-1352, 2000.
22. Saito, T, Chiba, S, Ichikawa, M, Kunisato, A, Asai, T, Shimizu, K, Yamaguchi, T, Yamamoto, G, Seo, S, Kumano, K, Nakagami-Yamaguchi, E, Hamada, Y, Aizawa, S, Hirai, H: Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. *Immunity*, 18: 675-685, 2003.
23. Guidos, CJ: Notch signaling in lymphocyte development. *Semin Immunol*, 14: 395-404, 2002.
24. Shi, J, Fallahi, M, Luo, JL, Petrie, HT: Nonoverlapping functions for Notch1 and Notch3 during murine steady-state thymic lymphopoiesis. *Blood*, 118: 2511-2519, 2011.
25. Berry, LW, Westlund, B, Schedl, T: Germ-line tumor formation caused by activation of glp-1, a Caenorhabditis elegans member of the Notch family of receptors. *Development*, 124: 925-936, 1997.
26. Johnston, LA, Edgar, BA: Wingless and Notch regulate cell-cycle arrest in the developing Drosophila wing. *Nature*, 394: 82-84, 1998.
27. Miller, DT, Cagan, RL: Local induction of patterning and programmed cell death in the developing Drosophila retina. *Development*, 125: 2327-2335, 1998.
28. Jehn, BM, Bielke, W, Pear, WS, Osborne, BA: Cutting edge: protective effects of notch-1 on TCR-induced apoptosis. *J Immunol*, 162: 635-638, 1999.
29. Hajdu, M, Kopper, L, Sebestyen, A: Notch-regulation upon Dll4-stimulation of TGFb-induced apoptosis and gene expression in human B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Scand J Immunol*, 71: 29-37, 2010.
30. Rebay, I, Fleming, RJ, Fehon, RG, Cherbas, L, Cherbas, P, Artavanis-Tsakonas, S: Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and Serrate: implications for Notch as a multifunctional receptor. *Cell*, 67: 687-699, 1991.
31. Lieber, T, Kidd, S, Alcamo, E, Corbin, V, Young, MW: Antineurogenic phenotypes induced by truncated Notch proteins indicate a role in signal transduction and may point to a novel function for Notch in nuclei. *Genes Dev*, 7: 1949-1965, 1993.
32. Greenwald, I: Structure/function studies of lin-12/Notch proteins. *Curr Opin Genet Dev*, 4: 556-562, 1994.
33. Tamura, K, Taniguchi, Y, Minoguchi, S, Sakai, T, Tun, T, Furukawa, T, Honjo, T: Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J kappa/Su(H). *Curr Biol*, 5: 1416-1423, 1995.
34. Zweifel, ME, Barrick, D: Studies of the ankyrin repeats of the Drosophila melanogaster Notch receptor. 1. Solution conformational and hydrodynamic properties. *Biochemistry*, 40: 14344-14356, 2001.
35. Zweifel, ME, Barrick, D: Studies of the ankyrin repeats of the Drosophila melanogaster Notch receptor. 2. Solution stability and cooperativity of unfolding. *Biochemistry*, 40: 14357-14367, 2001.
36. Kurooka, H, Kuroda, K, Honjo, T: Roles of the ankyrin repeats and C-terminal region of the mouse notch1 intracellular region. *Nucleic Acids Res*, 26: 5448-5455, 1998.
37. Rechsteiner, M: Regulation of enzyme levels by proteolysis: the role of pest regions. *Adv Enzyme Regul*, 27: 135-151, 1988.
38. Logeat, F, Bessia, C, Brou, C, LeBail, O, Jarriault, S, Seidah, NG, Israel, A: The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 8108-8112, 1998.
39. Aster, JC, Simms, WB, Zavala-Ruiz, Z, Patriub, V, North, CL, Blacklow, SC: The folding and structural integrity of the first LIN-12 module of human Notch1 are calcium-dependent. *Biochemistry*, 38: 4736-4742, 1999.

40. Weinmaster, G: The ins and outs of notch signaling. *Mol Cell Neurosci*, 9: 91-102, 1997.
41. Fitzgerald, K, Greenwald, I: Interchangeability of *Caenorhabditis elegans* DSL proteins and intrinsic signalling activity of their extracellular domains in vivo. *Development*, 121: 4275-4282, 1995.
42. Shimizu, K, Chiba, S, Kumano, K, Hosoya, N, Takahashi, T, Kanda, Y, Hamada, Y, Yazaki, Y, Hirai, H: Mouse jagged1 physically interacts with notch2 and other notch receptors. Assessment by quantitative methods. *J Biol Chem*, 274: 32961-32969, 1999.
43. Mumm, JS, Kopan, R: Notch signaling: from the outside in. *Dev Biol*, 228: 151-165, 2000.
44. Brou, C, Logeat, F, Gupta, N, Bessia, C, LeBail, O, Doedens, JR, Cumano, A, Roux, P, Black, RA, Israel, A: A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell*, 5: 207-216, 2000.
45. De Strooper, B, Annaert, W, Cupers, P, Saftig, P, Craessaerts, K, Mumm, JS, Schroeter, EH, Schrijvers, V, Wolfe, MS, Ray, WJ, Goate, A, Kopan, R: A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature*, 398: 518-522, 1999.
46. Beatus, P, Lundkvist, J, Oberg, C, Lendahl, U: The notch 3 intracellular domain represses notch 1-mediated activation through Hairy/Enhancer of split (HES) promoters. *Development*, 126: 3925-3935, 1999.
47. Shimizu, K, Chiba, S, Saito, T, Takahashi, T, Kumano, K, Hamada, Y, Hirai, H: Integrity of intracellular domain of Notch ligand is indispensable for cleavage required for release of the Notch2 intracellular domain. *EMBO J*, 21: 294-302, 2002.
48. Radtke, F, Schweisguth, F, Pear, W: The Notch 'gospel'. *EMBO Rep*, 6: 1120-1125, 2005.
49. Davis, RL, Turner, DL: Vertebrate hairy and Enhancer of split related proteins: transcriptional repressors regulating cellular differentiation and embryonic patterning. *Oncogene*, 20: 8342-8357, 2001.
50. Ishibashi, M, Ang, SL, Shiota, K, Nakanishi, S, Kageyama, R, Guillemot, F: Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects. *Genes Dev*, 9: 3136-3148, 1995.
51. Iso, T, Kedes, L, Hamamori, Y: HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J Cell Physiol*, 194: 237-255, 2003.
52. Jarriault, S, Le Bail, O, Hirsinger, E, Pourquie, O, Logeat, F, Strong, CF, Brou, C, Seidah, NG, Israel, A: Delta-1 activation of notch-1 signaling results in HES-1 transactivation. *Mol Cell Biol*, 18: 7423-7431, 1998.
53. Nishimura, M, Isaka, F, Ishibashi, M, Tomita, K, Tsuda, H, Nakanishi, S, Kageyama, R: Structure, chromosomal locus, and promoter of mouse Hes2 gene, a homologue of *Drosophila* hairy and Enhancer of split. *Genomics*, 49: 69-75, 1998.
54. Rangarajan, A, Talora, C, Okuyama, R, Nicolas, M, Mammucari, C, Oh, H, Aster, JC, Krishna, S, Metzger, D, Chambon, P, Miele, L, Aguet, M, Radtke, F, Dotto, GP: Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *EMBO J*, 20: 3427-3436, 2001.
55. Ronchini, C, Capobianco, AJ: Induction of cyclin D1 transcription and CDK2 activity by Notch(ic): implication for cell cycle disruption in transformation by Notch(ic). *Mol Cell Biol*, 21: 5925-5934, 2001.
56. Cheng, P, Zlobin, A, Volgina, V, Gottipati, S, Osborne, B, Simel, EJ, Miele, L, Gabrilovich, DI: Notch-1 regulates NF-kappaB activity in hemopoietic progenitor cells. *J Immunol*, 167: 4458-4467, 2001.
57. Nickoloff, BJ, Qin, JZ, Chaturvedi, V, Denning, MF, Bonish, B, Miele, L: Jagged-1 mediated activation of notch signaling induces complete maturation of human

- keratinocytes through NF-kappaB and PPARgamma. *Cell Death Differ*, 9: 842-855, 2002.
58. Gordon, WR, Arnett, KL, Blacklow, SC: The molecular logic of Notch signaling--a structural and biochemical perspective. *J Cell Sci*, 121: 3109-3119, 2008.
59. Moloney, DJ, Panin, VM, Johnston, SH, Chen, J, Shao, L, Wilson, R, Wang, Y, Stanley, P, Irvine, KD, Haltiwanger, RS, Vogt, TF: Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch. *Nature*, 406: 369-375, 2000.
60. Moloney, DJ, Shair, LH, Lu, FM, Xia, J, Locke, R, Matta, KL, Haltiwanger, RS: Mammalian Notch1 is modified with two unusual forms of O-linked glycosylation found on epidermal growth factor-like modules. *J Biol Chem*, 275: 9604-9611, 2000.
61. Bruckner, K, Perez, L, Clausen, H, Cohen, S: Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch-Delta interactions. *Nature*, 406: 411-415, 2000.
62. Zilian, O, Saner, C, Hagedorn, L, Lee, HY, Sauberli, E, Suter, U, Sommer, L, Aguet, M: Multiple roles of mouse Numb in tuning developmental cell fates. *Curr Biol*, 11: 494-501, 2001.
63. Cayouette, M, Whitmore, AV, Jeffery, G, Raff, M: Asymmetric segregation of Numb in retinal development and the influence of the pigmented epithelium. *J Neurosci*, 21: 5643-5651, 2001.
64. Berdnik, D, Torok, T, Gonzalez-Gaitan, M, Knoblich, JA: The endocytic protein alpha-Adaptin is required for numb-mediated asymmetric cell division in *Drosophila*. *Dev Cell*, 3: 221-231, 2002.
65. Qiu, L, Joazeiro, C, Fang, N, Wang, HY, Elly, C, Altman, Y, Fang, D, Hunter, T, Liu, YC: Recognition and ubiquitination of Notch by Itch, a hect-type E3 ubiquitin ligase. *J Biol Chem*, 275: 35734-35737, 2000.
66. Joutel, A, Corpechot, C, Ducros, A, Vahedi, K, Chabriat, H, Mouton, P, Alamowitch, S, Domenga, V, Cecillion, M, Marechal, E, Maciazek, J, Vayssiere, C, Cruaud, C, Cabanis, EA, Ruchoux, MM, Weissenbach, J, Bach, JF, Bousser, MG, Tournier-Lasserre, E: Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature*, 383: 707-710, 1996.
67. Joutel, A, Corpechot, C, Ducros, A, Vahedi, K, Chabriat, H, Mouton, P, Alamowitch, S, Domenga, V, Cecillion, M, Marechal, E, Maciazek, J, Vayssiere, C, Cruaud, C, Cabanis, EA, Ruchoux, MM, Weissenbach, J, Bach, JF, Bousser, MG, Tournier-Lasserre, E: Notch3 mutations in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL), a mendelian condition causing stroke and vascular dementia. *Ann N Y Acad Sci*, 826: 213-217, 1997.
68. Joutel, A, Vahedi, K, Corpechot, C, Troesch, A, Chabriat, H, Vayssiere, C, Cruaud, C, Maciazek, J, Weissenbach, J, Bousser, MG, Bach, JF, Tournier-Lasserre, E: Strong clustering and stereotyped nature of Notch3 mutations in CADASIL patients. *Lancet*, 350: 1511-1515, 1997.
69. Oda, T, Elkahoun, AG, Pike, BL, Okajima, K, Krantz, ID, Genin, A, Piccoli, DA, Meltzer, PS, Spinner, NB, Collins, FS, Chandrasekharappa, SC: Mutations in the human Jagged1 gene are responsible for Alagille syndrome. *Nat Genet*, 16: 235-242, 1997.
70. Yuan, ZR, Kobayashi, N, Kohsaka, T: Human Jagged 1 mutants cause liver defect in Alagille syndrome by overexpression of hepatocyte growth factor. *J Mol Biol*, 356: 559-568, 2006.
71. Le Caignec, C, Lefevre, M, Schott, JJ, Chaventre, A, Gayet, M, Calais, C, Moisan, JP: Familial deafness, congenital heart defects, and posterior embryotoxon caused by cysteine substitution in the first epidermal-growth-factor-like domain of jagged 1. *Am J Hum Genet*, 71: 180-186, 2002.



72. Chiaramonte, R, Basile, A, Tassi, E, Calzavara, E, Cecchinato, V, Rossi, V, Biondi, A, Comi, P: A wide role for NOTCH1 signaling in acute leukemia. *Cancer Lett*, 219: 113-120, 2005.
73. Demarest, RM, Ratti, F, Capobianco, AJ: It's T-ALL about Notch. *Oncogene*, 27: 5082-5091, 2008.
74. Zagouras, P, Stifani, S, Blaumueller, CM, Carcangiu, ML, Artavanis-Tsakonas, S: Alterations in Notch signaling in neoplastic lesions of the human cervix. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 6414-6418, 1995.
75. Harrison, H, Farnie, G, Brennan, KR, Clarke, RB: Breast cancer stem cells: something out of notching? *Cancer Res*, 70: 8973-8976, 2010.
76. Rae, FK, Stephenson, SA, Nicol, DL, Clements, JA: Novel association of a diverse range of genes with renal cell carcinoma as identified by differential display. *Int J Cancer*, 88: 726-732, 2000.
77. Sun, S, Du, R, Gao, J, Ning, X, Xie, H, Lin, X, Liu, J, Fan, D: Expression and clinical significance of Notch receptors in human renal cell carcinoma. *Pathology*, 41: 335-341, 2009.
78. McCright, B: Notch signaling in kidney development. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 12: 5-10, 2003.
79. Waters, AM, Wu, MY, Onay, T, Scutaru, J, Liu, J, Lobe, CG, Quaggin, SE, Piscione, TD: Ectopic notch activation in developing podocytes causes glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol*, 19: 1139-1157, 2008.
80. Cheng, HT, Kopan, R: The role of Notch signaling in specification of podocyte and proximal tubules within the developing mouse kidney. *Kidney Int*, 68: 1951-1952, 2005.
81. Morrissey, J, Guo, G, Moridaira, K, Fitzgerald, M, McCracken, R, Tolley, T, Klahr, S: Transforming growth factor-beta induces renal epithelial jagged-1 expression in fibrotic disease. *J Am Soc Nephrol*, 13: 1499-1508, 2002.
82. Niranjana, T, Bielez, B, Gruenwald, A, Ponda, MP, Kopp, JB, Thomas, DB, Susztak, K: The Notch pathway in podocytes plays a role in the development of glomerular disease. *Nat Med*, 14: 290-298, 2008.
83. Niranjana, T, Murea, M, Susztak, K: The pathogenic role of notch activation in podocytes. *Nephron Exp Nephrol*, 111: e73-79, 2009.
84. Bielez, B, Sirin, Y, Si, H, Niranjana, T, Gruenwald, A, Ahn, S, Kato, H, Pullman, J, Gessler, M, Haase, VH, Susztak, K: Epithelial Notch signaling regulates interstitial fibrosis development in the kidneys of mice and humans. *J Clin Invest*, 120: 4040-4054, 2010.
85. Joutel, A, Andreux, F, Gaulis, S, Domenga, V, Cecillon, M, Battail, N, Piga, N, Chapon, F, Godfrain, C, Tournier-Lasserre, E: The ectodomain of the Notch3 receptor accumulates within the cerebrovasculature of CADASIL patients. *J Clin Invest*, 105: 597-605, 2000.
86. Raffetseder, U, Rauen, T, Boor, P, Ostendorf, T, Hanssen, L, Floege, J, En-Nia, A, Djudjaj, S, Frye, BC, Mertens, PR: Extracellular YB-1 Blockade in Experimental Nephritis Upregulates Notch-3 Receptor Expression and Signaling. *Nephron Exp Nephrol*, 118: e100-e108, 2011.
87. Vogel, WF, Abdulhusein, R, Ford, CE: Sensing extracellular matrix: an update on discoidin domain receptor function. *Cell Signal*, 18: 1108-1116, 2006.
88. Shrivastava, A, Radziejewski, C, Campbell, E, Kovac, L, McGlynn, M, Ryan, TE, Davis, S, Goldfarb, MP, Glass, DJ, Lemke, G, Yancopoulos, GD: An orphan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors. *Mol Cell*, 1: 25-34, 1997.

89. Yoshimura, T, Matsuyama, W, Kamohara, H: Discoidin domain receptor 1: a new class of receptor regulating leukocyte-collagen interaction. *Immunol Res*, 31: 219-230, 2005.
90. Kim, HG, Hwang, SY, Aaronson, SA, Mandinova, A, Lee, SW: DDR1 receptor tyrosine kinase promotes pro-survival pathway through Notch1 activation. *J Biol Chem*, 286: 17672-17681, 2011.
91. Eddy, AA: Molecular insights into renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol*, 7: 2495-2508, 1996.
92. Eddy, AA: Molecular basis of renal fibrosis. *Pediatr Nephrol*, 15: 290-301, 2000.
93. Romberger, DJ: Fibronectin. *Int J Biochem Cell Biol*, 29: 939-943, 1997.
94. Norman, JT, Fine, LG: Progressive renal disease: fibroblasts, extracellular matrix, and integrins. *Exp Nephrol*, 7: 167-177, 1999.
95. Cheng, HT, Kim, M, Valerius, MT, Surendran, K, Schuster-Gossler, K, Gossler, A, McMahon, AP, Kopan, R: Notch2, but not Notch1, is required for proximal fate acquisition in the mammalian nephron. *Development*, 134: 801-811, 2007.
96. Cheng, HT, Miner, JH, Lin, M, Tansey, MG, Roth, K, Kopan, R: Gamma-secretase activity is dispensable for mesenchyme-to-epithelium transition but required for podocyte and proximal tubule formation in developing mouse kidney. *Development*, 130: 5031-5042, 2003.
97. Sharma, S, Sirin, Y, Susztak, K: The story of Notch and chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2010.
98. Wang, P, Pereira, FA, Beasley, D, Zheng, H: Presenilins are required for the formation of comma- and S-shaped bodies during nephrogenesis. *Development*, 130: 5019-5029, 2003.
99. Boulos, N, Helle, F, Dussaule, JC, Placier, S, Milliez, P, Djurdjaj, S, Guerrot, D, Joutel, A, Ronco, P, Boffa, JJ, Chatziantoniou, C: Notch3 is essential for regulation of the renal vascular tone. *Hypertension*, 57: 1176-1182, 2011.
100. Joutel, A, Monet, M, Domenga, V, Riant, F, Tournier-Lasserre, E: Pathogenic mutations associated with cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy differently affect Jagged1 binding and Notch3 activity via the RBP/JK signaling pathway. *Am J Hum Genet*, 74: 338-347, 2004.
101. Lasagni, L, Ballerini, L, Angelotti, ML, Parente, E, Sagrinati, C, Mazzinghi, B, Peired, A, Ronconi, E, Becherucci, F, Bani, D, Gacci, M, Carini, M, Lazzeri, E, Romagnani, P: Notch activation differentially regulates renal progenitors proliferation and differentiation toward the podocyte lineage in glomerular disorders. *Stem Cells*, 28: 1674-1685, 2010.
102. Le Hir, M: Histopathology of humorally mediated anti-glomerular basement membrane (GBM) glomerulonephritis in mice. *Nephrol Dial Transplant*, 19: 1875-1880, 2004.
103. Oie, E, Sandberg, WJ, Ahmed, MS, Yndestad, A, Laerum, OD, Attramadal, H, Aukrust, P, Eiken, HG: Activation of Notch signaling in cardiomyocytes during post-infarction remodeling. *Scand Cardiovasc J*, 44: 359-366, 2010.
104. Croquelois, A, Domenighetti, AA, Nemir, M, Lepore, M, Rosenblatt-Velin, N, Radtke, F, Pedrazzini, T: Control of the adaptive response of the heart to stress via the Notch1 receptor pathway. *J Exp Med*, 205: 3173-3185, 2008.
105. Strutz, F, Neilson, EG: New insights into mechanisms of fibrosis in immune renal injury. *Springer Semin Immunopathol*, 24: 459-476, 2003.
106. Strutz, F, Muller, GA: Renal fibrosis and the origin of the renal fibroblast. *Nephrol Dial Transplant*, 21: 3368-3370, 2006.
107. Strutz, F, Zeisberg, M: Renal fibroblasts and myofibroblasts in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, 17: 2992-2998, 2006.

- 
108. Ruiz-Ortega, M, Egido, J: Angiotensin II modulates cell growth-related events and synthesis of matrix proteins in renal interstitial fibroblasts. *Kidney Int*, 52: 1497-1510, 1997.
  109. Zhu, F, Li, T, Qiu, F, Fan, J, Zhou, Q, Ding, X, Nie, J, Yu, X: Preventive effect of Notch signaling inhibition by a gamma-secretase inhibitor on peritoneal dialysis fluid-induced peritoneal fibrosis in rats. *Am J Pathol*, 176: 650-659, 2010.
  110. Kennard, S, Liu, H, Lilly, B: Transforming growth factor-beta (TGF- 1) down-regulates Notch3 in fibroblasts to promote smooth muscle gene expression. *J Biol Chem*, 283: 1324-1333, 2008.
  111. Chevalier, RL, Forbes, MS, Thornhill, BA: Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney Int*, 75: 1145-1152, 2009.
  112. Forbes, MS, Thornhill, BA, Chevalier, RL: Proximal tubular injury and rapid formation of atubular glomeruli in mice with unilateral ureteral obstruction: a new look at an old model. *Am J Physiol Renal Physiol*, 301: F110-117, 2011.
  113. Kaneto, H, Morrissey, J, McCracken, R, Reyes, A, Klahr, S: Enalapril reduces collagen type IV synthesis and expansion of the interstitium in the obstructed rat kidney. *Kidney Int*, 45: 1637-1647, 1994.
  114. Eddy, AA, Lopez-Guisa, JM, Okamura, DM, Yamaguchi, I: Investigating mechanisms of chronic kidney disease in mouse models. *Pediatr Nephrol*, 2011.
  115. Klahr, S, Morrissey, J: Obstructive nephropathy and renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*, 283: F861-875, 2002.
  116. Dees, C, Zerr, P, Tomcik, M, Beyer, C, Horn, A, Akhmetshina, A, Palumbo, K, Reich, N, Zwerina, J, Sticherling, M, Mattson, MP, Distler, O, Schett, G, Distler, JH: Inhibition of Notch signaling prevents experimental fibrosis and induces regression of established fibrosis. *Arthritis Rheum*, 63: 1396-1404, 2011.
  117. Dees, C, Tomcik, M, Zerr, P, Akhmetshina, A, Horn, A, Palumbo, K, Beyer, C, Zwerina, J, Distler, O, Schett, G, Distler, JH: Notch signalling regulates fibroblast activation and collagen release in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*, 70: 1304-1310, 2011.
  118. Grande, MT, Lopez-Novoa, JM: Fibroblast activation and myofibroblast generation in obstructive nephropathy. *Nat Rev Nephrol*, 5: 319-328, 2009.
  119. Xu, K, Nieuwenhuis, E, Cohen, BL, Wang, W, Canty, AJ, Danska, JS, Coultas, L, Rossant, J, Wu, MY, Piscione, TD, Nagy, A, Gossler, A, Hicks, GG, Hui, CC, Henkelman, RM, Yu, LX, Sled, JG, Gridley, T, Egan, SE: Lunatic Fringe-mediated Notch signaling is required for lung alveogenesis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 298: L45-56, 2010.
  120. Liu, T, Hu, B, Choi, YY, Chung, M, Ullenbruch, M, Yu, H, Lowe, JB, Phan, SH: Notch1 signaling in FIZZ1 induction of myofibroblast differentiation. *Am J Pathol*, 174: 1745-1755, 2009.
  121. Saad, S, Stanners, SR, Yong, R, Tang, O, Pollock, CA: Notch mediated epithelial to mesenchymal transformation is associated with increased expression of the Snail transcription factor. *Int J Biochem Cell Biol*, 42: 1115-1122, 2010.
  122. Aoyagi-Ikeda, K, Maeno, T, Matsui, H, Ueno, M, Hara, K, Aoki, Y, Aoki, F, Shimizu, T, Doi, H, Kawai-Kowase, K, Iso, T, Suga, T, Arai, M, Kurabayashi, M: Notch Induces Myofibroblast Differentiation of Alveolar Epithelial Cells via Transforming Growth Factor- $\beta$ -Smad3 Pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 45: 136-144, 2011.
  123. Ono, Y, Sensui, H, Okutsu, S, Nagatomi, R: Notch2 negatively regulates myofibroblastic differentiation of myoblasts. *J Cell Physiol*, 210: 358-369, 2007.
  124. Leong, KG, Niessen, K, Kulic, I, Raouf, A, Eaves, C, Pollet, I, Karsan, A: Jagged1-mediated Notch activation induces epithelial-to-mesenchymal transition through Slug-induced repression of E-cadherin. *J Exp Med*, 204: 2935-2948, 2007.
-

125. Zhang, Z, Wang, H, Ikeda, S, Fahey, F, Bielenberg, D, Smits, P, Hauschka, PV: Notch3 in human breast cancer cell lines regulates osteoblast-cancer cell interactions and osteolytic bone metastasis. *Am J Pathol*, 177: 1459-1469, 2010.
126. Nyhan, KC, Faherty, N, Murray, G, Cooley, LB, Godson, C, Crean, JK, Brazil, DP: Jagged/Notch signalling is required for a subset of TGFbeta1 responses in human kidney epithelial cells. *Biochim Biophys Acta*, 1803: 1386-1395, 2010.
127. Zavadil, J, Cermak, L, Soto-Nieves, N, Bottinger, EP: Integration of TGF-beta/Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition. *EMBO J*, 23: 1155-1165, 2004.
128. Docherty, NG, Calvo, IF, Quinlan, MR, Perez-Barriocanal, F, McGuire, BB, Fitzpatrick, JM, Watson, RW: Increased E-cadherin expression in the ligated kidney following unilateral ureteric obstruction. *Kidney Int*, 75: 205-213, 2009.
129. Gupta, S, Li, S, Abedin, MJ, Wang, L, Schneider, E, Najafian, B, Rosenberg, ME: Effect of Notch activation on the regenerative response to acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009.
130. Kobayashi, T, Terada, Y, Kuwana, H, Tanaka, H, Okado, T, Kuwahara, M, Tohda, S, Sakano, S, Sasaki, S: Expression and function of the Delta-1/Notch-2/Hes-1 pathway during experimental acute kidney injury. *Kidney Int*, 73: 1240-1250, 2008.
131. Guo, G, Morrissey, J, McCracken, R, Tolley, T, Klahr, S: Role of TNFR1 and TNFR2 receptors in tubulointerstitial fibrosis of obstructive nephropathy. *Am J Physiol*, 277: F766-772, 1999.
132. Fung, E, Tang, SM, Canner, JP, Morishige, K, Arboleda-Velasquez, JF, Cardoso, AA, Carlesso, N, Aster, JC, Aikawa, M: Delta-like 4 induces notch signaling in macrophages: implications for inflammation. *Circulation*, 115: 2948-2956, 2007.
133. Perez-Cabezas, B, Naranjo-Gomez, M, Bastos-Amador, P, Requena-Fernandez, G, Pujol-Borrell, R, Borrás, FE: Ligation of Notch receptors in human conventional and plasmacytoid dendritic cells differentially regulates cytokine and chemokine secretion and modulates Th cell polarization. *J Immunol*, 186: 7006-7015, 2011.
134. Huang, R, Zhou, Q, Veeraragoo, P, Yu, H, Xiao, Z: Notch2/Hes-1 pathway plays an important role in renal ischemia and reperfusion injury-associated inflammation and apoptosis and the gamma-secretase inhibitor DAPT has a nephroprotective effect. *Ren Fail*, 33: 207-216, 2011.
135. Outtz, HH, Wu, JK, Wang, X, Kitajewski, J: Notch1 deficiency results in decreased inflammation during wound healing and regulates vascular endothelial growth factor receptor-1 and inflammatory cytokine expression in macrophages. *J Immunol*, 185: 4363-4373, 2010.

---

## 8. Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ -SMA	<i>alpha smooth muscle actin</i>
AGS	Alagille Syndrom
AP-2	Adaptor protein-2
APS	Ammoniumpersulfat
A. dest.	Destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
bHLH	Basische Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktoren
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine serum albumine</i> : Rinderalbumin
Ca <sup>2+</sup>	Ionisiertes Calcium
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CADASIL	Cerebrale autosomale dominante Arteriopathie mit subcorticalem Infarkt und Leukoenzephalopathie
CBF1	C promotor binding factor 1
cDNA	Komplementäre DNA
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CoA	Coaktivator
CoR	Corepressor
CR	Cystein-reiche Region
CWI	<i>cardiac weight index</i>
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DDR-1	<i>Discoidin domain</i> Rezeptor-1
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DII	Delta-like
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonuclein acid</i> : Desoxyribonukleinsäure
DNP	Diabetische Nephropathie
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSL	Delta/Serrate/Lag2

DTT	Dithiothreitol
ECM	extrazelluläre Matrix
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EMT	Epitheliale mesenchymale Transition
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERCB	<i>European renal cDNA bank</i>
FKS	Fetales Kälberserum
FSGS	Fokale segmentale Glomerulosklerose
g	Gramm
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GSI	Gamma-Sekretase-Inhibitor
HA	Hämagglutin
HBS	HEPES-gepufferter Kochsalzpuffer
HERP	<i>HES-related repressor protein</i>
HES	<i>Hairy/enhancer of split</i>
hMC	<i>human mesangial cells</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
ICN	Intrazelluläre Notch Domäne
Ig	Immunglobulin
IgA	IgA Nephritis
JAG	Jagged
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
LB	Luria-Bertani
LNR	Lin12/Notch repeats
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molar

MCP-1	<i>Macrophage chemoattractant and activating factor</i>
MGB	Minor groove binder
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MGN	Membranöse Glomerulonephritis
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
M-MLV RT	<i>Moloney murine leukemia virus</i> reverse Transkriptase
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	<i>messenger</i> -RNA
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NLS	<i>nuclear localisation sequenz</i> : nukleäre Lokalisierungssequenz
NO	Stickstoffoxid
Nr.	Nummer
n.s.	nicht signifikant
NTN	Nephrotoxische Nephritis
NTS	Nephrotoxisches Serum
qRT-PCR	quantitative <i>realtime</i> PCR
PAS	<i>Periodic acid Schiff</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> : Polymerase-Ketten-Reaktion
PDGF-B	<i>Platelet derived growth factor-B</i> : Plättchen-Wachstumsfaktor-B
PEST	Prolin, Glutamin, Serin, Threonin
PPAR	<i>Peroxisome proliferation activated receptor</i>
RAM	RBP-Jκ assoziiertes Modul
RCC	<i>renal cell carcinoma</i>
RNA	<i>Ribonuclein acid</i> : Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rotations per minute</i> : Rotationen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion
SD	<i>Standard deviation</i> (Standardabweichung)
SDS	Natriumlaurylsulfat

SDS-PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese im Natriumlaurylsulfatgel
siRNA	Short interference RNA
SLE (Lupus)	systemischer Lupus erythematodes (Lupus Nephritis)
SMAD2	<i>transcription factor involved in TGF-beta signaling</i>
SOD	Aktiviertes Natriumorthovanadat
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
Su(H)	<i>Suppressor of hairless</i>
SV40	<i>Simian Virus 40</i>
TACE	<i>Tumor necrosis factor alpha-converting enzyme</i>
TAD	Transkriptionelle Aktivierungsdomäne
TAE	Puffer aus Tris, Eisessig-Säure und Ethylendiamintetraessigsäure
T-ALL	T-Zelllymphoblastische Leukämie
TACE	<i>Tumor necrosis factor alpha-converting enzyme</i>
TAD	Transkriptionelle Aktivierungsdomäne
TAE	Puffer aus Tris, Eisessig-Säure und Ethylendiamintetraessigsäure
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TAQ	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Puffer aus Tris und Ethylendiamintetraessigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TIF	tubulointerstitielle Fibrose
TNF $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
TTBS	Tris-gepufferte Salzlösung/Tween-20
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transférase-mediated dUTP nick-end labeling</i>
U/l	<i>Units/Liter: Einheiten/Liter</i>
UUO	unilaterale Ureterobstruktion
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
v/v	Volumen/Volumen (Volumenprozent)
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht/Volumen (Gewichtprozent)
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
YB-1	<i>Y-Box</i> bindendes Protein-1



## 8.2 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den vielen Leute bedanken, die zu der Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst einmal gilt mein herzlicher Dank Herrn Prof. Dr. med. P.R. Mertens für die freundliche Überlassung des Promotionsthemas, für die Möglichkeit andere Labore kennen lernen zu dürfen und die persönliche Betreuung, die aufgrund der räumlichen Entfernung manchmal erschwert wurde.

Bei Herrn Prof. Dipl. Ing. Dr. W. Baumgartner bedanke ich mich vielmals für die Betreuung meiner externen Promotion.

Herrn Prof. Dr. med. J. Floege danke ich für die Möglichkeit, meine Promotion in seiner Klinik durchführen zu können und für die aufbauenden und motivierenden Worte nach meiner Rückkehr nach Aachen.

An dieser Stelle auch ein herzliches Dankeschön an Herrn Prof. Dr. rer. nat. C. Chatziantoniou und an seine Arbeitsgruppe, die mich so herzlich in Paris willkommen hießen und mir die Zeit dort unvergesslich gemacht haben.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. T. Ostendorf und seiner Arbeitsgruppe, insbesondere Dr. med. Peter Boor für die Einführung in die Welt der Immunhistochemie.

Bei Frau Dr. rer. nat. Ute Raffetseder bedanke ich mich in besonderer Weise für die herausragende Betreuung. Ohne ihre vielen hilfreichen Anregungen und ihre große Hilfsbereitschaft wäre diese Arbeit wohl nicht zustande gekommen.

Mein Dank gilt auch meinen beiden „Mitreiterinnen“ Lydia Hanßen und Christina Alidousty, die nicht nur die Arbeit, sondern auch die Freude und den Spaß daran mit mir geteilt haben.

Mein persönlicher Dank gilt vor allem meiner Familie und meinen Freunden, die immer für mich da waren und auf deren Hilfe und Unterstützung ich mich jederzeit verlassen konnte. Vorallem Angela Ganser, die mir gezeigt hat, dass Mathematiker und Biologen gar nicht so verschieden sind.

Ganz besonders aber möchte ich meinen Freund Thomas dafür danken, dass er tatkräftig meine „Umzüge“ nach Paris und Magdeburg unterstützt hat und mein Freud und Leid jederzeit geteilt hat.

### 8.3 Lebenslauf

#### Persönliche Daten

Name	Sonja Djudjaj
Anschrift	Zeisigweg 16, 52134 Herzogenrath
eMail	sdjudjaj@ukaachen.de
Geburtsdaten	31. August 1981 in Würselen
Familienstand	ledig
Nationalität	deutsch

#### Schulbildung

08.1988-07.1992	Grundschule Alsdorf Mitte
08.1992-07.2001	Städtisches Gymnasium Herzogenrath
18.06.2001	Allgemeine Hochschulreife

#### Hochschulstudium

10.2001-01.2008	Studium der Biologie an der RWTH Aachen Studienschwerpunkte: Mikrobiologie (Hauptfach) Genetik Humanbiologie Molekulare Medizin/ Virologie
07.2011-jetzt	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikum der RWTH Aachen im Rahmen des Start-Antrags „Role of platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)- $\beta$ ligands in renal fibrosis“ und seit dem 01.02.2012 zusätzlich im Rahmen des Start-Antrags „Regulation der IL-10 Expression durch das Kälteschock-Protein YB-1“.
03.2008-06.2011	Promotion in der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikum der RWTH Aachen mit dem Thema: „Untersuchungen zur Rolle von Notch-3 Rezeptoren in experimentellen Schädigungsmodellen der Niere“.
03.2007-02.2008	Diplomarbeit in der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikum der RWTH Aachen mit dem Thema: „Kälteschock (cold shock)- Proteine in Monozyten und ihre Regulation bei der Zelldifferenzierung“.

#### 8.4 Publikationsliste

**Djudjaj S**, Chatziantoniou C, Raffetseder U, Guerrot D, Dussaule JC, Boor P, Kerroch M, Hanssen L, Brandt S, Dittrich A, Ostendorf T, Floege J, Zhu C, Lindenmeyer M, Cohen CD, Mertens PR: Notch-3 receptor activation drives inflammation and fibrosis following tubulointerstitial kidney injury. *J Pathol.* in press

Brandt S, Raffetseder U, **Djudjaj S**, Schreiter A, Kadereit B, Michele M, Pabst M, Zhu C, Mertens PR: Cold shock Y-box protein-1 participates in signaling circuits with auto-regulatory activities. *Eur J Cell Biol.*, 91(6-7): 464-471, 2012.

Hanssen L, Frye BC, Ostendorf T, Alidousty C, **Djudjaj S**, Boor P, Rauen T, Floege J, Mertens PR, Raffetseder U: Y-box binding protein-1 mediates profibrotic effects of calcineurin inhibitors in the kidney. *J Immunol.*, 187(1): 298-308, 2011.

Boulos N, Helle F, Dussaule JC, Placier S, Milliez P, **Djudjaj S**, Guerrot D, Joutel A, Ronco P, Boffa JJ, Chatziantoniou C: Notch3 is essential for regulation of the renal vascular tone. *Hypertension*, 57(6): 1176-82, 2011.

Raffetseder U, Rauen T, Boor P, Ostendorf T, Hanssen L, Floege J, En-Nia A, **Djudjaj S**, Frye BC, Mertens PR: Extracellular YB-1 blockade in experimental nephritis upregulates notch-3 receptor expression and signaling. *Nephron Exp Nephrol.*, 118(4): 100-8, 2011.

Dahl E, En-Nia A, Wiesmann F, Krings R, **Djudjaj S**, Breuer E, Fuchs T, Wild PJ, Hartmann A, Dunn SE, Mertens PR: Nuclear detection of Y-box protein-1 (YB-1) closely associates with progesterone receptor negativity and is a strong adverse survival factor in human breast cancer. *BMC Cancer*, 9: 410, 2009.

Rauen T, Raffetseder U, Frye BC, **Djudjaj S**, Mühlenberg PJ, Eitner F, Lendahl U, Bernhagen J, Dooley S, Mertens PR: YB-1 acts as a ligand for Notch-3 receptors and modulates receptor activation. *J Biol Chem.*, 284(39): 26928-40, 2009.

Frye BC, Halfter S, **Djudjaj S**, Muehlenberg P, Weber S, Raffetseder U, En-Nia A, Knott H, Baron JM, Dooley S, Bernhagen J, Mertens PR: Y-box protein-1 is actively secreted through a non-classical pathway and acts as an extracellular mitogen. *EMBO Rep.*, 10(7): 783-9, 2009.

Raffetseder U, Rauen T, **Djudjaj S**, Kretzler M, En-Nia A, Tacke F, Zimmermann HW, Nelson PJ, Frye BC, Floege J, Stefanidis I, Weber C, Mertens PR: Differential regulation of chemokine CCL5 expression in monocytes/macrophages and renal cells by Y-box protein-1. *Kidney Int.*, 75(2):185-96, 2009.