

# INAUGURAL-DISSERTATION

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg

vorgelegt von  
Tanja Wiedenmann, M.Sc.  
aus Mutlangen

Tag der mündlichen Prüfung: .....



Die Bedeutung der renalen Proteincarbonylierung bei Diabetes  
mellitus:

Altersabhängige Modulation der Glutathionperoxidase-  
Aktivität im Mausmodell der diabetischen Nephropathie

Gutachter: Prof. Dr. Markus Hecker  
Prof. Dr. Marc Freichel



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>III</b>
<b>1 Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Summary .....</b>	<b>3</b>
<b>3 Einleitung .....</b>	<b>5</b>
3.1 Diabetes mellitus.....	5
3.1.1 Typ I Diabetes.....	5
3.1.2 Typ II Diabetes .....	6
3.1.3 Diabetische Tiermodelle.....	6
3.2 Nierenfunktion und diabetische Nephropathie.....	7
3.2.1 Funktion und Aufbau des Glomerulus.....	7
3.2.2 Verlauf der diabetischen Nephropathie .....	9
3.2.3 Promovierende Faktoren in der Entwicklung einer diabetischen Nephropathie.....	10
3.3 Oxidative Proteinmodifikationen und ROS als Teil der zellulären Signaltransduktion.....	12
3.4 Anti-oxidative Enzyme .....	14
3.4.1 Superoxid-Dismutase.....	14
3.4.2 Katalase.....	14
3.4.3 Peroxiredoxin.....	15
3.4.4 Glutathionperoxidase.....	15
3.5 Hypothese und Zielsetzung der Arbeit.....	17
<b>4 Material und Methoden .....</b>	<b>19</b>
4.1 Diabetische Tiermodelle .....	19
4.2 Zellkultur.....	19
4.3 Immunfluoreszenz-Färbungen .....	20
4.4 Immunhistologische Färbungen .....	22
4.5 Periodsäure-Schiff-Reaktion (PAS).....	23
4.6 Protein-Aufarbeitung.....	23
4.7 Messung von Protein-Konzentrationen.....	24
4.8 GPx-Aktivitätsassay.....	24

## Inhaltsverzeichnis

---

4.9	SDS-Polyacrylamid Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	25
4.10	Western Blot.....	25
4.11	Detektion von carbonylierten Proteinen.....	27
4.11.1	Western Blot-Methode (Oxyblot).....	27
4.11.2	Immunohistologische Färbung .....	28
4.12	Nachweis von freien Radikalen (oxidativer Stress).....	28
4.13	siRNA-vermittelte Depletion von GPx-1 .....	29
4.14	mRNA-Isolation.....	29
4.15	cDNA-Synthese.....	30
4.16	Quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) .....	30
4.17	Bestimmung der intrazellulären Glucose, Methylglyoxal und GSH-Konzentrationen .....	31
4.18	Zell-Vitalitätstest.....	32
4.19	Quantitative Bestimmung der GPx-1-Carbonylierung.....	32
4.20	Chemikalien und Lösungen.....	34
4.21	Puffer.....	34
4.22	Bild-Auswertungen .....	35
4.23	Statistische Tests .....	35
<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>37</b>
5.1	Proteincarbonylierung in den Glomeruli diabetischer <i>Ins2<sup>Akita</sup></i> -Mäuse.....	37
5.2	Proteincarbonylierung in Podozyten und Mesangiumszellen diabetischer <i>Ins2<sup>Akita</sup></i> -Mäuse .....	38
5.3	GPx-1 und GPx-4-Expression in Podozyten und Mesangiumszellen diabetischer <i>Ins2<sup>Akita</sup></i> -Mäuse .....	40
5.4	GPx-Aktivität in den Nieren von <i>Ins2<sup>Akita</sup></i> -Mäusen.....	42
5.5	GPx-Expression und Aktivität in der Niere von 18 Wochen alten diabetischen db/db-Mäusen.....	43
5.6	GPx-Expression und Aktivität in der Niere von 26 Wochen alten diabetischen db/db-Mäusen.....	46
5.7	GPx-Expression und Aktivität in der Niere von 10 Wochen alten diabetischen db/db-Mäusen.....	48
5.8	GPx-Expression und Aktivität in der Niere von 30 Wochen alten, hämochromatotischen db/db-Mäusen .....	52

5.9	Proteincarbonylierung und GPx-Expression in der Niere von 18 Wochen alten diabetischen db/db-Mäusen nach Behandlung mit Sul121 .....	56
5.10	Der Einfluss von Glucose auf die intrazellulären GSH-Konzentration und den oxidativen Stress in kultivierten Podozyten .....	58
5.11	Einfluss von Glucose und Methylglyoxal auf die GPx-1-Expression und Aktivität in Podozyten.....	61
5.12	Einfluss von Glucose auf die Proteincarbonylierung in Podozyten.....	64
5.13	Einfluss einer GPx-1-Depletion in Podozyten auf die GPx-4 und Prx II-Expression .....	66
5.14	Auswirkungen veränderter Eisenkonzentrationen auf die GPx-Expression in Podozyten .....	68
<b>6</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>73</b>
6.1	Eigenschaften der untersuchten diabetischen Mausmodelle.....	73
6.2	Unterschiedliche Auswirkungen der diabetischen Nephropathie auf verschiedene glomeruläre Zelltypen in <i>Ins2<sup>Akita</sup></i> -Mäusen .....	75
6.3	Die Rolle der GPx-1 bei der diabetischen Nephropathie .....	77
6.4	Die Rolle der Proteincarbonylierung bei der diabetischen Nephropathie.....	81
6.5	Unterschiedliche Proteincarbonylierungsprofile und GPx-Expression bei der Entwicklung der diabetischen Nephropathie in <i>Ins2<sup>Akita</sup></i> und db/db-Mäusen.....	82
6.6	Auswirkungen von Änderungen im Redox-Gleichgewicht .....	84
6.7	Effekte verschiedener Eisen-Konzentrationen auf die kultivierten Podozyten.....	85
6.8	Ausblick .....	86
<b>7</b>	<b>Verzeichnisse.....</b>	<b>VII</b>
7.1	Literaturverzeichnis.....	VII
7.2	Abkürzungsverzeichnis .....	XVIII
7.3	Abbildungsverzeichnis .....	XX
<b>8</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>XXIII</b>

---

## 1 Zusammenfassung

Unter physiologischen Bedingungen kann moderater oxidativer Stress eine wichtige Rolle in der zellulären Signaltransduktion spielen, wogegen eine das physiologische Ausmaß überschreitende Menge reaktiver Sauerstoffverbindungen zellschädigende Auswirkungen hat. Ziel der vorliegenden Studie war es, die Bedeutung der Proteincarbonylierung, als häufigster oxidativer Proteinmodifikation, in der Frühphase der diabetischen Nephropathie aufzuklären. Dazu wurden die Expression und Aktivität anti-oxidativer Enzyme, insbesondere der Glutathionperoxidase (GPx), und deren spezifische Carbonylierung im Vergleich zur Gesamtmenge carbonylierter Proteine in Mausmodellen für den Typ I und Typ II Diabetes im Verlauf der diabetischen Nephropathie analysiert. Zusätzlich wurden Podozyten untersucht, die unter hyperglykämischen Bedingungen oder in Gegenwart des reaktiven Glucosemetabolits Methylglyoxal kultiviert wurden.

In Nierenlysaten von Typ I diabetischen *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäusen konnten erhöhte Mengen an carbonylierten Proteinen detektiert und mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie in glomerulären Podozyten und Mesangiumszellen lokalisiert werden. Nach 3, 6 und 8 Monaten waren die GPx-1 bzw. GPx-4-Expression sowie die GPx-Gesamtaktivität in den Nieren dieser Tiere signifikant gesteigert. Nur in jungen 1 Monat alten *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäusen konnte noch keine gesteigerte GPx-Expression, aber dennoch eine erhöhte GPx-Aktivität und zusätzlich eine vermehrte GPx-1-Carbonylierung nachgewiesen werden. In den Nieren von Typ II diabetischen db/db-Mäusen war im Gegensatz dazu eine GPx-1 und GPx-4-Expressionssteigerung nur in jungen, 10 Wochen alten Mäusen detektierbar. Obwohl die Gesamtmenge an carbonylierten Proteinen in den Glomeruli der diabetischen Tiere erhöht war, konnte weder eine gesteigerte GPx-1-Carbonylierung noch GPx-Aktivität in diesen Tieren nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf der Erkrankung waren die GPx-Proteinmengen in 18, 26 und 30 Wochen alten nicht-diabetischen und diabetischen db/db-Mäusen vergleichbar.

In der Podozyten-Zelllinie E11 war die GPx-1-Expression unter hyperglykämischen Bedingungen und nach Stimulation mit Methylglyoxal gesteigert. Die GPx-Aktivität nahm in diesen Zellen durch Hyperglykämie jedoch ab, während eine vermehrte GPx-1-Carbonylierung nicht nachweisbar war. Desgleichen nahm die Gesamtmenge an carbonylierten Proteinen in kultivierten Podozyten nach Glucose-Stimulation nicht zu.

Insgesamt weisen die vorliegenden Ergebnisse auf eine Regulation der GPx-Expression und Aktivität während der Entwicklung einer diabetischen Nephropathie hin. Diese ist jedoch in db/db und *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäusen nicht kongruent. In Typ I diabetischen *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäusen stellt die GPx-Carbonylierung möglicherweise einen initialen Schutzmechanismus in der Frühphase der Pathogenese der diabetischen Nephropathie dar, der mit zunehmendem Fortschreiten der Erkrankung nicht mehr zum Tragen kommt.

---

## 2 Summary

Moderate oxidative stress under physiological conditions plays a pivotal role in cellular signal transduction whereas a further increased formation of reactive oxygen species may cause oxidative cell damage. The aim of this study was to investigate the relevance of protein carbonylation, one of the most frequent types of oxidative post-translational protein modification, during the early stages of diabetic nephropathy. Therefore, expression and activity of anti-oxidative enzymes, especially glutathione peroxidase (GPx), was investigated in mouse models for type I and type II diabetes. A further focus was on the analysis of the general amounts of carbonylated proteins and the specific GPx-1 carbonylation in the kidney. In addition, podocytes were used that were cultured under hyperglycemic conditions or in the presence of the reactive glucose intermediate methylglyoxal.

In the kidneys of type I diabetic *Ins2<sup>Akita</sup>* mice increased levels of carbonylated proteins were detected in podocytes and mesangial cells using Western blot analysis and fluorescence microscopy. Expression levels of GPx-1 and GPx-4 as well as total GPx activity were enhanced in 3, 6 and 8 months old *Ins2<sup>Akita</sup>* mice compared to non-diabetic control animals. Only in young one month old *Ins2<sup>Akita</sup>* mice GPx-1 and GPx-4 protein expression levels were unaltered, whereas an increase in GPx activity and GPx-1 carbonylation could be detected. In contrast, type II diabetic db/db mice only showed an increase in GPx-1 and GPx-4 expression in the kidney in young, 10 weeks old animals. Although the total amounts of carbonylated proteins in the glomeruli of these animals were enhanced, no specific increase in GPx-1 carbonylation nor GPx activity could be detected. During the further progression of diabetic nephropathy no significant change was found in GPx protein levels in 18, 26 and 30 weeks old non-diabetic and diabetic db/db mice.

Also in the podocyte cell line E11 GPx-1 expression was enhanced under hyperglycemic conditions and by stimulation with methylglyoxal. However, hyperglycemia decreased GPx activity without any increase in GPx-1 carbonylation. In addition, high glucose levels caused no increase in the total amounts of carbonylated proteins.

Taken together, these results demonstrate a different regulation of GPx expression and activity during the onset of diabetic nephropathy or diabetic kidney disease in type I and type II diabetic mouse models. In type I diabetic *Ins2<sup>Akita</sup>* mice GPx carbonylation might provide an initial cellular defense against oxidative stress during the early stages of diabetic nephropathy, which disappears during progression of the disease.

---

### 3 Einleitung

#### 3.1 Diabetes mellitus

Weltweit leiden etwa 415 Millionen Menschen unter der Stoffwechselkrankheit Diabetes mellitus. Diese Krankheit und ihre Folgen kosten jedes Jahr etwa 5 Millionen Menschen das Leben (1). In Deutschland ist inzwischen bereits jeder zehnte Erwachsene an Diabetes erkrankt, wobei die Anzahl der Erkrankten allein in den letzten 15 Jahren um über 50% angestiegen ist (2). Hauptkriterium für die Diagnose von Diabetes ist ein erhöhter Blutzuckerspiegel. Nach der Definition der Weltgesundheitsorganisation WHO liegt eine Diabetes-Erkrankung vor, wenn der Nüchternblutzuckerwert über 126 mg/dL (entspricht 7 mM) liegt (3). Ein weiterer wichtiger Parameter in der Diabetes-Diagnostik ist der Anteil an glykosyliertem Hämoglobin (HbA1c). Glucose kann sich durch eine Amadori-Umlagerung an Hämoglobin anlagern und es somit nichtenzymatisch glykosylieren. Da Hämoglobin im Blut nach etwa 3 Monaten abgebaut wird, lässt der Anteil an glykosyliertem Hämoglobin Rückschlüsse auf die durchschnittlichen Blutzuckerwerte der vorherigen 12 Wochen zu. Ein Anteil von etwa 5% HbA1c an Gesamthämoglobin gilt als Normalwert für physiologische Glucose-Konzentrationen, ein Anteil von über 6,5% deutet hingegen auf eine Diabetes-Erkrankung hin (4). Die erhöhten Glucose-Konzentrationen im Blut von Diabetikern werden dabei durch einen absoluten oder relativen Mangel an Insulin ausgelöst. Dieses Hormon wird für die schnelle Aufnahme von Glucose aus dem Blut in Skelettmuskelzellen benötigt, da es den Insulin-abhängigen Glucose-Transporter 4 aktiviert (5). Je nachdem, worin die Ursache des Insulinmangels begründet ist, wird zwischen Typ I und Typ II Diabetes unterschieden.

##### 3.1.1 Typ I Diabetes

Nur etwa 5% aller Diabetiker leiden an Typ I Diabetes. Diese Krankheit wird üblicherweise bei Kindern oder jungen Erwachsenen diagnostiziert. Bisher konnten mehr als 40 Gene identifiziert werden, die im Zusammenspiel mit bestimmten Umweltfaktoren mit der Pathogenese des Typ I Diabetes in Zusammenhang stehen (6). Der Auslöser dieser Diabetes-Form ist dabei eine Autoimmunreaktion, durch die die Insulin-produzierenden  $\beta$ -Zellen in der Bauchspeicheldrüse von körpereigenen T-Zellen zerstört werden (7). In der Folge kann vom Organismus nicht mehr genügend Insulin produziert werden, um eine effiziente Aufnahme von Glucose aus dem Blut in die Skelettmuskelzellen zu gewährleisten. Infolgedessen steigt der Blutzuckerspiegel. Die Therapie von Typ I Diabetes besteht daher in der Injektion von rekombinantem Insulin, um die Glucose-Aufnahme aus dem Blut zu begünstigen.

### 3.1.2 Typ II Diabetes

Die überwiegende Mehrheit der Diabetiker ist an Typ II Diabetes erkrankt. Bei vielen Menschen liegt diese Erkrankung unerkannt vor, daher gibt es eine hohe Dunkelziffer. Die Ursachen für Typ II Diabetes sind vielfältig und involvieren sowohl genetische Einflussfaktoren als auch Umweltfaktoren sowie den Lebensstil der Betroffenen (8). Grundsätzlich kommt es im Laufe dieser Erkrankung zu einer zunehmenden Resistenz der Zellen gegenüber Insulin. Um dies zu kompensieren, ist zu Beginn der Erkrankung die Insulin-Produktion der Bauchspeicheldrüse stark gesteigert. Im weiteren Verlauf der Pathogenese lässt die Insulin-Produktion jedoch nach und es verbleiben hohe Glucose-Mengen im Blut (9). Zusätzlich steigert dieser relative Insulinmangel die Gluconeogenese in der Leber, wodurch der Blutzuckerspiegel weiter erhöht wird. Das Behandlungsspektrum von Typ II Diabetes ist vielgestaltiger und beinhaltet u.a. eine Umstellung der Ernährung, um hohe Blutzuckerspitzen zu vermeiden. Außerdem erfolgt eine zusätzliche Behandlung mit Medikamenten, die die Gluconeogenese in der Leber inhibieren (10). Neuartige Medikamente können außerdem aktiv das Ausscheiden von Glucose mit dem Urin fördern, indem sie die renale Glucose-Reabsorption blockieren (11).

### 3.1.3 Diabetische Tiermodelle

Für die Untersuchungen von Diabetes und diabetischen Komplikationen sind verschiedene Tiermodelle etabliert (12). Die Behandlung von Mäusen mit Streptozotocin (STZ) stellt eine gängige Methode dar, um ein Tiermodell für den Typ I Diabetes zu erhalten. STZ wird selektiv von den pankreatischen  $\beta$ -Zellen aufgenommen und hat dort eine DNA-schädigende Wirkung. Dabei kann eine unspezifische Gewebetoxizität durch STZ in diesem Diabetes-Modell jedoch nicht ausgeschlossen werden (13). Um dies zu umgehen, werden häufig *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäuse als Mausmodell für den Typ I Diabetes verwendet (14). Diese Mäuse weisen eine Punktmutation im Insulin-Gen *Ins2* auf, bei der an der Aminosäureposition 96 Cystein zu Tyrosin mutiert ist (15). Dies führt zu einer abnormalen Faltung des Insulin-Proteins, das daraufhin im endoplasmatischen Retikulum (ER) zurückgehalten wird. Dieser hohe ER-Stress ist toxisch für die  $\beta$ -Zellen (16). In diesen Tieren bleiben nur wenige  $\beta$ -Zellen intakt, die in Summe lediglich sehr geringe Mengen an funktionalem Insulin herstellen können. *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäuse entwickeln daher schon früh, im Alter von etwa 3 bis 4 Wochen, spontan Diabetes, manifestiert durch Hyperglykämie, Hypoinsulinämie, Polydipsie und Polyurie (13). Auch typische Symptome einer Nephropathie, wie die Entwicklung einer Albuminurie, strukturelle Veränderungen in der Niere und der Verlust von Podozyten können in diesen Tieren beobachtet werden.

Auch für die Untersuchungen zum Typ II Diabetes sind Mausmodelle etabliert. Als Modell für das metabolische Syndrom und Typ II Diabetes sind db/db-Mäuse gut untersucht, da sie

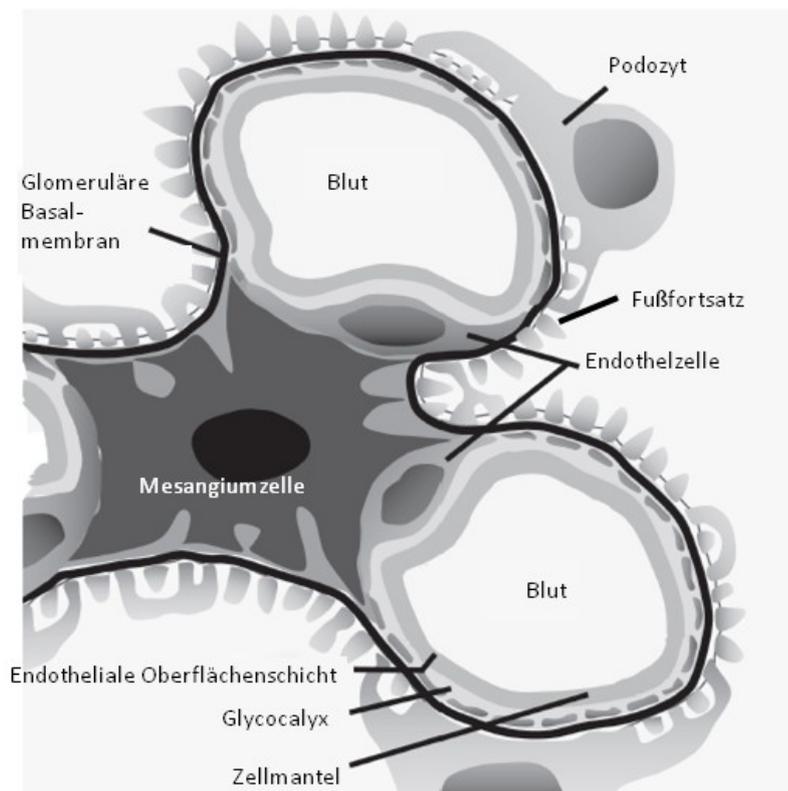
viele Ähnlichkeiten zur Entwicklung der humanen diabetischen Nephropathie aufweisen (13). db/db-Mäuse sind charakterisiert durch eine rezessive Punktmutation im Gen für die Leptin-Rezeptor Isoform *OB-Rb*, die zum Funktionsverlust dieser Rezeptor-Form führt und daher die Leptin-Signalwege inaktiviert. Auf diese Weise gewinnen diese Mäuse schnell an Körpergewicht und sind im Alter von 6 Wochen bereits deutlich adipös. Ab einem Alter von ca. 8 Wochen sind die Tiere diabetisch (13). Die Schwere des Krankheitsverlaufes ist bei diesen Tieren stark vom genetischen Hintergrund der verwendeten Mäuse abhängig. In dieser Studie wurden db/db-Mäuse mit einem genetischen C57BL/6 sowie C57BLKS-Hintergrund verwendet. Der C57BLKS-Hintergrund führt zu einem schweren Diabetes-Verlauf mit sehr hohen Blutzuckerwerten und nahezu kompletter  $\beta$ -Zell-Depletion. Die Lebenserwartung dieser Tiere beträgt etwa 10 Monate (17). Im Gegensatz dazu leben db/db-Mäuse mit C57BL/6-Hintergrund 8-10 Monate länger und zeigen eine mildere Diabetes-Erkrankung mit lebenslang anhaltender Hyperinsulinämie durch  $\beta$ -Zell-Hyperplasie (18). Heterozygote wt/db-Tiere weisen ein normales Körpergewicht sowie Plasma-Insulinkonzentrationen auf, jedoch sind auch in diesen Tieren metabolische Besonderheiten beobachtet worden. So können diese Tiere beispielsweise Fastenperioden länger überleben als Wildtyp-Mäuse (19).

### 3.2 Nierenfunktion und diabetische Nephropathie

#### 3.2.1 Funktion und Aufbau des Glomerulus

Die Filtration des Blutplasmas findet in den Glomeruli in der Nierenrinde statt. In jeder menschlichen Niere befinden sich zwischen 1 und 2,5 Millionen Glomeruli (20). In der gesunden Niere werden große Proteine wie Albumin nahezu komplett im Organismus zurück gehalten. Dies geschieht durch eine größen- und ladungsselektive glomeruläre Filtrationsbarriere (21). Diese besteht aus (Abb. 1):

- den gefensterten Endothelzellen, die auf der Innenseite der Blutkapillaren in direktem Kontakt mit dem Blut stehen,
- der glomerulären Basalmembran,
- den Podozyten, die im Bowman'schen Raum die Außenseite der glomerulären Kapillaren bedecken.



**Abb. 1: Schematische Zeichnung des glomerulären Feinbaus (modifiziert nach (22)).**

Die Endothelzellen sind von zahlreichen transzellulären Poren mit 60 bis 100 nm Durchmesser durchzogen (23). Trotz dieser Poren spielen auch die Endothelzellen eine wichtige Rolle im selektiven Filtrationsprozess der Glomeruli. Albumin beispielsweise wird bereits auf der luminalen Seite der Endothelzellen zurück gehalten und kann nicht frei durch die Poren diffundieren (24). Dies wird durch eine zusätzliche Schicht, die endotheliale Oberflächenschicht, bewirkt, die die Endothelzellen samt Poren überspannt. Sie besteht aus einem Zellmantel und der Glycocalyx (22). Die Glycocalyx ist eine etwa 200 nm dicke, negativ geladene Schicht aus Proteoglykanen und Glykoproteinen, die kovalent mit der Endothelzellmembran verbunden ist (25,26). An diese ist wiederum über Ladungsinteraktionen der Zellmantel gebunden. Diese endotheliale Oberflächenschicht spielt bereits eine wichtige Rolle dabei, Plasmaproteine in den glomerulären Blutgefäßen zurück zu halten.

Zwischen Endothelzellen und Podozyten befindet sich die glomeruläre Basalmembran. Diese Membran besteht zu einem Großteil aus Typ IV Collagen, Laminin und Wasser (27). Einen weiteren Bestandteil bilden die negativ geladenen Proteoglykane. Auch Veränderungen in der Zusammensetzung der Basalmembran können zu Nierenkrankheiten führen (28).

Zum Bowman'schen Raum hin auf der glomerulären Basalmembran ansetzend befinden sich die Podozyten. Diese Zellen bestehen aus einem Zellkörper und primären Fortsätzen, die sich weiter verzweigen in Fußfortsätze, eine Vielzahl an Ausstülpungen, mit denen sie im Kontakt zur Basalmembran stehen. Die Fußfortsätze benachbarter Podozyten sind eng ineinander verzahnt. Lediglich kleine Lücken befinden sich dazwischen, die durch eine Schlitzmembran verschlossen werden. Die Schlitzlöcher haben einen Durchmesser von 30 - 50 nm und erlauben den Durchtritt des glomerulären Ultrafiltrats (29). Podozyten sind post-mitotische Zellen, daher können sie sich bei Verlust einzelner Zellen nicht regenerieren und hinterlassen dann Lücken in der glomerulären Filtrationsbarriere. In der Tat ist der Zellzyklus dieser Zellen stark kontrolliert. Sobald die Entwicklung der Podozyten aus Vorläufer-Zellen abgeschlossen ist, exprimieren Podozyten hohe Proteinmengen der Zellzyklus-Inhibitoren p27 und p57, die die für die Zellteilung relevanten Cyclin-abhängigen Kinasen inhibieren (30). Dies geht einher mit der Expression von einer Reihe von Markerproteinen, die typisch für differenzierte Podozyten sind, unter anderem Nephrin, Podocin und das Aktin-assoziierte Synaptopodin (31).

Neben den Endothelzellen und Podozyten enthält der ausgereifte Glomerulus noch zwei weitere Zelltypen: die parietalen Epithelzellen, die die Bowman'sche Kapsel bilden und die Mesangiumszellen. Auch die Mesangiumszellen haben wichtige Aufgaben im Glomerulus: So regulieren sie u.a. den Aufbau und die Zusammensetzung der mesangialen extrazellulären Matrix und stützen die glomerulären Kapillaren. Durch ihre Fähigkeit zur Kontraktion können sie außerdem den intraglomerulären kapillaren Blutfluss mit steuern (32).

### **3.2.2 Verlauf der diabetischen Nephropathie**

Bei etwa 20–40% aller diabetischen Patienten entsteht als Folge dieser Stoffwechselerkrankung eine Nephropathie (33). Die Ursachen sind nicht vollständig geklärt, involvieren vermutlich aber sowohl genetische Faktoren als auch schlecht eingestellte Glucose-Werte sowie eine Hypertonie (34,35). Im Durchschnitt entwickelt sich eine diabetische Nephropathie etwa 15 Jahre nach dem Auftreten von Diabetes (36). Ein initiales Anzeichen hierfür ist eine glomeruläre Hyperfiltration. Anschließend manifestiert sich eine Mikroalbuminurie, gekennzeichnet durch geringe Mengen des Serum-Proteins Albumin im Urin (30 - 300 mg pro Tag) (33). Diese Mikroalbuminurie kann sich bei Fortbestehen der diabetischen Stoffwechselerkrankung zu einer Makroalbuminurie entwickeln (> 300 mg Albumin pro Tag). Die Geschwindigkeit mit der sich diese Albuminurie ausbildet ist individuell sehr verschieden und hängt von einer Vielzahl unterschiedlicher Einflussfaktoren ab (33).

Grundsätzlich wird die Albuminurie durch verschiedene Schäden an den Glomeruli in der Niere ausgelöst. Histologisch früh nachweisbar ist eine Ausdehnung des Mesangiums durch eine vermehrte Ansammlung extrazellulärer Matrix und eine Verdickung der glomerulären

Basalmembran. Assoziiert ist dies mit einem Verlust der Integrität der Filtrationsbarriere (37). Dabei kann es zum Wegfall der endothelialen Poren und einer Verdünnung der endothelialen Oberflächenschicht kommen (38). Auch die Funktion der Podozyten wird im Rahmen der Ausbildung der diabetischen Nephropathie in Mitleidenschaft gezogen, wobei den intakten Podozyten und insbesondere die Schlitzmembranen zwischen ihnen als molekülgrößenselektiver Filter von entscheidender Bedeutung für die funktionelle Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere sind. So kommt es zu einer Hypertrophie von Podozyten, einer Loslösung der Fußfortsätze und schließlich zum Verlust des Kontaktes zur glomerulären Basalmembran sowie Apoptose. Patienten mit diabetischer Nephropathie weisen daher häufig eine verringerte Anzahl an Podozyten in den Glomeruli auf (39,40).

Insgesamt führen die geschilderten Effekte zum finalen Funktionsverlust eines Teils der Glomeruli und damit zu einer eingeschränkten Nierenfunktion. Diabetische Nephropathie ist in westlichen Ländern der Hauptauslöser für terminale Nierenleiden und macht damit eine Vielzahl von Dialysen und Nierentransplantationen notwendig (35).

### **3.2.3 Promovierende Faktoren in der Entwicklung einer diabetischen Nephropathie**

Die zuvor beschriebenen Veränderungen in der Niere werden durch eine Reihe von Faktoren ausgelöst oder begünstigt. Dazu gehören eine erhöhte Konzentration von reaktiven Sauerstoffspezies in der Niere von diabetischen Patienten, sowie die vermehrte Ansammlung von fortgeschrittenen Glykosylierungsendprodukten, den sogenannten AGEs. Auch ein veränderter Eisen-Metabolismus und damit einhergehend erhöhte Eisen-Konzentrationen werden mit der Entwicklung einer diabetischen Nephropathie assoziiert.

#### **3.2.3.1 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)**

Hyperglykämie führt zu einem veränderten Metabolismus mit einer vermehrten Produktion von Sauerstoffradikalen (41). Dieses Übergewicht der Bildung von ROS gegenüber der zellulären anti-oxidativen Verteidigung wird als oxidativer Stress bezeichnet. Da ROS Schäden an Proteinen, Lipiden oder der DNA induzieren können, wird der hohe oxidative Stress als einer der Hauptauslöser der diabetischen Komplikationen angesehen (41). Ursache dieses oxidativen Stresses in diabetischen Patienten ist sowohl eine vermehrte ROS-Produktion in den Mitochondrien als auch veränderte metabolische und enzymatische Reaktionen aufgrund des Vorhandenseins großer Mengen intrazellulärer Glucose (42,43).

In den Mitochondrien werden Elektronen von NADH oder FADH<sub>2</sub> auf O<sub>2</sub> übertragen. Dabei wird der Großteil des O<sub>2</sub> zu H<sub>2</sub>O reduziert, es kann jedoch auch zur Superoxid (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)-Bildung kommen. In gesunden Zellen wird lediglich aus weniger als 1% der O<sub>2</sub>-Moleküle O<sub>2</sub><sup>-</sup> generiert (41). In beschädigten Mitochondrien oder unter hyperglykämischen Bedingungen ist die O<sub>2</sub><sup>-</sup> Bildung jedoch deutlich verstärkt. Dies geschieht hauptsächlich durch einen Verlust von Elektronen am Komplex I sowie zwischen Coenzym Q und Komplex III in der

mitochondrialen Atmungskette (41). Mitochondrien werden daher als Hauptquelle der  $O_2^-$ -Bildung im Organismus angesehen (43). Eine weitere Ursache für die erhöhte ROS-Produktion bei diabetischen Patienten liegt in ihrem veränderten Glucose-Metabolismus begründet. Ein Glucose-Abbau über den Polyol-Weg führt zu einer vermehrten ROS-Produktion im Vergleich zum Glucose-Abbau mittels Glykolyse. Der Polyol-Weg tritt unter hyperglykämischen Bedingungen zehnmal häufiger auf als bei Normoglykämie (34,44). Darüber hinaus kann  $O_2^-$  auch durch enzymatische Reaktionen gebildet werden, etwa durch die NADPH-Oxidase. Diese überträgt Elektronen von NADPH auf  $O_2$ , um so  $O_2^-$  für intrazelluläre Signalwege bereitzustellen (45,46).

### 3.2.3.2 Fortgeschrittene Glykosylierungsendprodukte (AGEs)

Unter Bedingungen einer hohen Glucose-Verfügbarkeit kann es auch zu einem Angriff von Glucose auf freie Aminogruppen in Proteinen kommen. Dadurch wird die Struktur der Aminosäure geändert und eine Schiff-Base geformt, die sich zu einem stabileren Ketoamin, das als Amadori-Produkt bezeichnet wird, umlagert. Dieses Amadori-Produkt kann eine Vielzahl weiterer reaktiver Carbonylverbindungen hervorbringen und mit weiteren Aminosäuren reagieren. Nach zusätzlichen chemischen Umlagerungen entstehen hieraus AGEs (41). Im Rahmen der AGE-Bildung kommt es oft zur gleichzeitigen Freisetzung von ROS (47). Im Serum und im Gewebe von Diabetikern ist die Ansammlung dieser AGEs signifikant erhöht (48,49). Sie stehen im Verdacht über Rezeptor-vermittelte und Rezeptor-unabhängige Mechanismen zur Entstehung der diabetischen Nephropathie beizutragen (41,50). Die Rezeptor-unabhängigen Mechanismen beinhalten unter anderem die Modifikation von extrazellulären Matrixmolekülen, DNA oder Lipiden (34,51). Der erste Inhibitor der AGE-Bildung, der therapeutisch geprüft wurde, ist Aminoguanidin (52). Dieser kann reaktive Aldehyde und Dicarbonyle binden und in unschädliche Hydrazone und Triazine umwandeln.

Ein prominenter AGE-Vorläufer ist das reaktive Dicarbonyl Methylglyoxal. Es entsteht unter anderem während der Glykolyse aus den Intermediaten Glycerinaldehydphosphat und Diphosphoglycerat, kann aber auch im Lipid- oder Aminosäuremetabolismus entstehen (53). Bei diabetischen Patienten ist der Anteil an Carbonylen, die zu Methylglyoxal umgeformt werden, deutlich erhöht. Oft ist sowohl die Entstehung als auch der enzymatische Abbau von Methylglyoxal mit einer Freisetzung von ROS assoziiert (54).

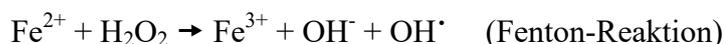
### 3.2.3.3 Plasma-Eisenkonzentrationen

Eisen, das als  $Fe^{2+}$  mit der Nahrung aufgenommen wird, ist ein wichtiges Spurenelement und essentiell für die Funktion aller Zellen (55) sowie als Bestandteil von Hämoglobin und Myoglobin. Freies Eisen hat ein toxisches Potential, da es entscheidend zur Produktion von Sauerstoffradikalen beitragen kann. Dies liegt darin begründet, dass  $Fe^{2+}$  einen verfügbaren

## Einleitung

---

Elektronen-Donator und  $\text{Fe}^{3+}$  einen effizienten Elektronen-Akzeptor darstellt. Damit kann Eisen, als Katalysator in der Fenton-Reaktion, dazu beitragen die Bildung von hochreaktiven Hydroxylradikalen aus Wasserstoffperoxid zu begünstigen (56):



Daher wird das Auftreten von freiem Eisen im Organismus möglichst verhindert, indem es sowohl zum Transport als auch zur Lagerung im Körper an spezielle Proteine (Transferrin bzw. Ferritin) (56) gebunden wird. Es ist bekannt, dass hohe Eisenmengen im Organismus dennoch einen nachteiligen Effekt auf den Glucose-Metabolismus haben. Eine Vielzahl an Studien belegt einen Zusammenhang zwischen erhöhten Eisenwerten (z. B. hervorgerufen durch genetische Hämochromatose) und einem hohen Risiko für Typ II Diabetes (54,57). Aber selbst eine hohe Eisenaufnahme mit der Nahrung ist bereits mit einem Risiko für die Ausbildung einer Insulin-Resistenz assoziiert (57). Eine *in vivo* Behandlung mit dem Eisenchelator Deferoxamin (DFO) kann sogar die HbA1c-Werte in diabetischen Ratten leicht reduzieren (58). Der genaue Mechanismus, über den Eisen eine Insulin-Resistenz vermitteln kann, ist bislang nicht eindeutig geklärt, jedoch scheinen die Ursachen vielschichtig zu sein. Zusätzlich zu einer erhöhten Insulin-Resistenz kann Eisen auch die Apoptose von  $\beta$ -Zellen begünstigen und damit die Insulin-Sekretion reduzieren (59). Auch auf die Entwicklung von diabetischen Komplikationen hat Eisen Einfluss. So entwickelt sich eine diabetische Nephropathie beispielsweise langsamer, wenn eine Diät mit geringem Eisen-Anteil gewählt oder Eisen durch einen Chelator gebunden wird (57).

### 3.3 Oxidative Proteinmodifikationen und ROS als Teil der zellulären Signaltransduktion

ROS können verschiedenste Zellbestandteile oxidieren und diese dadurch reversibel oder irreversibel modifizieren. Je nach Intensität des oxidativen Stresses können hierbei verschiedene Reaktionen ablaufen. Reversible Proteinmodifikationen beinhalten häufig Cystein-Modifikation, so wie die Oxidation zu Sulfen- oder Sulfinsäuren oder intra- bzw. intermolekulare Disulfid-Brückenbildung zwischen zwei Cystein-Resten. Cystein ist auch empfänglich für Nitrosylierung durch Peroxinitrit oder Anlagerung von Glutathion bei oxidativem Stress (60). Als irreversibel wird in der Regel die Nitrierung von Tyrosin-Resten durch Peroxinitrit angesehen. Nitrierung ist ein sehr selektiver Prozess, da nicht alle Tyrosin-Reste eines Proteins empfänglich für die Nitrierung sind. Oft sind diese Modifikationen mit einer Änderung der Proteinfunktion oder –stabilität assoziiert (60,61).

Die wahrscheinlich häufigste oxidative Proteinmodifikation stellt jedoch die Carbonylierung dar (62). In der Gegenwart von Eisen entstehen Hydroxylradikale, die selektiv Carbonylgruppen in Proteine einführen können (63). Bei der Entstehung von Protein-Carbonylderivaten werden zwei verschiedene Reaktionen unterschieden: So können Aminosäuren direkt durch einen oxidativen Angriff von Hydroxylradikalen auf die Aminosäuren-Seitenketten oxidiert werden. Dies geschieht in der Regel an Lysin-, Arginin-, Prolin- oder Threonin-Resten (62). Außerdem können verschiedene Aminosäuren in sekundären Reaktionen mit reaktiven Carbonylderivaten modifiziert werden. Besonders die Aminosäuren Lysin, Cystein und Histidin sind hierfür empfänglich. Hier können Reaktionen mit bereits vorhandenen, oxidierten Kohlenhydraten, Fetten oder AGEs stattfinden (64).

Zunächst wurde man auf die Proteincarbonylierung als eine schädliche Folge von oxidativem Stress aufmerksam. Lange ist bekannt, dass Proteincarbonylierungen eine Rolle im Alterungsprozess sowie bei bestimmten Erkrankungen spielen und Proteine für proteasomale Degradation empfänglicher machen (65). Außerdem kann Proteincarbonylierung zum Funktionsverlust eines Proteins führen und über weitere Reaktionen mit anderen Proteinen zur Bildung großer Multiproteinaggregate führen (65).

Inzwischen sind demgegenüber aber auch nutzbringende Funktionen der Proteincarbonylierung als redox-abhängiger Signalweg bekannt. In diesem Zusammenhang ist unter anderem der Nrf2/Keap1-Signalweg gut erforscht. Hier kann Proteincarbonylierung des Inhibitorproteins Keap1 (*Kelch ECH associating protein 1*) den Transkriptionsfaktor Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) aktivieren und somit die Genexpression redox-abhängig modulieren (66,67). Umstritten ist bislang, ob es auch metabolische Mechanismen zur Proteindecarbonylierung gibt (60,68).

ROS sind jedoch auch in vielerlei anderer Hinsicht bedeutsam für die intrazelluläre Signalweiterleitung. Verschiedene Ligand-Rezeptor-Interaktionen rufen eine ROS-Bildung hervor. Dies konnte zum Beispiel gezeigt werden für verschiedene Zytokine, unter anderem TNF- $\alpha$  (*Tumor necrosis factor  $\alpha$* ) und IL-1 $\beta$  (*Interleukin 1 $\beta$* ) (69,70), und wird auch für die Insulinrezeptor-Signaltransduktion vermutet (71,72). Daneben können ROS auch Protein-Kinasen oder Phosphatasen aktivieren und somit den Phosphorylierungsstatus anderer Proteine abwandeln (73,74). ROS können außerdem in die Gen-Expression von Zellen eingreifen, indem sie verschiedene Transkriptionsfaktoren modulieren. So kann ROS das NF- $\kappa$ B-Inhibitorprotein I $\kappa$ B empfänglicher für proteasomalen Abbau machen und somit die Aktivität von NF- $\kappa$ B beeinflussen. Ein weiterer bedeutender, redox-sensitiver Transkriptionsfaktor ist AP-1 (*activator protein 1*), dessen Transkription von ROS stimuliert wird (41).

### 3.4 Anti-oxidative Enzyme

Um zu verhindern, dass oxidativer Stress zellschädigende Ausmaße erreicht, sind eine Reihe von anti-oxidativen Enzymen in der Zelle aktiv:

#### 3.4.1 Superoxid-Dismutase

Zunächst kann Superoxid ( $O_2^-$ ) durch metallhaltige Superoxid-Dismutasen (SODs) zu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und  $O_2$  umgewandelt werden. Dadurch wird die Bildung von aggressiveren Radikalen, z.B. Peroxinitrit oder Hydroxylradikalen, verhindert. SODs katalysieren dabei eine zweigeteilte Reaktion. Zunächst wird ein  $O_2^-$ -Molekül mit Hilfe des Metallions der SOD zu  $O_2$  oxidiert. Anschließend wird das Metallion der SOD in den Ausgangszustand oxidiert, indem ein weiteres  $O_2^-$ -Molekül reduziert wird und mit 2 Protonen  $H_2O_2$  bildet (75). Als Bilanz ergibt sich:



Die in den SODs gebundenen Metallionen sind üblicherweise Mangan, Eisen, Kupfer oder Zink. Man unterscheidet mehrere SOD-Isoformen:

**SOD1** (Cu/ZnSOD) befindet sich hauptsächlich im Zytoplasma und Nukleus. Diese SOD verwendet Kupfer- und Zink-Ionen als Kofaktoren für die Konvertierung von  $O_2^-$ .

**SOD2** (MnSOD) basiert auf einem Mangan-Kofaktor für seine Aktivität und spielt eine wichtige Rolle beim Schutz gegen erhöhte  $O_2^-$  Produktion in den Mitochondrien (76). Daher ist SOD2 hauptsächlich in Mitochondrien lokalisiert.

**SOD3** ist hauptsächlich extrazellulär lokalisiert und verwendet ebenfalls Kupfer und Zink als Cofaktoren. Diese SOD ist vermutlich wichtig für den Schutz der extrazellulären Matrix gegen erhöhte Mengen von  $O_2^-$  (77).

Das von den SODs produzierte  $H_2O_2$  ist weniger reaktiv als das Superoxidanion, dennoch muss auch dieses weiter reduziert werden. Dafür gibt es in der Zelle hauptsächlich drei Enzyme: Katalase, Peroxiredoxin (Prx) und die Glutathionperoxidasen (GPx).

#### 3.4.2 Katalase

Die Katalase katalysiert eine Reaktion mit zwei Molekülen  $H_2O_2$ , wovon eines zu Wasser reduziert und das andere zu  $O_2$  oxidiert wird. Katalase ist in menschlichen und murinen Zellen lediglich in Peroxisomen lokalisiert, sodass seine Hauptfunktion vermutlich darin besteht  $H_2O_2$  zu reduzieren, das während der  $\alpha$ -Oxidation von Fettsäuren in den Peroxisomen anfällt. Katalase hat außerdem eine sehr hohe Katalysationsgeschwindigkeit, ist aber vermutlich nur effektiv in der Reduktion von großen  $H_2O_2$ -Mengen, da die Bindungsaffinität zu  $H_2O_2$  nicht besonders hoch ist (78).

### 3.4.3 Peroxiredoxin

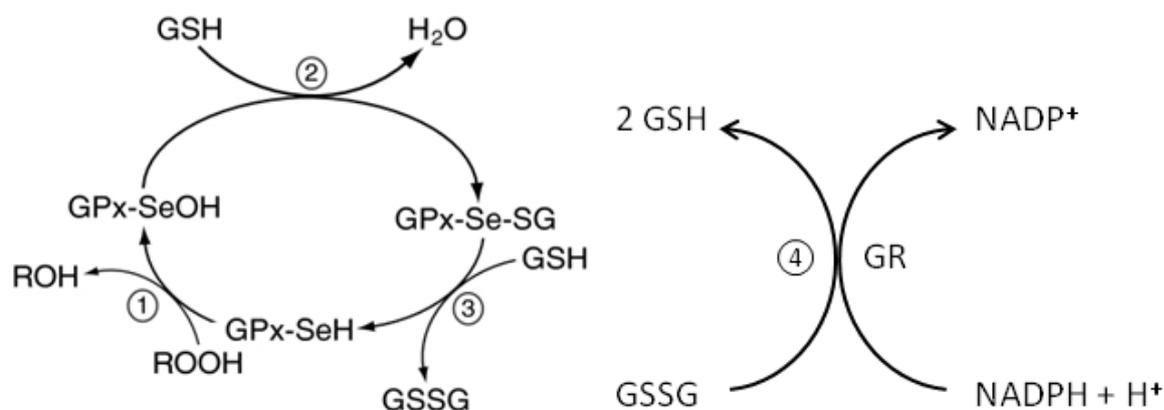
Peroxiredoxine (Prx) können  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder Alkylhydroperoxide zu Wasser bzw. Alkohol reduzieren. Prx existiert in sechs verschiedenen Isoformen, Prx I – VI. Alle Prx sind als Dimer aktiv und besitzen ein konserviertes Cystein am Aminoende des Proteins. Dieses Cystein ist für die Reduktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  essentiell und wird dabei zu Sulfensäure oxidiert. Die Reduktion in den Ausgangszustand erfolgt typischerweise durch Thioredoxine (78–80). Die verschiedenen Prx-Isoformen unterscheiden sich in ihrer intrazellulären Lokalisation: Prx I, II und VI befinden sich im Zytoplasma und Prx III und V in den Mitochondrien (80). Die Reaktionsgeschwindigkeit von Prx ist relativ langsam verglichen mit anderen anti-oxidativen Enzymen wie Katalase oder Glutathionperoxidase (81), liegt aber in sehr großen Mengen in der Zelle vor. Prx hat außerdem eine sehr hohe Bindungsaffinität zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  und spielt daher vermutlich eine wichtige Rolle bei der Reduktion von kleinen Mengen von  $\text{H}_2\text{O}_2$ , wie sie zum Beispiel bei verschiedenen Signalwegaktivierungen entstehen (82). Insofern spielt Prx auch eine wichtige Rolle bei der Regulation von Signalkaskaden, der Apoptose und der Zelldifferenzierung. Neben seiner Funktion als anti-oxidativem Enzym kann Prx auch als molekulares Chaperon wirken. Dies geschieht als Antwort auf verschiedene Arten von Zellstress, wie z. B. Änderungen der Ionenkonzentration, pH-Werte oder in einem reduzierenden Milieu, die eine Bildung von Prx-Decameren anstatt der üblichen Dimer-Form begünstigen (83).

### 3.4.4 Glutathionperoxidase

Eine weitere wichtige Gruppe von Peroxidasen sind die Glutathionperoxidasen (GPx), die durch Oxidation von Glutathion (oder selten auch anderen thiolhaltigen Molekülen) Peroxide reduzieren können (Abb. 2). Das oxidierte Glutathion wird durch die Glutathionreduktase mit Elektronen von NADPH in den Ausgangszustand reduziert. GPx sind Proteine, die in verschiedenen Isoformen existieren. Bisher wurden 8 verschiedene Formen von GPx identifiziert. Das außergewöhnliche an diesen Peroxidasen ist ihre Zusammensetzung: So enthalten die GPx-Isoformen 1-4 sowie humanes GPx-6 die seltene Aminosäure Selenocystein (84). Bisher sind nur etwa 25 humane Proteine bekannt, die diese Aminosäure benötigen. Selenocystein wird in der mRNA durch UGA codiert, das die mRNA-Translation normalerweise terminiert. Nur durch spezielle RNA-Sequenzen an der 3' untranslatierten Region (*SECIS*, *Selenocystein insertion sequence*) erfolgt über die Rekrutierung weiterer assistierender Proteine ein Einbau des Selenocysteins in die Polypeptid-Kette (85). Unter Selen-Mangelbedingungen wird Selenocystein nicht in alle GPx-Isoformen zu gleichen Anteilen eingebaut. Während GPx-2 und GPx-4-Expression durch Einbau von Selenocystein

## Einleitung

noch lange aufrechterhalten wird, stoppt die GPx-1-Expression in den Zellen schnell, in dem die GPx-1 mRNA vor der Translation abgebaut wird (84).



**Abb. 2: Schema der GPx-Reaktion (modifiziert nach (72)).**

Die schematische Darstellung zeigt die Reduktion eines Peroxids durch GPx. Im ersten Schritt wird das Peroxid reduziert, wobei das reaktive Selenocystein (SeH) im aktiven Zentrum von GPx oxidiert wird. Mit Hilfe von zwei reduzierten Glutathion-Molekülen (GSH) wird dieses, über die Bildung eines Zwischenprodukts (Se-SG), wieder in den Ausgangszustand zurück reduziert. Dabei entsteht Wasser und Glutathion wird oxidiert (GSSG) (Schritt 2 und 3). Anschließend wird das oxidierte Glutathion durch das Enzym Glutathion-Reduktase (GR) in 2 Moleküle GSH reduziert (Schritt 4). Die Elektronen hierfür stammen von NADPH.

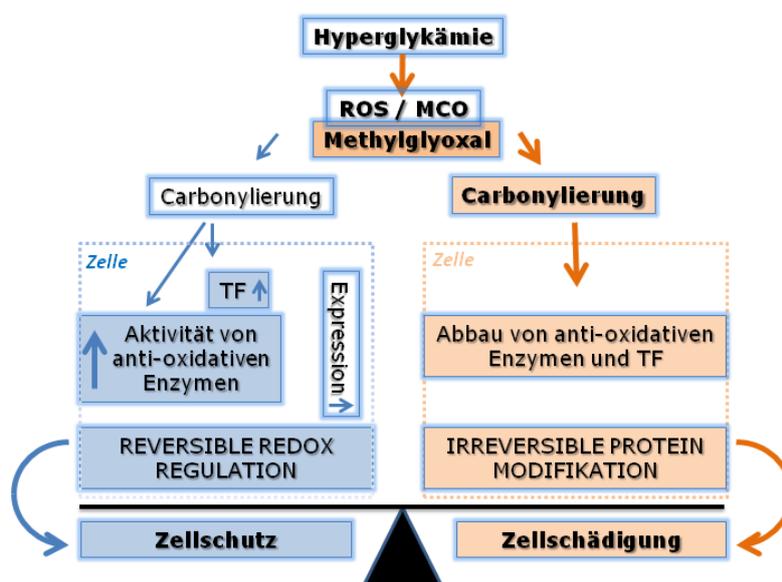
**GPx-1** wird ubiquitär in den meisten Zellarten exprimiert und liegt im Zytoplasma vor. Es reduziert hauptsächlich kleine Peroxide, beispielsweise Wasserstoffperoxid oder Peroxinitrit. Dies ist unter anderem seiner Struktur als Tetramer geschuldet, wodurch nur kleine Moleküle das aktive Zentrum erreichen können (86). **GPx-2** ist eng mit GPx-1 verwandt, kommt jedoch hauptsächlich im Gastrointestinaltrakt vor (87), während **GPx-3** überwiegend im Blutplasma und in anderen extrazellulären Flüssigkeiten lokalisiert ist (84).

Eine wichtige Rolle für den Schutz von Zellmembranen gegen oxidativen Stress spielt **GPx-4**. GPx-4 ist, im Gegensatz zu den meisten anderen GPx-Formen, als Monomer aktiv und erlaubt daher die Reaktion von großen Molekülen in seinem aktiven Zentrum. Daher ist GPx-4 in der Lage auch große Fettsäurehydroperoxide wie Phospholipid- oder Cholesterinhydroperoxide zu reduzieren (88). Es kommt in verschiedenen Isoformen hauptsächlich in den Mitochondrien und im Zytoplasma vor (84).

### 3.5 Hypothese und Zielsetzung der Arbeit

Eine vermehrte Produktion von ROS ist mit vielen Krankheitsbildern, beispielsweise Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Diabetes mellitus sowie Herz-Kreislauf-Erkrankungen, assoziiert (75). Andererseits werden ROS als wichtige Elemente in der intrazellulären Signaltransduktion benötigt, so unter anderem auch für die Insulin-Sensitivität. In der Zelle steht eine große Anzahl anti-oxidativer, ROS-inaktivierender Enzyme anderen Enzymen gegenüber, deren einzig bekannte Funktion die Produktion von ROS ist (NADPH-Oxidasen; (89)). Dies macht deutlich, wie präzise die Balance zwischen Bildung und Inaktivierung von ROS reguliert sein muss. Auch die ROS-vermittelten oxidativen Proteinmodifikationen werden heutzutage aus zwei Perspektiven betrachtet: Zum einen werden Proteincarbonylierungen als Teil bestimmter anti-oxidativer Signalkaskaden benötigt, andererseits kann zunehmende Carbonylierung zur Inaktivierung von Proteinen führen (60). Wir vermuten, dass eine begrenzte Proteincarbonylierung die zelluläre anti-oxidative Verteidigung steigern, während eine übermäßige Proteincarbonylierung die Zelle schädigen kann (Abb. 3).

Wo sich die Schwelle zwischen dem nutzbringenden und dem zellschädigenden Aspekt von Proteincarbonylierungen befindet, ist bis heute unklar. Daher ist es trotz dieses Wissens nicht bekannt, ob Proteincarbonylierungen zur Entwicklung von diabetischer Nephropathie



**Abb. 3: Arbeitshypothese.**

Hyperglykämie führt über reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Metall-katalysierte Oxidation (MCO) zur Carbonylierung von Proteinen. Carbonylierung an wenigen speziellen Aminosäuren eines Proteins (links) kann Transkriptionsfaktoren (TF) oder anti-oxidative Enzyme aktivieren. Diese Modifikationen vermitteln Schutz vor erhöhtem oxidativen Stress und können Teil der reversiblen Redoxregulation sein. Übermäßige Carbonylierung an einem Protein führen hingegen zu seiner Degradation (rechts). Dies beeinflusst die normalen Zellfunktionen und ist schädigend für die Zelle.

beitragen oder einen wichtigen Signalmechanismus für die Regulation anti-oxidativer Mechanismen in der Niere darstellen. Diese Arbeit soll neue Erkenntnisse zum Beitrag von Proteincarbonylierungen in der Entwicklung der diabetischen Nephropathie gewinnen. Daher werden folgende Aspekte betrachtet:

- **Untersuchung der Proteincarbonylierung während der Entwicklung der diabetischen Nephropathie:**

Proteincarbonylierung wird in den Nieren von Typ I diabetischen *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäusen und Typ II diabetischen db/db-Mäusen verschiedenen Alters untersucht, um Proteincarbonylierung in verschiedenen Stadien der diabetischen Nephropathie quantifizieren zu können. Die hauptsächliche Lokalisation carbonylierter Proteine in der Niere wird in diesen Tieren bestimmt.

- **Analysen der Expression und Aktivität der GPx-1 und GPx-4 in der Niere:**

Im Fokus steht das anti-oxidative Enzym GPx-1, das vermutlich eine wichtige Rolle bei der Reduktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in der Niere spielt. Daher wird speziell die GPx-1-Expression und Aktivität sowie der potentielle Einfluss einer GPx-1-Carbonylierung auf diese Parameter während der Pathogenese der diabetischen Nephropathie in den verwendeten Tiermodellen analysiert. Parallel dazu wird auch die Expression der GPx-4, der zweiten wichtigen GPx-Isoform in der Niere, analysiert.

- **Einfluss der diabetischen Stoffwechsellage auf anti-oxidative Schutzmechanismen in den Zellen der Glomeruli:**

Die Auswirkungen diabetischer Bedingungen auf glomeruläre Endothelzellen, Mesangiumszellen und Podozyten sollen untersucht werden. Dabei liegt der Fokus auf den Podozyten. Die Effekte einer Hyperglykämie auf Proteincarbonylierung, GPx-Expression und Aktivität werden in einer Podozyten-Zelllinie untersucht, die unter hyperglykämischen Bedingungen kultiviert wird.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Diabetische Tiermodelle

Die Nieren von Typ I diabetischen *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäusen und nicht-diabetischen Wurfgeschwistermäusen als entsprechende Kontrolltiere im Alter von 1, 3, 6 und 8 Monaten wurden freundlicherweise von Prof. Hans-Peter Hammes und Nadine Dietrich (V. Medizinische Klinik, Universitätsklinikum Mannheim) zur Verfügung gestellt. Es wurden nur männliche Tiere verwendet.

Typ II diabetische db/db-Mäuse des Stammes B6.BKS(D)-Lepr<sup>db</sup>/J und heterozygote Zuchttiere wurden von Prof. Martina Muckenthaler und Dr. Sandro Altamura (Klinik für Kinderheilkunde III, Universitätsklinikum Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Die Nieren von weiblichen 30 Wochen alten db/db-Mäusen mit Hämochromatose wurden ebenfalls freundlicherweise von Prof. Muckenthaler zur Verfügung gestellt.

Die Nieren von männlichen, Sul121-behandelten db/db und nicht-diabetischen Kontrollmäusen im Alter von 18 Wochen stammen von Prof. Rob Henning und Dr. Leo Deelman (Department for Clinical Pharmacy and Pharmacology, University Medical Center Groningen, Niederlande). Die Behandlung dieser Tiere des Stammes BKS.Cg-Dock7<sup>m</sup>+/+Lepr<sup>db</sup>/J mit Sul121 (Sulfateq, Groningen, Niederlande) bzw. einer Salzlösung erfolgte durch Dr. Deelman in Groningen, Niederlande.

Die Entnahme der Nieren von db/db und nicht-diabetischen Mäusen erfolgte nach ordnungsgemäßer Tötungsanmeldung nach §4 Tierschutzgesetz (Referenznummer T25/14). Dazu wurden die Mäuse mit CO<sub>2</sub> getötet. Anschließend wurde durch Herzpunktion etwa 0,5 ml Blut entnommen und in ein 1,3 ml Reaktionsgefäß überführt, das gebrauchsfertig mit EDTA benetzt ist (Sarstedt, Nümbrecht, 41.1504.005). Die Blutproben wurden bis zur Messung des HbA1c-Wertes bei -20°C gelagert. Der HbA1c-Wert wurde mittels HPLC von Dr. Thomas Fleming (Klinik für Endokrinologie, Stoffwechsel und Klinische Chemie, Universitätsklinikum Heidelberg) ermittelt. Die Nieren wurden sofort nach Entnahme in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bis zur Erstellung von Gewebeschnitten oder Organhomogenaten bei -80°C gelagert.

### 4.2 Zellkultur

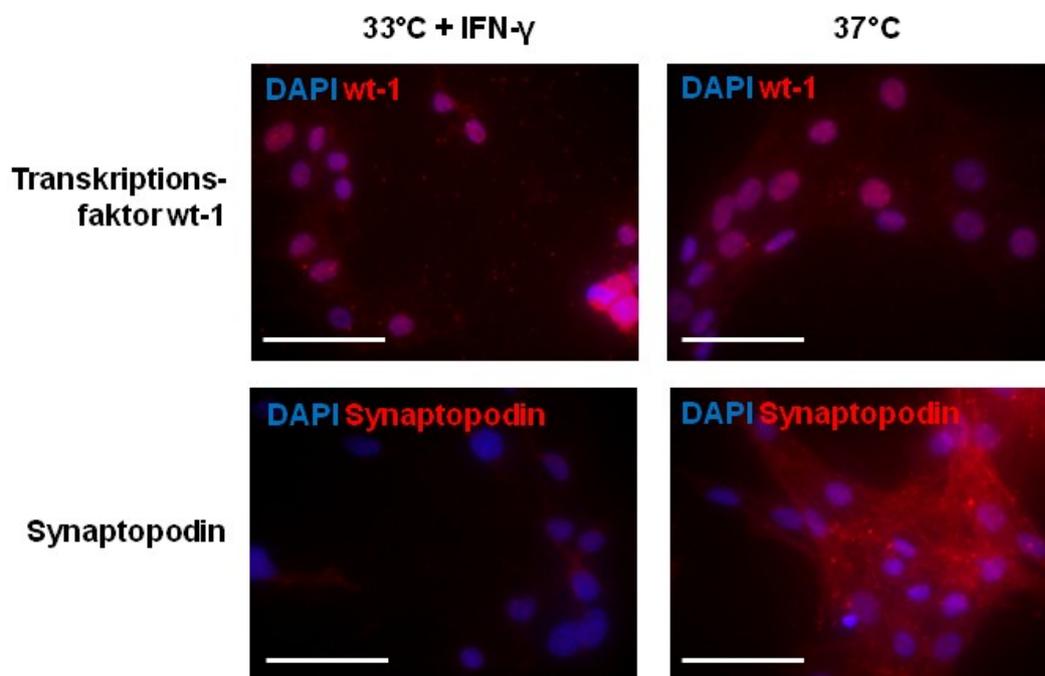
Für die Versuche mit Podozyten wurde die Zelllinie E11 (Cell line services, Eppelheim, 400494) verwendet. Diese Zellen verfügen über eine temperatursensitive Variante des SV40 T-Antigens unter der Kontrolle eines IFN- $\gamma$  induzierbaren Promoters. Die Kultivierung

dieser Zellen findet daher bei 33°C mit Zugabe von 10 U/ml IFN- $\gamma$  (Biomol, Hamburg, 87389.20) statt, um die Proliferation der Zellen zu begünstigen. Für die Entwicklung zu ausdifferenzierten Podozyten wurden die Zellen im Anschluss 14 Tage bei 37°C weiter kultiviert. Dabei erfolgte dreimal pro Woche ein kompletter Austausch des Kulturmediums. Nach diesem Zeitraum wurde die Expression der typischen Podozytenmarkerproteine wt-1, Synaptopodin und  $\alpha$ -Actinin-4 mithilfe von spezifischen Antikörpern in immunfluoreszenten Färbungen überprüft (Abb. 4). Die Zellen wurden in RPMI-Medium (ohne Glucose, Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, 11879-020) unter Zugabe von 10% fötalem Kälberserum (FCS), 5 mM Glucose, 35 nM Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert. Für die Stimulation der Zellen wurde 20 mM Glucose bzw. 20 mM Mannitol als osmotische Kontrolle am 13. Tag der Zellen bei 37°C zugegeben und für 24 Stunden inkubiert. Methylglyoxal (Sigma-Aldrich, Steinheim, M0252, ~40% in H<sub>2</sub>O) zur Stimulation der Zellen stellte Dr. Thomas Fleming zur Verfügung. Die Konzentration der Lösung wurde von Dr. Fleming, nach Derivatisierung des Methylglyoxals mit 1,2-Diaminobenzol, durch Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung bestimmt und die Methylglyoxal-Konzentration mit H<sub>2</sub>O auf 1 M eingestellt. Fortan wurde die verdünnte Lösung bei -20°C gelagert und die Verwendung erfolgte für höchstens 4 Wochen. Für die Inhibierung des Proteasoms in der Podozyten-Zelllinie wurde Bortezomib (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) in einer Konzentration von 10 nM für 24 Stunden eingesetzt. Um die Podozyten bei reduzierten Eisen-Konzentrationen zu kultivieren, wurden sie für 24 Stunden mit dem Eisen-Chelator Deferoxaminmesylat (DFO, Sigma-Aldrich, D9533) in einer Konzentration von 10  $\mu$ M behandelt. Zugabe von Eisen ins Kulturmedium erfolgte über Stimulation der Zellen mit Nitrioltriessigsäure (Sigma-Aldrich, N0128) und 50  $\mu$ M Fe<sup>3+</sup> (FeNTA). Dabei wurde einer frischen Lösung aus 40 mM Nitrioltriessigsäure 10 mM FeCl<sub>3</sub> zugegeben und die Mischung durch einen 0,2  $\mu$ M-Filter steril filtriert. Alternativ wurden die Zellen für 24 Stunden mit 30  $\mu$ M Holotransferrin (Merck, Darmstadt, #616424-100MG) bzw. Apotransferrin (Sigma-Aldrich, T1147-100MG) behandelt.

### 4.3 Immunfluoreszenz-Färbungen

Zur Überprüfung der korrekten Differenzierung der Podozyten Zelllinie E11 in ausgereifte Podozyten bei 37°C wurden Markerproteine für reife Podozyten in den Zellen angefärbt. Dafür wurden die Zellen in PBS gewaschen und für 30 min in 1,5% Paraformaldehyd (PFA) in PBS fixiert. Danach wurden die Zellmembranen durch fünfminütige Inkubation in 0,3% TritonX100 in PBS permeabilisiert. Nach mehreren Waschschritten wurden unspezifische Antikörperbindungsstellen für 1 Stunde mit 5% bovinem Serumalbumin (BSA) in PBS

blockiert. Anschließend erfolgte eine Färbung der Antigene mit Antikörpern gegen die Podozyten-Markerproteine wt-1,  $\alpha$ -Actinin-4 und Synaptopodin (Tab. 1) für 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Während wt-1 in allen Zellen mit podozytischem Ursprung exprimiert wird, ist Synaptopodin nur in ausdifferenzierten Podozyten vorhanden (Abb. 4). Nach dem erneuten Waschen der Zellen mit PBS wurden spezifische, mit einem Fluorophor markierte Zweitantikörper für eine Stunde zugegeben. Zur besseren Orientierung wurden die Zellkerne mit 4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI, invitrogen, Karlsruhe, D1306, 0,5  $\mu$ g/ml, 8 min) angefärbt. Nach gründlichem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit Mowiol (Calbiochem, Sandhausen, 475904) und einem Deckgläschen bedeckt und bis zur mikroskopischen Analyse bei 4°C im Dunkeln gelagert.



**Abb. 4: Differenzierung der Podozyten Zelllinie E11.**

Die Zellen wurden entweder bei 33°C unter Zugabe von 10 U/ml Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) oder für 14 Tage bei 37°C ohne Zugabe von IFN- $\gamma$  kultiviert. Die Expression der Markerproteine wt-1 und Synaptopodin wurde mittels Immunfluoreszenz-Färbung überprüft. Wt-1 ist sowohl in undifferenzierten als auch in differenzierten Podozyten in den Zellkernen lokalisiert. Das zytoplasmatische, Aktin-assoziierte Protein Synaptopodin ist nur in differenzierten Podozyten exprimiert. Der Größenbalken entspricht 100  $\mu$ m.

## Material und Methoden

---

**Tab. 1: Verwendete Antikörper für Zell- und Gewebefärbungen.**

Für immunfluoreszente Zellfärbungen wurden die Antikörper wie angegeben in 5% BSA in PBS verdünnt. Für histologische Färbungen von Nierengewebe wurden die Antikörper wie angegeben in 7% BSA, 5% Ziegen Serum und 0,1% Triton X100 in PBS verdünnt. (HRP = Meerrettich-Peroxidase)

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller und Bestellnummer</b>	<b>Eingesetzte Verdünnung</b>
$\alpha$ -Actinin-4	Adipogen, AG-25T-0107	1:300
CD 31	Santa Cruz, SC-18916	1:50
DNP	Invitrogen, A6430	1:100
DNP-AlexaFluor488	Invitrogen, A11097	1:100
GPx-1	GeneTex, GTX116040	1:100
GPx-4	abcam, ab125066	1:100
PDGFRB	LifeSpan BioSciences Inc, LS-C106587	1:50
Synaptopodin	Santa Cruz, SC-21537	1:50
Wt-1	Santa Cruz, SC-192	1:50
<b>Sekundäre Antikörper:</b>		
anti-Kaninchen-AlexaFluor488	Dianova, 712-545-153	1:100
anti-Kaninchen-Cy3	Dianova, 711-166-152	1:100
anti -Ratte-Dylight549	Dianova, 712-505-153	1:100
anti -Ziege-Cy3	Dianova, 711-166-147	1:100
anti -Ziege-Cy5	Dianova, 711-175-147	1:100
anti-Kaninchen-HRP	Dako, P0448	1:100

### 4.4 Immunhistologische Färbungen

Um Zielstrukturen und Proteine spezifisch in der Niere lokalisieren zu können, wurden immunhistologische Färbungen durchgeführt. Dazu wurden 5  $\mu$ m dicke Schnitte von kryokonservierten Nieren angefertigt und bis zur Färbung bei -80°C gelagert. Dann wurden die Schnitte bei Raumtemperatur aufgetaut und für 10 min getrocknet. Anschließend erfolgte eine Fixierung des Gewebes durch Inkubation des Objektträgers in eiskaltem Aceton für 5 min. Die Objektträger wurden in PBS gespült und unspezifische Antikörperbindungsstellen für 30 min mit einer Blockierlösung aus 7% BSA, 5% Ziegen Serum und 0,1% Triton X100 in PBS blockiert. Anschließend wurden spezifische Primärantikörper verdünnt zugegeben (siehe Tab. 1) und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer auf den Schnitten inkubiert. Für

Fluoreszenzfärbungen erfolgte nach drei Waschschritten (PBS) eine Inkubation mit Fluorophor-konjugierten Zweitantikörpern für eine Stunde bei Raumtemperatur auf den Gewebeschnitten. Nach drei weiteren Waschschritten und einer Färbung der Zellkerne mit DAPI wurden die Schnitte mit Mowiol und einem Deckgläschen bedeckt und bis zur mikroskopischen Analyse bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Für immunhistochemische Färbungen wurden die Gewebeschnitte nach der Inkubation des Primärantikörpers ebenfalls dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 30 min inkubiert, um die Aktivität endogener Peroxidasen zu blockieren. Nach gründlichem Waschen wurde für 30 min ein mit Meerrettich-Peroxidase (HRP)-konjugierter Zweitantikörper zugegeben und nach erneutem Waschen durch Zugabe des Enzymsubstrates Diaminobenzidin für 2 min visualisiert. Die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt und die Schnitte mit dem wässrigen Eindeckmedium Faramount (Dako, Bollscheil, S3025) und einem Deckgläschen bedeckt.

### 4.5 Periodsäure-Schiff-Reaktion (PAS)

Diabetische Nephropathie ist histologisch durch eine fokale segmentale Glomerulosklerose mit einer Expansion der extrazellulären Matrix assoziiert. Die PAS-Reaktion wird zum Nachweis dieser Glykoprotein-reichen extrazellulären Matrix verwendet. Die Färbeintensität liefert wichtige morphologische Hinweise auf das Ausmaß der Nephropathie.

Für die PAS-Färbung wurden 5 µm dicke Schnitte von kryokonservierten Nieren angefertigt und für 4-7 Tage bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden die Präparate mit Reinstwasser gespült und 5 min mit 0,5%iger Periodsäure-Lösung behandelt. Dadurch wurden 1,2-Glykole zu Aldehydgruppen oxidiert. Die Präparate wurden dann 3 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen und in Reinstwasser gespült. Durch die Zugabe von Schiffs Reagenz (fuchsin-schwefelige Säure, Merck, 1.09033) für 15 min reagierten die Aldehyde mit dem Reagenz in einer roten Farbreaktion. Die Schnitte wurden erneut gewaschen und die Zellkerne für 2 min mit einer Hämatoxylin-Lösung gegengefärbt. Nach dem erneuten Waschen der Schnitte für 3 min unter fließendem Leitungswasser folgte die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Danach wurde Eukitt (Kindler GmbH, Freiburg) auf die Gewebeschnitt aufgetropft und dann ein Deckglas aufgelegt.

### 4.6 Protein-Aufarbeitung

Um Proteine aus kultivierten Zellen zu isolieren, wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, mit einem Zellschaber abgekratzt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 1.100 g und 4°C für 5 min um die Zellen zu pelletieren. Das Pellet wurde in 200 µl Homogenisierungspuffer (Tab. 6) resuspendiert und die Proteine anschließend durch Ultraschall aufgeschlossen. Hierfür wurden die Zellen 3 x 10 sec sonifiziert (UP50H Ultraschallprozessor, Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow) und zwischen den Durchläufen jeweils für mindestens 30 sec auf Eis gekühlt. Im Anschluss erfolgte eine weitere Zentrifugation der Zellhomogenate für 5 min bei 1.100 g und 4°C. Die Überstände wurden abgenommen und bei -80°C gelagert.

Um Proteine aus dem Nierenkortex zu isolieren, wurden ca. 20 mg Gewebe zusammen mit 190 µl Homogenisierungspuffer in einem kleinen Glaspotter (Spezialanfertigung, Glasbläserei, Universität Heidelberg) gründlich zerdrückt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation des Homogenates für 5 min bei 1.100 g und 4°C. Die Überstände wurden abgenommen und bei -80°C gelagert.

### 4.7 Messung von Protein-Konzentrationen

Die Protein-Konzentration von Zell- und Nierenhomogenaten wurde mit Hilfe des Bradford-Assays bestimmt (90). Dieser Assay basiert auf der Bildung von Komplexen zwischen dem roten Farbstoff Brilliantblau und den Proteinen in der Probe. Diese Komplexbildung bewirkt eine Verschiebung des Licht-Absorptionsmaximums von 465 zu 595 nm. Die Menge der Lichtabsorption ist proportional zur Protein-Menge in der Probe. Die Farbreaktion ist abhängig vom Gehalt an aromatischen und an basischen Aminosäuren wie z.B. Arginin.

Für die Messung wurden die Proben 1:100 bis 1:1.000 verdünnt und 80 µl des verdünnten Proteinhomogenates mit 200 µl Bradford-Reagenz (Bio-Rad, München, 500-0006, 1:5 verdünnt) in einer 96-well-Platte vermischt. Unter Zuhilfenahme einer Protein-Standardreihe (5, 10, 15, 20 und 30 µg/ml) erfolgte dann die Bestimmung der Proteinkonzentration anhand der Lichtabsorption bei 595 nm.

### 4.8 GPx-Aktivitätsassay

Die GPx-Aktivität in Organ- und Zellysaten wurde nach dem von Günzler *et al.*, 1974 (91) beschriebenen Verfahren bestimmt, in dem indirekt die Oxidation von NADPH zu NADP<sup>+</sup> durch die Glutathion-Reduktase und die damit einhergehende Abnahme der Lichtabsorption bei 340 nm gemessen wird. Es wurden 10 µg Protein aus Nierenhomogenaten bzw. 75 µg Protein aus Podozytenhomogenaten verwendet. Die zu bestimmende Probe wurde mit 1 U/ml Glutathion-Reduktase, 100 nM GSH (Sigma-Aldrich, 9001-48-3 und G4251) und 25 nM NADPH (Biomol, CAS 606-68-8) vermischt und zu einem Gesamtvolumen von 100 µl pro

Probe aufgefüllt. Der Assay wurde durch Zugabe von jeweils 10 µl 0,25% Cumolhydroperoxid-Lösung gestartet. Dann wurde über 10 min alle 30 sec die Lichtabsorption bei 340 nm gemessen. Die Abnahme der Absorption ist proportional zur Oxidation von NADPH zu NADP<sup>+</sup>. Die GPx-Aktivität lässt sich dann durch folgende Formel berechnen:

$$\text{GPx-Aktivität} = \frac{\Delta \text{Absorption } 340 \text{ nm} \times \frac{1}{\text{min}}}{0.00373 \text{ } \mu\text{M} \times 10^{-1}} \times \text{Verdünnung der Probe}$$

### 4.9 SDS-Polyacrylamid Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

SDS-PAGE ist eine Methode, um Proteine in einem elektrischen Feld nach ihrer Größe aufzutrennen. Dazu wurden die Proteine zunächst durch Hitze und durch Bindung von Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert. Dies führte zur Bildung von negativ geladenen Protein-SDS-Komplexen. Die Proteine migrierten dann in einem elektrischen Feld durch eine Gel-Matrix, in dem die Beweglichkeit der Proteine proportional zu ihrer Größe abnimmt. In Folge wandern kleine Proteine schneller durch die Gel-Matrix als große Proteine.

In dieser Studie wurde ein diskontinuierliches System aus zwei Gelen, einem Trenngel (unten) und einem Sammelgel (oben) verwendet, die sich beide im Hinblick auf den pH, die Ionenstärke und die Porengröße unterscheiden. Für das Trenngel wurden in einer wässrigen Lösung 10 oder 12% Acrylamid, 0,3% Bisacrylamid, 0,4 M Tris-HCl (pH 8,8), 0,1% SDS und 0,1% APS vorbereitet. Die Zugabe von 0,1% TEMED führte zur Polymerisierung des Acrylamids. Das Sammelgel bestand aus 4% Acrylamid, 0,1% Bisacrylamid, 62 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,1% SDS, 0,1% APS und 0,1% TEMED. Vor der Polymerisation des Trenngels wurde ein Kamm mit der benötigten Anzahl an Taschen hinzugefügt. Die Proteinproben (10-15 µg Protein pro Probe) wurden dann mit 4-fach SDS Probenpuffer (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, K929.1) vermischt und 5 min bei 95°C denaturiert. Die Proben wurden anschließend, neben einer Protein-Standard-Mischung (Bio-Rad, 161-0374), in die Taschen des Gels aufgetragen. An das Gel wurde eine Spannung von 80 V angelegt, bis die Proteine in das Trenngel migriert waren. Anschließend erfolgte die Auftrennung des Proteingemischs (120 V, 90 min).

### 4.10 Western Blot

Um bestimmte Proteine in einem Zell- oder Gewebehomogenat detektieren und quantifizieren zu können, wurden die Proteine nach Auftrennung durch SDS-PAGE mittels *semi-dry* Western Blot auf eine PVDF-Membran mit 0,2 oder 0,45 µm Porengröße (Merck,

## Material und Methoden

---

IPVH00010, bzw. ISEQ00010) übertragen. Diese Membran wurde dann mit Antikörpern gegen die zu bestimmenden Proteine inkubiert und diese in einer lumineszenten Reaktion visualisiert.

Zunächst wurde hierzu die PVDF-Membran für 5 min in Methanol aktiviert und anschließend mit Wasser gewaschen. Dann wurden jeweils von unten nach oben zwei in Blot-Puffer getränkte Filterpapiere (Neolab, Heidelberg, 2-4325), die aktivierte PVDF-Membran, das Gel und zwei weitere Blotting-Filterpapiere in einer Blotkammer (Trans-Blot Turbo, Bio-Rad) gestapelt. Eine Spannung von 25 V (bei max. 1 mA) wurde für 30 min (bei 0,75 mm Geldicke) bzw. für 60 min (bei 1,5 mm Geldicke) angelegt. Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran wurde diese für mindestens eine Stunde in Block-Lösung (5% BSA, 0,05% Tween20, PBS) inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungsstellen zu blockieren. Erstantikörper wurden üblicherweise über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler (Intelli-Mixer RM2-L, LTF Labortechnik) inkubiert (Tab. 2). Die Membran wurde dann dreimal 5 min mit TBST + 0,05% Tween20 gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe des HRP-konjugierten Zweitantikörpers für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nachdem die Membran wie zuvor gewaschen wurde, konnten die vom Antikörper gebundenen Proteine durch Zugabe eines HRP-Substrats über ein lumineszentes System (ImageQuant LAS 4000 mini, GE Healthcare) detektiert und quantifiziert werden.

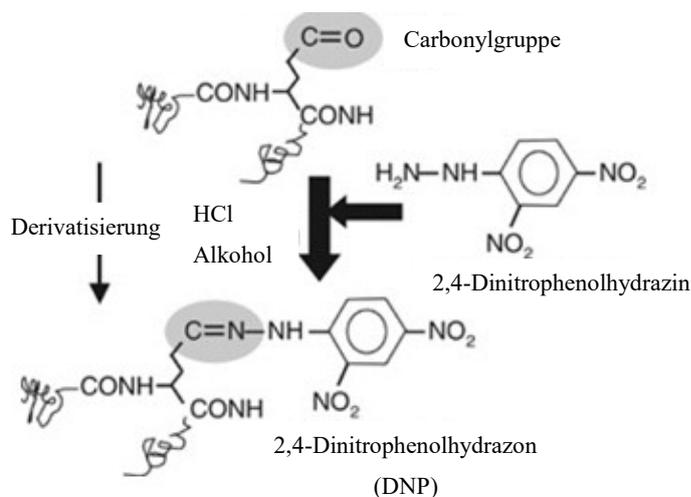
**Tab. 2: Verwendete Antikörper für Western Blot.**

Die Antikörper wurden in Block-Lösung (5% BSA, 0,05% Tween20, PBS) verdünnt (HRP = Meerrettich-Peroxidase).

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller und Bestellnummer</b>	<b>Eingesetzte Verdünnung</b>
β-Aktin	abcam, ab6276	1:5.000
DNP	Invitrogen, A6430	1:2.500
GPx-1	GeneTex, GTX116040	1:1.000
GPx-4	abcam, ab125066	1:2.000
Peroxiredoxin II	Abfrontier, LF-MA0144	1:2.000
CuZnSOD	abcam, ab16831	1:1.000
MnSOD	Enzo Life Sciences, ADI-SOD110	1:1.000
<b>Sekundäre Antikörper:</b>		
anti-Kaninchen-HRP	Sigma-Aldrich, A6154	1:5.000
anti-Maus-HRP	Sigma-Aldrich, A4416	1:5.000

#### 4.11 Detektion von carbonylierten Proteinen

Die Detektion und Quantifizierung von Carbonylgruppen erfolgte über eine Derivatisierung mit 2,4-Dinitrophenolhydrazin (DNPH). DNPH derivatisiert spezifisch Carbonylgruppen durch einen nukleophilen Angriff auf das positiv geladene Carbonyl-Kohlenstoffatom (Abb. 5). Dabei ersetzt DNPH die Carbonylgruppe und wird zu Dinitrophenolhydrazon (DNP). Mit Hilfe von spezifisch gegen DNP-gerichteten Antikörpern können so carbonylierte Proteine mit der Western Blot-Methode und auch in immunohistologischen Färbungen nachgewiesen werden.



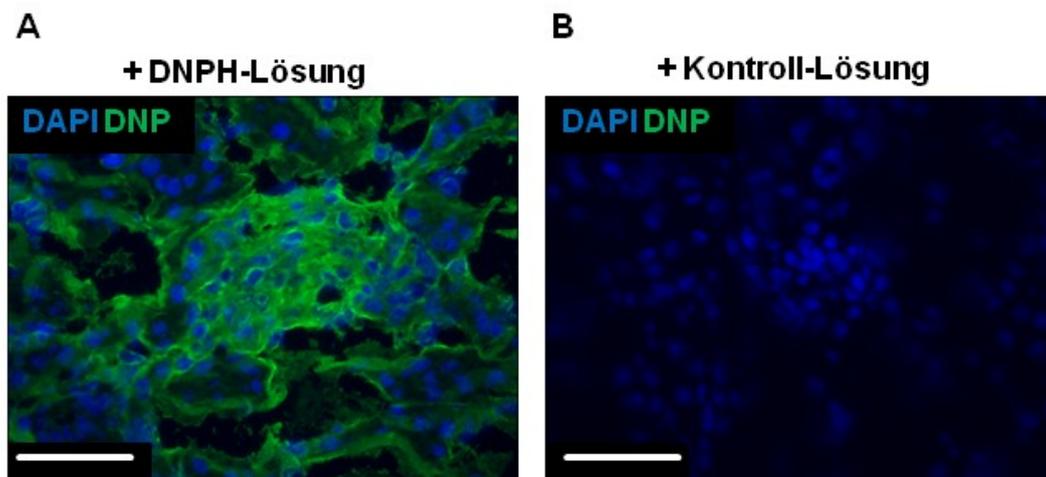
**Abb. 5: Derivatisierung von Carbonylgruppen mit 2,4-Dinitrophenolhydrazin (DNPH).**  
(Modifiziert nach (185))

##### 4.11.1 Western Blot-Methode (Oxyblot)

Zur Quantifizierung von carbonylierten Proteinen mittels OxyBlot wurden 10 µg Protein mit dem Oxyblot Protein Detektionskit (Merck, S7150) gemäß den Herstellerangaben derivatisiert. Dazu wurden die Proteine zunächst durch Zugabe von 6% SDS denaturiert und 15 min bei Raumtemperatur mit der sauren, DNPH-enhaltenden Derivatisierungslösung bzw. einer Kontroll-Lösung behandelt. Anschließend wurde eine Neutralisationslösung zugegeben um den pH-Wert der Probe zu neutralisieren. Um das Volumen der Proben zu reduzieren, erfolgte anschließend eine Ethanol-Präzipitation der Proteine. Dazu wurde das 4-fache Volumen der Probe an eiskaltem Ethanol zugegeben und die Probe 10 min auf Eis inkubiert. Die Proben wurden dann bei 20.800 g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Die Überstände wurden vorsichtig abgenommen und das Protein-Pellet für 10 min bei 37°C getrocknet. Anschließend wurden die Proteine in 10 µl 2 x Ladepuffer aufgenommen und gründlich resuspendiert. Die Proben wurden für 5 min bei 95°C aufgekocht und wie beschrieben für SDS-PAGE und Western Blot verwendet (Kapitel 0 und 4.10).

### 4.11.2 Immunohistologische Färbung

Für die Lokalisation von carbonylierten Proteinen im Nierengewebe wurden 5 µm dicke Kryoschnitte angefertigt und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Dann wurden die Schnitte bei Raumtemperatur aufgetaut und für 10 min getrocknet. Anschließend erfolgte eine Fixierung des Gewebes durch Inkubation des Objektträgers in eiskaltem Aceton für 5 min. Die Objektträger wurden dann in PBS gespült und carbonylierte Proteine mit DNPH derivatisiert. Dazu erfolgte eine Inkubation mit einer Derivatisierungslösung bzw. einer Kontroll-Lösung (beides Oxyblot Protein Detektionskit) 1:100 in PBS verdünnt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Gewebe. Danach wurde die Lösung entfernt und unspezifische Antikörperbindungsstellen für mindestens 30 min mit einer Blockierlösung aus 7% BSA, 5% Ziegen Serum und 0,1% Triton X100 in PBS blockiert. Die weitere Färbung mit einem anti-DNP-Antikörper erfolgte wie in Kapitel 4.4 angegeben. Die Spezifität des anti-DNP-Antikörpers wurde durch Färbung auf Schnitten, die mit der Kontroll-Lösung behandelt wurden, überprüft (Abb. 6).



**Abb. 6: Nachweis der Spezifität der DNP-Färbung in der Niere diabetischer Mäuse.**

(A) Positiver Nachweis von carbonylierten Proteinen in einem Glomerulus einer 30 Wochen alten diabetischen db/db Maus nach Derivatisierung mit DNPH. (B) Die Negativkontrolle ohne Derivatisierung zeigt die Spezifität des anti-DNP-Antikörpers. Der Größenbalken entspricht 50 µm.

### 4.12 Nachweis von freien Radikalen (oxidativer Stress)

Zur Detektion von oxidativem Stress in Podozyten wurden Zellen in einer 12-well-Platte kultiviert (greiner bio-one, Frickenhausen, 665180). Nach vollendeter Differenzierung zu reifen Podozyten wurden die Zellen für 30 min bei 37°C in 5 µM Dichlorodihydrofluorescein Diacetat (DCFH-DA, ThermoFisher Scientific, D-399, gelöst in DMSO) prä-inkubiert. Zwei

Proben verblieben als Blindwert ohne DCFH-DA. DCFH-DA ist als Essigsäureester membranpermeabel und wird intrazellulär von Esterasen in Dichlorodihydrofluorescein (DCFH) gespalten. DCFH wird durch  $H_2O_2$ , Peroxinitrit oder Hydroxyl- und Peroxi-Radikale zum grün-fluoreszierenden Fluorophor oxidiert (92). Nach einer 30-minütigen Vorinkubation für die Aufnahme von DCFH-DA in die Zelle, wurden dem Zellkulturmedium für eine Stunde weitere Stimuli zugegeben. Anschließend wurden die Zellen gründlich mit PBS gewaschen und die Fluoreszenzintensität der Zellen als Lichtemission bei 538 nm nach Absorption von Licht mit 485 nm Wellenlänge mit einem Fluoreszenzplattenleser (Fluoroskan Ascent, Thermo Fisher Scientific) gemessen. Die in den Blindwerten gemessene Autofluoreszenz der Zellen wurde bei der Auswertung von den gemessenen Werten abgezogen.

### 4.13 siRNA-vermittelte Depletion von GPx-1

Um die Proteinmenge an GPx-1 in Podozyten zu reduzieren, wurden undifferenzierte Podozyten zu  $5 \times 10^4$  Zellen/Well in einer 6-well-Platte ausgesät und zur Differenzierung bei  $37^\circ C$  weiter kultiviert. Nach 72 Stunden erfolgte die erste Transfektion mit siRNA gegen GPx-1 (Sigma-Aldrich, SASI\_Mm02\_00313265) bzw. einer Kontroll-siRNA (Dharmacon, Lafayette, D-001206-13-05). Hierzu wurde  $1 \mu g$  siRNA mit Optimem (gibco, 11058-021) auf ein Volumen von  $100 \mu l$  aufgefüllt. Außerdem wurden  $8 \mu l$  Transfektionsreagenz (Santa Cruz, sc-29528) in  $100 \mu l$  Optimem verdünnt. Die siRNA wurde durch vorsichtiges Pipettieren mit dem verdünnten Transfektionsreagenz vermischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Podozyten wurden einmal mit  $1 ml/Well$  Optimem gewaschen. Dann erfolgte die Zugabe von  $800 \mu l$  Optimem in jedes Well, zusammen mit dem verdünnten Transfektionsreagenz und der siRNA. Die Zellen wurden 7 Stunden bei  $37^\circ C$  inkubiert, bevor  $1 ml$  RPMI mit 20% FCS zugegeben wurde. Nach 24 Stunden erfolgte ein Austausch des Mediums. 48 Stunden nach der ersten Transfektion wurden die Zellen erneut wie beschrieben transfiziert. Eine Analyse der GPx-1-Proteinmengen erfolgte 4 Tage nach der ersten Transfektion der Zellen und betrug üblicherweise 60 - 70% der GPx-1-Proteinmengen der mit einer willkürlichen siRNA transfizierten Zellen. Mittels qRT-PCR wurden die GPx-1 mRNA-Mengen 24 Stunden nach der ersten Transfektion der Zellen analysiert.

### 4.14 mRNA-Isolation

Die mRNA-Isolation erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, 74106), nachdem die kultivierten Podozyten einmal in PBS gewaschen und mit RLT-Puffer, dem 1%  $\beta$ -Mercaptoethanol zugesetzt wurde, lysiert wurden. Die Zellen wurden dann mit demselben

Volumen 70% Ethanol vermischt und von der Kultivierungsoberfläche abgekratzt. Nach dem Pipettieren der Lysate auf die RNA-Säulen wurde die RNA entsprechend der Herstellervorgaben mehrmals gewaschen. Zuletzt wurde die RNA in 20 µl RNase freiem Wasser eluiert und bei -80°C gelagert.

### 4.15 cDNA-Synthese

Die Konzentration der isolierten RNA wurde photometrisch gemessen (NanoDrop ND1000, NanoDrop Technologies) und 1 µg RNA mit Hilfe des Omniscript RT Kit (Qiagen, 205111) in cDNA umgeschrieben. Dies erfolgte durch Zugabe von OligodT Primern (Promega GmbH, Mannheim, C110A), dNTPs, einem RNase Inhibitor (Promega GmbH, N251B) und reverser Transkriptase zu der mRNA und durch eine anschließende Inkubation von 1 Stunde bei 37°C. Dann wurden die Proben 1:5 verdünnt und bei -20°C gelagert.

### 4.16 Quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

qRT-PCR erlaubt einen Vergleich von bestimmten cDNA-Mengen in verschiedenen Proben. Dazu wurde SYBR Green verwendet, das spezifisch an doppelsträngige DNA (dsDNA) bindet und sich in diesem Zustand durch ein fluoreszentes Signal messen und quantifizieren lässt. Da die Menge dsDNA mit jedem PCR-Zyklus erhöht wird, nimmt die SYBR Green-Fluoreszenz entsprechend zu. Am Ende der Analyse wird der *cycle threshold* (ct-)Wert bestimmt, der die benötigte Anzahl an PCR-Zyklen angibt, die benötigt werden bis das fluoreszente SYBR Green-Signal die Hintergrund-Fluoreszenz überschreitet. Dieser liegt umso niedriger, je mehr cDNA des Ziel-Gens in der zu bestimmenden Probe vorhanden war. Anschließend wird die Differenz des ct-Wertes der Proben zum ct-Wert einer nichtstimulierten Kontrolle errechnet ( $\Delta$ ct).

Um etwaige Unterschiede bei der Menge der eingesetzten cDNA in den Proben auszugleichen, wurde der gemessene  $\Delta$ ct-Wert der Proben ins Verhältnis mit den  $\Delta$ ct-Werten des *Housekeeping*-Gens GAPDH derselben Proben gesetzt. Dies geschah nach folgender Formel:

$$\text{Verhältnis} = \frac{2^{\Delta ct \text{ Probe}}}{2^{\Delta ct \text{ GAPDH}}}$$

Zur Überprüfung der GPx-1-Depletion wurde die GPx-1-mRNA in den Zellen mittels qRT-PCR quantifiziert und auf GAPDH-Transkription normalisiert. Dazu wurde 50 ng cDNA mit 2 x SYBR Green (Qiagen, 204145) und mit den entsprechenden *forward* und *reverse* Primern (Tab. 3) gemischt. Alle Messungen wurden in Duplikaten durchgeführt und die ct-Werte mit

einem Thermocycler (Rotor-Gene Q, Qiagen) gemäß den nachfolgend genannten Programmen gemessen (Tab. 4 und 5).

**Tab. 3: Verwendete Primer für qRT-PCR.**

Primer	Sequenz (5' → 3') bzw. Bestellnummer	Endkonzentration
GAPDH <i>forward</i>	GAC CAC AGT CCA TGC CAT CAC TGC	1 pmol/μl
GAPDH <i>reverse</i>	ATG ACC TTG CCC ACA GCC TTG G	1 pmol/ μl
GPx-1 ( <i>forward</i> und <i>reverse</i> )	Qiagen, QT01195936	1:10 Verdünnung

**Tab. 4: PCR-Programm für die Vervielfältigung der GPx-1 cDNA via qRT-PCR.**

Dauer	Temperatur
15 min	95°C
15 sec	94°C
30 sec	55°C
30 sec	72°C

} 40 Zyklen

**Tab. 5: PCR-Programm für die Vervielfältigung der GAPDH cDNA via qRT-PCR.**

Dauer	Temperatur
15 min	95°C
15 sec	94°C
25 sec	60°C
30 sec	72°C

} 35 Zyklen

#### **4.17 Bestimmung der intrazellulären Glucose, Methylglyoxal und GSH-Konzentrationen**

Die Messung intrazellulärer Konzentrationen für Glucose, Methylglyoxal und GSH erfolgte nach Stimulation der Zellen mit verschiedenen Substanzen für 24 Stunden. Anschließend wurden die Zellen einmal gewaschen, mit Trypsin von der Zellkulturschale abgelöst, durch Zentrifugation bei 1.000 g pelletiert und ein weiteres Mal gewaschen. Für die Bestimmung der GSH-Konzentrationen wurden dann  $3 \times 10^6$  Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Messung bei -80°C gelagert. Für die Bestimmung von intrazellulären Glucose und

Methylglyoxal-Konzentrationen wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in 0,1 M Natrium Acetat (pH 4,0; 0,1% TritonX100) resuspendiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die GSH-Messungen wurden von Nadine Volk (Klinik für Endokrinologie, Stoffwechsel und Klinische Chemie, Universitätsklinikum Heidelberg) und die Glucose- und Methylglyoxal-Messungen von Dr. Thomas Fleming durchgeführt.

### 4.18 Zell-Vitalitätstest

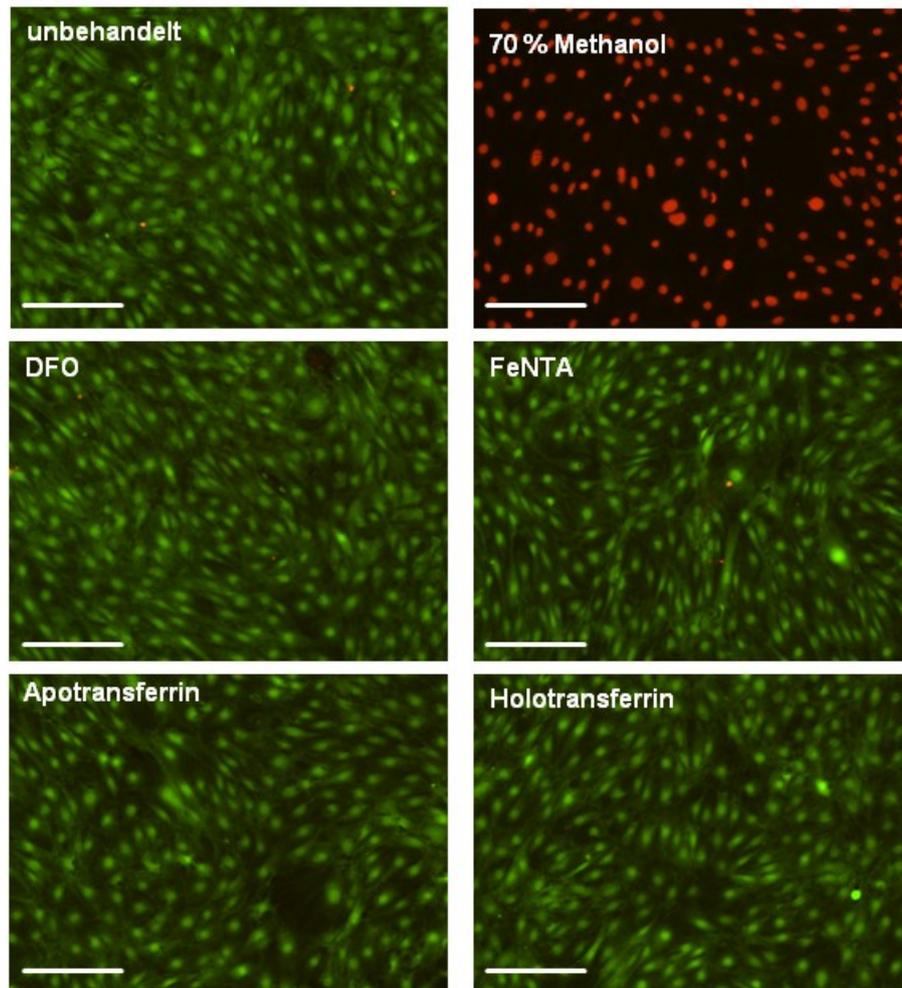
Um das Überleben der Podozyten nach Stimulation mit verschiedenen Substanzen zu überprüfen, wurde ein Vitalitätstest durchgeführt (LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit, Thermo Fisher Scientific, L3224). Dieser basiert auf der Färbung der Zellen mit Calcein AM und Ethidium homodimer-1 (Eth-D1). Calcein AM wird in lebenden Zellen durch ubiquitäre Esterase-Aktivität zum grün-fluoreszenten Calcein gespalten. Eth-D1 kann nur in Zellen mit beschädigter Zellmembran eindringen und zeigt eine 40-fache Zunahme an Fluoreszenz im roten Lichtbereich, wenn es an DNA gebunden ist. Dadurch werden speziell die Zellkerne toter Zellen mit Eth-D1 rot angefärbt.

Die Zellen wurden zu Beginn des Assays nach der Stimulation der Zellen mit verschiedenen Substanzen für die gewünschten Zeitspannen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 10 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  in RPMI-Medium, das  $2 \mu\text{M}$  Calcein AM und  $8 \mu\text{M}$  Eth-D1 enthielt. Nach der Zugabe von frischem Medium wurden die Zellen mikroskopisch untersucht.

Um sicherzustellen, dass von veränderten Eisenkonzentrationen keine toxische Effekte auf Podozyten ausgehen, wurden die Zellen 24 Stunden mit DFO, FeNTA oder Transferrin stimuliert und anschließend wie oben beschrieben für den Vitalitätstest angefärbt (Abb. 7).

### 4.19 Quantitative Bestimmung der GPx-1-Carboxylierung

Es wurde ein Assay entwickelt, um die Carboxylierung von GPx-1 in Zell- oder Nierenhomogenaten zu quantifizieren. Dazu wurde zunächst in eine entsprechende Anzahl an Wells einer 96-well-Platte mit mittlerer Proteinbindungskapazität (Corning, Kaiserslautern, 3591) ein Bindungspuffer (Tab. 6) mit  $1 \mu\text{g/ml}$  von einem GPx-1/2-Antikörper (Santa Cruz, sc-133152) bzw. einem Kontroll-IgG-Antikörper (Cell Signaling, Danvers, CS#5415S) zugegeben und bei  $4^{\circ}\text{C}$  über Nacht inkubiert. Nach der Entfernung des Bindungspuffers erfolgte eine Zugabe von 1% BSA in PBS für 90 min. Danach wurden die Carbonylgruppen



**Abb. 7: Effekt von Eisenchelation oder Steigerung der Eisenkonzentration auf die Vitalität kultivierter Podozyten.**

Podozyten wurden für 24 h entweder mit einer Mischung aus Nitrilotriessigsäure und  $\text{Fe}^{3+}$  (FeNTA, 50  $\mu\text{M}$ ), 10  $\mu\text{M}$  Deferoxamin (DFO), 30  $\mu\text{M}$  Apotransferrin oder Holotransferrin stimuliert oder für 30 min mit 70% Methanol behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit Calcein AM und Ethidium homodimer 1 (EthD-1) gefärbt. Metabolisch aktive Zellen erscheinen grün, Zellen mit beschädigter Zellmembran werden rot angefärbt. Die Bilder sind repräsentativ für 2 unabhängige Versuche. Der Größenbalken entspricht 200  $\mu\text{m}$ .

in jeweils 2,5  $\mu\text{g}$  Zell- oder Gewebehomogenaten mit DNPH derivatisiert wie unter Kapitel 4.11.1 beschrieben. Nach der Derivatisierung wurde das Volumen der Proben mit 1% BSA in PBS auf 50  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und in Duplikaten in den Wells der 96-well-Platte für 90 min inkubiert. Anschließend fanden 3 Waschschrte mit PBS + 0,05% Tween20 statt und anschließend die Zugabe eines mit AlexaFluor488-konjugierten anti-DNP-Antikörpers (invitrogen, A11097) für 2 Stunden und 1:250 in 1% BSA in PBS verdünnt. Nach weiteren Waschschrten erfolgte für 1 Stunde die Zugabe eines Kaninchen-spezifischen AlexaFluor488-konjugierten Zweitantikörpers (Dianova, Hamburg, 711-546-152) 1:250 in

## Material und Methoden

---

1% BSA in PBS verdünnt. Nach einem erneuten Waschschrift wurde in jedes Well 50  $\mu$ l PBS gegeben und die Fluoreszenz der einzelnen Wells an einem Fluoreszenzplattenleser ermittelt. Dazu fand eine Messung der Lichtemission bei 538 nm nach Absorption von Licht mit 485 nm Wellenlänge statt.

### 4.20 Chemikalien und Lösungen

Tween20, Tris, BSA, Acrylamid, Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethylethylendiamin (TEMED) wurden von der Carl Roth GmbH bezogen. EDTA stammte von Appllichem, Darmstadt und SDS von der Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg.

Glucose wurde von der Merck GmbH und Mannitol von Sigma-Aldrich verwendet. Desweiteren stammt auch PFA, Cumolhydroperoxid,  $\beta$ -Mercaptoethanol, Natriumselenit, Ziegenserum, Aminoguanidiniumhydrochlorid, Dithiothreitol (DTT), Pefabloc, Leupeptin, Pepstatin A und TritonX100 von Sigma-Aldrich.

FCS, Trypsin-EDTA, Penicillin/Streptomycin und PBS wurden von Thermo Fisher Scientific bezogen.

### 4.21 Puffer

Die verwendeten Puffer sind in Tabelle 6 aufgeführt.

**Tab. 6: Übersicht über verwendete Puffer.**

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Homogenisierungspuffer	25 mM Tris-HCl (pH 7,4) 0,55% KCl 1 mM EDTA 2,5 mM Glucose Vor Benutzung wurden 0,1 mM DTT, 80 $\mu$ g/ml Pefabloc, 6 $\mu$ g/ml Pepstatin A und 6 $\mu$ g/ml Leupeptin frisch zugegeben.
Lauf-Puffer (SDS-PAGE)	25 mM Tris-HCl (pH 8,3) 192 mM Glycin 3,5 mM SDS

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Blotting-Puffer (Western Blot)	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% SDS 10% Methanol
Bindungspuffer (GPx-1 Carbonylierungsassay)	10 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 40 mM NaHCO <sub>3</sub> pH auf 9,2 eingestellt

#### **4.22 Bild-Auswertungen**

Quantifizierung von Proteinbanden im Western Blot erfolgte mit dem Open-Source-Programm ImageJ, Version 1.47v.

Mit ImageJ, Version 1.47v wurden auch Immunfluoreszenz-Aufnahmen ausgewertet. Hierzu wurde zunächst von allen Bildern ein konstanter, der Hintergrundfluoreszenz entsprechender Helligkeitswert abgezogen. Anschließend erfolgte eine Bestimmung des verbleibenden Durchschnittshelligkeitswertes der Bildpunkte in einer gewählten Region von Interesse (z.B. einem Glomerulus in der Niere). Bei immunhistochemischen Bildern wurde zunächst die Farbe von Interesse durch einen Farb-*threshold* ausgewählt. Von dieser Farbe wurde dann in einer Region von Interesse der durchschnittliche Bildpunktwert bestimmt.

#### **4.23 Statistische Tests**

Statistische Test wurden von Versuchen mit mindestens 3 unabhängigen Replikaten durchgeführt und die Ergebnisse wurden als Durchschnitt und Standardfehler des Durchschnitts angegeben. Sofern nicht anders angegeben, wurde der zweiseitige t-Test für statistische Analysen verwendet. Ergebnisse mit einem p-Wert < 0,05 wurden als signifikant angesehen.

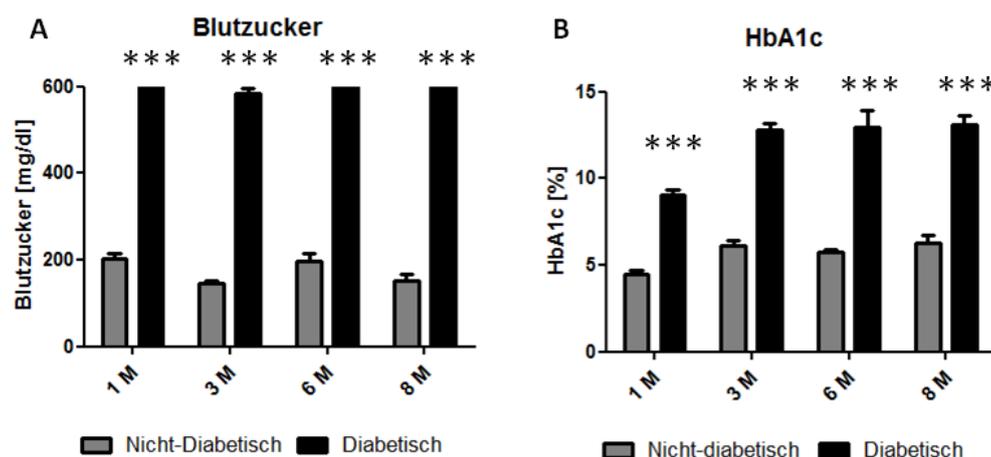


## 5 Ergebnisse

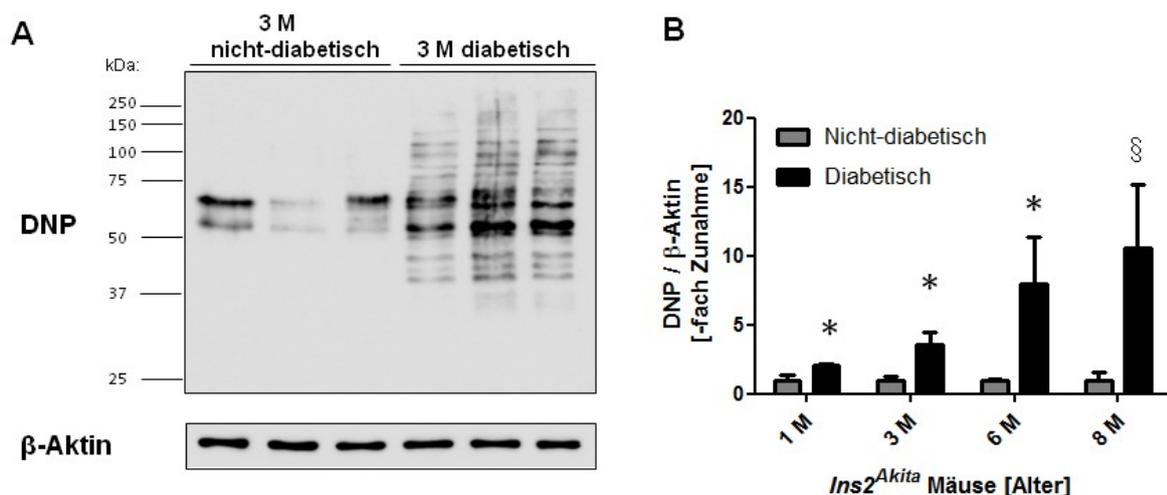
Durch oxidativen Stress können Proteine, DNA oder Lipide modifiziert werden. So führt die Reaktion von Wasserstoffperoxid mit Metallionen wie z.B.  $\text{Fe}^{2+}$  zur Bildung von Hydroxyl ( $\text{OH}\cdot$ )-Radikalen (Fenton-Reaktion). Ein direkter oxidativer Angriff dieser Radikale an bestimmten Aminosäuren von Proteinen bedingt deren Carbonylierung (93). Ziel dieser Arbeit ist es, die Bedeutung dieser Proteincarbonylierungen während des Krankheitsverlaufs im Mausmodell der diabetischen Nephropathie zu untersuchen.

### 5.1 Proteincarbonylierung in den Glomeruli diabetischer *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäuse

*Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäuse sind charakterisiert durch einen raschen Anstieg der Blutzuckerkonzentration und sehr hohe HbA1c-Werte (Abb. 8). Um die Relevanz der Carbonylierung von Proteinen während der Ausprägung einer diabetischen Nephropathie in diesen Tieren einzuschätzen, wurde zunächst die Gesamtmenge carbonylierter Proteine in den Nieren unterschiedlich alter, männlicher Mäuse untersucht. Bei dieser Quantifizierung mithilfe eines OxyBlot genannten, modifizierten Western Blots zeigten sich klare, altersabhängige Unterschiede (Abb. 9). So konnte bereits in Nierenkortex-Lysaten von nur 4 Wochen alten diabetischen Mäusen eine Verdopplung der Proteincarbonylierung im Vergleich zu gleichaltrigen nicht-diabetischen Tieren nachgewiesen werden. Dieser Unterschied nahm mit zunehmendem Alter deutlich und signifikant zu. Bei 3 Monate alten Tieren entsprach er einem Faktor von 4, bei 6 Monate alten Mäusen Faktor 6 und bei 8 Monate alten Tieren Faktor 8 (Abb. 9).



**Abb. 8: Erhöhter Blutzuckerspiegel und HbA1c-Anteil bei unterschiedlich alten *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäusen.** Bestimmung von (A) Blutzucker und (B) Anteil von glykosyliertem Hämoglobin (HbA1c) am Gesamthämoglobin männlicher *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäuse verschiedenen Alters. Der Messbereich des verwendeten Blutzuckermessgeräts endet bei 600 mg/dl. Die Daten wurden von Nadine Dietrich, V. medizinische Klinik, Universitätsklinikum Mannheim zur Verfügung gestellt. n=3-6. \*\*\*p<0,001 (zweifaktorieller Anova mit Bonferroni-Posttest).



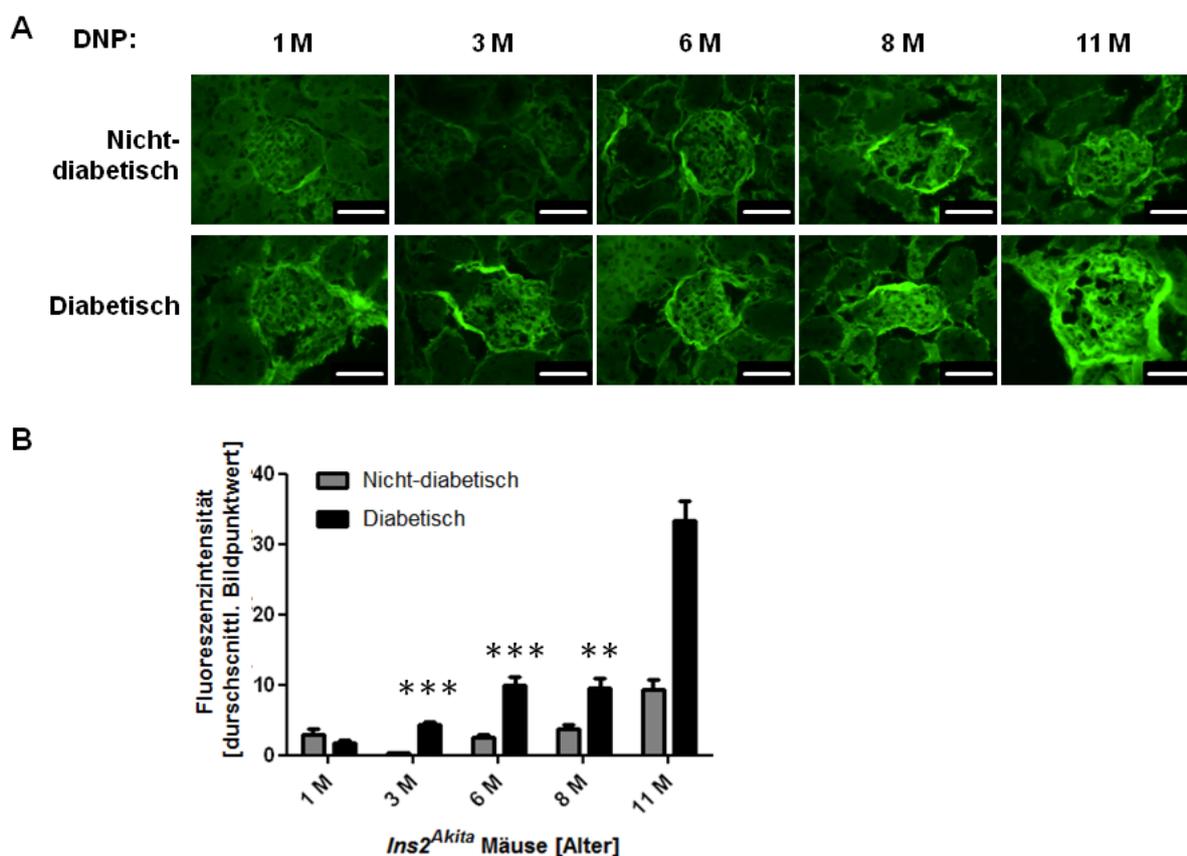
**Abb. 9: Nachweis der gesteigerten Proteincarbonylierung in Homogenaten des Nierenkortex von diabetischen *Ins2*<sup>Akita</sup>-Mäusen.**

Carbonylgruppen in Nierenkortexhomogenaten von nicht-diabetischen und diabetischen *Ins2*<sup>Akita</sup> Mäusen verschiedenen Alters wurden mit 2,4-Dinitrophenolhydrazin (DNPH) versetzt. Nachdem die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet worden waren, erfolgte die Detektion der derivatisierten carbonylierten Proteine mit einem anti-Dinitrophenylhydrazon (DNP)-Antikörper. (A) Repräsentativer OxyBlot der Homogenate von 3 Monate alten diabetischen und nicht-diabetischen Tieren. Für die Normalisierung der aufgetragenen Proteinmenge pro Probe wurde  $\beta$ -Aktin verwendet. (B) Statistische Zusammenfassung der Ergebnisse der Quantifizierung. n=6 (1, 3 und 6 M) bzw. n=3 (8 M). M = Monat. \*p<0,05 vs. nicht-diabetische gleichaltrige Tiere.  $\S$ p<0,05 vs. 1 M diabetisch.

Dieser mittels OxyBlot nachgewiesene altersabhängige Unterschied in der Gesamtmenge an carbonylierten Proteinen konnte auch auf histologischer Ebene durch Färbung der entsprechenden Nierendünnschnittpräparate belegt werden. Hier war die Carbonylierung in den Glomeruli von 3, 6 und 8 Monate alten Tieren im Vergleich zu gleichaltrigen nicht-diabetischen Tieren ebenfalls signifikant erhöht (Abb. 10). Außerhalb der Glomeruli konnte sowohl in diabetischen als auch in nicht-diabetischen Tieren nur eine geringere Färbungsintensität nachgewiesen werden.

### 5.2 Proteincarbonylierung in Podozyten und Mesangiumszellen diabetischer *Ins2*<sup>Akita</sup>-Mäuse

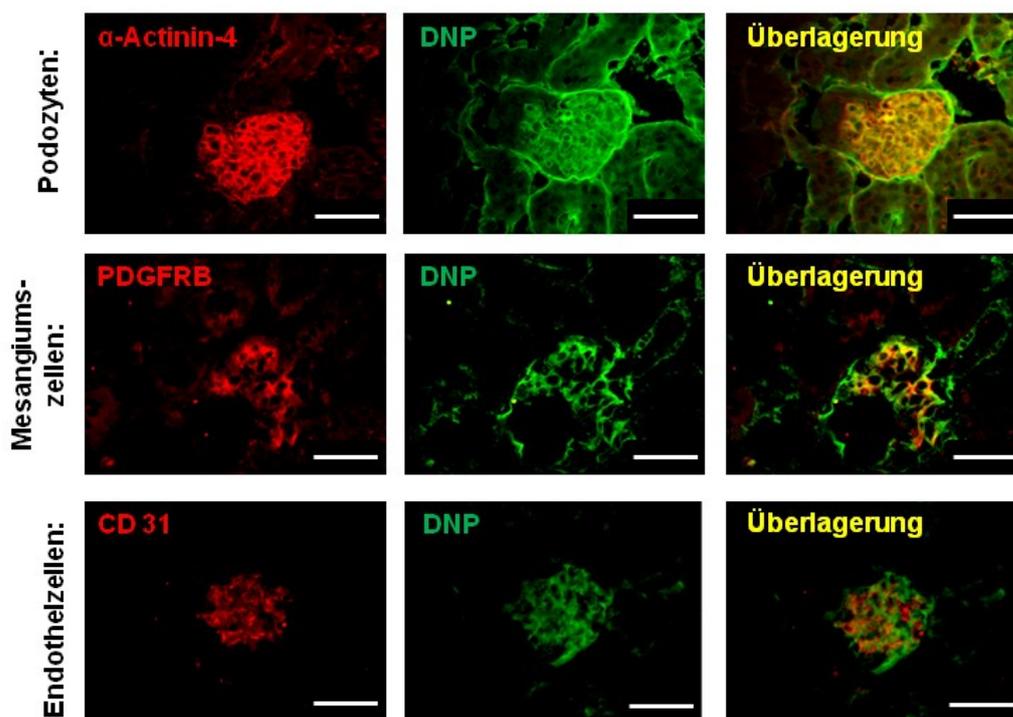
Im Inneren der Glomeruli von diabetischen *Ins2*<sup>Akita</sup>-Mäusen war histologisch eine erhöhte Fluoreszenzintensität als Maß für die Proteincarbonylierungen nachweisbar. In der Folge sollte untersucht werden, in welchen glomerulären Zelltypen carbonylierte Proteine vorrangig detektiert werden können. Hierfür erfolgte zunächst die Färbung der carbonylierten Proteine



**Abb. 10: Histologischer Nachweis einer gesteigerten Proteincarbonylierung in den Glomeruli von *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäusen.**

Proteincarbonylgruppen in Nierendünnschnittpräparaten von nicht-diabetischen und diabetischen *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäusen verschiedenen Alters wurden mit DNPH *in situ* derivatisiert und anschließend mithilfe des anti-DNP-Antikörpers und der Fluoreszenzmikroskopie lokalisiert. (A) Repräsentative Aufnahmen von Glomeruli der verschiedenen Mäuse; der Größenbalken entspricht 50  $\mu$ m. (B) Statistische Zusammenfassung der detektierten Fluoreszenzintensitäten. n=3 Tiere pro Gruppe mit >8 untersuchten Glomeruli pro Tier. 11 M: n=1 Tier mit 15 untersuchten Glomeruli. M = Monat. \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 vs. nicht-diabetische Kontrolltiere.

wie gehabt und anschließend eine Inkubation mit Antikörpern gegen Antigene, die spezifisch für Podozyten, Mesangiumszellen bzw. Endothelzellen sind. Abb. 11 zeigt, dass hauptsächlich Podozyten und Mesangiumszellen eine vermehrte Proteincarbonylierung aufwiesen. In den glomerulären mikrovaskulären Endothelzellen hingegen konnten mit dieser Technik keine carbonylierten Proteine detektiert werden.

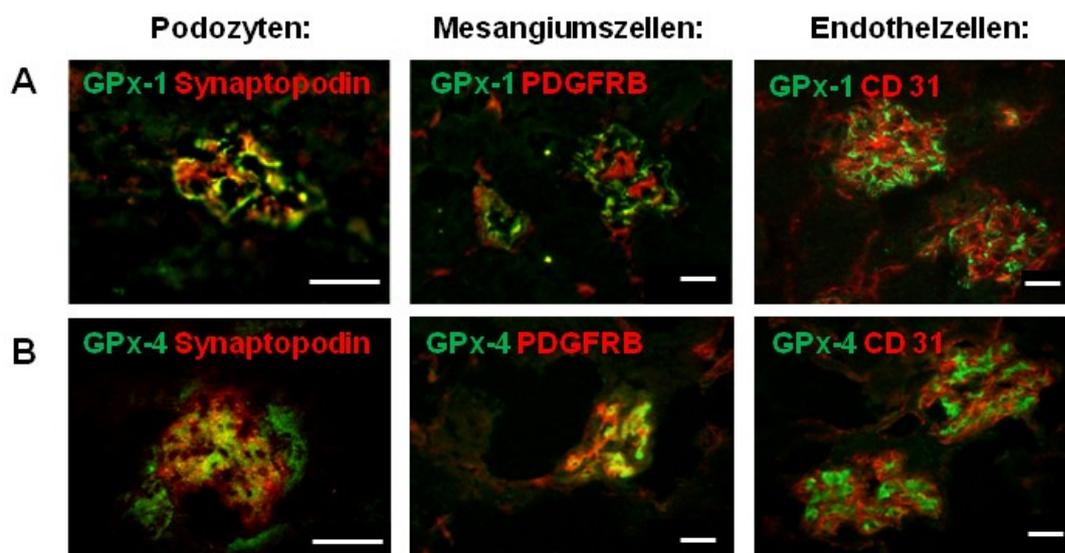


**Abb. 11: Nachweis von carbonylierten Proteinen in Podozyten und Mesangiumszellen in Nierengewebeschnitten diabetischer *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäuse.**

Proteincarbonylgruppen in Nierendünnschnittpräparaten von 3 Monate alten *Ins2<sup>Akita</sup>* Mäusen wurden mit DNPH derivatisiert und anschließend mit einem fluoreszenten anti-DNP-Antikörper detektiert. Die Schnitte wurden außerdem mit Antikörpern gegen Markerproteine von Podozyten ( $\alpha$ -Actinin-4), Mesangiumszellen (PDGFRB, *platelet-derived growth factor receptor  $\beta$* ) oder Endothelzellen (CD 31, PECAM-1) gefärbt und anschließend Bilder mit einem konfokalen Mikroskop aufgenommen. Repräsentative (n=6) Aufnahmen typischer Glomeruli diabetischer *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäuse sind abgebildet. Der Größenbalken entspricht 50  $\mu$ m.

### 5.3 GPx-1 und GPx-4-Expression in Podozyten und Mesangiumszellen diabetischer *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäuse

Um herauszufinden, ob nicht nur die Carbonylierung als Folge von oxidativem Stress in den Podozyten und Mesangiumszellen der diabetischen Mäuse verändert ist, sondern auch die Expression anti-oxidativer Enzyme beeinflusst wird, wurde die Menge und Lokalisation des anti-oxidativen Enzyms Glutathionperoxidase (GPx) analysiert. Eine gemeinsame Färbung für GPx-1 sowie Markerproteine für die verschiedenen glomerulären Zelltypen in den Nierendünnschnittpräparaten der *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäuse zeigte eine Kolokalisation von GPx-1 nur mit dem in Podozyten exprimierten Synaptopodin (Abb. 12A). In Endothelzellen und Mesangiumszellen ließ sich keine GPx-1-Expression nachweisen. Die Expression von GPx-4 konnte dagegen sowohl in Mesangiumszellen, durch Kolokalisation mit dem Markerprotein *platelet-derived growth factor receptor  $\beta$*  (PDGFRB), als auch in Podozyten, nicht jedoch in

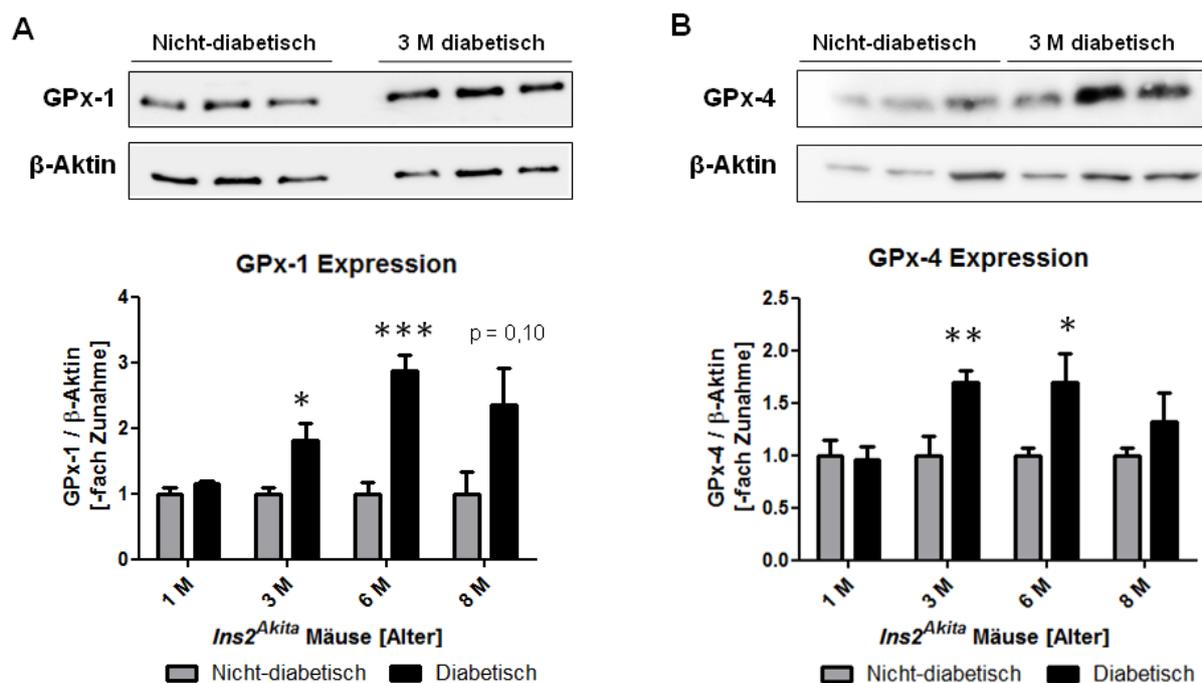


**Abb. 12: Lokalisation von GPx-1 und GPx-4 in unterschiedlichen glomerulären Zelltypen in Nierendünnschnittpräparaten diabetischer  $Ins2^{Akita}$ -Mäuse.**

Nierendünnschnittpräparate von 3 Monate alten  $Ins2^{Akita}$ -Mäusen wurden mit Antikörpern gegen (A) GPx-1 oder (B) GPx-4 sowie mit Antikörpern gegen Markerproteine von Podozyten (Synaptopodin), Mesangiumszellen (PDGFRB, *platelet-derived growth factor receptor*  $\beta$ ) oder Endothelzellen (CD 31, PECAM-1) gefärbt und mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Repräsentative (n=3) Aufnahmen typischer Glomeruli diabetischer  $Ins2^{Akita}$ -Mäuse sind abgebildet. Der Größenbalken entspricht 50  $\mu$ m.

den mikrovaskulären glomerulären Endothelzellen nachgewiesen werden (Abb. 12B). Die Expression von GPx-1 und GPx-4 in den Nieren diabetischer  $Ins2^{Akita}$ -Mäuse konnte daher den Podozyten und Mesangiumszellen in den Glomeruli zugeordnet werden.

Neben ihrer Lokalisation sollte auch die relative Menge von GPx-1 und GPx-4 in den Nieren der nicht-diabetischen bzw. diabetischen Mäuse untersucht werden. Dazu wurden Nierenkortexhomogenate mittels Western Blot analysiert (Abb. 13). In einen Monat alten Mäusen gab es keine quantitativen Unterschiede in der Expression von GPx-1 oder GPx-4. Bei drei bzw. sechs Monate alten diabetischen Mäusen war dagegen im Vergleich zu den nicht-diabetischen Tieren sowohl die GPx-1 als auch die GPx-4-Expression um den Faktor 1,7 bzw. 2,9 und 1,7 erhöht. In 8 Monate alten Tieren betrug die Zunahme nur noch Faktor 2,3 (GPx-1) bzw. 1,3 (GPx-4) und war nicht signifikant. Nichtsdestotrotz belegen diese Daten, dass die Expression der GPx-1 und der GPx-4 in den Nieren diabetischer  $Ins2^{Akita}$ -Mäuse mit zunehmendem Alter im Vergleich zu nicht-diabetischen Tieren deutlich erhöht ist.

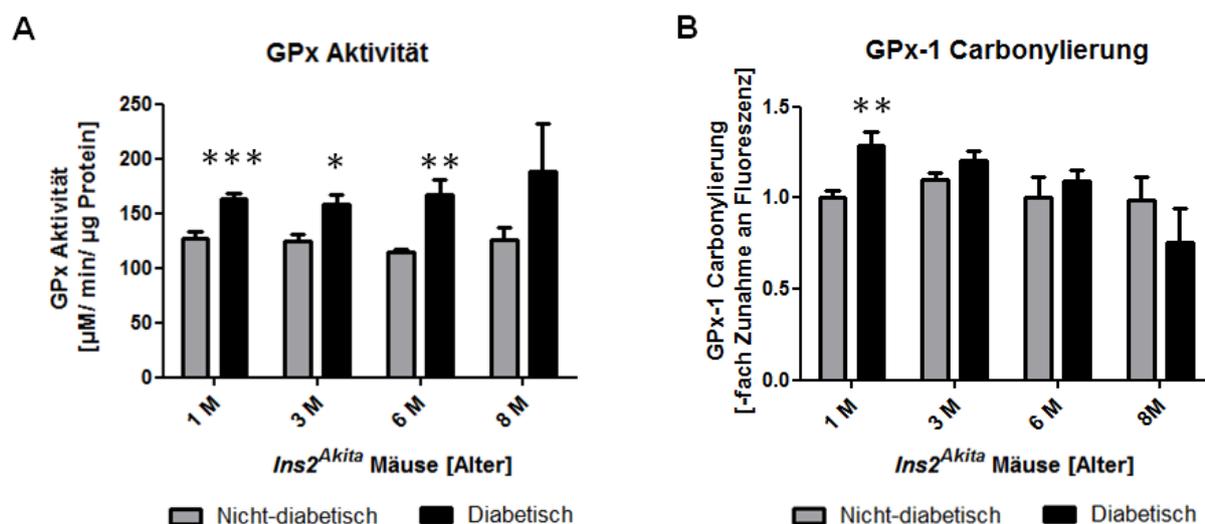


**Abb. 13: Die Menge von GPx-1 und GPx-4 in Nierenkortexhomogenaten diabetischer *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäuse ist altersabhängig deutlich erhöht.**

Proteine aus Nierenkortexhomogenaten von nicht-diabetischen und diabetischen *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäusen wurden durch SDS-PAGE separiert, geblottet und die relativen Proteinmengen von (A) GPx-1 und (B) GPx-4 mithilfe spezifischer Antikörper bestimmt. Repräsentative Western Blot-Ergebnisse für die Homogenate von 3 Monate alten Tieren sind oben abgebildet. Für die Normalisierung der aufgetragenen Proteinmenge pro Probe wurde  $\beta$ -Aktin verwendet. Die statistische Zusammenfassung ist unten dargestellt. n=6 (1, 3, 6 M) bzw. n=3 (8 M). M = Monate. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 vs. nicht-diabetische Kontrolltiere.

### 5.4 GPx-Aktivität in den Nieren von *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäusen

Da eine gesteigerte GPx-1 und GPx-4-Expression in den Nieren von älteren diabetischen *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäusen nachgewiesen werden konnte, sollte im Folgenden untersucht werden, ob diese Zunahme auf Proteinebene auch in einer gesteigerten GPx-Aktivität in den Nierenproben resultiert. Dazu wurden Proteinproben der Nieren von nicht-diabetischen und *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäusen in einem Assay mit Cumolhydroperoxid als GPx-Substrat untersucht (Abb. 14A). Eine gesteigerte GPx-Aktivität in den Nieren der diabetischen Mäuse konnte dabei in allen Altersgruppen nachgewiesen werden. Die Zunahme an GPx-Aktivität in den Nierenkortexhomogenaten von 1, 3, 6 und 8 Monate alten Tieren betrug jeweils gegenüber der Aktivität der gleichaltrigen nicht-diabetischen Tiere etwa 30–50%.



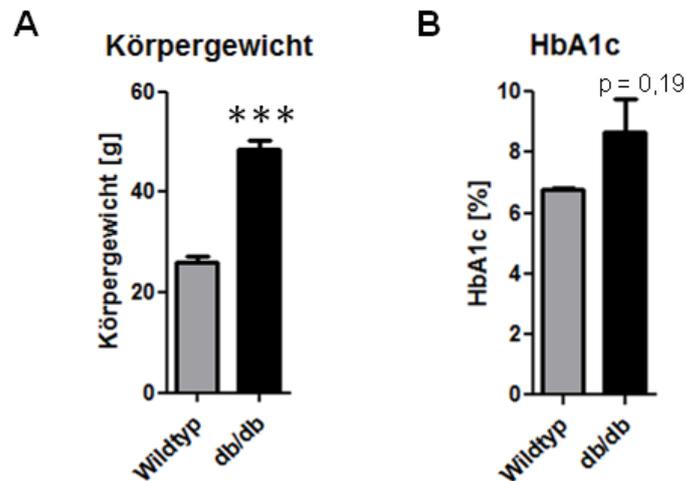
**Abb. 14: Gesteigerte GPx-Aktivität und GPx-1-Carbonylierung in Nierenkortexhomogenaten diabetischer *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäuse verschiedenen Alters.**

(A) Bestimmung der GPx-Aktivität in 10 µg Protein aus Nierenkortexhomogenaten. Die Messung basiert auf der Oxidation von NADPH zu NADP<sup>+</sup> und der damit einhergehenden Veränderung der Lichtabsorption bei 340 nm. n=6 (1, 3, 6 M) bzw. n=3 (8 M). (B) Messung der spezifischen GPx-1-Carbonylierung mithilfe einer ELISA-basierenden Methode. n=10 (1 M), 6 (3, 6 M) oder 3 (8 M). M = Monate. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 vs. nicht-diabetische Kontrolltiere.

In der Folge sollte untersucht werden, ob weitere Faktoren die GPx-Aktivität in den Nierenhomogenaten beeinflussen können. Vorarbeiten haben gezeigt, dass die Aktivität von rekombinanter GPx-1 durch *in vitro*-Carbonylierung deutlich um den Faktor 4 gesteigert werden kann (94). Daher wurde die Carbonylierung von GPx-1 in den Nieren der diabetischen Mäuse mithilfe eines Carbonylierungsassays (vergl. Kapitel 4.19) untersucht. Im Vergleich zu gleichaltrigen nicht-diabetischen Mäusen zeigte sich eine signifikante Zunahme der GPx-1-Carbonylierung nur in einem Monat alten diabetischen *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäusen (Abb. 14B). Bei 3, 6 und 8 Monate alten Tieren gab es hingegen keine signifikanten Unterschiede in der GPx-1-Carbonylierung zwischen den nicht-diabetischen und diabetischen Tieren.

### 5.5 GPx-Expression und Aktivität in der Niere von 18 Wochen alten diabetischen db/db-Mäusen

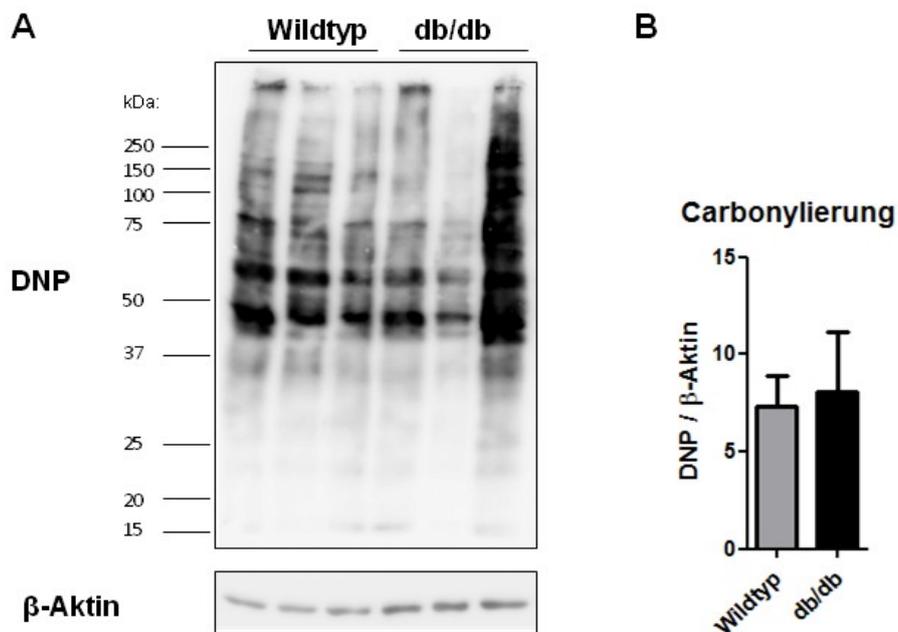
Um herauszufinden, ob es hinsichtlich der beobachteten altersabhängigen Veränderungen der GPx-Expression und Carbonylierung in Typ I diabetischen *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäusen einen Unterschied zu Typ II Diabetes-Mausmodellen gibt, wurden Analysen mit db/db-Mäusen durchgeführt.



**Abb. 15: Erhöhtes Körpergewicht und HbA1c-Anteil in 18 Wochen alten db/db-Mäusen.**

Bestimmung von (A) Körpergewicht und (B) Anteil von glykosyliertem Hämoglobin (HbA1c) am Gesamthämoglobin von 18 Wochen alten, männlichen db/db-Mäusen. Die HbA1c-Werte wurden von Dr. Thomas Fleming, Klinik für Endokrinologie, Stoffwechsel und Klinische Chemie, Universitätsklinikum Heidelberg gemessen. n=3-4. \*\*\*p<0,001 vs. nicht-diabetische Kontrolltiere.

Zunächst sollte analysiert werden, ob auch in diesem diabetischen Modell Unterschiede in der Proteincarbonylierung zwischen diabetischen und Wildtyp-Tieren nachweisbar sind. Im Alter von 18 Wochen zeigten die diabetischen db/db-Mäuse ein signifikant erhöhtes Körpergewicht



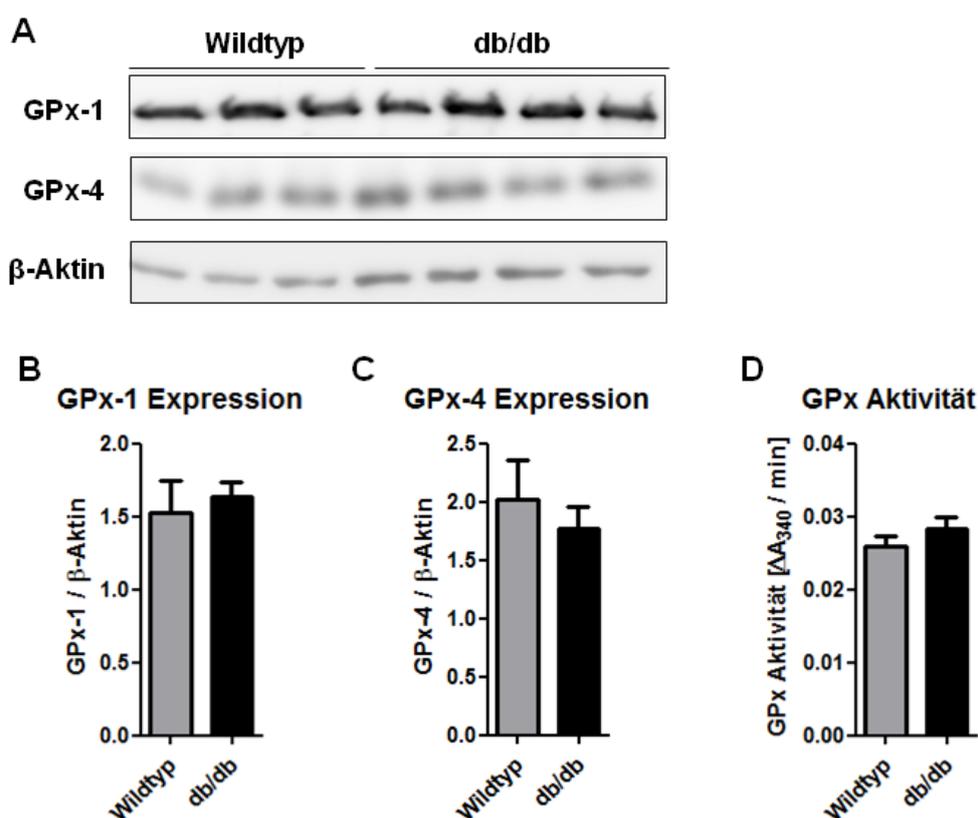
**Abb. 16: Nachweis vergleichbarer Mengen carbonylierter Proteine in Homogenaten des Nierenkortex von 18 Wochen alten Wildtyp und db/db-Mäusen.**

(A) Detektion carbonylierter Proteine in Nierenkortexhomogenaten von 18 Wochen alten nicht-diabetischen und diabetischen db/db-Mäusen durch die OxyBlot-Methode mit einem anti-DNP-Antikörper nach Auftrennung durch SDS-PAGE und entsprechendem Blotting. Für die Normalisierung der aufgetragenen Proteinmenge pro Probe wurde  $\beta$ -Aktin verwendet. (B) Quantifizierung der Menge carbonylierter Proteine. n=3.

von durchschnittlich 49 g, während das durchschnittliche Körpergewicht von nicht diabetischen Wildtyp-Mäusen 26 g betrug (Abb. 15A). Der Anteil an glykosyliertem Hämoglobin (HbA1c) am Gesamthämoglobin war bei den hier verwendeten db/db-Tieren leicht aber nicht signifikant erhöht (Abb. 15B).

Um das Ausmaß der renalen Proteincarbonylierung in den jeweiligen Tieren zu untersuchen, wurden Homogenate aus dem Nierenkortex dieser Mäuse mittels OxyBlot analysiert. Eine Quantifizierung der carbonylierten Proteine ergab in diesem Fall keinen eindeutigen Trend hin zu einer vermehrten Proteincarbonylierung in der Niere der db/db-Mäuse (Abb. 16).

Insofern sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob diese db/db-Mäuse möglicherweise über eine vermehrte Expression von anti-oxidativen Enzymen verfügen. Da das *Ins2<sup>Akita</sup>*-Modell darauf hindeutete, dass die GPx ein wichtiges Enzym für die Reduktion von Peroxiden in der Niere von diabetischen Tieren sein könnte, wurde auch bei den db/db-Tieren



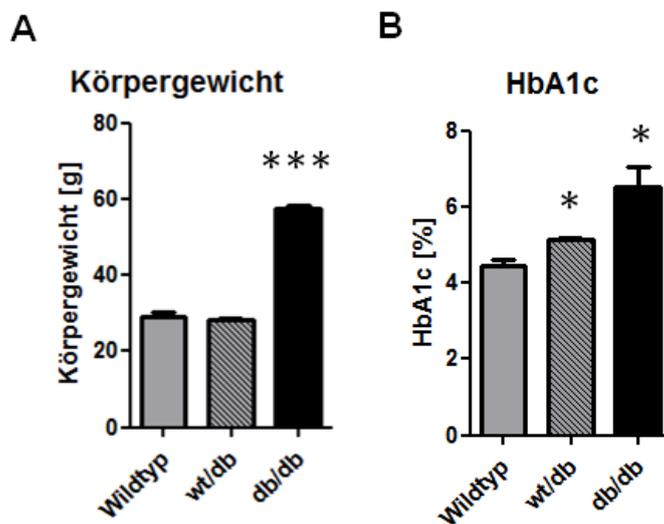
**Abb. 17: Unveränderte GPx-Expression und Aktivität in Nierenkortexhomogenaten von 18 Wochen alten nicht-diabetischen und Typ II diabetischen Mäusen.**

(A) Western Blot: Proteine aus Nierenkortexhomogenaten von nicht-diabetischen und diabetischen 18 Wochen alten db/db-Mäusen wurden mittels SDS-PAGE separiert, geblottet und die Proteinmengen von GPx-1 und GPx-4 mithilfe spezifischer Antikörpern bestimmt. (B und C) Quantifizierung der GPx-1 und GPx-4-Expression. Für die Normalisierung der aufgetragenen Proteinmenge pro Probe wurde  $\beta$ -Aktin verwendet. (D) Bestimmung der GPx-Aktivität in den Nierenkortexhomogenaten (10  $\mu$ g Protein/Probe). n=3-4.

die Expression von GPx-1 und GPx-4 untersucht (Abb. 17A bis C). Hier ließ sich in den Nieren im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen kein Unterschied in der Abundanz dieser antioxidativen Enzyme mittels Western Blot detektieren. Auch die GPx-Aktivität war in den Nierenhomogenaten der db/db-Mäuse gering aber nicht signifikant erhöht (Abb. 17D).

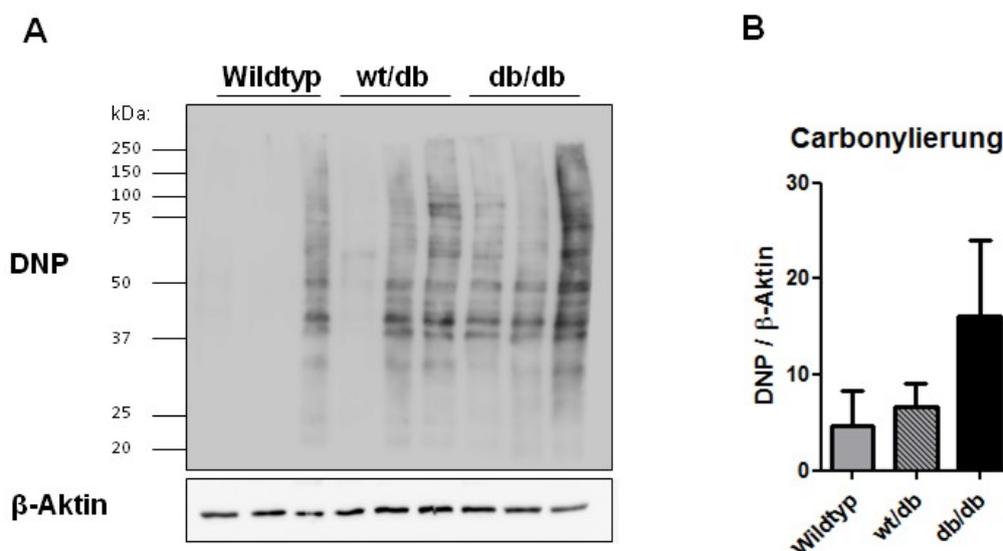
### 5.6 GPx-Expression und Aktivität in der Niere von 26 Wochen alten diabetischen db/db-Mäusen

Um zu überprüfen, ob db/db-Tiere erst im späteren Verlauf des Typ II Diabetes eine erhöhte Proteincarbonylierung oder veränderte GPx-Expression zeigen, wurden die Nieren von 26 Wochen alten db/db-Mäusen und nicht-diabetischen Wildtyp-Tieren verglichen. Außerdem wurden Tiere, die die Mutation im *OB-Rb*-Gen nur heterozygot aufweisen (wt/db), als nicht-diabetische Kontrollgruppe in die Analysen mit einbezogen. Die db/db-Tiere in diesem Alter hatten ein mittleres Körpergewicht von 57 g und waren damit gegenüber den Wildtyp- oder heterozygoten Tieren, die im Mittel lediglich 29 g bzw. 28 g wogen, signifikant schwerer (Abb. 18A). Der HbA1c-Wert war bei den 26 Wochen alten homozygoten db/db-Tieren deutlich, bei den heterozygoten Mäusen immer noch signifikant im Vergleich zu den nicht-diabetischen Tieren erhöht (Abb. 18B).



**Abb. 18: Erhöhtes Körpergewicht und HbA1c-Anteil in 26 Wochen alten db/db-Mäusen.**

Bestimmung von (A) Körpergewicht und (B) Anteil von glykosyliertem Hämoglobin (HbA1c) am Gesamthämoglobin in 26 Wochen alten, weiblichen db/db-Mäusen. n=3. \*p<0,05; \*\*\*p<0,001 vs. nicht-diabetische Wildtyp-Mäuse.



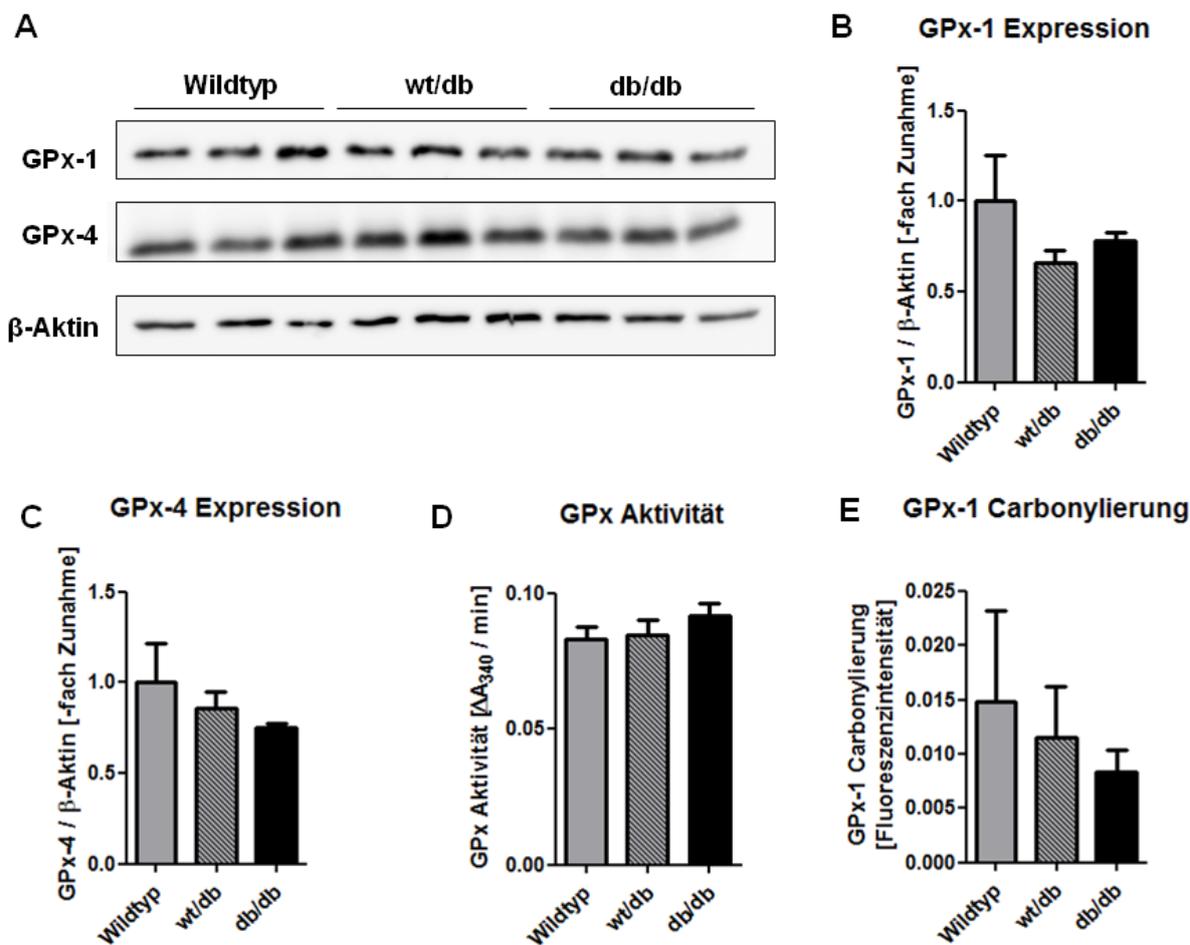
**Abb. 19: Quantifizierung der Proteincarbonylierung in Homogenaten des Nierenkortex von 26 Wochen alten db/db, wt/db und Wildtyp-Mäusen.**

(A) OxyBlot, für die Normalisierung der aufgetragenen Proteinmenge pro Probe wurde β-Aktin verwendet. (B) Quantifizierung der Menge carbonylierter Proteine. n=3.

Eine Untersuchung der Nieren dieser Tiere mittels OxyBlot-Analyse auf carbonylierte Proteine ergab, dass in diesem Alter eine deutliche Tendenz zu mehr Carbonylierung in den db/db-Mäusen vorliegt, jedoch war dieser Effekt aufgrund der geringen Stichprobengröße noch nicht signifikant (Abb. 19).

Um zu untersuchen, ob die GPx-Expression in der Niere bei diesen Tieren beeinflusst ist, wurden Western Blot-Analysen durchgeführt, um die GPx-1 und GPx-4-Proteinmengen zu bestimmen (Abb. 20A bis C). Auch in diesem Alter ließen sich keine Unterschiede zwischen den homozygoten diabetischen bzw. heterozygoten Mäusen und den Wildtyp-Kontrolltieren feststellen. Ebenso verhielt es sich mit der GPx-Aktivität und der Carbonylierung der GPx-1 (Abb. 20D und E).

Im nächsten Schritt sollte daher mit einer PAS-Reaktion anhand der Nierenmorphologie sichergestellt werden, dass diese Tiere dennoch eine Nephropathie entwickelten. Die PAS-Reaktion ist eine immunhistochemische Färbemethode, mit der sich Nierenschäden, wie z.B. die Glomerulosklerose, durch Veränderungen der extrazellulären Matrix visualisieren und quantifizieren lassen. Die durchgeführte PAS-Färbung zeigte, dass diabetische db/db-Mäuse in diesem Alter vermehrte Ansammlungen von extrazellulärer Matrix in den Glomeruli gegenüber nicht-diabetischen Mäusen aufweisen (Abb. 21).

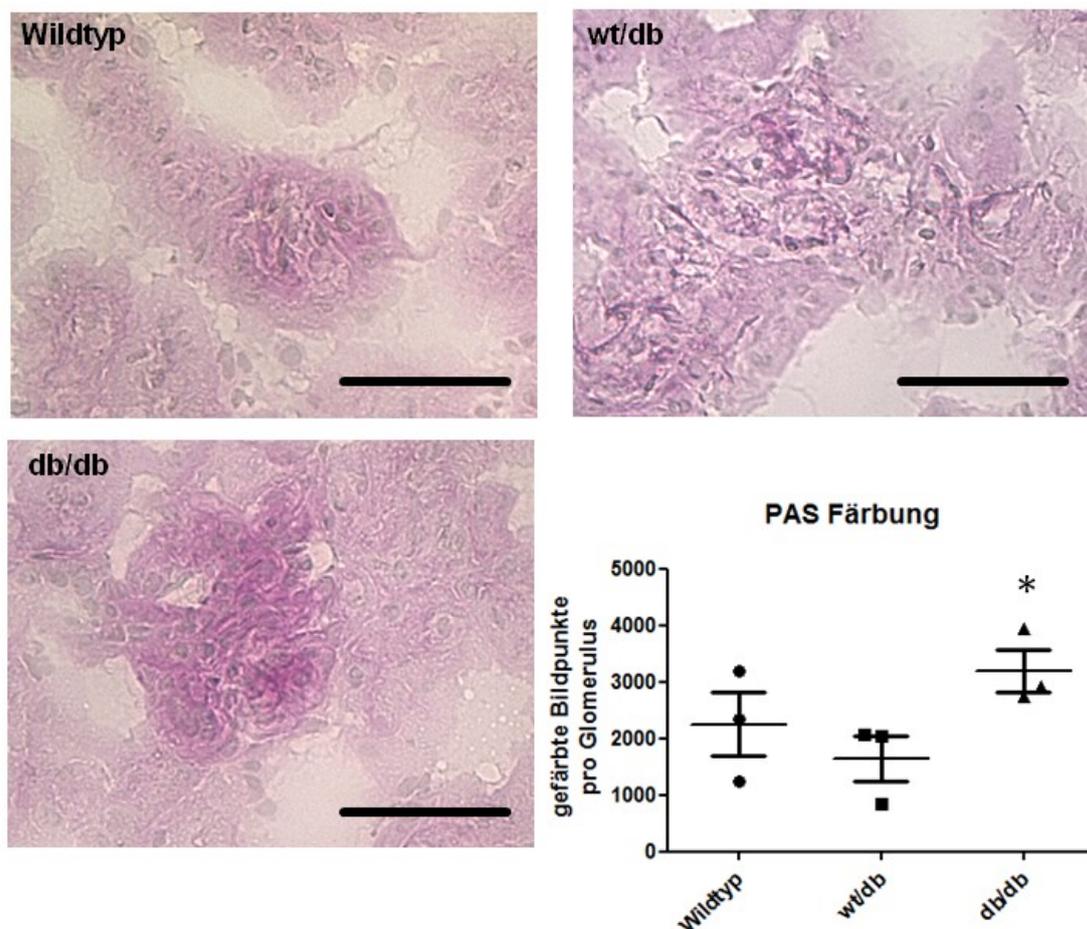


**Abb. 20: Tendenziell reduzierte GPx-Expression und Aktivität in Nierenkortexhomogenaten von 26 Wochen alten db/db, wt/db und Wildtyp-Mäusen.**

(A) Repräsentativer Western Blot für die Bestimmung der GPx-1 bzw. GPx-4-Abundanz. (B und C) Quantifizierung der GPx-1 und GPx-4-Expression. n=3 (D) Bestimmung der GPx-Aktivität (10  $\mu$ g Protein/Probe). n=3 (E) Messung der GPx-1-Carbonylierung mithilfe eines modifizierten ELISA (Kapitel 4.19). n=3.

### 5.7 GPx-Expression und Aktivität in der Niere von 10 Wochen alten diabetischen db/db-Mäusen

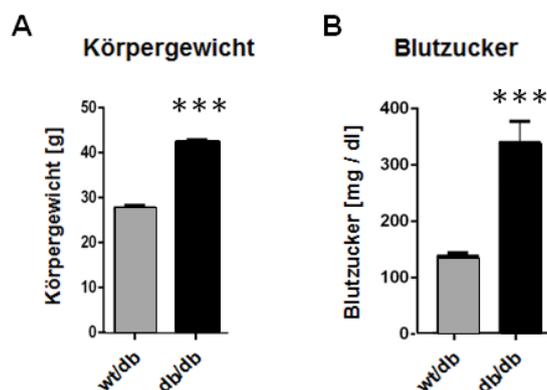
Da sich bei 18 und 26 Wochen alten Typ II diabetischen Mäusen keine eindeutigen Effekte auf die oxidative Proteincarbonylierung bzw. GPx-Regulation in den Nierenglomeruli nachweisen ließen, sollten zum Vergleich 10 Wochen alte Tiere, die sich praktisch am Beginn ihrer Typ II Diabeteserkrankung befinden, auf diese Parameter hin untersucht werden. Im Alter von 8 bis 10 Wochen liegen in der verwendeten db/db-Mauslinie typischerweise die höchsten Blutzuckerwerte vor; ab einem Alter von 12 Wochen nehmen diese dann kontinuierlich ab



**Abb. 21: Veränderte Nierenmorphologie in 26 Wochen alten db/db, wt/db und Wildtyp-Mäusen.** Nierendünnschnittpräparate der genannten Mäuse wurden einer PAS (*periodic acid-Schiff*)-Reaktion unterzogen, wodurch Glykoproteine angefärbt werden. Anschließend erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Repräsentative Aufnahmen von Glomeruli der Tiere (wie bezeichnet); der Größenbalken entspricht 50  $\mu$ m. Das Färbeareal in den Glomeruli wurde quantifiziert und statistisch zusammengefasst. n=3 Tiere pro Gruppe mit >8 untersuchten Glomeruli pro Tier. \* $p < 0,05$  vs. wt/db.

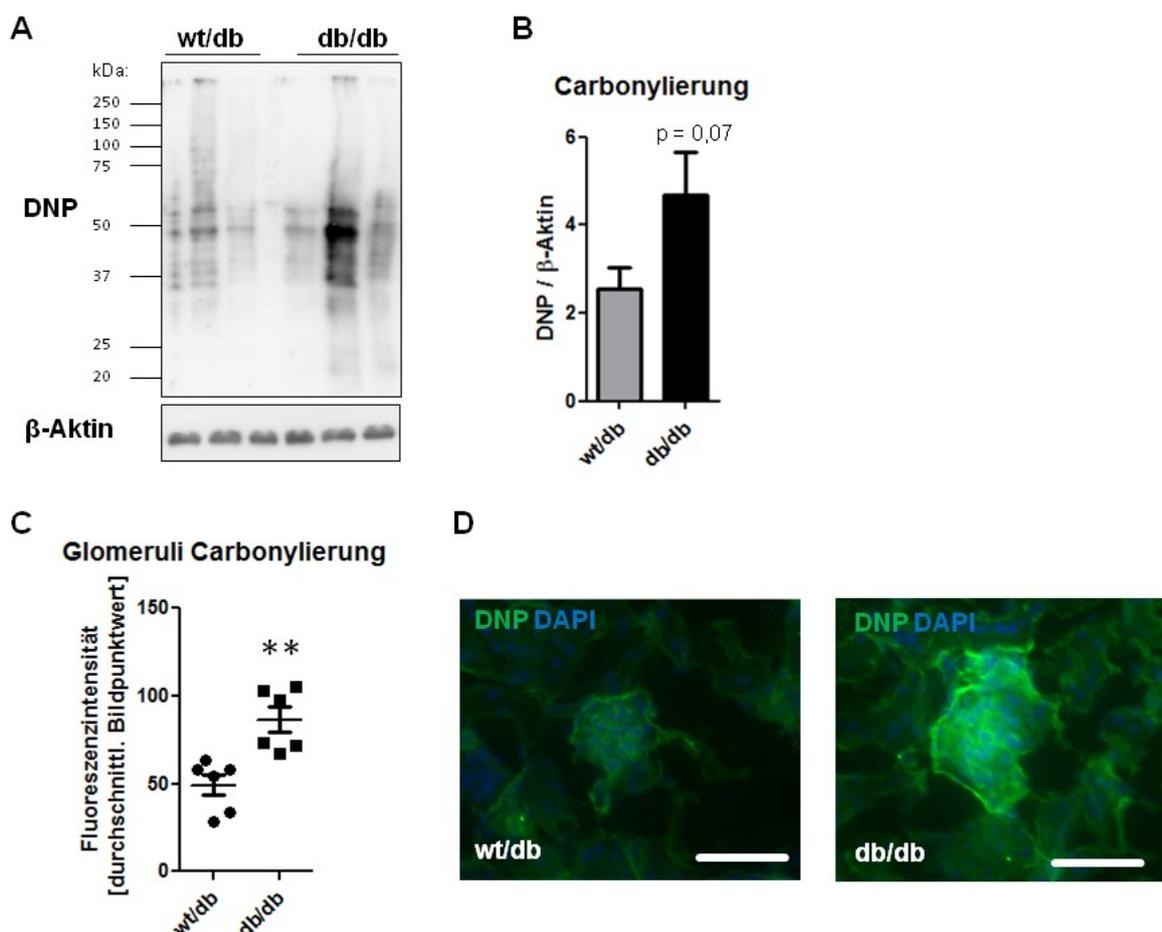
(95). Auch hier zeigten die 10 Wochen alten Tiere bereits signifikante Zunahmen im Körpergewicht und in den Nüchtern-Blutzuckerwerten im Vergleich zu nicht-diabetischen Kontrolltieren (Abb. 22).

Zu diesem Zeitpunkt konnte in Nierenkortexhomogenaten dieser Tiere in etwa eine Verdoppelung an carbonylierten Proteinen im Vergleich zu nicht-diabetischen wt/db-Mäusen nachgewiesen werden (Abb. 23A und B). Zusätzlich wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt, um die Proteincarbonylierung gezielt in den Glomeruli zu untersuchen und zu quantifizieren. Die Menge der detektierbaren carbonylierten Proteine in den Glomeruli von 10 Wochen alten diabetischen db/db-Mäusen war gegenüber den gleichaltrigen nicht-diabetischen wt/db-Tieren deutlich und signifikant erhöht (Abb. 23C und D).



**Abb. 22: Erhöhtes Körpergewicht und erhöhter Blutzuckerspiegel in 10 Wochen alten db/db-Mäusen.**

Bestimmung von (A) Körpergewicht und (B) Blutzuckerwerte nach einer 3,5 stündigen Fastenzeit in 10 Wochen alten, männlichen db/db-Mäusen. Die Daten wurden von Dr. Sandro Altamura, Klinik für Kinderheilkunde III, Universitätsklinikum Heidelberg, zur Verfügung gestellt. n=6. \*\*\*p<0,001 vs. nicht-diabetische Kontrolltiere.

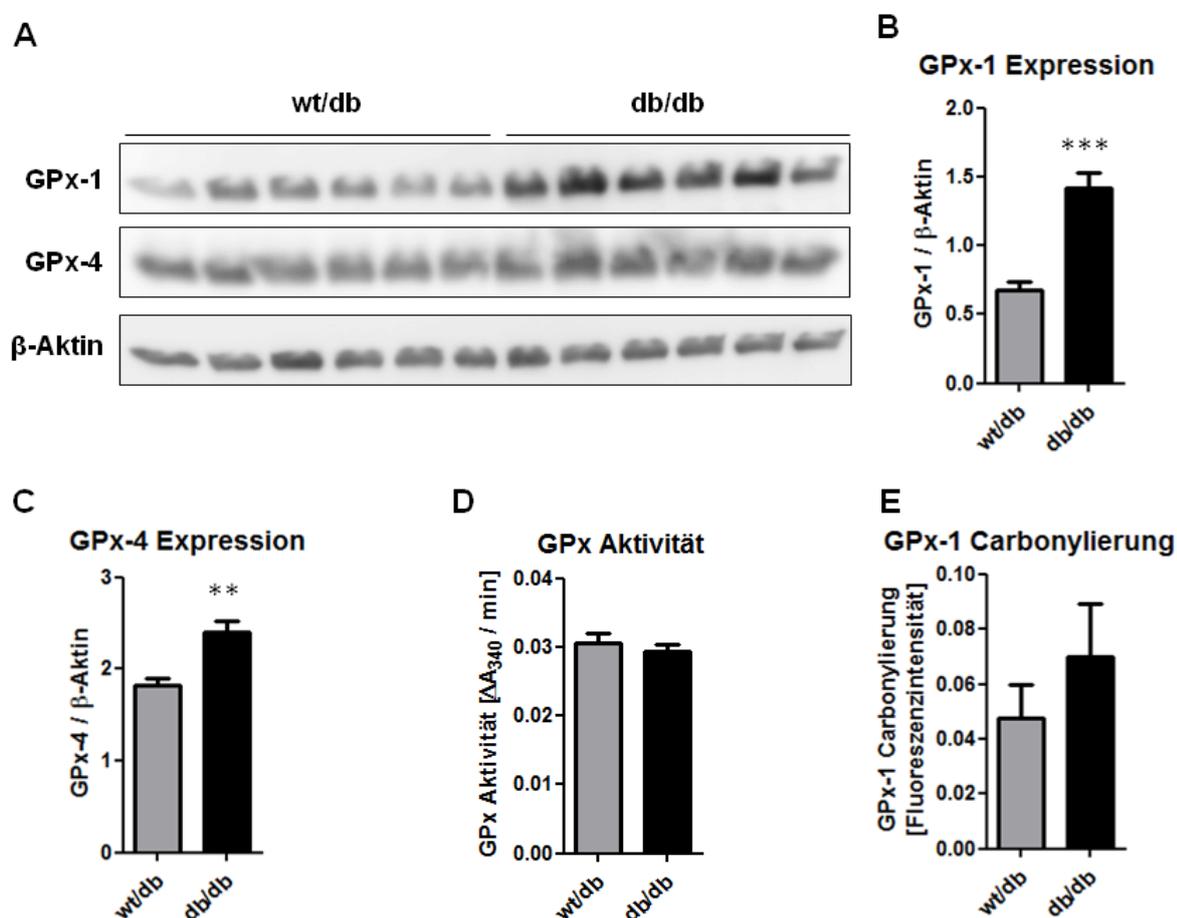


**Abb. 23: Gesteigerte Proteincarbonylierung in den Glomeruli 10 Wochen alter db/db-Mäuse.**

(A) Repräsentativer OxyBlot und (B) Quantifizierung der Gesamtmenge carbonylierter Proteine. n=6 (C und D) Detektion von carbonylierten Proteinen in Nierendünnschnittpräparaten mithilfe eines Fluoreszenzfarbstoff-markierten anti-DNP-Antikörpers. (C) Statistische Zusammenfassung der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität von >5 untersuchten Glomeruli pro Tier, die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. n=6. \*\*p<0,01 vs. wt/db-Kontrolltiere. (D) Repräsentative Fluoreszenzmikroskopiebilder; der Größenbalken entspricht 50  $\mu$ m.

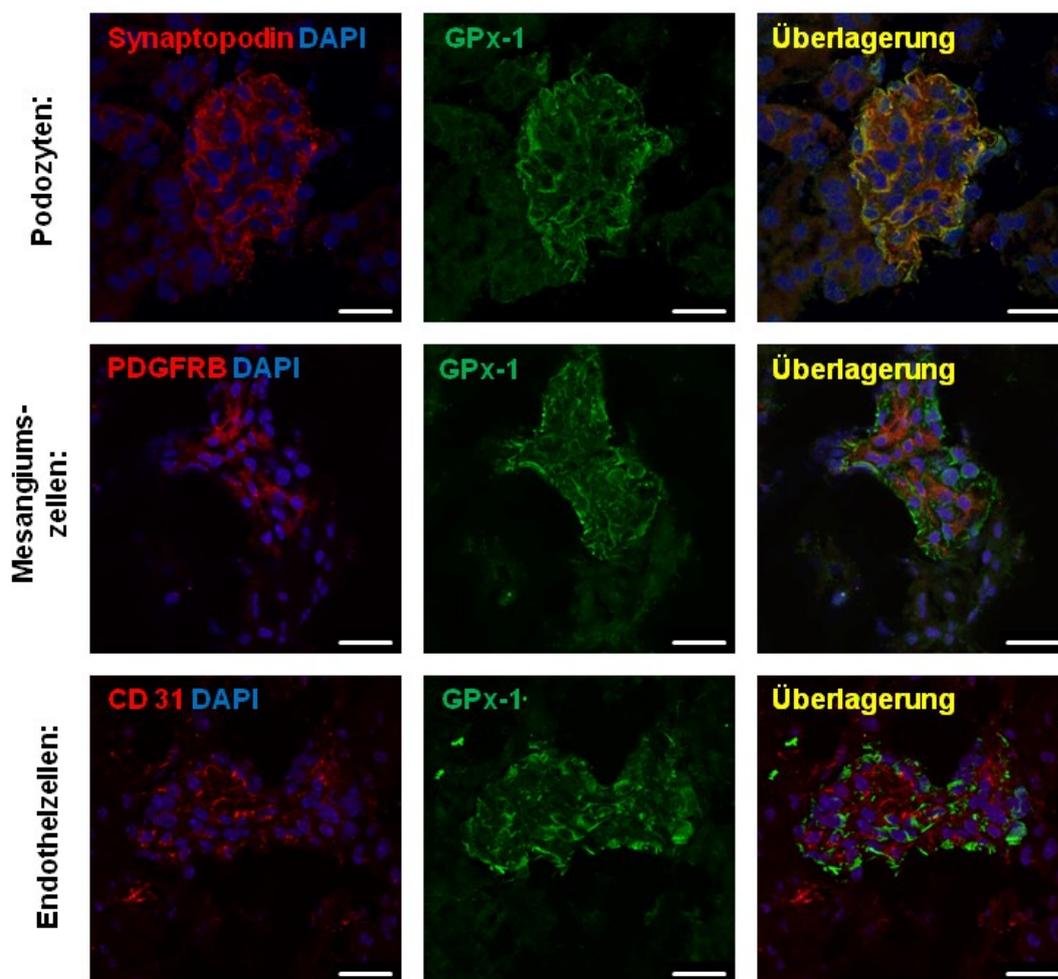
Im Western Blot zeigte sich eine etwa doppelt so große GPx-1-Proteinmenge und auch die Abundanz der GPx-4 war um ca. 30% erhöht (Abb. 24A bis C). Dagegen war die GPx-Aktivität praktisch unverändert (Abb. 24D) und die Carbonylierung der GPx-1 in der Tendenz deutlich aber nicht signifikant erhöht (Abb. 24E).

Da die renale GPx-1-Proteinexpression in den 10 Wochen alten db/db-Mäusen deutlich erhöht war, sollte immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht werden in welchen renalen bzw. glomerulären Zelltypen die gesteigerte GPx-1-Expression nachweisbar ist. Ein gleichzeitiges Anfärben mit Podozyten, Mesangiumszellen und Endothelzellen-Markern zeigte eine Kolokalisation der GPx-1-Färbung insbesondere mit dem Podozyten-Marker Synaptopodin (Abb. 25).



**Abb. 24: Gesteigerte GPx-Expression in der Niere von 10 Wochen alten db/db-Mäusen bei unveränderter GPx-Aktivität.**

(A) Western Blot und (B und C) Quantifizierung der GPx-1 und GPx-4-Expression in den Nierenhomogenaten von 10 Wochen alten db/db-Tieren und wt/db-Kontrollmäusen im Vergleich. (D) Bestimmung der GPx-Aktivität (10  $\mu\text{g}$  Protein/Probe) und (E) Messung der GPx-1-Carbonylierung mithilfe eines modifizierten ELISA. Jeweils n=6. \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 vs. nicht-diabetische wt/db-Kontrollmäuse.



**Abb. 25: Lokalisation von GPx-1 in glomerulären Podozyten von 10 Wochen alten db/db-Mäusen.**

Nierendünnschnittpräparate von 10 Wochen alten db/db-Mäusen wurden mit Antikörpern gegen GPx-1 sowie mit Antikörpern gegen Markerproteine von Podozyten (Synaptopodin), Mesangiumszellen (PDGFRB, *platelet-derived growth factor receptor β*) oder Endothelzellen (CD 31, PECAM-1) gefärbt und mithilfe der konfokalen Mikroskopie analysiert. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Repräsentative Aufnahmen der Glomeruli von drei db/db-Mäusen; der Größenbalken entspricht 20 µm.

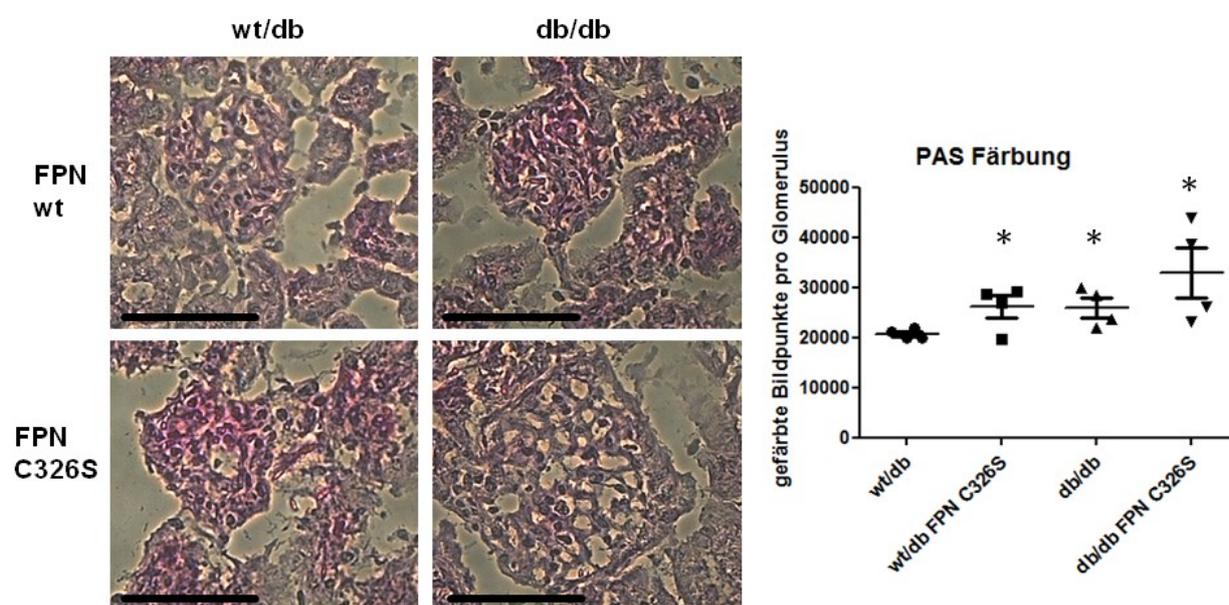
### 5.8 GPx-Expression und Aktivität in der Niere von 30 Wochen alten, hämochromatotischen db/db-Mäusen

Um zu untersuchen, ob Eisen im Rahmen der Fenton-Reaktion einen Beitrag zur Entwicklung der diabetischen Nephropathie in den db/db-Mäusen im Zusammenhang mit der Proteincarbonylierung und GPx-Expression liefert, wurden db/db-Tiere mit zusätzlicher, genetisch bedingter Hämochromatose verwendet. Dazu wurde bei Mäusen zunächst eine heterozygote Punktmutation im Gen für den Eisenexporter Ferroportin *Fpn* eingeführt, welche die Hepcidin-vermittelte Internalisierung von Ferroportin verhindert. Der Eisenexporter entlässt daher permanent Eisen aus den Eisenspeichern des Organismus in die Blutzirkulation.

Die in dieser Studie verwendeten auf den wt/db bzw. db/db-Hintergrund zurückgekreuzten 30 Wochen alten hämochromatotischen Mäuse wurden freundlicherweise von Prof. Martina Muckenthaler und Dr. Sandro Altamura (Klinik für Kinderheilkunde III, Universitätsklinikum Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Die Tiere weisen eine etwa doppelt so hohe Plasmaeisenkonzentrationen wie Wildtyp-Mäuse auf (96).

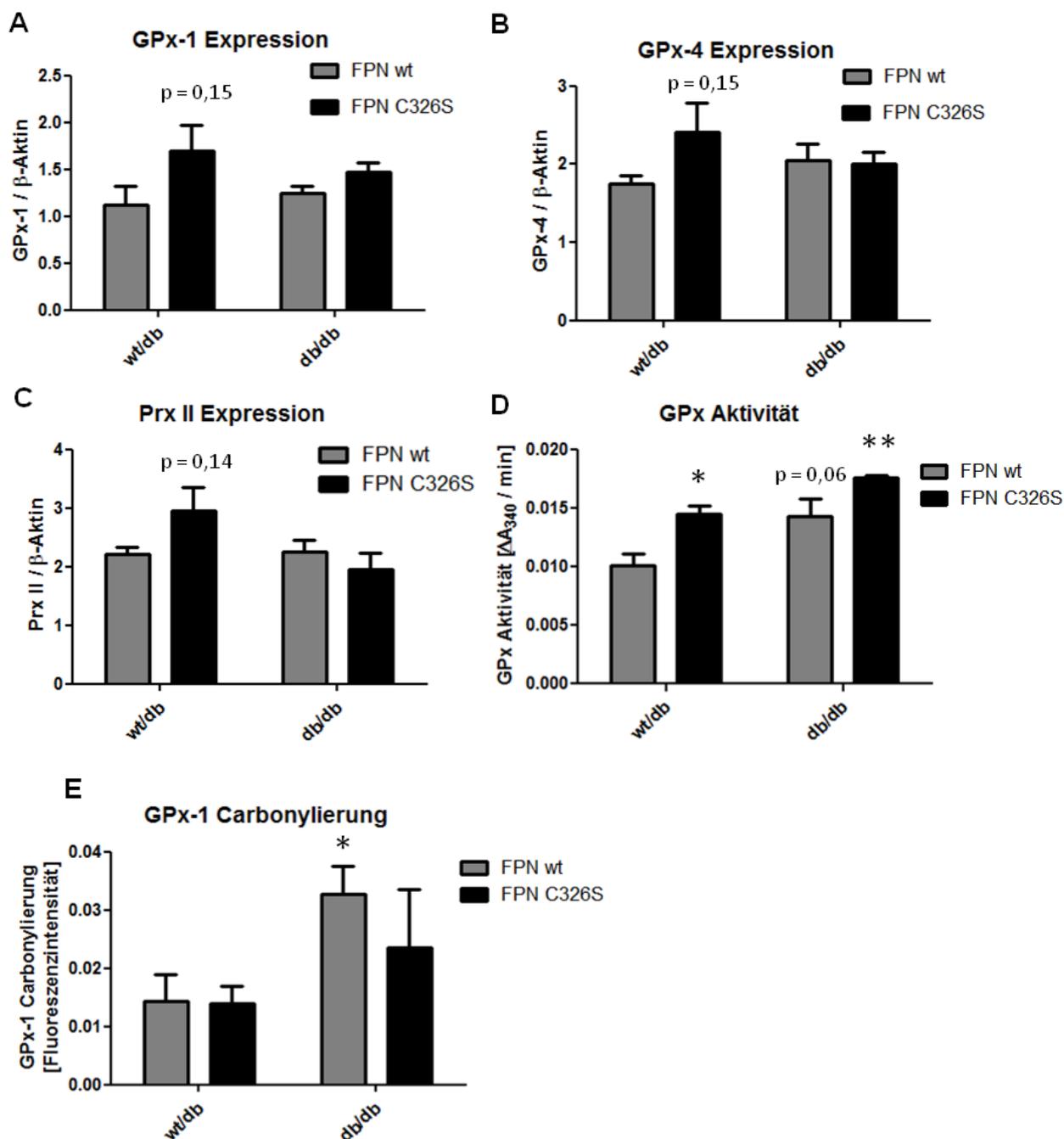
Um zu untersuchen, ob bei diesen Tieren nephropathische Symptome wie eine Glomerulosklerose verstärkt vorliegen, wurden Dünnschnittpräparate des Nierengewebes einer PAS-Analyse unterzogen (Abb. 26). Die Quantifizierung der Färbung verdeutlichte, dass selbst nicht-diabetische Mäuse mit Hämochromatose eine signifikant verschlechterte Nierenmorphologie im Vergleich zu gesunden Mäusen aufweisen. Die Intensität der messbaren Glomerulosklerose war vergleichbar mit der der diabetischen db/db-Mäuse. Hämochromatotische, diabetische db/db-Mäuse zeigten in der Tendenz eine noch stärkere Glomeruloskleroseneigung als die db/db-Mäuse mit normalen Eisenwerten, dieser Unterschied war aber nicht statistisch signifikant.

Es steht zu vermuten, dass infolge der erhöhten Eisenwerte oxidativer Stress die Nierenmorphologie auch in den nicht-diabetischen Mäusen verschlechtert. Um zu



**Abb. 26: Nachweis morphologischer Nierenschäden, ausgelöst durch Hämochromatose, in 30 Wochen alten diabetischen db/db-Mäusen mittels PAS-Reaktion.**

Nierendünnschnittpräparate von weiblichen, 30 Wochen alten wt/db und db/db-Mäusen, teilweise mit einer heterozygoten Punktmutation im *Fpn*-Gen (FPN C326S), wurden einer PAS (*periodic acid-Schiff*)-Reaktion unterzogen und anschließend mit Hämatoxylin gegengefärbt. Repräsentative Aufnahmen der Glomeruli der Tiere; der Größenbalken entspricht 50  $\mu$ m. Das Färbere-Areal in den Glomeruli wurde quantifiziert. n=4 Tiere pro Gruppe mit je >5 untersuchten Glomeruli. FPN = Ferroportin-Gen. \*: p<0,05 vs. nicht-diabetische wt/db-Kontrolltiere.



**Abb. 27: Gleichbleibende Expression von GPx und Prx II in der Niere von 30 Wochen alten hämochromatotischen db/db-Mäusen bei gleichzeitig erhöhter GPx-Aktivität und GPx-1-Carbonylierung.**

Proteine aus Nierenkortexhomogenaten von weiblichen nicht-diabetischen und diabetischen 30 Wochen alten db/db-Mäusen, teilweise mit einer heterozygoten Punktmutation im *Fpn*-Gen (FPN C326S), wurden durch SDS-PAGE separiert, geblotet und die Proteinmenge von GPx-1, GPx-4 und Prx II mithilfe spezifischer Antikörper bestimmt. Statistische Zusammenfassungen der Quantifizierung der (A) GPx-1 (B) GPx-4 sowie (C) Prx II-Expression. (D) Bestimmung der GPx-Aktivität in Nierenkortexhomogenaten der Tiere (10 µg Protein/Probe). (E) Messung der GPx-1-Carbonylierung mithilfe einer ELISA-basierenden Methode. n=6. FPN = Ferroportin. \*p<0,05 vs. wt/db FPN wt; \*\*p<0,01 vs. wt/db FPN C326S.

untersuchen, ob in diesen Tieren auch die Expression anti-oxidativer Enzyme verändert ist, wurde in nicht-diabetischen und diabetischen hämochromatotischen Mäusen die Expression der anti-oxidativen Enzyme GPx-1, GPx-4 und Peroxiredoxin II (Prx II) untersucht. Prx II, das ubiquitär exprimiert ist, wird direkt durch seinen Redoxstatus in seiner Aktivität als Peroxidase reguliert (80) und könnte daher auch in seiner Expression beeinflusst sein. Western Blot-Analysen zeigten eine leichte Steigerung der GPx-1 und GPx-4-Expression in den hämochromatotischen nicht-diabetischen Mäusen im Vergleich zu gesunden Mäusen, die aufgrund des geringen Stichprobenumfangs jedoch keine statistische Signifikanz erreichte (

Abb. 27A und B). Diabetische und auch hämochromatotische diabetische Mäuse wiesen keine veränderte GPx-Expression im Vergleich zu gesunden Mäusen auf. Auch die Expression von Prx II zeigte dieselbe Tendenz (

Abb. 27C).

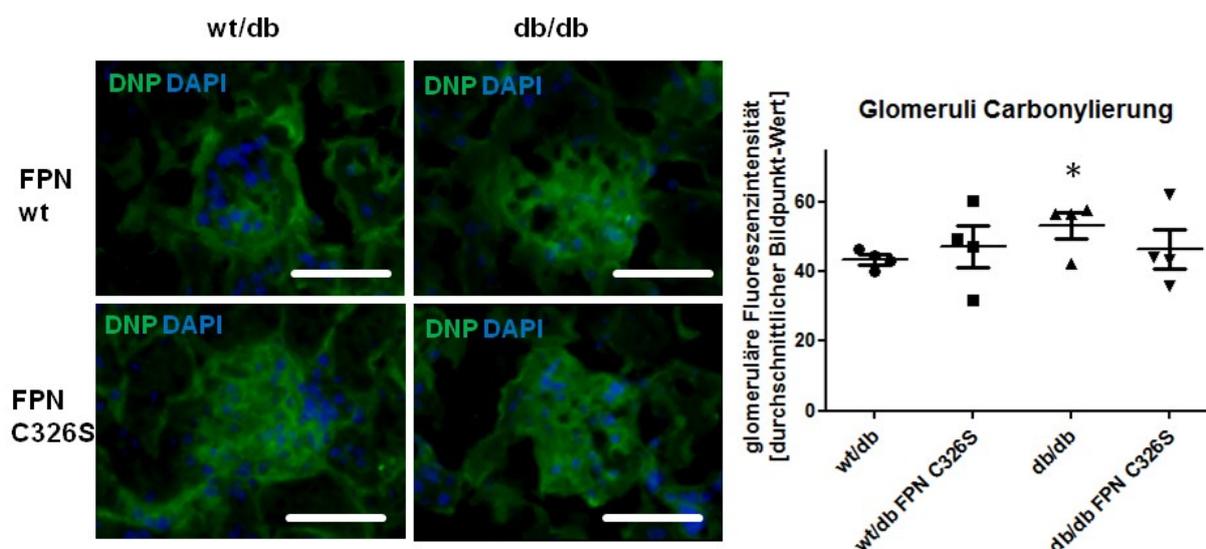
Ferner zeigten die hämochromatotischen nicht-diabetische Mäuse eine um etwa 40% signifikant erhöhte GPx-Aktivität gegenüber nicht-hämochromatotischen Tieren. Die GPx-Aktivität in den db/db-Tieren ohne Hämochromatose war etwa auf dasselbe Niveau erhöht, erreichte aber knapp keine statistische Signifikanz. Auch beim Vergleich der hämochromatotischen mit den nicht-hämochromatotischen db/db-Mäusen ließ sich eine geringfügige Erhöhung der GPx-Aktivität um etwa 25% beobachten. Zwischen den diabetischen (db/db) und nicht-diabetischen (wt/db) hämochromatotischen Mäusen betrug die GPx-Aktivitätszunahme etwa 20% (

Abb. 27D).

Um herauszufinden, ob diese Änderungen in der GPx-Aktivität auf eine gesteigerte Carbonylierung der GPx-1 zurückzuführen ist, wurde diese analysiert (

Abb. 27E). Hier zeigte sich eine signifikante Zunahme der GPx-1-Carbonylierung in den diabetischen db/db-Mäusen im Vergleich zu den nicht-diabetischen wt/db-Mäusen, wobei die Plasmaeisenspiegel überraschenderweise keinen Einfluss auf das Ausmaß der GPx-1-Carbonylierung hatten.

Daher wurde weiterführend untersucht, ob generell ein Anstieg carbonylierter Proteine in der Niere hämochromatotischer db/db-Mäuse vorliegt. Dabei zeigte sich nur in den Glomeruli der db/db-Mäuse ohne Hämochromatose eine signifikante Zunahme an carbonylierten Proteinen (Abb. 28).

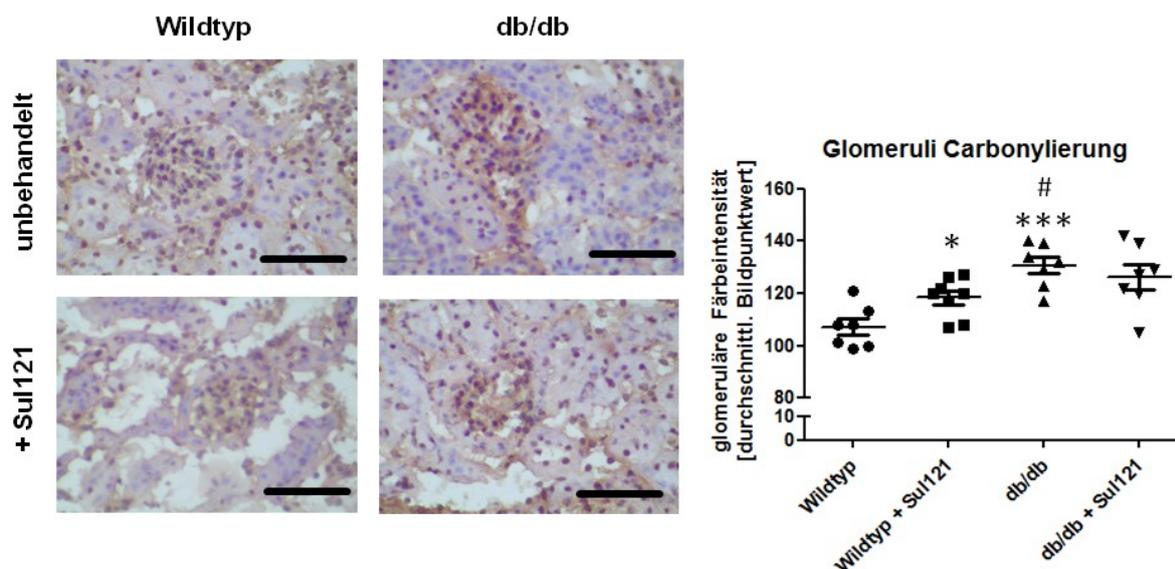


**Abb. 28: Gesteigerte Proteincarbonylierung in den Glomeruli von 30 Wochen alten db/db-Mäusen.**

Detektion carbonylierter Proteine mittels anti-DNP-Antikörper in Nierendünnschnittpräparaten nicht-diabetischer (wt/db) und diabetischer (db/db), 30 Wochen alter Mäusen, ohne oder mit heterozygoter Punktmutation im *Fpn*-Gen (FPN C326S). Repräsentative Aufnahmen der Glomeruli; der Größenbalken entspricht 50  $\mu$ m. Für die statistische Zusammenfassung wurden die Fluoreszenzintensitäten der Glomeruli quantifiziert. n=4 Tiere pro Gruppe mit je >5 untersuchten Glomeruli pro Tier. FPN = Ferroportin-Gen. \*p<0,05 vs. nicht-diabetische wt/db-Kontrolltiere.

### 5.9 Proteincarbonylierung und GPx-Expression in der Niere von 18 Wochen alten diabetischen db/db-Mäusen nach Behandlung mit Sul121

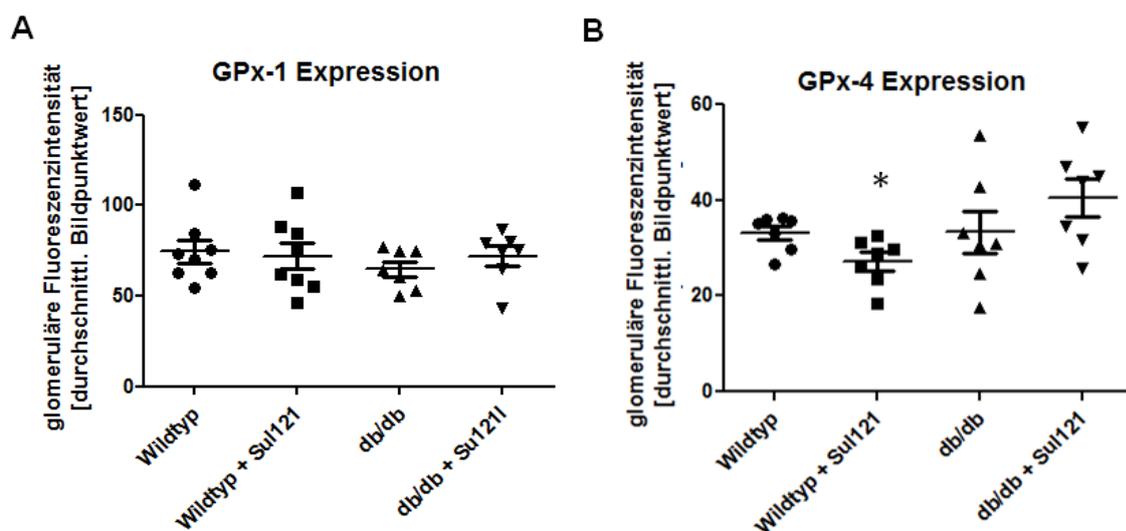
Um zu untersuchen, welche Folge eine Reduktion des oxidativen Stresses in diabetischen db/db-Mäusen hat, wurden die Tiere mit der aromatischen Verbindung Sul121 behandelt. Sul121 verstärkt die endogene H<sub>2</sub>S-Produktion über das Enzym Cystathionin- $\beta$ -Synthase. Das vermehrt produzierte H<sub>2</sub>S kann reaktive Sauerstoffspezies reduzieren. Tatsächlich zeigten 18 Wochen alte diabetische db/db-Mäuse nach Sul121-Behandlung, nicht aber nicht-diabetische Kontrollmäuse, eine verbesserte Nierenmorphologie in der PAS-Analyse (in Zusammenarbeit mit Dr. Leo Deelman, Department for Clinical Pharmacy and Pharmacology, Universitair Medisch Centrum Groningen, Niederlande, unveröffentlichte Ergebnisse). In den Glomeruli der unbehandelten db/db-Mäuse war die Menge an carbonylierten Proteinen im Vergleich zu nicht-diabetischen Mäusen signifikant erhöht (Abb. 29). Nicht-diabetische, mit Sul121 behandelte Mäuse zeigten eine größere Abundanz an carbonylierten Proteinen als unbehandelte Kontrolltiere. Diabetische db/db-Tiere wiesen noch einmal signifikant mehr carbonylierte Proteine auf, die jedoch durch eine Sul121-Behandlung nicht bedeutend reduziert werden konnten.



**Abb. 29: Die gesteigerte Proteincarbonylierung in Glomeruli von 18 Wochen alten db/db-Mäusen ist durch Sul121-Behandlung unbeeinflusst.**

(Rechts) Detektion von carbonylierten Proteinen mit einem anti-DNP-Antikörper und einem HRP-konjugierten Zweitantikörper in Nierendünnschnittpräparaten von nicht-diabetischen (Wildtyp) und diabetischen 18 Wochen alten db/db-Mäusen, die teilweise über 8 Wochen mit dem H<sub>2</sub>S-induzierenden Reagenz Sul121 behandelt worden waren. Die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt. Repräsentative Aufnahmen der Glomeruli; der Größenbalken entspricht 50 µm. (Links) Die Färbeintensitäten der aufgenommenen Glomeruli wurden quantifiziert und statistisch ausgewertet. n=7–8 Tiere pro Gruppe mit je >5 analysierten Glomeruli pro Tier. \*p<0,05 vs. Wildtyp; \*\*\*p<0,001 vs. Wildtyp; #p<0.05 vs. Wildtyp + Sul121.

Ferner wurde immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht, ob Sul121 bei diesen Tieren auch einen Effekt auf die GPx-Expression hat. Während die glomeruläre GPx-1-Expression in keiner der vier verschiedenen Gruppen signifikant verändert war (Abb. 30A), war die GPx-4-Expression in den Glomeruli der nicht-diabetischen Sul121-behandelten Tiere gegenüber den unbehandelten Wildtyp-Mäusen leicht aber signifikant reduziert (Abb. 30B). Bei den db/db-Tieren war die GPx-4-Expression durch die Sul121-Behandlung in der Tendenz eher aber nicht signifikant erhöht.



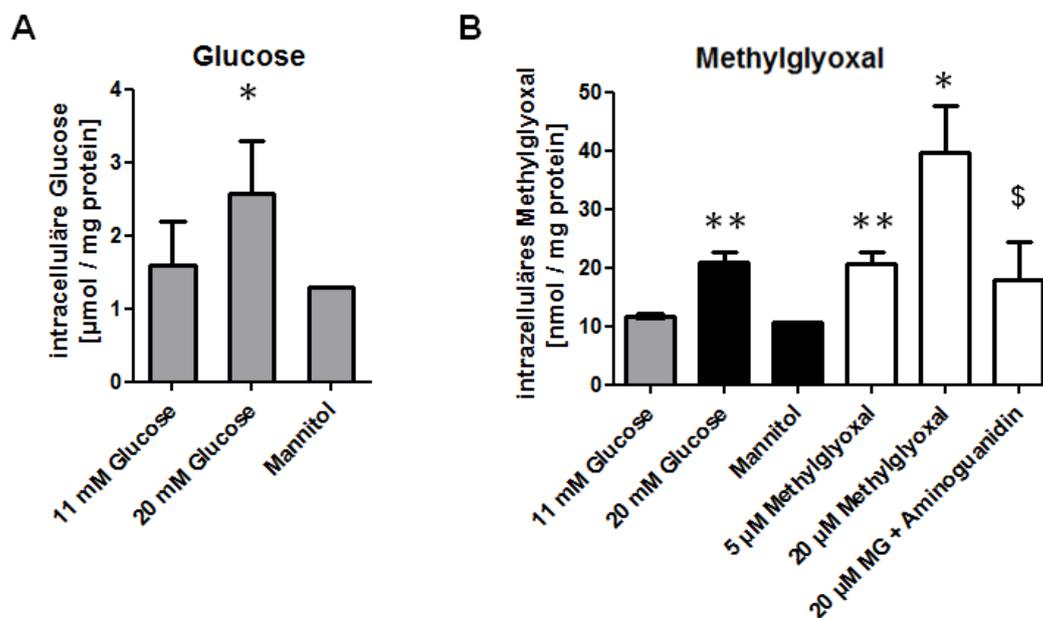
**Abb. 30: Die GPx-Expression in den Glomeruli 8 Wochen alter diabetischer db/db-Mäuse ist durch Sul121-Behandlung unbeeinflusst.**

Nierendünnschnittpräparate von nicht-diabetischen und diabetischen 18 Wochen alten db/db-Mäusen, teilweise über 8 Wochen mit dem H<sub>2</sub>S-induzierenden Molekül Sul121 behandelt, wurden mit spezifischen Antikörpern gegen GPx-1 oder GPx-4 und einem Fluoreszenzfarbstoff-markierten Zweitantikörper angefärbt. Die Fluoreszenzintensitäten in den Glomeruli wurden anschließend quantifiziert. Statistische Zusammenfassung der (A) GPx-1 und (B) GPx-4-Abundanz. n=7–8 Tiere pro Gruppe mit je >5 analysierten Glomeruli pro Tier. \*p<0,05 vs. nicht-diabetische Kontrolltiere.

### 5.10 Der Einfluss von Glucose auf die intrazellulären GSH-Konzentration und den oxidativen Stress in kultivierten Podozyten

Die bisherigen Untersuchungen an den *Ins2<sup>Akita</sup>* und db/db-Mäusen haben gezeigt, dass die im Rahmen der Diabetes-Entwicklung hervorgerufenen Veränderungen in der Carbonylierung, Expression und Aktivität der Glutathionperoxidasen hauptsächlich in den Podozyten stattfinden. Daher sollten die Auswirkungen diabetischer Bedingungen auf Podozyten genauer untersucht werden. Dazu wurde eine murine Podozyten-Zelllinie verwendet, die bei 33°C unter Zugabe von Interferon- $\gamma$  ein Antigen exprimiert, das zur Zellteilung führt. Bei 37°C differenzieren die Zellen und stellen die Zellteilung ein. Die Expression der typischen Podozyten-Markerproteine wt-1 und Synaptopodin wurde nach der Differenzierung der Zellen überprüft (siehe Abb. 4).

Die Effekte diabetischer Bedingungen auf anti-oxidative Mechanismen in den Podozyten wurden untersucht, indem die Zellen mit Diabetes-relevanten Glucose-Konzentrationen oder dem reaktiven Glucosemetabolit Methylglyoxal inkubiert wurden. Es wurde zunächst überprüft, ob die extrazellulär zugegebenen Mengen an Glucose und Methylglyoxal zu einer erhöhten Konzentration dieser Substanzen im Zellinneren führen. In Zellen, die in Gegenwart



**Abb. 31: Erhöhte intrazelluläre Glucose- und Methylglyoxal-Konzentrationen in kultivierten Podozyten nach Zugabe dieser Metabolite in das Kulturmedium.**

Bestimmung der Mengen an (A) intrazellulärer Glucose und (B) Methylglyoxal in Podozyten unter Basalbedingungen (11 mM Glucose) oder nach Stimulation mit Glucose bzw. Methylglyoxal (MG) für 24 Stunden. Die Messungen wurden von Dr. Thomas Fleming, Klinik für Endokrinologie, Stoffwechsel und Klinische Chemie, Universitätsklinikum Heidelberg, durchgeführt. Mannitol: Stimulation mit 11 mM Glucose und 9 mM Mannitol für 24 Stunden. Aminoguanidin: Stimulation mit 300 µM Aminoguanidin für 24 Stunden. n=2-3. \*p<0,05; \*\*p<0,01 vs. 11 mM Glucose; \$p=0,1 vs. 20 µM MG.

von 11 mM Glucose für 24 Stunden kultiviert worden waren, konnte eine Glucose-Konzentration von durchschnittlich 1,6 µmol/mg Protein nachgewiesen werden (Abb. 31A). Wurden die Zellen mit 20 mM Glucose kultiviert, stieg die Menge an intrazellulärer Glucose signifikant an, während die Zugabe von 9 mM Mannitol zusätzlich zu den 11 mM Glucose, um eine osmotische Stressreaktion auszuschließen, die intrazelluläre Glucose-Konzentration sogar unter den Ausgangswert senkte.

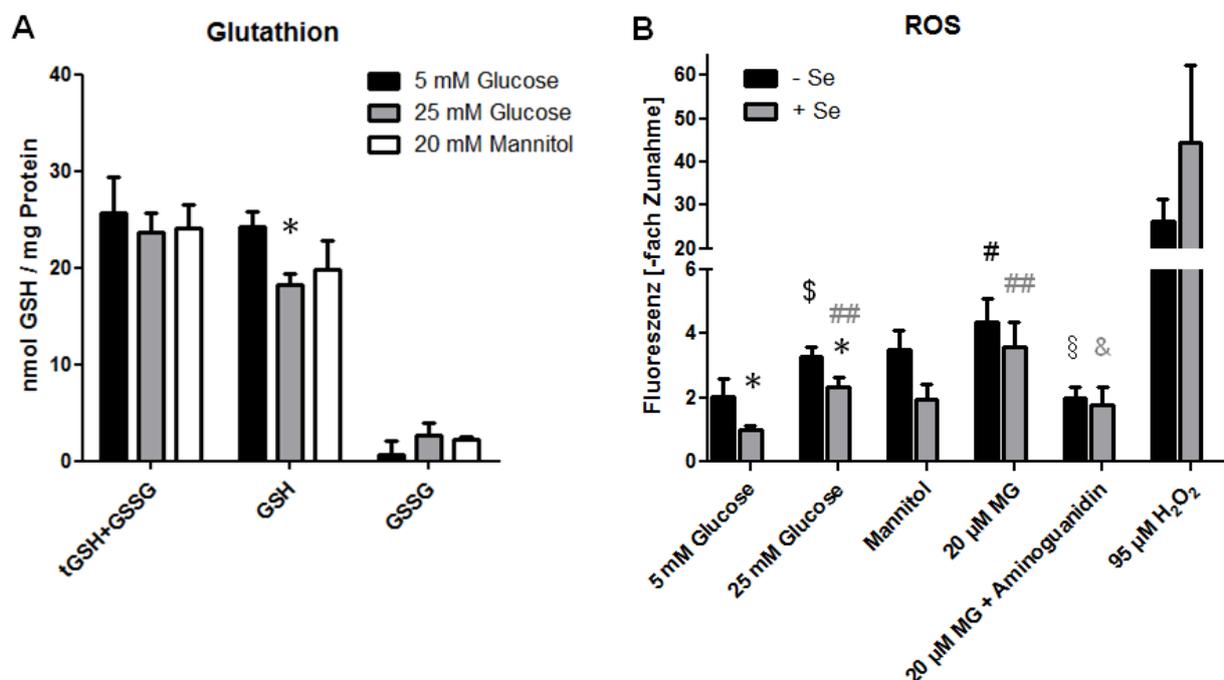
Die intrazelluläre Methylglyoxal-Konzentration verdoppelte sich in etwa bei einem Anstieg der Glucose-Konzentration im Zellkulturmedium von 11 auf 20 mM und sank ebenfalls geringfügig unter das Ausgangsniveau in Gegenwart von Glucose und Mannitol (Abb. 31B). Die Zugabe von Methylglyoxal in das Kulturmedium steigerte die intrazelluläre Konzentration von Methylglyoxal ebenfalls deutlich. Dieser Anstieg konnte durch die Zugabe von Aminoguanidin, welches Methylglyoxal bindet, effektiv verhindert werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass sowohl Glucose als auch Methylglyoxal in der Lage ist, aus dem Zellkulturmedium in die Zellen zu gelangen.

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die Glucose- bzw. Methylglyoxal-Aufnahme auch Auswirkungen auf die oxidative Balance in den Podozyten hat. Daher wurde die

## Ergebnisse

intrazelluläre Konzentration von reduziertem (GSH) und oxidiertem (GSSG) Glutathion in den Zellen gemessen. Stimulation mit 25 mM Glucose über 24 Stunden führte zu einer signifikanten Abnahme der GSH-Konzentration im Vergleich zu Podozyten, die mit 5 mM Glucose kultiviert wurden (Abb. 32A).

Um zu untersuchen, ob dies mit einer Steigerung des oxidativen Stresses einhergeht, wurden Fluoreszenzintensitätsänderungen in den Zellen nach Inkubation mit DCFH-DA gemessen. Dieser Indikatorfarbstoff kann in die Zellen diffundieren und emittiert dort, nach Oxidation durch ROS, Fluoreszenz. Außerdem sollte der Einfluss von Selen im Kulturmedium untersucht werden, da Selen ein wichtiger Bestandteil der anti-oxidativen Selenoenzyme ist, zu denen auch verschiedene Glutathionperoxidasen gehören. Daher wurde die



**Abb. 32: Reduzierte GSH-Konzentrationen und erhöhter oxidativer Stress in Podozyten nach Inkubation mit Glucose oder Methylglyoxal.**

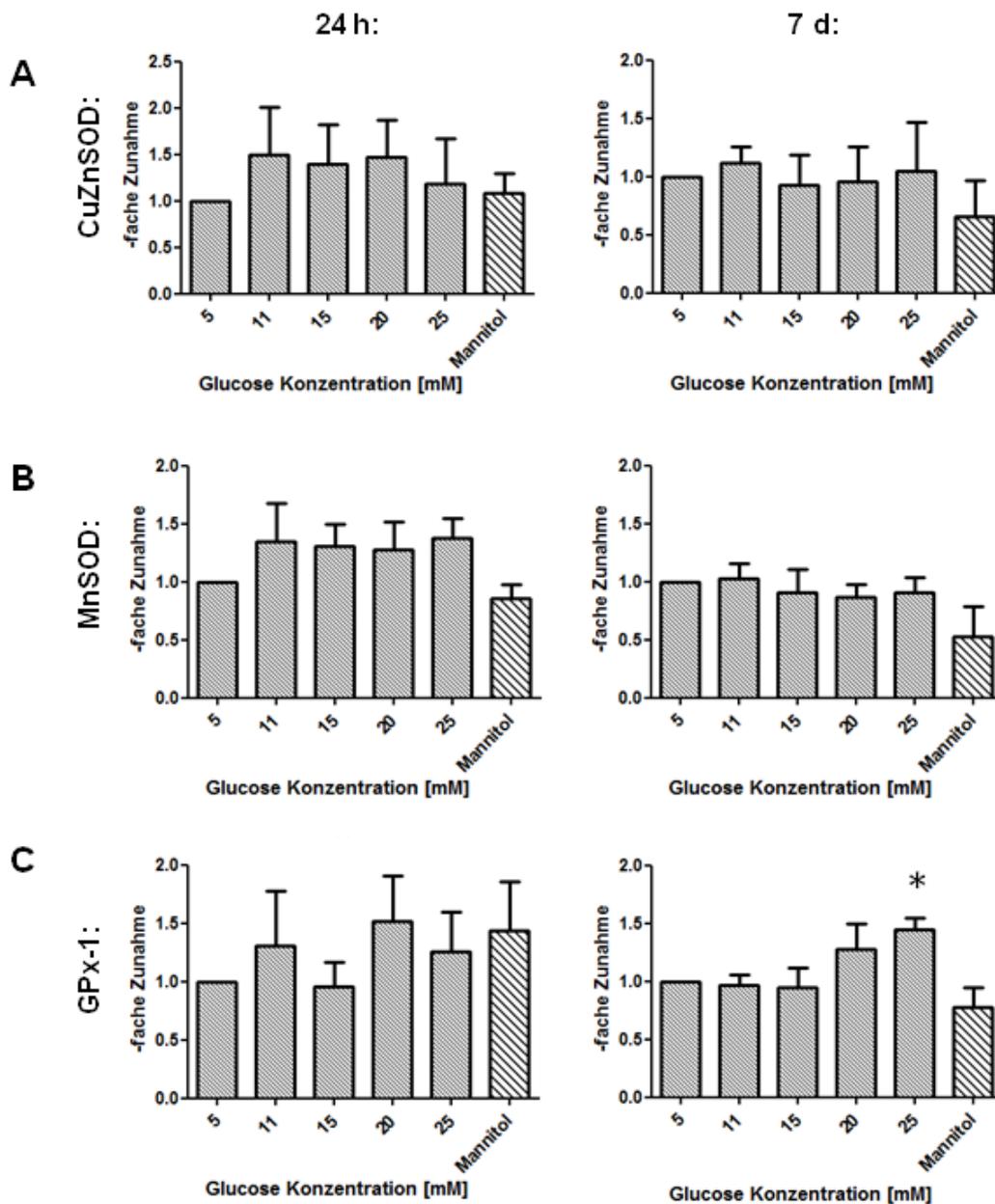
(A) Intrazelluläre Konzentrationen an totalem (tGSH+GSSG), reduziertem (GSH) und oxidiertem Glutathion (GSSG) in Podozyten nach Stimulation mit Glucose oder Mannitol für 24 Stunden wurden gemessen von Nadine Volk, Klinik für Endokrinologie, Stoffwechsel und Klinische Chemie, Universitätsklinikum Heidelberg. n=3. \*p<0,05 vs. 5 mM Glucose. (B) Podozyten wurden 30 min mit DCFH-DA inkubiert und für 1 Stunde mit Glucose oder Methylglyoxal stimuliert. Stimulation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diente als positiver Nachweis des Test-Prinzips. Die Fluoreszenzintensität in den Zellen wurde anschließend mit einem Fluoreszenz-Plattenleser bestimmt. Mannitol = 5 mM Glucose + 20 mM Mannitol. MG = Methylglyoxal. Aminoguanidin = Stimulation mit 300 µM Aminoguanidin. Se = 35 nM Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>. n=3-4. \*p<0,05 vs. Podozyten ohne Se; #p<0,05 vs. 5 mM Glucose; ##p<0,01 vs. 5 mM Glucose; \$p=0,06 vs. 5 mM Glucose; §p=0,06 vs. 20 µM MG; &p=0,13 vs. 20 µM MG.

ROS-Bildung in den Podozyten in RPMI-Kulturmedium vor und nach Zugabe von 35 nM Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> gemessen (Abb. 32B). Tatsächlich zeigten die Messungen, dass die Fluoreszenz des ROS-Indikators DCFH-DA signifikant abnahm, wenn die Zellen für 7 Tage unter Selen-supplementierten Bedingungen kultiviert wurden. Stimulation mit 20 µM Methylglyoxal steigerte die ROS-Akkumulation unter beiden Bedingungen. Wurde Methylglyoxal jedoch zusammen mit Aminoguanidin zugegeben, ließ sich kein Anstieg an ROS detektieren. Auch Stimulation der Zellen mit 25 mM Glucose erhöhte die ROS-Produktion. Allerdings zeigte sich auch ein ähnlich starker, jedoch nicht signifikanter Effekt bei Erhöhung der Osmolarität des Mediums durch Mannitol. Da beobachtet werden konnte, dass die Selen-Konzentration im Medium einen großen Einfluss auf die nachweisbaren Mengen an ROS hat, wurden die Podozyten in den nachfolgenden Versuchen stets unter Zugabe von 35 nM Selen kultiviert, um eine adäquate Expression der anti-oxidativen Selenoenzyme sicherzustellen.

### **5.11 Die Effekte von Glucose und Methylglyoxal auf die GPx-1-Expression und Aktivität in Podozyten**

Da die ROS-Messung durch DCFH-DA zeigte, dass gesteigerte Glucose und auch Methylglyoxal-Konzentrationen den oxidativen Stress in Podozyten erhöhten, sollte im nächsten Schritt die Expression von anti-oxidativen Enzymen untersucht werden. Dazu wurden die Proteinmengen von CuZnSOD, MnSOD und GPx-1 mittels Western Blot-Analyse quantifiziert, nachdem die Zellen für 24 Stunden oder 7 Tage in verschiedenen Glucose-Konzentrationen kultiviert worden waren. Die Ergebnisse zeigten, dass die Expression von CuZnSOD und MnSOD durch hohe Glucose-Konzentrationen nicht signifikant beeinflusst wird (Abb. 33A und B). Auch die GPx-1-Expression zeigte keine signifikante Veränderung nach 24 Stunden (Abb. 33C). 7 Tage Kultivierung mit 25 mM Glucose führten jedoch zu einer Zunahme der GPx-1-Proteinmenge um fast 50%. Geringere Glucose-Konzentrationen und Mannitol-Zugabe hatten keinen Einfluss auf die GPx-1-Proteinmenge.

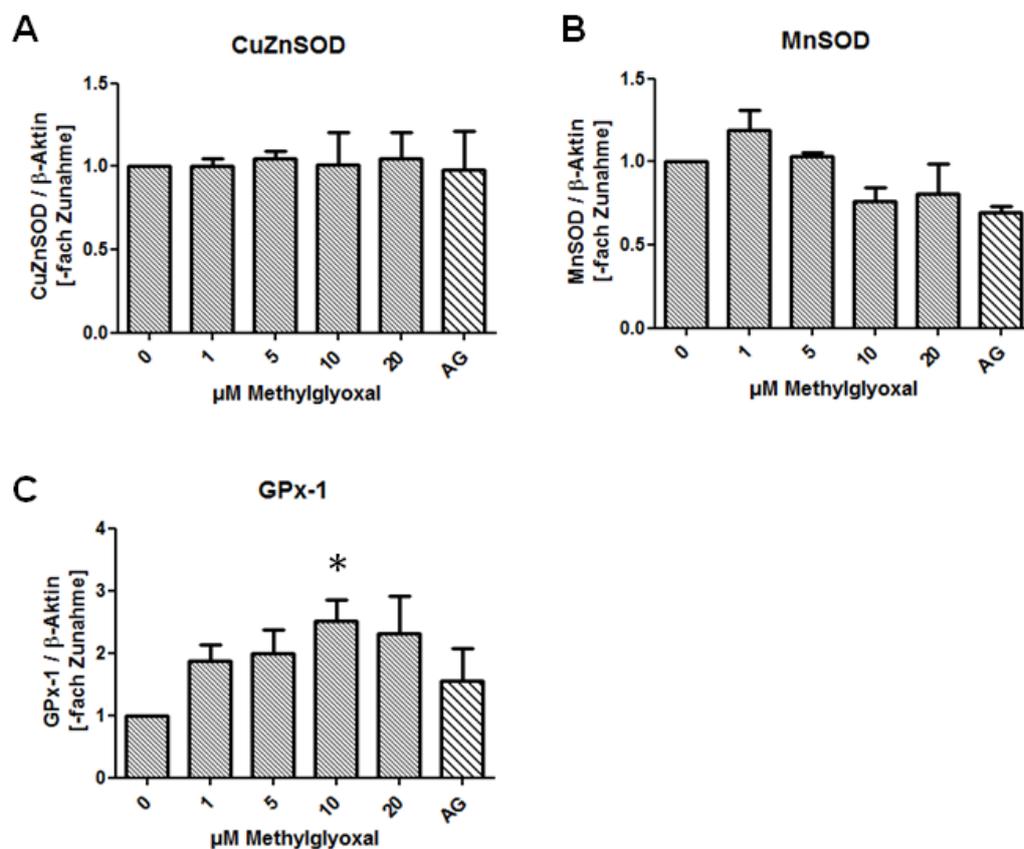
Methylglyoxal entsteht in der Zelle als Stoffwechselprodukt beim Abbau von Glucose. Um zu analysieren inwieweit veränderte Methylglyoxal-Spiegel die Expression anti-oxidativer Enzyme beeinflussen, wurden die Podozyten für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von Methylglyoxal stimuliert. Auch in diesem Fall ließen sich keine Veränderungen der CuZnSOD oder MnSOD-Expression per Western Blot-Analyse detektieren (Abb. 34A und B). Eine deutliche Zunahme der GPx-1-Expression war hingegen auch bei Stimulation mit Methylglyoxal nachweisbar (Abb. 34C).



**Abb. 33: Verstärkte GPx-1 aber nicht CuZnSOD oder MnSOD-Expression in Podozyten durch Hyperglykämie für 7 Tage.**

Podozyten wurden für 24 Stunden (links) bzw. für 7 Tage (rechts) mit verschiedenen Glucose-Konzentrationen stimuliert. Quantifizierung der Expression der anti-oxidativen Enzyme (A) CuZnSOD, (B) MnSOD und (C) GPx-1 mittels Western-Blot-Analyse. Für die Normalisierung der aufgetragenen Proteinmenge pro Probe wurde  $\beta$ -Aktin verwendet. Mannitol = 5 mM Glucose + 20 mM Mannitol. n=3. \* $p < 0,05$  vs. 5 mM Glucose.

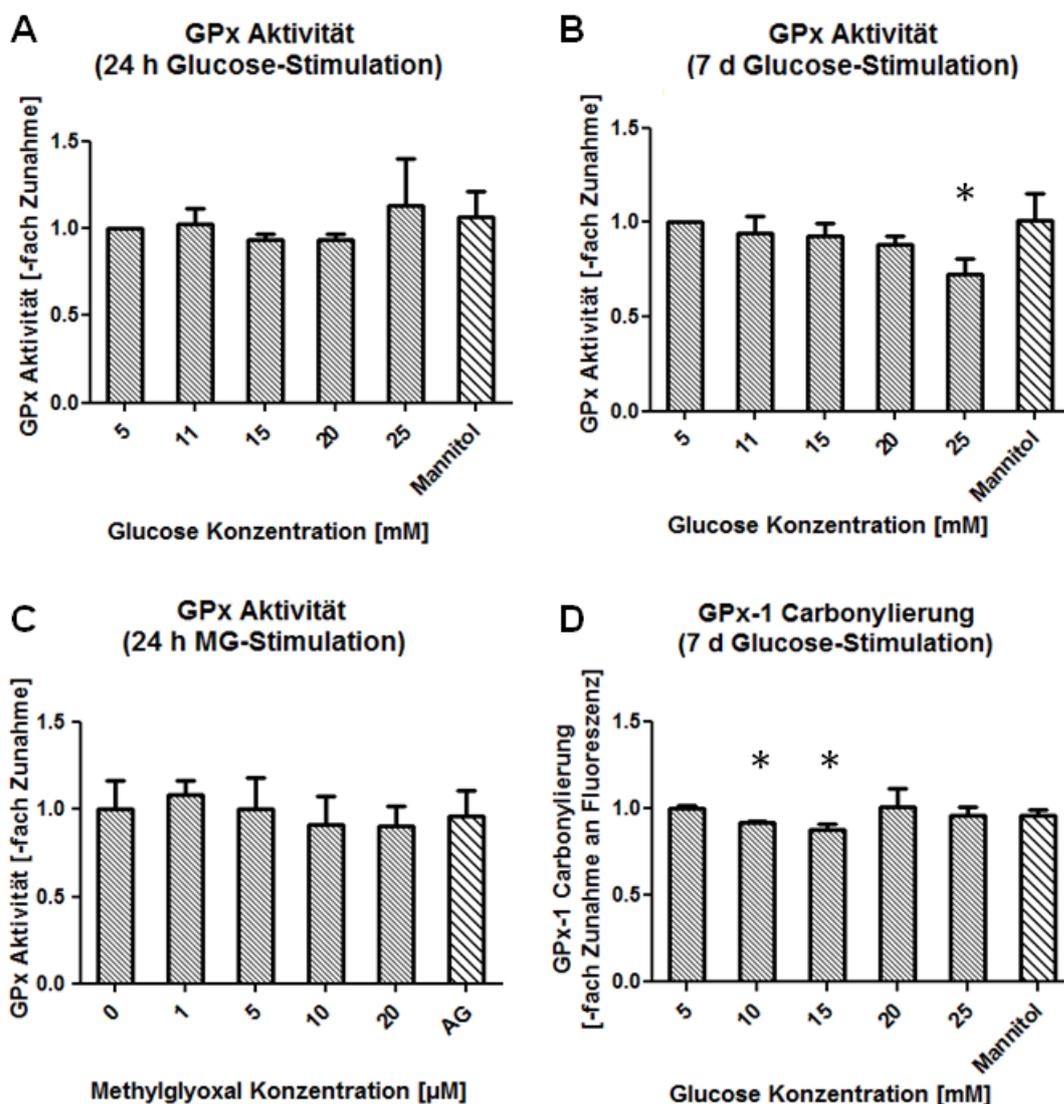
Im Gegensatz zu den untersuchten SODs war die GPx-1-Expression nach Stimulation mit Methylglyoxal für 24 Stunden bzw. Glucose für 7 Tage signifikant erhöht. Weiterführende GPx-Aktivitätsmessungen mit Podozytenhomogenaten zeigten nach Kultivierung mit



**Abb. 34: Verstärkte GPx-1 aber nicht CuZnSOD oder MnSOD-Expression in Podozyten nach Methylglyoxal-Exposition.**

Podozyten wurden für 24 Stunden mit verschiedenen Methylglyoxal-Konzentrationen stimuliert. Quantifizierung der Expression der anti-oxidativen Enzyme (A) CuZnSOD, (B) MnSOD und (C) GPx-1 mittels Western-Blot-Analyse. AG = 5 μM Methylglyoxal + 300 μM Aminoguanidin. n=4. \*p<0,05.

verschiedenen Glucose-Konzentrationen (5-25 mM für 24 Stunden) keine Veränderung (Abb. 35A). Eine Inkubation der Zellen mit 25 mM Glucose für 7 Tage führte trotz der erhöhten GPx-1-Proteinmenge zu einer moderaten Abnahme der GPx-Aktivität (Abb. 35B). Nur in Zellen, die mit 10-15 mM Glucose kultiviert worden waren, konnte eine noch moderatere aber signifikante Abnahme der GPx-1-Carboxylierung nachgewiesen werden (Abb. 35D). Eine Behandlung der Podozyten mit verschiedenen Methylglyoxal-Konzentrationen hatte hingegen keinen Einfluss auf die GPx-Aktivität (Abb. 35C).

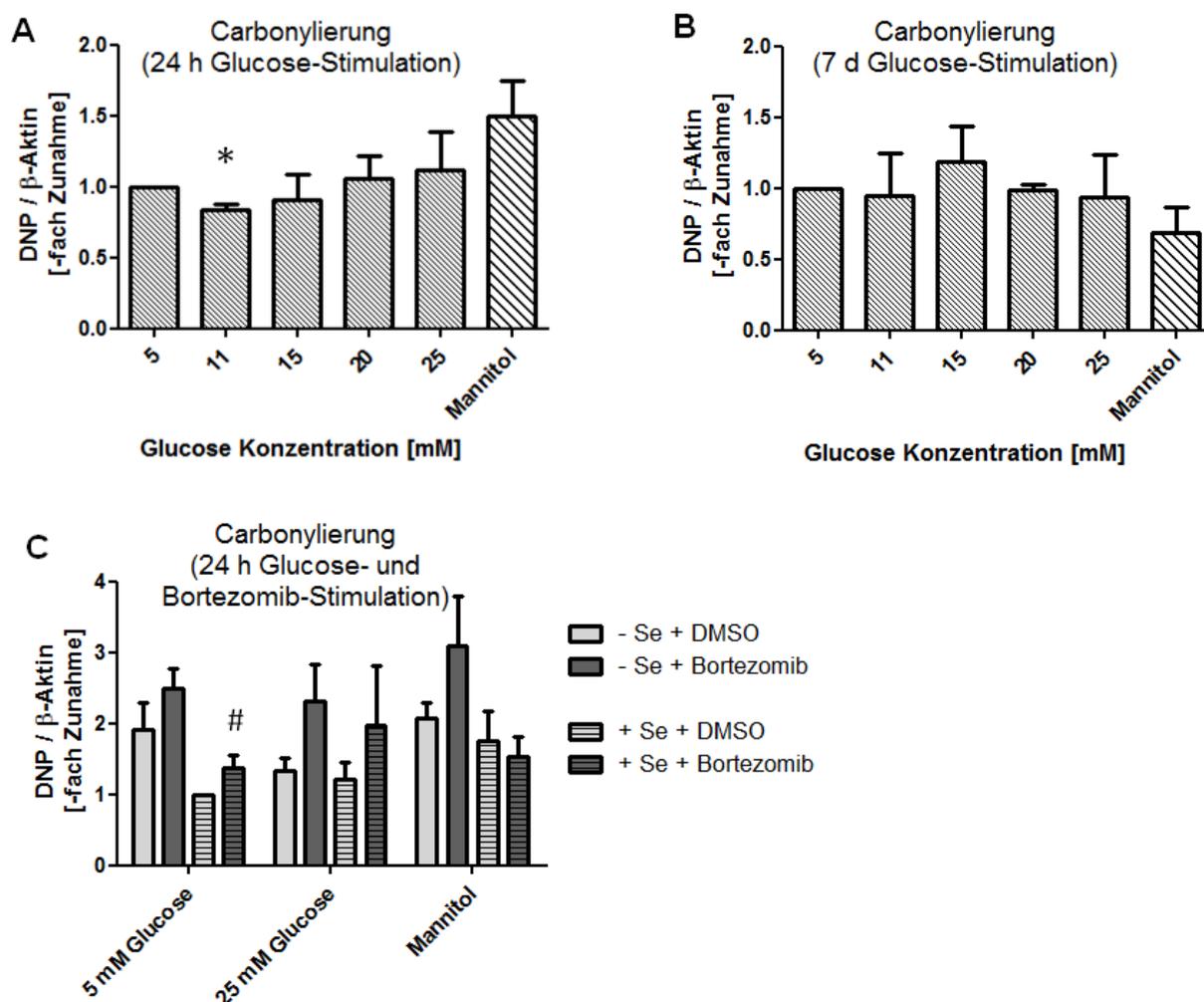


**Abb. 35: Verringerte GPx-Aktivität und Carbonylierung in Podozyten nach Glucose-Exposition für 7 Tage.**

Die kultivierten Podozyten wurden für (A) 24 Stunden bzw. (B) 7 Tage mit Glucose oder für (C) 24 Stunden mit Methylglyoxal inkubiert. Anschließend wurde die GPx-Aktivität (75 µg Protein/Probe) gemessen. (D) Messung der GPx-1-Carbonylierung in Podozyten mittels modifiziertem ELISA. Hierzu wurden die Podozyten ebenfalls für 7 Tage mit verschiedenen Glucose-Konzentrationen behandelt. Mannitol = 5 mM Glucose + 20 mM Mannitol; AG = 5 µM Methylglyoxal + 300 µM Aminoguanidin. MG = Methylglyoxal. n=3-6. \*p<0,05 vs. 5 mM Glucose.

### 5.12 Die Auswirkungen von Glucose auf die Proteincarbonylierung in Podozyten

Immunhistologische Färbungen an Nierendünnschnitten zeigten eine starke Zunahme an Proteincarbonylierung in den glomerulären Podozyten diabetischer Mäuse. Es sollte daher untersucht werden, ob sich die Unterschiede in der Proteincarbonylierung auch in kultivierten Podozyten bestätigen lassen. Daher wurde die Menge an carbonylierten Proteinen mithilfe



**Abb. 36: Der Proteasom-Inhibitor Bortezomib hat nur einen geringen Einfluss auf das Ausmaß der Proteincarbonylierung in kultivierten Podozyten.**

Kultivierte Podozyten wurden für (A) 24 Stunden bzw. (B) 7 Tage mit verschiedenen Glucose-Konzentrationen stimuliert. Carbonylierte Proteine in Zellhomogenaten wurden dann mittels OxyBlot-Technik quantifiziert. (C) Die Zellen wurden für 7 Tage ohne (- Se) bzw. mit Zugabe von 35 nM  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  (+ Se) kultiviert und anschließend für 24 Stunden mit Glucose in Gegenwart oder Abwesenheit des Proteasom-Inhibitors Bortezomib stimuliert. Mannitol = 5 mM Glucose + 20 mM Mannitol. DMSO = Dimethylsulfoxid.  $n=3-5$ . \* $p<0,05$  vs. 5 mM Glucose; # $p<0,05$  vs. Bortezomib-behandelte Zellen ohne Selen.

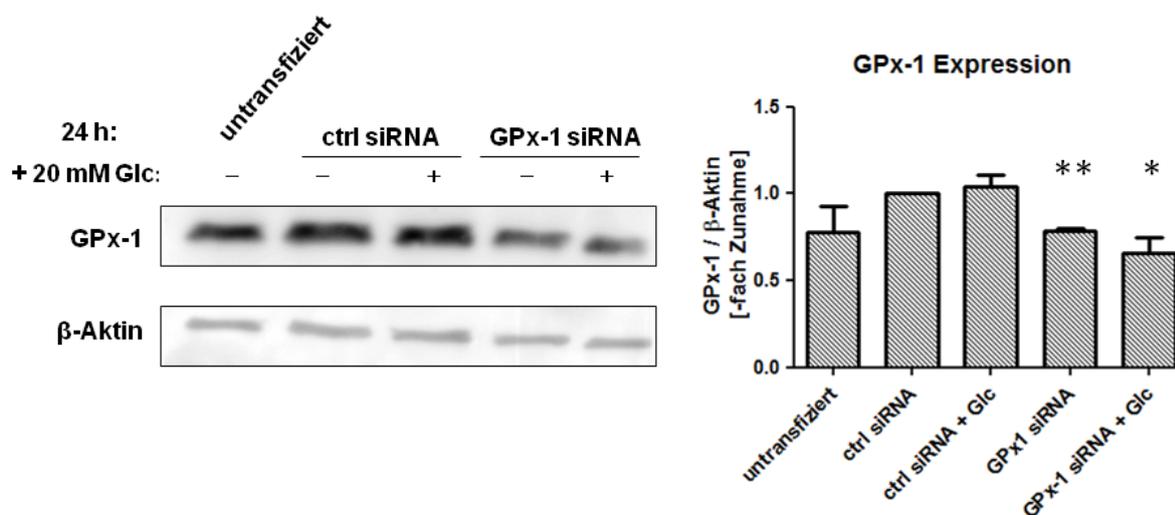
eines OxyBlots quantifiziert, nachdem die Podozyten für 24 Stunden unter verschieden hohen Glucose-Konzentrationen (11-25 mM) kultiviert worden waren (Abb. 36A). Es zeigte sich, dass eine Kultivierung unter leicht hyperglykämischen Bedingungen (11 mM Glucose) zu einer geringen Abnahme der Menge carbonylierter Proteinen führte. Höhere Glucose-Konzentrationen hingegen hatten keinen Einfluss auf das Ausmaß der Proteincarbonylierung. Auch eine Langzeitexposition mit hohen Glucose-Konzentrationen für 7 Tage beeinflusste die Proteincarbonylierung in den kultivierten Podozyten nicht (Abb. 36B).

## Ergebnisse

Da es möglich ist, dass die carbonylierten Proteine in den Zellen zügig abgebaut werden, wurde der generelle Proteasom-Inhibitor Bortezomib eingesetzt. Dies sollte Aufschluss darüber geben, ob das Proteasom unter diesen Bedingungen in den Abbau von carbonylierten Proteinen involviert ist. Außerdem sollte überprüft werden, welchen Einfluss eine Zugabe von Selen auf die Proteincarbonylierung hat (Abb. 36C). Die Zugabe von Bortezomib führte tendenziell zu einer leichten Zunahme der Menge carbonylierter Proteine, dieser Effekt erreichte aber keine statistische Signifikanz. Bei Podozyten unter normoglykämischen Bedingungen (5 mM Glucose) führte die Zugabe von Selen zu einer Abnahme an carbonylierten Proteinen. Diese Abnahme erreichte statistische Signifikanz, wenn zusätzlich das Proteasom durch Bortezomib inhibiert war.

### 5.13 Einfluss einer GPx-1-Depletion in Podozyten auf die GPx-4 und Prx II-Expression

Die vorherigen Untersuchungen zeigten, dass Selen-Supplementierung eine deutliche Reduktion des oxidativen Stresses in den Podozyten zur Folge hat. Um daher die Relevanz von GPx-1 als Selen-abhängigem Enzym in den Podozyten genauer untersuchen zu können, sollte die GPx-1-Expression mittels siRNA verringert werden. Die Zellen wurden entweder mit einer siRNA gegen GPx-1 oder einer *scrambled* Kontroll-siRNA transfiziert. Fünf Tage später wurde die GPx-1-Proteinmenge in den Proben verglichen. Eine Transfektion mit der GPx-1-siRNA reduzierte die GPx-1-Expression auf 70% der Expression, die in den mit einer Kontroll-siRNA transfizierten Zellen zu detektieren war (Abb. 37). Anschließend wurde der

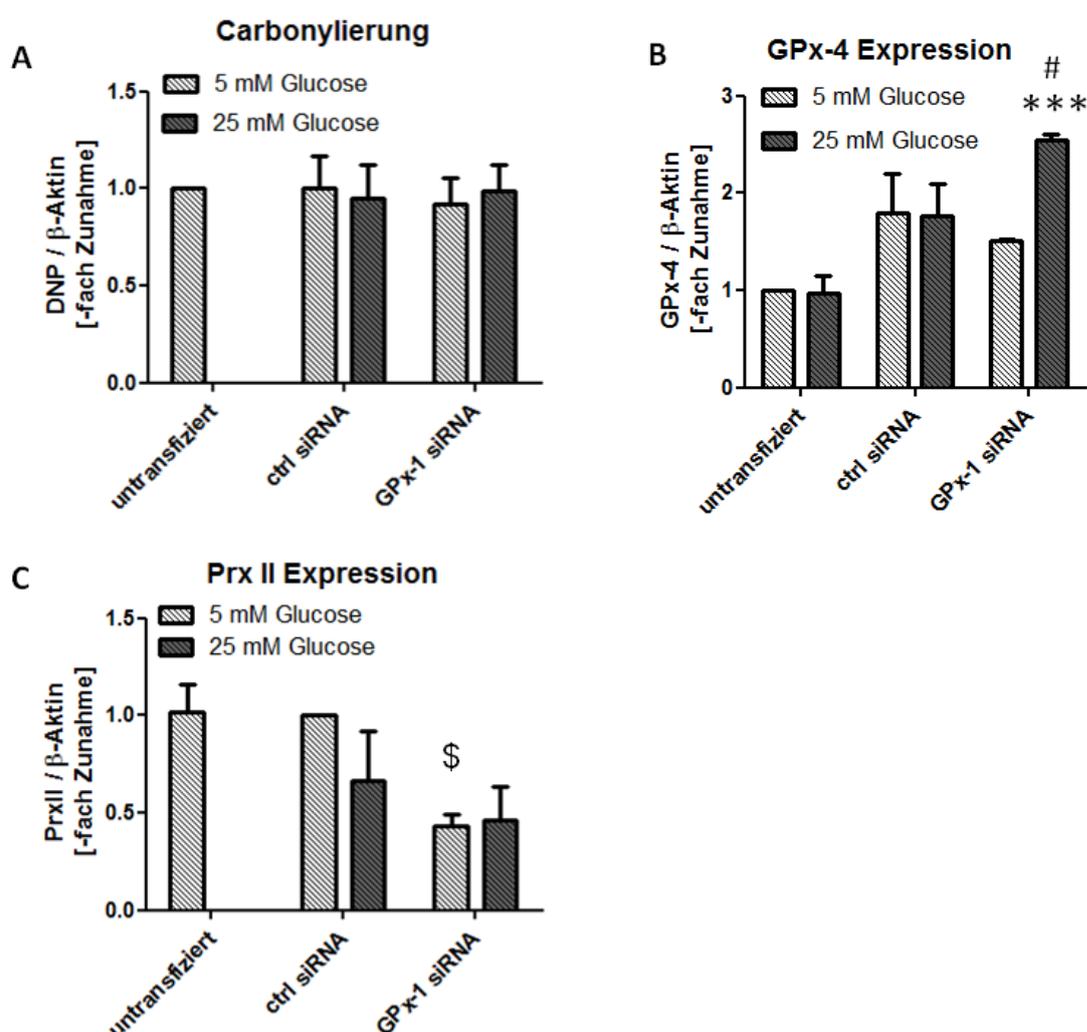


**Abb. 37: Nachweis der GPx-1-Depletion in Podozyten.**

Podozyten wurden zweimal mit siRNA gegen GPx-1 bzw. einer Kontroll-siRNA (ctrl siRNA) transfiziert und am Tag nach der zweiten Transfektion für 24 Stunden mit 20 mM Glucose (Glc) stimuliert. Ein repräsentativer Western Blot und die statistische Zusammenfassung sind abgebildet. n=3–4. \*p<0,05; \*\*p<0,01 vs. ctrl siRNA.

Effekt dieser partiellen GPx-1-Depletion auf die Proteincarbonylierung untersucht (Abb. 38A). Dabei zeigte sich, dass die Depletion der GPx-1 offenbar zu schwach war, um nach Zugabe von 25 mM Glucose Proteincarbonylierung in den kultivierten Podozyten signifikant zu steigern.

Da die GPx-1-Proteinmenge in Podozyten reduziert war, sich aber keine Steigerung der Proteincarbonylierung in den Zellen detektieren ließ, sollte untersucht werden, ob andere antioxidative Enzyme kompensatorisch in ihrer Expression gesteigert sind. Daher wurde die Expression der GPx-4 analysiert. Tatsächlich war die GPx-4-Expression nach siRNA-vermittelter GPx-1-Suppression und Inkubation mit 25 mM Glucose um ca. 50% erhöht



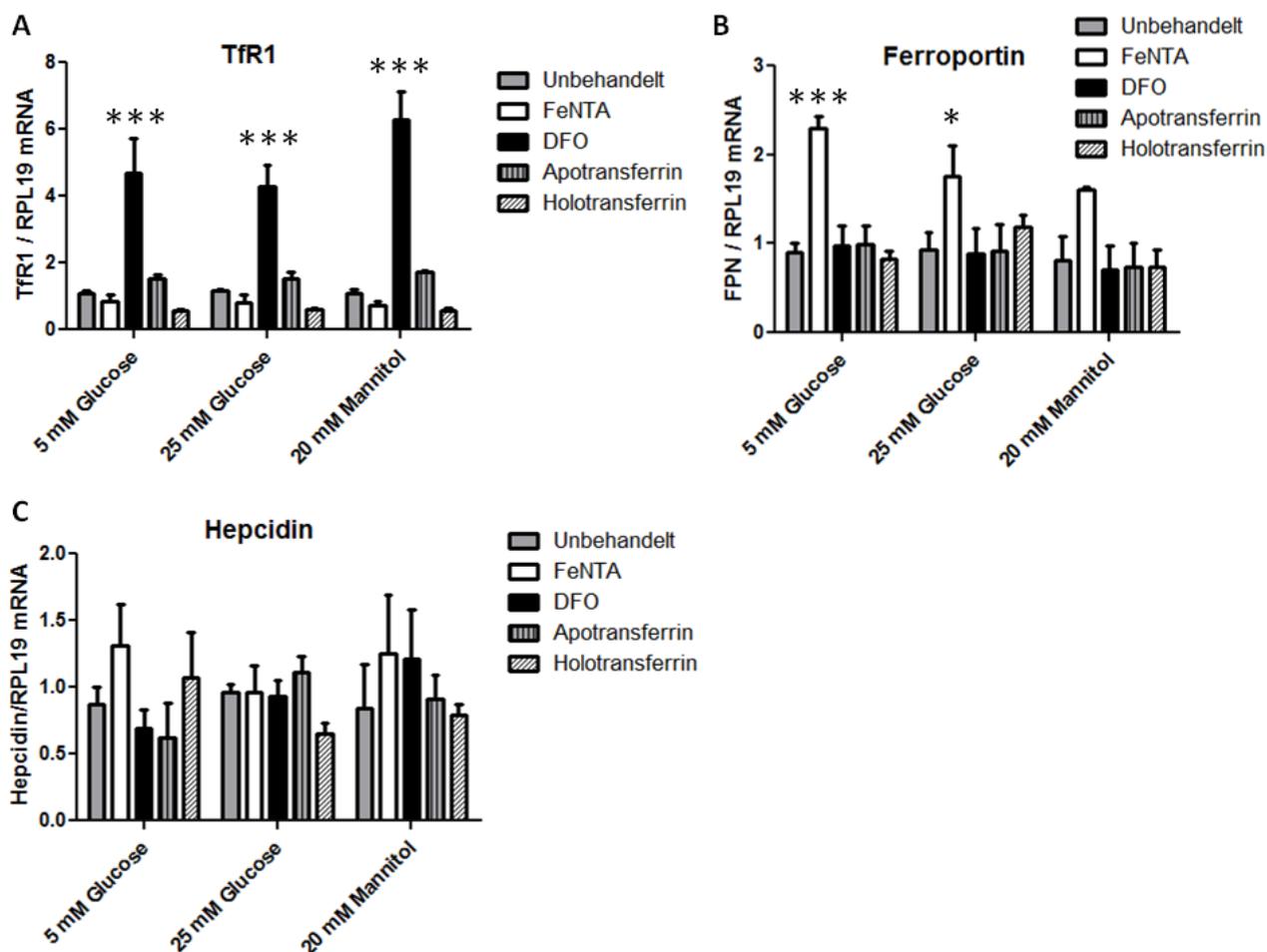
**Abb. 38: Einfluss der GPx-1-Depletion in kultivierten Podozyten auf GPx-4 und Prx II-Expression.**

Die kultivierten Podozyten wurden wie in Abb. 39 beschrieben mit siRNA gegen GPx-1 bzw. einer Kontroll-siRNA (ctrl siRNA) transfiziert und anschließend für 24 Stunden unter normo- bzw. hyperglykämischen Bedingungen inkubiert. Die Quantifizierung der (A) carbonylierten Proteine, der (B) GPx-4 und (C) von Prx II erfolgte mittels OxyBlot bzw. Western Blot.  $n=3-4$ . # $p<0,05$  vs. ctrl siRNA + 25 mM Glucose; \*\*\* $p<0,001$  vs. GPx-1 siRNA + 5 mM Glucose; \$ $p<0,05$  vs. ctrl siRNA + 5 mM Glucose.

(Abb. 38B). Bei 5 mM Glucose im Kulturmedium hingegen zeigte sich kein Unterschied der GPx-4-Expression im Vergleich zu den mit einer Kontroll-siRNA transfizierten Zellen. Im Gegensatz dazu nahm die Prx II-Expression nach GPx-1-Suppression um ca. 60% ab (Abb. 38C). Hierbei war die Expression dieses Redoxenzym sowohl unter Kontrollbedingungen als auch bei Inkubation mit 25 mM Glucose gleichermaßen reduziert.

### 5.14 Auswirkungen veränderter Eisenkonzentrationen auf die GPx-Expression in Podozyten

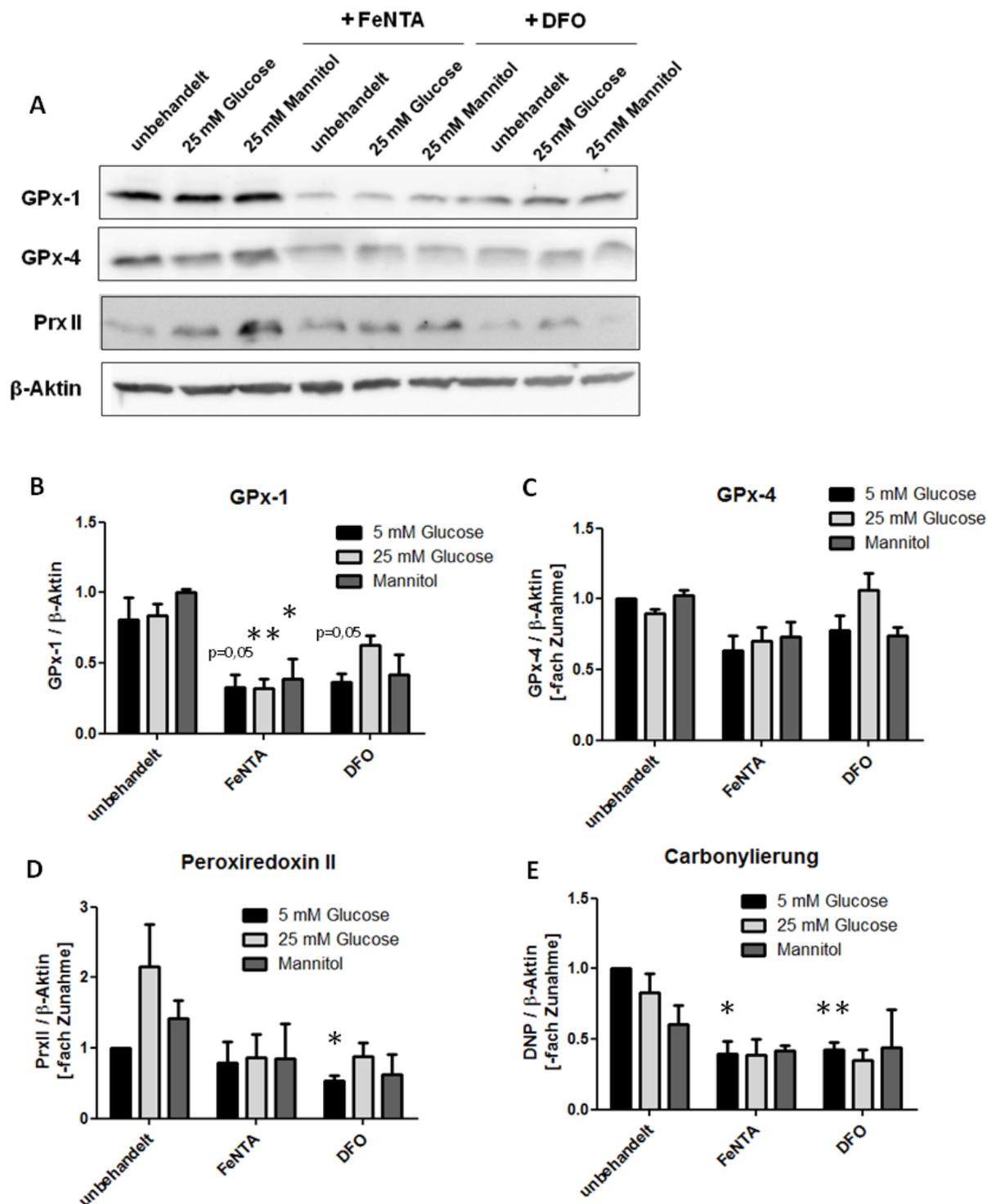
In db/db-Mäusen konnte eine Beeinflussung der GPx-Aktivität durch Hämochromatose festgestellt werden. Um zu prüfen, ob eine Veränderung der Eisen-Homöostase auch in kultivierten Podozyten einen Einfluss hat, wurden die Zellen zur Reduktion der Eisenkonzentrationen mit dem Eisenchelator Deferoxamin (DFO) behandelt. Um die Eisenkonzentrationen zu erhöhen, wurde den Zellen entweder Nitritotriessigsäure und  $\text{Fe}^{3+}$  (FeNTA) oder Holotransferrin zugesetzt. Zunächst wurde untersucht, ob die Veränderung der Eisen-Konzentrationen für sich genommen bereits einen toxischen Effekt auf Podozyten hat (siehe Abb. 7). Dieser Test zeigte kein erhöhtes Absterben von Podozyten im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Anschließend sollte daher der Effekt von veränderten Eisenbedingungen in Podozyten auf die Transkription der Eisen-abhängig kontrollierten Gene des für die Eisenaufnahme wichtigen Transferrin-Rezeptors 1 *TfR1* und des Eisenexporters Ferroportin *Fpn* per qRT-PCR nach Behandlung mit DFO, FeNTA oder Transferrin untersucht werden. Erhöhte *TfR1* mRNA-Mengen konnten unter Bedingungen der verringerten Eisenverfügbarkeit nach DFO-Exposition nachgewiesen werden (Abb. 40A). Im Gegensatz dazu war die *TfR1*-Transkription reduziert, wenn den Podozyten vermehrt Eisen in Form von FeNTA oder Holotransferrin zur Verfügung stand. Auch die Transkription des *Fpn*-Gens zeigte eine Abhängigkeit von der Eisen-Konzentration (Abb. 40B). So steigerten erhöhte Eisenspiegel (Inkubation mit FeNTA) die Transkription. Desweiteren konnte auch die Transkription des für die Regulation des Eisenhaushalts wichtigen Hormons Heparin in der verwendeten Podozyten-Zelllinie nachgewiesen werden (Abb. 40C). Heparin zeigte jedoch keine Regulation durch eine Veränderung des Eisenspiegels bzw. der Glucose-Konzentration.



**Abb. 40: Abhängigkeit der TfR1 und Ferroportin-Expression von der intrazellulären Eisenkonzentrationen in kultivierten Podozyten.**

Podozyten wurden für 24 Stunden entweder mit einer Mischung aus Nitritotriessigsäure und  $\text{Fe}^{3+}$  (FeNTA), Deferoxamin (DFO), Apotransferrin oder Holotransferrin und Glucose stimuliert. Die mRNA-Spiegel für (A) den Transferrin-Rezeptor 1 (TfR1), (B) Ferroportin und (C) Hepcidin in den Zellen wurden anschließend von Dr. Sandro Altamura, Klinik für Kinderheilkunde III, Universitätsklinikum Heidelberg quantifiziert. Statistische Zusammenfassung.  $n=3$ ; \* $p<0,05$ ; \*\*\* $p<0,001$  vs. unbehandelte Zellen.

Nachdem somit sichergestellt war, dass die verwendeten Bedingungen nicht toxisch für Podozyten sind aber dennoch Veränderungen in der Genexpression hervorrufen können, sollte untersucht werden, ob die Proteincarbonylierung oder die Expression der anti-oxidativen Enzyme GPx-1, GPx-4 oder Prx II durch die veränderte Eisen-Homöostase beeinflusst wird (Abb. 41A). Die Stimulation der Zellen mit FeNTA führte zu einer signifikanten Abnahme der GPx-1-Proteinmenge um 60% (Abb. 41B). Jedoch zeigte auch eine Behandlung mit dem Eisenchelator DFO eine nicht signifikante Tendenz zu einer verringerten GPx-1-Expression.



**Abb. 41: Einfluss von Eisenmangel bzw. Überschuss auf die GPx und Prx II-Expression sowie Proteincarbonylierung in kultivierten Podozyten.**

Die kultivierten Podozyten wurden für 24 Stunden mit normaler oder erhöhter Glucose-Konzentration und einer Mischung aus Nitritotriessigsäure und  $\text{Fe}^{3+}$  (FeNTA) oder Deferoxamin (DFO) inkubiert. Die Expression der anti-oxidativen Enzyme GPx-1, GPx-4 und Prx II wurde mittels Western Blot überprüft. (A) Repräsentativer Western Blot, (B bis D) Quantifizierung der Proteinmengen von (B) GPx-1, (C) GPx-4 und (D) Prx II. (E) Quantifizierung carbonylierter Proteine mittels OxyBlot. Mannitol = 5 mM Glucose + 20 mM Mannitol. n=3. \*p<0,05; \*\*p<0,01 vs. unbehandelte Zellen.

Die GPx-4-Expression wurde durch FeNTA oder DFO nicht signifikant verändert (Abb. 41C). Auch die Prx II-Expression zeigte keine Beeinflussung durch die Erhöhung des Eisenspiegels mit FeNTA, Komplexierung (DFO) und damit eine Verringerung der intrazellulären Eisenkonzentration führte jedoch zu einer Abnahme der Prx II-Proteinmenge um etwa 50% im Vergleich zu den unbehandelten Podozyten (Abb. 41D). Zusätzliche Hyperglykämie führte zu keinen signifikanten Veränderungen gegenüber der alleinigen Zugabe von FeNTA oder DFO. Die isolierte Zugabe von FeNTA oder DFO zu den Podozyten reduzierte die Mengen an carbonylierten Proteinen auf jeweils etwa 40% gegenüber den unbehandelten Zellen (Abb. 41E). Zusammenfassend zeigen sich somit deutliche Effekte der intrazellulären Eisenkonzentration auf die Expression anti-oxidativer Enzyme und der Proteincarbonylierung in den kultivierten Podozyten.



## 6 Diskussion

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) werden permanent als Nebenprodukt des normalen Zellmetabolismus gebildet. Physiologische ROS-Konzentrationen spielen eine wichtige Rolle bei verschiedenen zellulären Prozessen, z.B. bei der Steuerung der Genexpression im Rahmen des Wachstums oder der Differenzierung von Zellen (97). Anti-oxidative Enzyme regulieren das Redoxgleichgewicht und unterbinden schädigende Einflüsse, die mit einer überschießenden ROS-Bildung, d.h. oxidativem Stress verbunden sind. Wasserstoffperoxid kann durch die Reaktion mit Metallionen (Fenton-Reaktion) hochreaktive Hydroxyl (OH•)-Radikale bilden. Durch einen direkten oxidativen Angriff dieser Radikale können bestimmte Aminosäuren in Proteinen carbonyliert werden (93). Die Carbonylierung ist eine Proteinmodifikation, die eine Rolle bei der Regulation der oxidativen Balance spielen kann, z.B. über die Modulierung der Expression oder Aktivität von anti-oxidativen Enzymen (66). Es ist jedoch auch bekannt, dass ein hohes Maß an Proteincarbonylierung reguläre Zellfunktionen behindert, da diese Proteine durch zunehmende Änderungen der Proteinkonformation inaktiviert werden oder in der Zelle Aggregate bilden (98).

In dieser Arbeit wurde der Einfluss und die Relevanz von Proteincarbonylierungen im Rahmen der diabetischen Nephropathie in Mausmodellen für den Typ I bzw. Typ II Diabetes sowie in kultivierten Podozyten der Maus untersucht. Dabei konnte eine Glutathionperoxidase-Aktivitätssteigerung in frühen Stadien des Typ I Diabetes nachgewiesen werden, die mit einer erhöhten Carbonylierung der GPx-1 assoziiert war. Im Typ II Diabetes-Modell, bei dem die GPx-1 und GPx-4 Expression in jungen Tieren zu Beginn der Erkrankung erhöht war, sowie in kultivierten Podozyten konnte eine solche aktivitätssteigernde Carbonylierung der GPx-1 nicht nachgewiesen werden.

### 6.1 Eigenschaften der untersuchten diabetischen Mausmodelle

Zunächst wurden für die Untersuchungen zur diabetischen Nephropathie *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäuse gewählt, da diese Tiere schon sehr früh spontan einen Diabetes entwickeln und bei sehr hohen Blutzuckerspiegeln (üblicherweise > 500 mg/dl) rasch die Entwicklung von diabetischen Komplikationen folgt (99). Trotz dieses schweren Diabetes-Verlaufs entwickeln *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäuse überwiegend leichte nephropathische Symptome mit einer milden Albuminurie sowie mäßiger Mesangium-Expansion und Verdickung der Basalmembran (12,100). Die Hyperglykämie löst jedoch schwere Schäden an der Retina dieser Tiere aus, sodass *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäuse häufig für Untersuchungen zur diabetischen Retinopathie verwendet werden (101). Im

Gegensatz dazu entwickeln db/db-Mäuse starke vaskuläre Schädigungen und einen schwereren Verlauf der diabetischen Nephropathie. Charakteristisch ist weiterhin eine schwere Albuminurie (bis zu 600 µg Albumin/24 Stunden), assoziiert mit glomerulärer Hypertrophie, Verlust von Podozyten, Expansion der mesangialen Matrix und Verdickung der Basalmembran (100). Diese Symptome entwickeln sich eher langsam und sind zum Teil erst in Mäusen ab einem Alter von 6 Monaten deutlich ausgebildet. db/db-Mäuse sind ein etabliertes Modell für die frühen Symptome der humanen diabetischen Nephropathie, jedoch entwickeln sie im späteren Verlauf keine Mesangiolyse oder tubuläre Atrophie (12,102).

Ein besonderes Augenmerk in dieser Arbeit war auf die Rolle von Podozyten bei der Entwicklung der diabetischen Nephropathie gerichtet. Podozyten wird eine Schlüsselrolle im Verständnis der diabetischen Nephropathie eingeräumt. So können sich diese Zellen nicht selber regenerieren und ihr Verlust führt zur Vernarbung und zu Lücken in der glomerulären Filtrationsbarriere (39,40). Die Folgen des Podozytenverlusts sind Glomerulosklerose, Albuminurie und Nierenversagen (40). Es ist daher entscheidend zu verstehen wie es zu diesen schädlichen Auswirkungen auf die Podozyten kommt. In dieser Arbeit wurde eine Podozyten-Zelllinie verwendet, die unter normoglykämischen sowie verschiedenen hyperglykämischen Bedingungen kultiviert wurde. Für die *in vitro*-Versuche wurden Glucose-Konzentrationen bis zu 25 mM (500 mg/dl) verwendet. Dies entspricht einem Wert, wie er im Plasma von Menschen mit Diabetes vorkommt. Die Kontrollzellen wurden in 5 mM Glucose kultiviert, was in etwa der physiologischen Glucose-Konzentration im Plasma gesunder Menschen (100 mg/dl) entspricht.

Methylglyoxal ist ein reaktives, toxisches Nebenprodukt des Glucose-Stoffwechsels und ist insbesondere bei Menschen mit Diabetes nachweisbar (103,104). Bei ihnen kann Methylglyoxal in einer Konzentration von etwa 200 nM im Plasma nachgewiesen werden (105). Da jedoch mehr als 99% des Methylglyoxal nicht frei im Plasma vorliegt sondern reversibel oder irreversibel an Proteine gebunden ist (106), wurde es in dieser Arbeit zur Stimulation der Zellen in Konzentrationen bis zu 25 µM verwendet. Um zu untersuchen, wie die verschiedenen Glucose bzw. Methylglyoxal-Konzentrationen die Podozyten beeinflussen, wurden die Effekte entweder nach 24 Stunden oder nach 7 Tagen analysiert. Der Analysezeitpunkt nach 24 Stunden wurde gewählt, da eine erhöhte ROS-Produktion schon innerhalb einer Stunde nach Glucose-Exposition gemessen werden konnte. Auch andere Studien können Änderungen in der Expression bestimmter anti-oxidativer Enzyme, z.B. in Endothelzellen, bereits nach 24 Stunden Hyperglykämie detektieren (107). Da Diabetes-assoziierte Komplikationen jedoch erst mit länger fortschreitender Erkrankung auftreten, wurde die Expression der anti-oxidativen Enzyme auch nach 7 Tagen analysiert, um mögliche Langzeit-Effekte der hohen Glucose-Konzentrationen zu detektieren. Diese Langzeit-

Exposition von Zellen gegenüber hohen Glucose-Konzentrationen ist ebenfalls in der Literatur weit verbreitet (108,109). Einige Studien weisen auch auf verschiedene Glucose-induzierte Effekte auf die zelluläre ROS-Produktion bzw. mitochondriale Funktionen zu frühen und späten Betrachtungszeitpunkten hin (110,111).

Für die Untersuchungen an Podozyten wurde eine Zelllinie verwendet. Da primäre, ausgereifte Podozyten in ihrer Zellteilung stark eingeschränkt sind, stellt die Verwendung einer Zelllinie speziell für Forschungen an kultivierten Podozyten eine etablierte Methode dar (112). Zelllinien sind jedoch bestimmten Limitierungen unterworfen, da sie nicht die komplette biologische Variabilität widerspiegeln können. Daher sind auch erfolgreich Bemühungen unternommen worden, um primäre Podozyten aus der Niere von Mäusen oder Ratten zu isolieren und sie eine begrenzte Zeit in Kultur zu halten (113,114).

In dieser, wie in vielen anderen Studien, wurden die kultivierten Podozyten isoliert betrachtet (111,115,116). Allerdings ist es wichtig, die einzelnen glomerulären Zelltypen nicht isoliert, sondern in der Gesamtschau des glomerulären Filters zu untersuchen. So konnte nachgewiesen werden, dass die einzelnen Zelltypen auch untereinander kommunizieren können. Lokale Schädigungen einzelner Podozyten können sich auf weitere Podozyten ausbreiten und schließlich auch die Vitalität der Endothel- oder Mesangiumszellen beeinflussen (117). So kann selbst ein lokal begrenzter Schaden an einigen Podozyten zu einer schwerwiegenden glomerulären Funktionsstörung führen. Auch von Mesangiums- und Endothelzellen freigesetzte Faktoren haben einen Einfluss auf die Vitalität der Podozyten. U.a. beeinflusst das durch mesangiale Zellschäden induzierte Chemokin CXCL12 die Podozyten-Integrität und deren Adhäsion an der Basalmembran (32).

### **6.2 Unterschiedliche Auswirkungen der diabetischen Nephropathie auf verschiedene glomeruläre Zelltypen in *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäusen**

In der vorliegenden Arbeit konnten in den Nieren diabetischer *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäusen größere Mengen an carbonylierten Proteinen vor allem in den Glomeruli lokalisiert werden. Damit übereinstimmend konnte eine gesteigerte ROS-Produktion in der Niere bisher fast ausschließlich in Glomeruli und den sich an diese anschließenden proximalen Tubuli detektiert werden (43). Veränderungen in den Glomeruli der Niere sind üblicherweise auch erste morphologische Hinweise, die auf eine Nephropathie schließen lassen (43,118).

Mithilfe von Immunfluoreszenzaufnahmen konnte eine Proteincarbonylierung in dieser Arbeit ausschließlich in Podozyten, Mesangiumszellen und parietalen Epithelzellen der Bowman'schen Kapsel detektiert werden. In den mikrovaskulären (Kapillar-)Endothelzellen

der Glomeruli hingegen ließen sich keine carbonylierten Proteine nachweisen. Möglicherweise ist der oxidative Stress in den mikrovaskulären Endothelzellen weniger ausgeprägt als in den anderen glomerulären Zelltypen. Eine Hauptquelle von ROS stellt die mitochondriale Atmungskette dar. Endothelzellen gewinnen ATP jedoch hauptsächlich durch Glykolyse (119). So haben Mitochondrien in Endothelzellen nur einen Anteil von 2-6% des Zellvolumens, während es in anderen Zellen wie z.B. Hepatozyten oder Myozyten ca. 30% sind (120).

Auch die intrazellulären Glucose-Konzentrationen können in den verschiedenen glomerulären Zelltypen unterschiedlich sein und damit in verschiedenem Maße zur Entstehung von oxidativem Stress beitragen. So ist bekannt, dass kultivierte Podozyten und Mesangiumszellen den hoch affinen Glucosetransporter GLUT1 bei erhöhter Glucose-Verfügbarkeit verstärkt exprimieren (121,122). Auch der Glucosetransporter GLUT8 ist in Podozyten von db/db-Mäusen in stärkerem Maß exprimiert als in Podozyten von nicht-diabetischen Mäusen (123). Daher nehmen Podozyten und Mesangiumszellen diabetischer Tiere vermutlich große Mengen an Glucose auf. Für die glomerulären mikrovaskulären Endothelzellen ist eine solche Steigerung der Abundanz bestimmter Glucosetransporter nicht bekannt. Im Gegenteil, oxidativer Stress kann GLUT1 in den mikrovaskulären Endothelzellen der Retina inaktivieren (124), während die Glucose-Aufnahme in Endothelzellen aus der Aorta durch unterschiedlich hohe Glucose-Konzentrationen nicht beeinflusst wird (125).

NADPH-Oxidasen (Nox) leisten einen entscheidenden Beitrag zur Superoxid-bzw.  $H_2O_2$ -Produktion in der Niere (126,127). Vor allem Nox 1, 2 und 4 spielen hier eine Rolle. Die Aktivität dieser Nox wird durch Angiotensin II, *transforming growth factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) oder AGEs, die in einem diabetischen Milieu erhöht vorliegen, verstärkt (128). Eine Vielzahl an Studien beschreibt eine erhöhte Nox4-Expression in Podozyten und Mesangiumszellen in diabetischen Tiermodellen und in Kultur nach Hyperglykämie. Vor allem in Podozyten und Mesangiumszellen trägt die ROS-Bildung über Nox wesentlich zum dort präsenten oxidativen Stress und den dadurch ausgelösten Zellschäden bei (128). Nox4-Inhibition reduziert signifikant oxidativen Stress ( $H_2O_2$ -Bildung) und Schäden an Podozyten *in vivo* und *in vitro* (128). In glomerulären Endothelzellen hat die ROS-Produktion über die verschiedenen NADPH-Oxidasen dagegen nur eine geringe Bedeutung (129).

Einen Einfluss auf die Proteincarbonylierung kann auch die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) haben, die von den mikrovaskulären Endothelzellen verstärkt exprimiert wird. Das gebildete NO reagiert mit  $O_2^-$  zu der reaktiven Stickstoffverbindung Peroxinitrit. Sena *et al.* konnten zeigen, dass in Endothelzellen der Aorta und in Nierenarterien von diabetischen Ratten große Mengen Nitrotyrosin-modifizierter Proteine vorliegen. Dies kann

bedeuten, dass diese posttranslationale Proteinmodifikation in den glomerulären Endothelzellen eine größere Rolle spielen könnte als die Proteincarbonylierung (130).

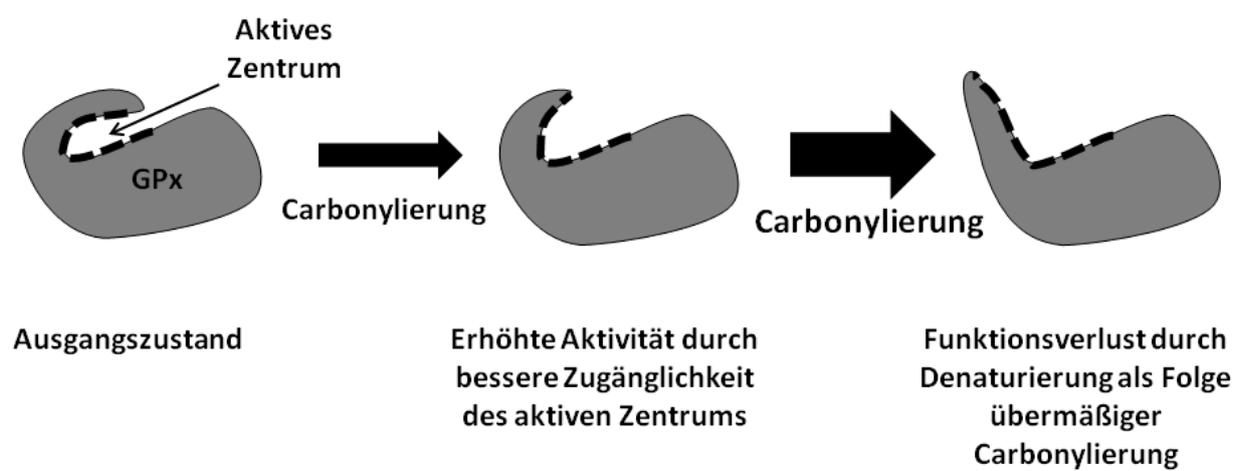
Eine geringe Glucose-Aufnahme und verminderte ROS-Produktion über die mitochondriale Atmungskette oder Nox könnte auch erklären warum die Expression von GPx-1 und GPx-4, im Gegensatz zu Podozyten und Mesangiumszellen, speziell in den glomerulären Endothelzellen diabetischer Mäuse nicht detektiert werden konnte. So könnte in den Endothelzellen der oxidative Stress geringer ausfallen und daher keine (redoxabhängige) Steigerung der Expression dieser Glutathionperoxidasen auslösen.

### 6.3 Die Rolle der GPx-1 bei der diabetischen Nephropathie

In den Podozyten wurde oxidativer Stress bei Normo- und Hyperglykämie durch Selen-Supplementation im Medium signifikant reduziert. Dies lässt auf eine wichtige Rolle für Selenoenzyme im Schutz gegen oxidativen Stress in Podozyten schließen. In der Tat war in den Podozyten die GPx-1-Expression nach Zugabe von Glucose oder Methylglyoxal gesteigert, während die CuZnSOD und MnSOD-Proteinmengen unverändert blieben. Auch in diabetischen *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäusen und jungen db/db-Mäusen war die GPx-Expression im Vergleich zu nicht-diabetischen Mäusen verschieden reguliert. Dies lässt eine Bedeutung der GPx-1 für den Schutz vor diabetisch bedingten Nierenschäden vermuten. *In vivo* scheint es jedoch möglich, dass die Aktivität der GPx-1 auch durch andere Peroxidasen ersetzt werden kann. So führt eine globale GPx-1-Depletion nicht zu messbaren Effekten auf das Ausmaß der diabetischen Nephropathie in STZ-behandelten diabetischen Mäusen (131). Nicht-diabetische GPx-1-Knockoutmäuse zeigen ebenfalls keinen Phänotyp unter normalen Bedingungen, weisen aber eine erhöhte Mortalität bei Induktion von oxidativem Stress auf (132).

Erhöhte GPx-1 und GPx-4-Proteinkonzentrationen konnten in Lysaten des Nierenkortex von *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäusen ab einem Alter von 3 Monaten im Western Blot nachgewiesen werden. Bei einem Monat alten nicht-diabetischen wie diabetischen *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäusen waren die Proteinmengen vergleichbar. Trotzdem war die GPx-Aktivität auch in den Nierenproben der einen Monat alten *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäuse erhöht. Hier konnte eine gesteigerte Carbonylierung der GPx-1 nachgewiesen werden. Damit konnte möglicherweise ein neuartiger Regulationsmechanismus für die GPx-1-Aktivität *in vivo* identifiziert werden. Die Proteincarbonylierung könnte ein relevanter Mechanismus sein, um die GPx-1-Aktivität unter moderaten oxidativen Stressbedingungen zu verstärken. Andere Effekte der Carbonylierung auf die Aktivität von weiteren Enzymen konnten bereits nachgewiesen werden. So reduziert Carbonylierung die Aktivität von Ca<sup>2+</sup>-ATPasen und Kreatinkinasen in Skelettmuskelzellen (65,133). Im Gegensatz dazu wird die Aktivität der Carnosinase durch Carbonylierung

gesteigert, durch NO-abhängige S-Nitrosylierung dagegen gehemmt (134). Carbonylierungen an einem Protein können die Sekundärstruktur des betroffenen Peptids verändern (135). Dies kann die beschriebene Aktivitätszunahme bzw. Abnahme einzelner Enzyme erklären. Im Fall von GPx-1 ist es möglich, dass durch die Konformationsänderung zunächst das aktive Zentrum für Substrate besser zugänglich wird (Abb. 42). Durch zusätzliche Carbonylierung kann sich die Struktur jedoch weiter ändern und neue Aminosäuren für weitere Carbonylierungen zugänglich machen. Durch hochgradige Carbonylierung kann das Enzym dann schließlich denaturiert und funktionslos werden.



**Abb. 42: Mögliche Auswirkungen einer Carbonylierung auf die GPx-Aktivität.**

Untersuchungen durch Massenspektrometrie haben gezeigt, dass lediglich bestimmte Threonin-, Lysin-, Prolin- und Argininreste des GPx-1-Proteins durch Metall-katalysierte Oxidation bzw. nach Stimulation mit Methylglyoxal carbonyliert werden können (136). Darüber hinaus kommt es an Cystein-Resten zu Methylglyoxal-Anlagerungen. Interessanterweise führt dabei die Methylglyoxal-Inkubation zu einem anderen Carbonylierungsmuster als eine Metall-katalysierte Oxidation (137). Dies kann ein weiterer Hinweis auf die spezifische Regulation der GPx-Aktivität durch verschiedene Intensitäten an oxidativem Stress darstellen. Auch an anderen Proteinen konnten verschiedene Carbonylierungsprofile, je nach Art des oxidativen Stresses, beobachtet werden, so z. B. für Albumin nach Metall-katalysierter Oxidation oder Oxidation durch hypochlorige Säure (138). In db/db-Mäusen konnte eine erhöhte GPx-1 und GPx-4-Expression zu Beginn der Diabetes-Erkrankung, d.h. in 10 Wochen alten Tieren, detektiert werden. Dennoch resultierte diese erhöhte Proteinmenge nicht in einer gesteigerten GPx-Aktivität. Auch in Bezug auf die Carbonylierung der GPx-1 konnte in diesen Tieren kein quantitativer Unterschied detektiert

werden. In den kultivierten Podozyten konnte ebenfalls eine Hyperglykämie-induzierte Mehrexpression der GPx-1 beobachtet werden, während die Aktivität unabhängig von der Carbonylierung abnahm. Daher müssen andere Faktoren die Aktivität der GPx-1 in den jungen db/db-Mäusen bzw. den murinen kultivierten Podozyten hemmen. So sind eine Reihe von oxidativen Modifikationen bekannt, die die Aktivität der GPx-1 modulieren können. U.a. konnte gezeigt werden, dass Methylglyoxal (durch Adduktbildung) die GPx-1 irreversibel modifizieren kann und dadurch inaktiviert. Dies geschieht durch Methylglyoxal-Anlagerung an Argininresten an Position 184 und 185 der Glutathion-Bindungsstelle der bovinen GPx-1 (139). Weiterhin konnte eine Ethanol-induzierte GPx-1-Acetylierung in der Leber von Ratten nachgewiesen werden (140). Diese Acetylierung an Lysin-Resten reduziert ebenfalls die GPx-1-Aktivität.

Im Gegensatz dazu sind auch verschiedene aktivitätsverstärkende Modifikationen für die GPx-1 bekannt. Die Tyrosin-Kinasen c-Abl und Arg (*Abl-related gene*) werden durch oxidativen Stress aktiviert und steigern die GPx-1-Aktivität durch Phosphorylierung des Tyrosins an Position 96 (141). Außerdem ist eine GPx-1-Modifikation durch Glykosylierung am C-terminalen Proteinende mit N-Acetylglukosamin beschrieben, die die Bindung zu c-Abl und Arg verstärkt und damit ebenfalls wichtig für die Aktivierung der GPx-1 ist (142).

Neben einer gesteigerten GPx-1-Proteinexpression in Folge eines vermehrten oxidativen Stress (143) existieren durch post-translationale Proteinmodifikationen also zusätzliche aktivitätsverstärkende bzw. -inhibierende Regulationsmöglichkeiten. Verschiedene Studien zeigen, dass eine hohe GPx-Aktivität eine schädliche Wirkung haben kann. So ist eine erhöhte GPx-Expression mit Insulin-Resistenz und Hyperglykämie assoziiert (144), da auch der Insulin-Signalweg von der Generierung von ROS abhängig ist. Eine erhöhte Selen-Aufnahme erhöht sogar das Risiko an Diabetes zu erkranken (145). Daher hat eine hohe GPx-Aktivität nicht immer unbedingt einen positiven Effekt. Durch diese Anzahl an post-translationalen Modifikationen kann die GPx-Aktivität ohne lange Reaktionszeiten an die aktuellen intrazellulären ROS-Mengen angepasst werden und damit sicher stellen, dass stets auch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Signalmolekül zur Verfügung steht. Dies weist auf eine sensible Balance im Redoxstatus einer Zelle hin.

Um die Relevanz von GPx-1 als anti-oxidativem Enzym in den kultivierten Podozyten zu untersuchen, wurde die GPx-1-Proteinmenge mittels RNA-Interferenz reduziert. Anschließend zeigten Western Blot-Analysen eine kompensatorische Verstärkung der GPx-4-Expression unter Hyperglykämie, während die Expression von Peroxiredoxin II verringert war. Sowohl GPx-1 als auch GPx-4 können Wasserstoffperoxid reduzieren. Daher kann, in gewissem Umfang, die GPx-4 eine verringerte Expression oder Aktivität der GPx-1

kompensieren. Allerdings liegt GPx-4 im Vergleich zu GPx-1 in nur sehr geringen Mengen in der Niere vor (146). Daher ist es möglich, dass die beobachtete Steigerung der GPx-4-Proteinmenge um 50% alleine nicht ausreicht, um die Reduktion der GPx-1 zu kompensieren. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass eine Metall-katalysierte Carbonylierung der GPx-4 deren Aktivität ähnlich wie die der GPx-1 steigern kann (137).

Auch Prx II ist in der Lage, Wasserstoffperoxid zu reduzieren und zeigt damit ebenfalls eine Überlappung mit der Funktion der GPx-1. Entgegen den Erwartungen zeigten die Zellen, in denen die GPx-1-Expression reduziert wurde, jedoch auch eine um etwa 60% verringerte Menge an Prx II gegenüber nicht-transfizierten Zellen bzw. Zellen, die mit einer *scrambled* siRNA transfiziert worden waren. Es ist bekannt, dass Prx II, neben seiner Funktion als anti-oxidatives Enzym, auch anti-apoptotische Eigenschaften besitzt. Bei hohem Zellstress dient Prx II als molekulares Chaperon (83). Hsu *et al.* konnten zeigen, dass Prx II in Podozyten in großen Mengen vorhanden ist, jedoch im Rahmen einer Angiotensin II-induzierten Apoptose deutlich zurückgeht (115). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Vitalität der Podozyten durch die verringerte Expression der GPx-1 reduziert ist.

Mehr Aufschlüsse zur Rolle der GPx-1 in den Podozyten könnte eine deutlich bessere GPx-1-Depletion liefern. In dieser Arbeit wurde ein siRNA-basierendes Verfahren gewählt, das die Proteinmenge nur um 30% reduzierte. Die Expression von funktionalem GPx-1 ist aber hauptsächlich über den Einbau von Selenocystein und damit der Verfügbarkeit von Selen und den Proteinen des Selen-Metabolismus reguliert. Selen-Mangelbedingungen sorgen für einen zügigen Abbau der GPx-1 mRNA (147). Außerdem ist der Einbau des Selenocysteins am UGA-Codon im Allgemeinen ein sehr ineffizienter Prozess, der häufig zu einem Kettenabbruch während der Translation führt (148–150). Im Speziellen ist die GPx-1 mRNA, verglichen mit z.B. der mRNA für andere Selenoenzyme wie GPx-4, für sich genommen bereits instabil und wird zügig abgebaut (151). Ein anderes Protein, das die GPx-1 Expression beeinflusst, ist das *selenium-binding protein 1* (SBP1). Es konnte gezeigt werden, dass die Proteinkonzentrationen von GPx-1 und SBP1 negativ miteinander korreliert sind. Der genaue Mechanismus wie die GPx-1-Expression durch SBP1 reguliert wird bleibt unklar, vermutlich spielt aber die Konkurrenz um intrazelluläres Selen eine Rolle (152). In Summe bestimmen diese Translationsmechanismen die GPx-1-Proteinmenge mehr als es für die Transkription und vorliegende Menge an mRNA der Fall ist. Dadurch ist die Effizienz der RNA-Interferenz vermutlich limitiert.

#### 6.4 Die Rolle der Proteincarbonylierung bei der diabetischen Nephropathie

In *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäusen und in den untersuchten Glomeruli der db/db-Mäuse wurde per Immunfluoreszenzfärbung eine Zunahme an Proteincarbonylierung im Vergleich zu den nicht-diabetischen Kontrolltieren nachgewiesen. Während jedoch in diabetischen *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäusen das Ausmaß der Proteincarbonylierung mit dem Alter zunahm, nahm die spezifische Carbonylierung der GPx-1 mit dem Alter ab. Eine mögliche Erklärung hierfür ist der gezielte Abbau von stark carbonyliertem GPx-1 durch das Proteasom (65). Eine weitere Möglichkeit sind spezifische Decarbonylierungsreaktionen. Auch bei der funktionell wichtigen Phosphorylierung gibt es die Möglichkeit der Dephosphorylierung, darum sollte auch die Möglichkeit der Decarbonylierung als mögliche Deaktivierungsreaktion in Betracht gezogen werden. Dies wird bislang jedoch kontrovers diskutiert. Oft gilt die Carbonylierung als irreversibel mit der hauptsächlichen Funktion fehlerhafte oder beschädigte Proteine für proteasomalen Abbau zu markieren (63,64). Andererseits beschreiben Wong *et al.* eine Decarbonylierungsreaktion carbonylierter Proteine, an der Cystein oder Glutathion als Thiol-Substrat beteiligt sind (153). In einer anderen Studie konnte Thioredoxin als beteiligter Partner an Decarbonylierungen diverser Proteine identifiziert werden (68). Es gibt enzymatische Wege, die zumindest direkt eingeführte Carbonylgruppen an freien Aminosäuren entfernen können: Die Enzyme Threonin-3-Dehydrogenase, Saccharopin-Dehydrogenase oder Ornithin-Aminotransferase können bestimmte carbonylierte Aminosäuren in Threonin, Lysin bzw. Arginin umwandeln (154). Die *in vivo*-Relevanz dieser Reaktionen ist allerdings unklar.

Bei den *in situ*-Untersuchungen mittels Immunfluoreszenz in der Niere der diabetischen Mäuse konnten große Mengen carbonylierter Proteine vor allem in den Podozyten detektiert werden. Im Zellkultursystem war hingegen keine Zunahme der Proteincarbonylierung in Podozyten bei Hyperglykämie nachzuweisen. Es ist daher möglich, dass Mechanismen der spezifischen Carbonylierung, Decarbonylierung oder dem Abbau carbonylierter Proteine in kultivierten Zellen, verglichen mit Podozyten im Glomerulus, die im Austausch mit mindestens zwei anderen Zelltypen stehen, verschieden reguliert sind. Ein Abbau carbonylierter Proteine durch das Proteasom scheint in den kultivierten Podozyten eine geringe Rolle zu spielen, wie die Versuche mit dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib zeigten. Der Proteincarbonylierung wird im Allgemeinen eine Rolle bei der Markierung für den Abbau durch das 26S-Proteasom zugesprochen (65). In den kultivierten Podozyten stieg die Menge an Proteincarbonylierung unter hyperglykämischen Bedingungen nach Proteasom-Inhibition jedoch nur unwesentlich an. Allerdings kann im hier untersuchten Modell der proteasomale Abbau vermindert sein. Die Carbonylierung einer Untereinheit vom 26S-Proteasom kann seine Aktivität inhibieren (155). Auch Addukt-Bildung mit Methylglyoxal *in*

*vitro* und in diabetischen Mäusen *in vivo* reduziert die katalytische Aktivität des Proteasoms (156).

Sollten tatsächlich spezifische Decarboxylierungsreaktionen ablaufen, ist es möglich, dass der in dieser Studie gewählte Analysezeitpunkt nach 24 Stunden ungünstig war, um eine erhöhte Proteincarboxylierung detektieren zu können. Mehrere Quellen berichten von einer lediglich transienten Zunahme der Proteincarboxylierung. In glatten Muskelzellen ist die Gesamtproteincarboxylierung bereits 30 min nach Endothelin-1-Stimulation auf das Ausgangsniveau reduziert (68). In Skelettmuskelzellen ist eine gesteigerte Proteincarboxylierung ebenfalls nur für eine Stunde bei erhöhtem mitochondrial-bedingtem, oxidativen Stress messbar (133).

Es ist das entscheidende Kriterium eines Signalweges, dass dieser sich bei auslösenden Stimuli nicht nur schnell aktivieren lässt, sondern die Signalweiterleitung auch zeitnah beendet werden kann. Die Identifizierung von „Decarboxylasen“ könnte daher die Bedeutung der Proteincarboxylierung als möglichen Signalmechanismus weiter verstärken.

### **6.5 Unterschiedliche Proteincarboxylierungsprofile und GPx-Expression bei der Entwicklung der diabetischen Nephropathie in *Ins2<sup>Akita</sup>* und db/db-Mäusen**

In dieser Studie wurden Unterschiede in der Entwicklung nephropathischer Schäden zwischen db/db (Typ II Diabetes) und *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäusen (Typ I Diabetes) nachgewiesen. Verglichen mit gesunden Mäusen, war in den Nieren von *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäusen ab einem Alter von 3 Monaten eine gesteigerte Proteincarboxylierung und erhöhte GPx-1 bzw. GPx-4-Expression nachweisbar; in db/db-Mäusen hingegen war eine Zunahme der Proteincarboxylierung nur dann belegbar, wenn gezielt Glomeruli mittels Immunfluoreszenz analysiert wurden, nicht aber durch Western Blot-Analysen von Nierenkortexhomogenaten. In diesen Tieren war eine erhöhte GPx-1 und GPx-4-Expression nur zu Beginn des Diabetes (10 Wochen), jedoch nicht mehr zu späteren Zeitpunkten nachweisbar.

Im Allgemeinen sind die pathophysiologischen Mechanismen, die zur Entwicklung einer diabetischen Nephropathie führen, unabhängig von dem Vorliegen eines Typ I oder Typ II Diabetes (157). Trotzdem ist der Typ II-Diabetes häufig von einer Anzahl weiterer Morbiditätsfaktoren wie Bluthochdruck, Adipositas, Arteriosklerose und Dyslipidämie begleitet, die die Nieren zusätzlich schädigen und so den Nephropathie-Verlauf verschlimmern können.

Eine Studie von Susztak *et al.* konnte bereits zeigen, dass der Verlust von Podozyten und Albuminurie in db/db-Mäusen verhältnismäßig früher einsetzt (nach 8-12 Wochen) als in

*Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäusen (ab 20 Wochen, (99)). Genexpressionsstudien konnten außerdem nachweisen, dass im Vergleich zu nicht-diabetischen Kontrolltieren in Nieren von db/db-Mäusen und eines durch STZ induzierten Typ I Diabetesmodells eine große Anzahl an Genen unterschiedlich reguliert sind. Dazu gehören beispielsweise die Glutathion-S-Transferase, GPx-3 oder auch mitochondriale Proteine (158). Dies stimmt mit der hier gemachten Beobachtung überein, dass es offenbar Unterschiede im Ausmaß der Poteincarbonylierung und der GPx-Expression zwischen Mäusen mit Typ I bzw. Typ II Diabetes existieren. Die vorgenannte Genexpressionsstudie (158) konnte in den untersuchten 24 Wochen alten db/db-Mäusen keine Unterschiede in der renalen GPx-1 bzw. GPx-4-Expression feststellen. Dies stimmt damit überein, dass auch im Rahmen dieser Arbeit in den verwendeten 18 und 26 Wochen alten db/db-Mäusen keine GPx-Expressionsunterschiede detektiert werden konnten.

In *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäusen und db/db-Mäusen sind verschiedene Signalwege aktiv, die die Unterschiede in den untersuchten Modellen erklären können. In db/db-Mäusen wird das Adipokin Leptin in großen Mengen produziert (159). In diesen Tieren wird der komplette Leptinrezeptor *Ob-Rb*, der für die Leptin-vermittelte Appetit-Regulation im Hypothalamus benötigt wird, nicht exprimiert. Allerdings sind weitere Leptin-Rezeptor-Splicevarianten, die andere Signalkaskaden aktivieren können, auch in der Niere nachweisbar (160,161). Diese Leptin-Rezeptorvarianten besitzen identische extrazelluläre amino-terminale Enden, die Leptin binden können, unterscheiden sich jedoch in den carboxy-terminalen Enden, die für die Signaltransduktion wichtig sind. Jedoch können selbst in kultivierten Mesangiumszellen von db/db-Mäusen durch Leptin-Zugabe die Glucose-Aufnahme gesteigert und vermehrt Kollagen, als Bestandteil der mesangialen Matrix, gebildet werden (160). Leptin induziert in Mesangiumszellen außerdem die Expression des *transforming growth factor β* (TGF-β)-Rezeptors II (160) und in glomerulären Endothelzellen die Sekretion des Liganden TGF-β1 (161). In Mesangiumszellen moduliert dies die Expression extrazellulärer Matrixmoleküle und trägt so zur Glomerulosklerose bei (162). Auch auf Podozyten hat TGF-β1 Einfluss. Hier kann es Apoptose induzieren (163).

In *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäusen gibt es keine Belege für eine vermehrte Leptin-Expression. Bei diesen Tieren konnten aber auch protektive Effekte einer artifiziell vermehrten Leptin-Produktion beobachtet werden. Leptin-transgene *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäuse weisen reduzierte Blutzuckerwerte und eine bessere Glucose-Toleranz auf als *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäuse, die über normale Leptin-Konzentrationen verfügen (164).

Auch Insulin ist in db/db-Mäusen weiter präsent, während *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäuse aufgrund des genetischen Defekts nur sehr geringe Mengen an funktionalem Insulin bilden können. In den hier verwendeten C57BL/6 db/db-Mäusen wird Insulin während der Diabetesentwicklung

weiter sekretiert. Insulin-Rezeptoren sind auch in Podozyten exprimiert (165). In Podozyten-Zelllinien kann Insulin-Stimulation die Glucose-Aufnahme der Zellen durch Mobilisation von GLUT1 und GLUT4 stark erhöhen (165,166). Auch *in vivo* zeigt sich eine Insulin-Abhängigkeit der glomerulären Filtrationsbarriere. Bereits 1980 konnte gezeigt werden, dass die Infusion von Insulin (zusammen mit Glucose, um die Normoglykämie aufrechtzuerhalten) in gesunden Probanden zu einer Albuminurie führt (167). Unterschiedliche Insulin-Mengen in *Ins2<sup>Akita</sup>* und db/db-Mäusen können daher unterschiedliche Effekte in der Niere hervorrufen. Jedoch hat auch das Fehlen von Insulin-Signalwegen in der Niere schädliche Auswirkungen. Eine selektive Insulinrezeptor-Depletion in Podozyten von gesunden Mäusen führt zu Symptomen ähnlich einer diabetischen Nephropathie (165). Es ist daher möglich, dass es während dem Verlauf der diabetischen Nephropathie auch zum Verlust der Insulin-Sensitivität der Podozyten kommt und dass dies den Krankheitsverlauf mit beeinflusst (168).

### 6.6 Die Auswirkungen von Änderungen im Redox-Gleichgewicht

In dieser Arbeit wurden zwei Modelle verwendet, in denen die oxidative Balance der diabetischen Tiere beeinflusst wurde. Für eine Untersuchung der Auswirkungen von erhöhtem oxidativen Stress wurden 30 Wochen alte hämochromatotische Tiere verwendet. Bei diesen heterozygoten Tieren ist an Position 326 in der Polypeptidkette Serin gegen Cystein in dem Eisenexporter Ferroportin ausgetauscht. Im Alter von 10 Wochen weisen diese hämochromatotischen Tiere bereits etwa zweimal höhere Plasma-Eisenwerte auf als Wildtyp-Mäuse (96). Das Eisen reichert sich bei diesen Tieren auch in den Nieren an. Mäuse mit dieser C326S-Mutation im *FPN*-Gen zeigten eindeutige morphologische Schäden in den Nierenglomeruli. Allerdings konnte keine Beeinflussung der Proteincarbonylierung in den Glomeruli durch die Hämochromatose nachgewiesen werden, obwohl die hohen Eisenkonzentrationen in diesen Tieren über die Fenton-Reaktion zu einer vermehrten Bildung hochreaktiver Hydroxyl-Radikale führen sollten. Es ist auch bekannt, dass erhöhte Eisenwerte im Serum oxidativen Stress intensivieren können (169). Jedoch scheint die Konzentration der Sauerstoffradikale bei diesen Tieren nicht ausreichend hoch zu sein, um eine verstärkte Proteincarbonylierung in den Glomeruli auszulösen. Es ist möglich, dass Eisen in den hämochromatotischen Tieren hauptsächlich in einem Redox-inaktiven Zustand vorliegt. Diese Tiere weisen in der Tat auch hohe Konzentrationen an Ferritin auf, das Eisen bindet und damit für Reaktionen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> weniger zugänglich macht (96). Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen ist die Ferritin-Konzentration in 10 Wochen alten heterozygoten *FPN*-transgenen Mäusen etwa um den Faktor 4 erhöht, die Plasma-Eisenkonzentration dagegen nur um den Faktor 2. Ferritin wird sowohl durch hohe Eisenkonzentrationen als auch durch oxidativen

Stress vermehrt gebildet (170). Auch die Menge des Eisen-gebundenen Transferrins ist in heterozygoten *FPN*-transgenen Mäusen etwa doppelt so hoch wie in Wildtyp-Tieren (96).

Die nachteiligen Effekte der erhöhten Eisenspiegel auf die Nierenmorphologie sind offenbar unabhängig von einer Proteincarbonylierung. Jedoch ist bekannt, dass Eisen weitere Effekte auf die Diabetes-Entwicklung hat. So steigern erhöhte Eisenwerte unter anderem das Risiko an Typ II Diabetes zu erkranken (57). Eine Reduktion der Eisen-Aufnahme mit der Nahrung hingegen kann die Insulin-Sensitivität von Diabetikern verbessern und die Progression der diabetischen Nephropathie deutlich verlangsamen (171).

In dieser Studie wurden 18 Wochen alte db/db-Mäuse mit Sul121 behandelt, um die Konzentration an ROS zu reduzieren. Sul121 stimuliert die endogene H<sub>2</sub>S-Produktion durch das Enzym Cystathionin-β-Synthase. H<sub>2</sub>S dissoziiert bei physiologischen pH-Werten leicht zu HS<sup>-</sup> und ist somit ein effektives Reduktionsmittel, das mit Peroxinitrit oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reagieren kann (172). Eine quantitative mikroskopische Analyse der Glomeruli ergab jedoch keine signifikante Reduktion der Menge an carbonylierten Proteinen durch Sul121 in den db/db-Mäusen. Im Gegensatz dazu war in den Glomeruli nicht-diabetischer Tiere die Proteincarbonylierung sogar leicht aber signifikant erhöht. Eine mögliche Erklärung für diese vermehrte Carbonylierung kann eine verringerte Decarbonylierung darstellen. Cystein wurde als ein mögliches Thiol-haltiges Substrat für die Proteindecarbonylierung vorgeschlagen (153), jedoch wird Cystein durch die gesteigerte H<sub>2</sub>S Produktion des Enzyms Cystathionin-β-Synthase verbraucht (173).

Ohne die Proteincarbonylierung quantitativ zu verändern, weisen mit Sul121 behandelte db/db-Tiere Verbesserungen in der Nierenmorphologie auf. H<sub>2</sub>S besitzt als Gasotransmitter auch anti-inflammatorische, vasorelaxierende und vaskuloprotektive Effekte (174), die unabhängig von einer Beeinflussung des Redoxgleichgewichts zu einer Verbesserung der Nierenmorphologie führen können.

## 6.7 Die Effekte verschiedener Eisen-Konzentrationen auf die kultivierten Podozyten

Wie unter Kapitel 6.6 beschrieben, können veränderte Eisen-Konzentrationen die Entwicklung des Diabetes und einer diabetischen Nephropathie beeinflussen. In dieser Arbeit wurden die Effekte von Eisen auf die Proteincarbonylierung und die Expression antioxidativer Enzyme in den kultivierten Podozyten besonders betrachtet. Ziel war es, herauszufinden, welche Mechanismen zu der ungünstigen Wirkung von Eisen auf die Entwicklung einer diabetischen Nephropathie beitragen. Die Inkubation der kultivierten Zellen mit Fe<sup>3+</sup> oder einem Eisen-Chelator hatte in beiden Fällen eine Abnahme der GPx-1-

Proteinmenge um etwa 50% zur Folge. Es gibt Berichte, dass Eisenkonzentrationen Effekte auf den proteasomalen Abbau von spezifischen Proteinen haben können. Beispielsweise wird das eisenregulatorische Protein II (IRP2) bei hohen Eisenkonzentrationen durch Aktivierung einer E3-Ligase dreimal schneller abgebaut als unter physiologischen Bedingungen (175,176). Ob jedoch auch der Abbau anderer Proteine durch solch einen Mechanismus beeinflusst wird, ist bislang unbekannt.

Auch die Reduktion der Gesamtcarbonylierung unter erhöhten Eisen-Konzentrationen war unerwartet. Die Menge der Proteincarbonylierung wurde 24 Stunden nach Eisen-Zugabe analysiert. Da ROS mit ihrer üblicherweise sehr geringen Halbwertszeit Proteincarbonylierungen sehr viel schneller katalysieren können, besteht auch hier die Möglichkeit, dass das Ausmaß der Carbonylierung 24 Stunden später bereits durch den Abbau der carbonylierten Proteine bzw. Decarbonylierung reduziert war.

In Podozyten konnte eine Transkription des Eisen-regulatorischen Proteins Heparin nachgewiesen werden. Es ist bereits seit längerem bekannt, dass Heparin neben der Leber als Hauptsyntheseort auch in der Niere gebildet wird (177,178). Dabei konnten Epithelzellen, vor allem im dicken absteigenden Teil der Henle-Schleife im Nierenkortex, als Quelle der Heparin-Synthese identifiziert werden. Eine Heparin-Expression in Podozyten ist bisher nicht in der Literatur beschrieben. Vermutlich spielt die Heparin-Expression in der Niere eine Rolle für die Eisenhomöostase im Organismus, da Heparin durch Regulation des divalenten Metalltransporter 1 in Nierentubuluszellen die Reabsorption des filtrierten Eisen beeinflussen kann (177). Veränderte Eisen-Konzentrationen zeigen in Podozyten jedoch keine Regulation der Heparin-Transkription. Heparin ist nach Sekretion in den Urin auch durch seine antimikrobiellen Effekte in den Schutz des Urinaltraktes vor Infekten involviert (179).

### 6.8 Ausblick

Oxidativer Stress ist ein wichtiger Faktor in der Entwicklung der diabetischen Nephropathie. Daher wurde bereits in mehreren Tier- und Patientenstudien der Versuch unternommen, durch eine Reduktion von ROS den Verlauf der diabetischen Nephropathie zu verlangsamen. Während Tierversuche vorsichtigen Optimismus verbreiteten, sind die Ergebnisse in klinischen Studien enttäuschend oder widersprüchlich (180). Hier wurde vor allem die Gabe von Vitamin E als Antioxidans untersucht. In klinischen Studien konnte jedoch kaum ein Nutzen einer derartigen anti-oxidativen Therapie für Diabetiker belegt werden (180). Die Gabe von  $\alpha$ -Liponsäure konnte eine Verbesserung der Insulin-Sensitivität in Menschen mit Typ II Diabetes erreichen, allerdings nur durch intravenöse Infusion (181). Sehr widersprüchlich sind vor allem die Effekte einer Nahrungssupplementierung mit Selen, dem

sowohl positive als auch negative Effekte auf die Entwicklung des Diabetes und seinen Komplikationen zugesprochen werden (182). Auch eine Therapie durch Gabe des GPx-Mimetikums Ebselen konnte in Tierversuchen die Erwartungen nicht komplett erfüllen. Zwar konnte Ebselen in Typ II diabetischen *Zucker diabetic fatty* (ZDF-) Ratten Blutzucker- und HbA1c-Werte reduzieren und die  $\beta$ -Zellmasse durch verminderte Apoptose schützen (183), jedoch wurden die primären nephropathischen Symptome Glomerulosklerose und Albuminurie in *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäusen nicht verbessert (184). Daher ist es schwer, die Rolle von Antioxidantien, vor allem Selen und Selenoenzymen, bei der Entstehung des Diabetes und seinen Komplikationen abzuschätzen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine gesteigerte GPx-1-Carboxylierung mit einer erhöhten GPx-Aktivität assoziiert werden. Diese Funktion der GPx-Carboxylierung konnte in diabetischen *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäusen zu Beginn der diabetischen Nephropathie beobachtet werden. In Typ II diabetischen db/db-Mäusen und älteren *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäusen ließ sich solch ein Mechanismus jedoch nicht nachweisen. Die Möglichkeit besteht, dass dies ein spezifischer Mechanismus ist, um die GPx-Aktivität in diesem Fall auf ein protektives Niveau zu erhöhen. Dieser Mechanismus wird jedoch im weiteren Krankheitsverlauf und längerer Hyperglykämie nicht aufrechterhalten. Eine genaue Identifizierung des Mechanismus, der eine GPx-Carboxylierung in dem beobachteten aktivitätssteigernden Ausmaß in *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäusen auslöst, könnte interessante Hinweise für einen potentiellen therapeutischen Einsatz liefern.

Als Fazit bleibt, dass Eingriffe in das Redoxgleichgewicht mit besonderer Vorsicht erfolgen müssen. Eine Reduktion von oxidativem Stress weist nicht unter allen Bedingungen die erhofften positiven Wirkungen auf die Entwicklung einer diabetischen Nephropathie auf. Es ist zwar belegt, dass hoher oxidativer Stress zu vielgestaltigen Zellschäden führen kann, jedoch vermindert eine zu hohe Peroxidasen-Aktivität Insulin-Signalwege und führt dadurch zu verstärkter Insulin-Resistenz. Das ideale Niveau an oxidativem Stress ist daher ein wichtiger Faktor für den Erhalt der Nierenfunktion.

Weitere Studien sind notwendig, um Mechanismen zu identifizieren, die im Fall der diabetischen Nephropathie zellschädigende Auswirkungen einer gesteigerten Carboxylierung verhindern, damit der initiale protektive Effekt dieser Proteinmodifikation auf Redoxenzyme überwiegt. Falls es gelingt, diese Mechanismen zu ergründen, werden neue Türen für die Behandlung und vielleicht auch eine Primärprophylaxe der diabetischen Nephropathie geöffnet.

---

## 7 Verzeichnisse

### 7.1 Literaturverzeichnis

1. International Diabetes Federation (IDF). IDF Diabetes Atlas 7th edition. *idf.org* (2015). doi:10.1289/image.ehp.v119.i03
2. Köster, I., Schubert, I. & Huppertz, E. Follow up of the CoDiM-Study: Cost of diabetes mellitus 2000-2009. *Dtsch. Medizinische Wochenschrift* **137**, 1013–1016 (2012).
3. WHO. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet. Med.* **15**, 539–553 (1998).
4. Committee, P. Standards of Medical Care in Diabetes - A Classification. *Diabetes Care* **33**, S11–S61 (2010).
5. Huang, S. & Czech, M. P. The GLUT4 Glucose Transporter. *Cell Metab.* **5**, 237–252 (2007).
6. Akerblom, H. K., Vaarala, O., Hyöty, H., Ilonen, J. & Knip, M. Environmental factors in the etiology of type 1 diabetes. *Am. J. Med. Genet.* **115**, 18–29 (2002).
7. Janeway; Immunologie. 7. Auflage S. 783 ff (Spektrum Akademischer Verlag, 2009).
8. Riserus, U., Willett, W. C. & Hu, F. B. Dietary fats and prevention of type 2 diabetes. *Prog Lipid Res* **48**, 44–51 (2009).
9. Ramlo-Halsted, B. a & Edelman, S. V. The natural history of type 2 diabetes. Implications for clinical practice. *Prim. Care* **26**, 771–789 (1999).
10. Sliwinska, A. & Drzewoski, J. Molecular Action of Metformin in Hepatocytes: an Updated Insight. *Curr. Diabetes Rev.* (2015).
11. Vallon, V. The mechanisms and therapeutic potential of SGLT2 inhibitors in diabetes mellitus. *Annu. Rev. Med.* **66**, 255–70 (2015).
12. Alpers, C. E. & Hudkins, K. L. Mouse models of diabetic nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **20**, 278–284 (2011).
13. Breyer, M. D., Böttinger, E., Brosius, F. C., Coffman, T. M., ... Sharma, K. Mouse models of diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**, 27–45 (2005).
14. Yoshioka, M., Kayo, T., Ikeda, T. & Koizumi, A. A novel locus, Mody4, distal to D7Mit189 on chromosome 7 determines early-onset NIDDM in nonobese C57BL/6 (Akita) mutant mice. *Diabetes* **46**, 887–894 (1997).
15. Gurley, S. B., Mach, C. L., Stegbauer, J., Yang, J., ... Coffman, T. M. Influence of genetic background on albuminuria and kidney injury in Ins2(+ / C96Y) (Akita) mice. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **298**, F788–95 (2010).
16. Ron, D. Proteotoxicity in the endoplasmic reticulum: lessons from the Akita diabetic mouse. *J. Clin. Invest.* **109**, 443–5 (2002).
17. The Jackson Laboratory. Maus Stamm Datenblatt 000642. aufgerufen am 17.03.2016 at <<https://www.jax.org/strain/000642>>
18. The Jackson Laboratory. Maus Stamm Datenblatt 000697. aufgerufen am 17.03.2016 at <<https://www.jax.org/strain/000697>>
19. Coleman, D. L. Obesity genes: beneficial effects in heterozygous mice. *Science* (80- ).

- 203**, 663–665 (1979).
20. Scott, R. P. & Quaggin, S. E. The cell biology of renal filtration. *J. Cell Biol.* **209**, 199–210 (2015).
  21. Haraldsson, B., Nyström, J. & Deen, W. M. Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiol. Rev.* **88**, 451–87 (2008).
  22. Haraldsson, B. & Nyström, J. The glomerular endothelium: new insights on function and structure. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **21**, 258–63 (2012).
  23. Ballermann, B. J. Contribution of the endothelium to the glomerular permselectivity barrier in health and disease. *Nephron - Physiol.* **106**, (2007).
  24. Ryan, G. B. & Karnovsky, M. J. Distribution of endogenous albumin in the rat glomerulus: role of hemodynamic factors in glomerular barrier function. *Kidney Int.* **9**, 36–45 (1976).
  25. Hjalmarsson, C., Johansson, B. R. & Haraldsson, B. Electron microscopic evaluation of the endothelial surface layer of glomerular capillaries. *Microvasc. Res.* **67**, 9–17 (2004).
  26. Advani, A. & Gilbert, R. E. The Endothelium in Diabetic Nephropathy. *Semin. Nephrol.* **32**, 199–207 (2012).
  27. Deen, W. M., Lazzara, M. J. & Myers, B. D. Structural determinants of glomerular permeability. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **281**, F579–96 (2001).
  28. Miner, J. H. The glomerular basement membrane. *Exp. Cell Res.* **318**, 973–978 (2012).
  29. Furukawa, T., Ohno, S., Oguchi, H., Hora, K., ... Furuta, S. Morphometric study of glomerular slit diaphragms fixed by rapid-freezing and freeze-substitution. *Kidney Int.* **40**, 621–4 (1991).
  30. Barisoni, L., Mokrzycki, M., Sablay, L., Nagata, M., ... Mundel, P. Podocyte cell cycle regulation and proliferation in collapsing glomerulopathies. *Kidney Int.* **58**, 137–143 (2000).
  31. Pavenstädt, H., Kriz, W. & Kretzler, M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol. Rev.* **83**, 253–307 (2003).
  32. Schlöndorff, D. & Banas, B. The mesangial cell revisited: no cell is an island. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20**, 1179–1187 (2009).
  33. Ritz, E. Diabetic nephropathy. *Saudi J. Kidney Dis. Transpl.* **17**, 481–490 (2006).
  34. Forbes, J. M. & Cooper, M. E. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol. Rev.* **93**, 137–88 (2013).
  35. Freedman, B. I., Bostrom, M., Daeihagh, P. & Bowden, D. W. Genetic factors in diabetic nephropathy. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2**, 1306–1316 (2007).
  36. Najafian, B., Alpers, C. E. & Fogo, A. B. Pathology of human diabetic nephropathy. *Contrib. Nephrol.* **170**, 36–47 (2011).
  37. Drummond, K. & Mauer, M. The Early Natural History of Nephropathy in Type 1 Diabetes: II. Early Renal Structural Changes in Type 1 Diabetes. *Diabetes* **51**, 1580–1587 (2002).
  38. Kuwabara, A., Satoh, M., Tomita, N., Sasaki, T. & Kashihara, N. Deterioration of glomerular endothelial surface layer induced by oxidative stress is implicated in altered permeability of macromolecules in Zucker fatty rats. *Diabetologia* **53**, 2056–2065 (2010).

39. Steffes, M. W. W., Schmidt, D., Mccrery, R. & Basgen, J. M. M. Glomerular cell number in normal subjects and in type 1 diabetic patients. *Kidney Int.* **59**, 2104–2113 (2001).
40. Pagtalunan, M. E., Miller, P. L., Jumping-Eagle, S., Nelson, R. G., ... Meyer, T. W. Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes. *J. Clin. Invest.* **99**, 342–348 (1997).
41. Kashihara, N., Haruna, Y., Kondeti, V. K. & Kanwar, Y. S. Oxidative stress in diabetic nephropathy. *Curr. Med. Chem.* **17**, 4256–4269 (2010).
42. Newsholme, P., Haber, E. P., Hirabara, S. M., Rebelato, E. L., ... Curi, R. Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. *J. Physiol.* **583**, 9–24 (2007).
43. Nishikawa, T., Brownlee, M. & Araki, E. Mitochondrial reactive oxygen species in the pathogenesis of early diabetic nephropathy. *J. Diabetes Investig.* **6**, 137–9 (2015).
44. Greene, D. A., Lattimer, S. A. & Sima, A. A. Sorbitol, phosphoinositides, and sodium-potassium-ATPase in the pathogenesis of diabetic complications. *N. Engl. J. Med.* **316**, 599–606 (1987).
45. Asaba, K., Tojo, A., Onozato, M. L., Goto, A., ... Wilcox, C. S. Effects of NADPH oxidase inhibitor in diabetic nephropathy. *Kidney Int.* **67**, 1890–1898 (2005).
46. Thallas-Bonke, V., Thorpe, S. R., Coughlan, M. T., Fukami, K., ... Forbes, J. M. Inhibition of NADPH oxidase prevents advanced glycation end product-mediated damage in diabetic nephropathy through a protein kinase C-alpha-dependent pathway. *Diabetes* **57**, 460–469 (2008).
47. Fu, M. X., Wells-Knecht, K. J., Blackledge, J. A., Lyons, T. J., ... Baynes, J. W. Glycation, glycooxidation, and cross-linking of collagen by glucose: Kinetics, mechanisms, and inhibition of late stages of the Maillard reaction. *Diabetes* **43**, 676–683 (1994).
48. Bierhaus, A., Hofmann, M. A., Ziegler, R. & Nawroth, P. P. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovasc. Res.* **37**, 586–600 (1998).
49. Makita, Z., Radoff, S., Rayfield, E. J., Yang, Z., ... Vlassara, H. Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy. *N. Engl. J. Med.* **325**, 836–842 (1991).
50. Song, Y. M., Song, S. O., You, Y. H., Yoon, K. H., ... Lee, B. W. Glycated albumin causes pancreatic  $\beta$ -cells dysfunction through autophagy dysfunction. *Endocrinology* **154**, 2626–2639 (2013).
51. Schleicher, E. D., Wagner, E. & Nerlich, A. G. Increased accumulation of the glycooxidation product N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. *J. Clin. Invest.* **99**, 457–68 (1997).
52. Brownlee, M., Vlassara, H., Kooney, A., Ulrich, P. & Cerami, A. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science* **232**, 1629–1632 (1986).
53. Kiefer, A. S., Fleming, T., Eckert, G. J., Poindexter, B. B., ... Yoder, M. C. Methylglyoxal concentrations differ in standard and washed neonatal packed red blood cells. *Pediatr. Res.* **75**, 409–414 (2014).
54. Kalapos, M. P. The tandem of free radicals and methylglyoxal. *Chem. Biol. Interact.*

- 171, 251–271 (2008).
55. Creighton Mitchell, T. & McClain, D. A. Diabetes and hemochromatosis. *Curr. Diab. Rep.* **14**, 488 (2014).
  56. Liu, Q., Sun, L., Tan, Y., Wang, G., ... Cai, L. Role of iron deficiency and overload in the pathogenesis of diabetes and diabetic complications. *Curr. Med Chem.* **16**, 113–129 (2009).
  57. Swaminathan, S., Fonseca, V. A. V., Alam, M. G. M. & Shah, S. S. V. The role of iron in diabetes and its complications. *Diabetes Care* **30**, 1926–33 (2007).
  58. Young, I. S., Tate, S., Lightbody, J. H., McMaster, D. & Trimble, E. R. The effects of desferrioxamine and ascorbate on oxidative stress in the streptozotocin diabetic rat. *Free Radic. Biol. Med.* **18**, 833–40 (1995).
  59. Cooksey, R. C., Jouihan, H. A., Ajioka, R. S., Hazel, M. W., ... McClain, D. A. Oxidative stress,  $\beta$ -cell apoptosis, and decreased insulin secretory capacity in mouse models of hemochromatosis. *Endocrinology* **145**, 5305–5312 (2004).
  60. Cai, Z. & Yan, L.-J. Protein Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health. *J. Biochem. Pharmacol. Res.* **1**, 15–26 (2013).
  61. Wagner, A. H., Hildebrandt, A., Baumgarten, S., Jungmann, A., ... Hecker, M. Tyrosine nitration limits stretch-induced CD40 expression and disconnects CD40 signaling in human endothelial cells. *Blood* **118**, 3734–3742 (2011).
  62. Cattaruzza, M. & Hecker, M. Protein carbonylation and decarboxylation: a new twist to the complex response of vascular cells to oxidative stress. *Circ. Res.* **102**, 273–4 (2008).
  63. Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R. & Milzani, A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol. Med.* **9**, 169–176 (2003).
  64. Nyström, T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J.* **24**, 1311–1317 (2005).
  65. Frohnert, B. I. & Bernlohr, D. a. Protein carbonylation, mitochondrial dysfunction, and insulin resistance. *Adv. Nutr.* **4**, 157–63 (2013).
  66. Curtis, J. M., Hahn, W. S., Long, E. K., Burrill, J. S., ... Bernlohr, D. A. Protein carbonylation and metabolic control systems. *Trends Endocrinol. Metab.* **23**, 399–406 (2012).
  67. McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M. & Hayes, J. D. Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. *J. Biol. Chem.* **278**, 21592–21600 (2003).
  68. Wong, C. M., Cheema, A. K., Zhang, L. & Suzuki, Y. J. Protein carbonylation as a novel mechanism in redox signaling. *Circ. Res.* **102**, 310–318 (2008).
  69. Schreck, R., Rieber, P. & Baeuerle, P. A. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* **10**, 2247–58 (1991).
  70. Thannickal, V. J. & Fanburg, B. L. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **279**, L1005–28 (2000).
  71. Krieger-Brauer, H. I. & Kather, H. Human fat cells possess a plasma membrane-bound H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating system that is activated by insulin via a mechanism bypassing the

- receptor kinase. *J. Clin. Invest.* **89**, 1006–1013 (1992).
72. Lubos, E., Loscalzo, J. & Handy, D. E. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 1957–97 (2011).
  73. Suzuki, Y. J., Forman, H. J. & Sevanian, A. Oxidants as stimulators of signal transduction. [Review] [184 refs]. **22**, 269–285 (1997).
  74. Ray, P. D., Huang, B.-W. & Tsuji, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell. Signal.* **24**, 981–90 (2012).
  75. Brieger, K., Schiavone, S., Miller, J. & Krause, K. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med. Wkly.* 1–14 (2012). doi:10.4414/smw.2012.13659
  76. Morten, K. J., Ackrell, B. a C. & Melov, S. Mitochondrial reactive oxygen species in mice lacking superoxide dismutase 2: attenuation via antioxidant treatment. *J. Biol. Chem.* **281**, 3354–9 (2006).
  77. Fattman, C. L., Schaefer, L. M. & Oury, T. D. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radic. Biol. Med.* **35**, 236–256 (2003).
  78. Rhee, S. G., Yang, K.-S., Kang, S. W., Woo, H. A. & Chang, T.-S. Controlled elimination of intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via post-translational modification. *Antioxid. Redox Signal.* **7**, 619–626 (2005).
  79. Veal, E. A., Day, A. M. & Morgan, B. A. Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol. Cell* **26**, 1–14 (2007).
  80. Wood, Z. A., Schröder, E., Harris, J. R. & Poole, L. B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 32–40 (2003).
  81. Chae, H. Z., Kim, H. J., Kang, S. W. & Rhee, S. G. Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **45**, 101–112 (1999).
  82. Choi, M. H., Lee, I. K., Kim, G. W., Kim, B. U., ... Kang, S. W. Regulation of PDGF signalling and vascular remodelling by peroxiredoxin II. *Nature* **435**, 347–353 (2005).
  83. Barranco-Medina, S., Lázaro, J. J. & Dietz, K. J. The oligomeric conformation of peroxiredoxins links redox state to function. *FEBS Lett.* **583**, 1809–1816 (2009).
  84. Brigelius-Flohé, R. & Maiorino, M. Glutathione peroxidases. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1830**, 3289–3303 (2013).
  85. Caban, K. & Copeland, P. R. Size matters: A view of selenocysteine incorporation from the ribosome. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 73–81 (2006).
  86. Takebe, G., Yarimizu, J., Saito, Y., Hayashi, T., ... Takahashi, K. A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein P. *J. Biol. Chem.* **277**, 41254–41258 (2002).
  87. Chu, F. F., Doroshow, J. H. & Esworthy, R. S. Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J. Biol. Chem.* **268**, 2571–2576 (1993).
  88. Thomas, J. P., Geiger, P. G., Maiorino, M., Ursini, F. & Girotti, A. W. Enzymatic reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides in artificial bilayers and lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.* **1045**, 252–260 (1990).
  89. Bedard, K. & Krause, K.-H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases:

- physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* **87**, 245–313 (2007).
90. Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein– dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
  91. Günzler, W. A., Kremers, H. & Flohé, L. An improved coupled test procedure for glutathione peroxidase (EC 1-11-1-9-) in blood. *Zeitschrift für Klin. Chemie und Klin. Biochem.* **12**, 444–8 (1974).
  92. Gomes, A., Fernandes, E. & Lima, J. L. F. C. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J. Biochem. Biophys. Methods* **65**, 45–80 (2005).
  93. Fedorova, M., Bollineni, R. C. & Hoffmann, R. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: Update of analytical strategies. *Mass Spectrom. Rev.* **33**, 79–97 (2014).
  94. Wagner, A. H. . *unveröffentlichte Ergebnisse*. (Institut für Physiologie und Pathophysiologie, Universität Heidelberg).
  95. The Jackson Laboratory. <https://www.jax.org/jax-mice-and-services/find-and-order-jax-mice/most-popular-jax-mice-strains/phenotype-information-for-000632-and-000697>. at <aufgerufen am 12.05.16>
  96. Altamura, S., Kessler, R., Gröne, H. J., Gretz, N., ... Muckenthaler, M. U. Resistance of ferroportin to hepcidin binding causes exocrine pancreatic failure and fatal iron overload. *Cell Metab.* **20**, 359–367 (2014).
  97. Giacco, F. & Brownlee, M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ. Res.* **107**, 1058–1070 (2010).
  98. Dalle-Donne, I., Aldini, G., Carini, M., Colombo, R., ... Milzani, A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J. Cell. Mol. Med.* **10**, 389–406 (2006).
  99. Susztak, K., Raff, A. C., Schiffer, M. & Böttinger, E. P. Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy. *Diabetes* **55**, 225–233 (2006).
  100. Kong, L. L., Wu, H., Cui, W. P., Zhou, W. H., ... Miao, L. N. Advances in murine models of diabetic nephropathy. *J. Diabetes Res.* **2013**, (2013).
  101. Robinson, R., Barathi, V. a., Chaurasia, S. S., Wong, T. Y. & Kern, T. S. Update on animal models of diabetic retinopathy: from molecular approaches to mice and higher mammals. *Dis. Model. Mech.* **5**, 444–456 (2012).
  102. Sharma, K., McCue, P. & Dunn, S. R. Diabetic kidney disease in the db/db mouse. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **284**, F1138–44 (2003).
  103. Kalapos, M. P. Where does plasma methylglyoxal originate from? *Diabetes Res. Clin. Pract.* **99**, 260–271 (2013).
  104. Rabbani, N. & Thornalley, P. J. The critical role of methylglyoxal and glyoxalase 1 in diabetic nephropathy. *Diabetes* **63**, 50–52 (2014).
  105. Beisswenger, P. J., Howell, S. K., Touchette, A. D., Lal, S. & Szwegold, B. S. Metformin reduces systemic methylglyoxal levels in type 2 diabetes. *Diabetes* **48**, 198–202 (1999).
  106. Lo, T. W. C., Westwood, M. E., McLellan, A. C., Selwood, T. & Thornalley, P. J. Binding and Modification of Proteins by Methylglyoxal under Physiological

- Conditions: A kinetic and mechanistic study with Na-acetylarginine, Na-acetylcysteine, and Na-acetyllysine, and bovine serum albumin. *J. Biol. Chem.* **269**, 32299–32305 (1994).
107. Li, X., Rong, Y., Zhang, M., Wang, X. L., ... Shen, Y. H. Up-regulation of thioredoxin interacting protein (Txnip) by p38 MAPK and FOXO1 contributes to the impaired thioredoxin activity and increased ROS in glucose-treated endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **381**, 660–665 (2009).
  108. Li, C. & Siragy, H. M. High glucose induces podocyte injury via enhanced (Pro)renin receptor-Wnt-beta-catenin-snail signaling pathway. *PLoS One* **9**, (2014).
  109. Liu, B. C., Song, X., Lu, X. Y., Li, D. T., ... Ma, H. P. High glucose induces podocyte apoptosis by stimulating TRPC6 via elevation of reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1833**, 1434–1442 (2013).
  110. Al-Kafaji, G., Sabry, M. A. & Skrypnik, C. Time-course effect of high glucose-induced reactive oxygen species on mitochondrial biogenesis and function in human renal mesangial cells. - PubMed - NCBI. *Cell Biol. Int.* n/a–n/a (2015). doi:10.1002/cbin.10520
  111. Piwkowska, A., Rogacka, D., Audzeyenka, I., Jankowski, M. & Angielski, S. High glucose concentration affects the oxidant-antioxidant balance in cultured mouse podocytes. *J. Cell. Biochem.* **112**, 1661–1672 (2011).
  112. Shankland, S. J., Pippin, J. W., Reiser, J. & Mundel, P. Podocytes in culture: past, present, and future. *Kidney Int.* **72**, 26–36 (2007).
  113. Katsuya, K., Yaoita, E., Yoshida, Y., Yamamoto, Y. & Yamamoto, T. An improved method for primary culture of rat podocytes. *Kidney Int.* **69**, 2101–6 (2006).
  114. Krtil, J., Platenik, J., Kazderova, M., Tesaar, V. & Zima, T. Culture methods of glomerular podocytes. *Kidney Blood Press. Res.* **30**, 162–174 (2007).
  115. Hsu, H.-H., Hoffmann, S., Di Marco, G. S., Endlich, N., ... Pavenstädt, H. Downregulation of the antioxidant protein peroxiredoxin 2 contributes to angiotensin II-mediated podocyte apoptosis. *Kidney Int.* **80**, 959–969 (2011).
  116. Lewko, B., Bryl, E., Witkowski, J. M., Latawiec, E., ... Stepinski, J. Mechanical stress and glucose concentration modulate glucose transport in cultured rat podocytes. *Nephrol. Dial. Transplant* **20**, 306–11 (2005).
  117. Ichikawa, I., Ma, J., Motojima, M. & Matsusaka, T. Podocyte damage damages podocytes: autonomous vicious cycle that drives local spread of glomerular sclerosis. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **14**, 205–10 (2005).
  118. Kriz, W., Shirato, I., Nagata, M., LeHir, M. & Lemley, K. V. The podocyte's response to stress: the enigma of foot process effacement. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **304**, F333–47 (2013).
  119. Culic, O., Gruwel, M. L. & Schrader, J. Energy turnover of vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol.* **273**, C205–C213 (1997).
  120. Tang, X., Luo, Y.-X. X., Chen, H.-Z. Z. & Liu, D.-P. P. Mitochondria, endothelial cell function, and vascular diseases. *Front. Physiol.* **5**, 175 (2014).
  121. Heilig, C. W., Liu, Y., England, R. L., Freytag, S. O., ... Brosius, F. C. D-Glucose Stimulates Mesangial Cell GLUT1 Expression and Basal and IGF-I-Sensitive Glucose Uptake in Rat Mesangial Cells: Implications for Diabetic Nephropathy. *Diabetes* **46**, 1030–1039 (1997).

122. Brosius, F. C. & Heilig, C. W. Glucose transporters in diabetic nephropathy. *Pediatr. Nephrol.* **20**, 447–51 (2005).
123. Schiffer, M., Susztak, K., Ranalletta, M., Raff, A. C., ... Charron, M. J. Localization of the GLUT8 glucose transporter in murine kidney and regulation in vivo in nondiabetic and diabetic conditions. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **289**, F186–93 (2005).
124. Fernandes, R., Hosoya, K. & Pereira, P. Reactive oxygen species downregulate glucose transport system in retinal endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **300**, C927–C936 (2011).
125. Kaiser, N., Sasson, S., Feener, E. P., Boukobza-Vardi, N., ... King, G. L. Differential regulation of glucose transport and transporters by glucose in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Diabetes* **42**, 80–89 (1993).
126. Kitada, M., Koya, D., Sugimoto, T., Isono, M., ... Haneda, M. Translocation of glomerular p47phox and p67phox by protein kinase C- $\beta$  activation is required for oxidative stress in diabetic nephropathy. *Diabetes* **52**, 2603–2614 (2003).
127. Gill, P. S. & Wilcox, C. S. NADPH oxidases in the kidney. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 1597–1607 (2006).
128. Gorin, Y. & Block, K. Nox as a target for diabetic complications. *Clin. Sci. (Lond.)* **125**, 361–82 (2013).
129. Thallas-Bonke, V., Jandeleit-Dahm, K. a. M. & Cooper, M. E. Nox-4 and progressive kidney disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **24**, 74–80 (2015).
130. Sena, C. M., Pereira, A. M. & Seica, R. Endothelial dysfunction - A major mediator of diabetic vascular disease. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1832**, 2216–2231 (2013).
131. de Haan, J. B., Stefanovic, N., Nikolic-Paterson, D., Scurr, L. L., ... Tesch, G. H. Kidney expression of glutathione peroxidase-1 is not protective against streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **289**, F544–F551 (2005).
132. Cheng, W. H., Ho, Y. S., Valentine, B. a, Ross, D. a, ... Lei, X. G. Cellular glutathione peroxidase is the mediator of body selenium to protect against paraquat lethality in transgenic mice. *J. Nutr.* **128**, 1070–1076 (1998).
133. Matsunaga, S., Mishima, T., Yamada, T., Inashima, S. & Wada, M. Alterations in in vitro function and protein oxidation of rat sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase during recovery from high-intensity exercise. *Exp. Physiol.* **93**, 426–33 (2008).
134. Peters, V., Lanthaler, B., Amberger, A., Fleming, T., ... Schmitt, C. P. Carnosine metabolism in diabetes is altered by reactive metabolites. *Amino Acids* **47**, 2367–2376 (2015).
135. Moller, I. M., Rogowska-Wrzesinska, A. & Rao, R. S. P. Protein carbonylation and metal-catalyzed protein oxidation in a cellular perspective. *J. Proteomics* **74**, 2228–2242 (2011).
136. Bireckoven, A. Inauguraldissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades, Insitut für Physiologie und Pathophysiologie, Universität Heidelberg, Protein carbonylation in endothelial cells in the course of diabetes: Effect on redox enzyme expression and function. (2014).
137. Wagner, A. H. *persönliche Mitteilung (2016)*; Institut für Physiologie und Pathophysiologie, Universität Heidelberg
138. Temple, A., Yen, T. Y. & Gronert, S. Identification of Specific Protein Carbonylation

- Sites in Model Oxidations of Human Serum Albumin. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **17**, 1172–1180 (2006).
139. Park, Y. S., Koh, Y. H., Takahashi, M., Miyamoto, Y., ... Taniguchi, N. Identification of the binding site of methylglyoxal on glutathione peroxidase: methylglyoxal inhibits glutathione peroxidase activity via binding to glutathione binding sites Arg 184 and 185. *Free Radic. Res.* **37**, 205–211 (2003).
140. Shepard, B. D., Tuma, D. J. & Tuma, P. L. Chronic ethanol consumption induces global hepatic protein hyperacetylation. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **34**, 280–291 (2010).
141. Cao, C., Leng, Y., Huang, W., Liu, X. & Kufe, D. Glutathione peroxidase 1 is regulated by the c-Abl and Arg tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* **278**, 39609–39614 (2003).
142. Yang, W. H., Park, S. Y., Ji, S., Kang, J. G., ... Cho, J. W. O-GlcNAcylation regulates hyperglycemia-induced GPX1 activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **391**, 756–761 (2010).
143. Wagner, A. H., Kautz, O., Fricke, K., Zerr-Fouineau, M., ... Hecker, M. Upregulation of glutathione peroxidase offsets stretch-induced proatherogenic gene expression in human endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 1894–1901 (2009).
144. McClung, J. P., Roneker, C. a, Mu, W., Lisk, D. J., ... Lei, X. G. Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione peroxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 8852–8857 (2004).
145. Steinbrenner, H., Speckmann, B., Pinto, A. & Sies, H. High selenium intake and increased diabetes risk: experimental evidence for interplay between selenium and carbohydrate metabolism. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **48**, 40–5 (2011).
146. De Haan, J. B., Bladier, C., Griffiths, P., Kelner, M., ... Kola, I. Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress- inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* **273**, 22528–22536 (1998).
147. Moriarty, P. M., Reddy, C. C. & Maquat, L. E. Selenium deficiency reduces the abundance of mRNA for Se-dependent glutathione peroxidase 1 by a UGA-dependent mechanism likely to be nonsense codon-mediated decay of cytoplasmic mRNA. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 2932–9 (1998).
148. Martin, G. W. & Berry, M. J. Selenocysteine codons decrease polysome association on endogenous selenoprotein mRNAs. *Genes to Cells* **6**, 121–129 (2001).
149. Nasim, M. T., Jaenecke, S., Belduz, A., Kollmus, H., ... McCarthy, J. E. G. Eukaryotic selenocysteine incorporation follows a nonprocessive mechanism that competes with translational termination. *J. Biol. Chem.* **275**, 14846–14852 (2000).
150. Stoytcheva, Z., Tujebajeva, R. M., Harney, J. W. & Berry, M. J. Efficient incorporation of multiple selenocysteines involves an inefficient decoding step serving as a potential translational checkpoint and ribosome bottleneck. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 9177–9184 (2006).
151. Budiman, M. E., Bubenik, J. L., Miniard, A. C., Middleton, L. M., ... Driscoll, D. M. Eukaryotic Initiation Factor 4a3 Is a Selenium-Regulated RNA-Binding Protein that Selectively Inhibits Selenocysteine Incorporation. *Mol. Cell* **35**, 479–489 (2009).
152. Fang, W., Goldberg, M. L., Pohl, N. M., Bi, X., ... Yang, W. Functional and physical interaction between the selenium-binding protein 1 (SBP1) and the glutathione peroxidase 1 selenoprotein. *Carcinogenesis* **31**, 1360–1366 (2010).

153. Wong, C. M., Marcocci, L., Das, D., Wang, X., ... Suzuki, Y. J. Mechanism of protein decarboxylation. *Free Radic. Biol. Med.* **65**, 1126–1133 (2013).
154. Wong, C.-M., Bansal, G., Marcocci, L. & Suzuki, Y. J. Proposed role of primary protein carbonylation in cell signaling. *Redox Rep.* **17**, 90–4 (2012).
155. Bardag-Gorce, F., Li, J., French, B. A. & French, S. W. The effect of ethanol-induced CYP2E1 on proteasome activity: The role of 4-hydroxynonenal. *Exp. Mol. Pathol.* **78**, 109–115 (2005).
156. Queisser, M. A., Yao, D., Geisler, S., Hammes, H. P., ... Preissner, K. T. Hyperglycemia impairs proteasome function by methylglyoxal. *Diabetes* **59**, 670–678 (2010).
157. Wolf, G. New insights into the pathophysiology of diabetic nephropathy: from haemodynamics to molecular pathology. *Eur. J. Clin. Invest.* **34**, 785–96 (2004).
158. Susztak, K., Böttinger, E., Novetsky, A., Liang, D., ... Sharma, K. Molecular profiling of diabetic mouse kidney reveals novel genes linked to glomerular disease. *Diabetes* **53**, 784–94 (2004).
159. Frederich, R. C., Hamann, A., Anderson, S., Löllmann, B., ... Flier, J. S. Leptin levels reflect body lipid content in mice: Evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat. Med.* **1**, 1311–1314 (1995).
160. Han, D. C., Isono, M., Chen, S., Casaretto, A., ... Ziyadeh, F. N. Leptin stimulates type I collagen production in db/db mesangial cells: glucose uptake and TGF-beta type II receptor expression. *Kidney Int.* **59**, 1315–23 (2001).
161. Wolf, G., Chen, S., Han, D. C. & Ziyadeh, F. N. Leptin and renal disease. *Am. J. Kidney Dis.* **39**, 1–11 (2002).
162. Kanwar, Y. S., Sun, L., Xie, P., Liu, F.-Y. & Chen, S. A glimpse of various pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy. *Annu. Rev. Pathol.* **6**, 395–423 (2011).
163. Schiffer, M., Bitzer, M., Roberts, I. S., Kopp, J. B., ... Böttinger, E. P. Apoptosis in podocytes induced by TGF-beta and Smad7. *J. Clin. Invest.* **108**, 807–16 (2001).
164. Naito, M., Fujikura, J., Ebihara, K., Miyanaga, F., ... Nakao, K. Therapeutic impact of leptin on diabetes, diabetic complications, and longevity in insulin-deficient diabetic mice. *Diabetes* **60**, 2265–2273 (2011).
165. Hale, L. J. & Coward, R. J. M. The insulin receptor and the kidney. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **22**, 100–6 (2013).
166. Coward, R. J. M., Welsh, G. I., Yang, J., Tasman, C., ... Saleem, M. A. The Human Glomerular Podocyte Is a Novel Target for Insulin Action. *Diabetes* **54**, 3095–3102 (2005).
167. Mogensen, C. E., Christensen, N. J. & Gundersen, H. J. The acute effect of insulin on heart rate, blood pressure, plasma noradrenaline and urinary albumin excretion. The role of changes in blood glucose. *Diabetologia* **18**, 453–7 (1980).
168. Welsh, G. I., Hale, L. J., Eremina, V., Jeansson, M., ... Coward, R. J. M. Insulin signaling to the glomerular podocyte is critical for normal kidney function. *Cell Metab.* **12**, 329–340 (2010).
169. Handa, P., Morgan-Stevenson, V., Maliken, B. D., Nelson, J. E., ... Kowdley, K. V. Iron overload results in oxidative stress, immune cell activation and ballooning injury leading to nonalcoholic steatohepatitis in genetically obese mice. *Am. J. Physiol.*

- Gastrointest. Liver Physiol.* ajpgi.00246.2015 (2015). doi:10.1152/ajpgi.00246.2015
170. Arosio, P. & Levi, S. Cytosolic and mitochondrial ferritins in the regulation of cellular iron homeostasis and oxidative damage. *Biochim. Biophys. Acta* **1800**, 783–92 (2010).
  171. Fernández-Real, J. M., López-Bermejo, A. & Ricart, W. Iron stores, blood donation, and insulin sensitivity and secretion. *Clin. Chem.* **51**, 1201–1205 (2005).
  172. Carballal, S., Trujillo, M., Cuevasanta, E., Bartesaghi, S., ... Alvarez, B. Reactivity of hydrogen sulfide with peroxynitrite and other oxidants of biological interest. *Free Radic. Biol. Med.* **50**, 196–205 (2011).
  173. Kimura, H. Hydrogen sulfide: Its production, release and functions. *Amino Acids* **41**, 113–121 (2011).
  174. Streeter, E., Ng, H. H. & Hart, J. L. Hydrogen sulfide as a vasculoprotective factor. *Med. Gas Res.* **3**, 9 (2013).
  175. Guo, B., Phillips, J. D., Yu, Y. & Leibold, E. A. Iron regulates the intracellular degradation of iron regulatory protein 2 by the proteasome. *J. Biol. Chem.* **270**, 21645–21651 (1995).
  176. Salahudeen, A. A., Thompson, J. W., Ruiz, J. C., Ma, H.-W., ... Bruick, R. K. An E3 ligase possessing an iron-responsive hemerythrin domain is a regulator of iron homeostasis. *Science (80-. )*. **326**, 722–726 (2009).
  177. Moulouel, B., Houamel, D., Delaby, C., Tchernitchko, D., ... Karim, Z. Heparin regulates intrarenal iron handling at the distal nephron. *Kidney Int.* **84**, 756–66 (2013).
  178. Kulaksiz, H., Theilig, F., Bachmann, S., Gehrke, S. G., ... Stremmel, W. The iron-regulatory peptide hormone hepcidin: Expression and cellular localization in the mammalian kidney. *J. Endocrinol.* **184**, 361–370 (2005).
  179. Houamel, D., Ducrot, N., Lefebvre, T., Daher, R., ... Karim, Z. Heparin as a Major Component of Renal Antibacterial Defenses against Uropathogenic Escherichia coli. *J. Am. Soc. Nephrol.* **1–12** (2015). at <<http://www.jasn.org/cgi/doi/10.1681/ASN.2014101035>>
  180. Tavafi, M. Diabetic nephropathy and antioxidants. *J. Nephropathol.* **2**, 20–7 (2013).
  181. Evans, J. L. & Goldfine, I. D. Alpha-lipoic acid: a multifunctional antioxidant that improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Technol Ther* **2**, 401–413 (2000).
  182. Mao, S., Zhang, A. & Huang, S. Selenium supplementation and the risk of type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Endocrine* **47**, 758–763 (2014).
  183. Mahadevan, J., Parazzoli, S., Oseid, E., Hertzog, A. V., ... Robertson, R. P. Ebselen treatment prevents islet apoptosis, maintains intranuclear Pdx-1 and MafA levels, and preserves  $\beta$ -cell mass and function in ZDF rats. *Diabetes* **62**, 3582–3588 (2013).
  184. Tan, S. M., Sharma, A., Stefanovic, N. & de Haan, J. B. Late-intervention study with ebselen in an experimental model of type 1 diabetic nephropathy. *Free Radic. Res.* **49**, 219–27 (2015).
  185. Nyström, T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *Embo J.* **24**, 1311–1317 (2005).

### 7.2 Abkürzungsverzeichnis

AGE	Fortgeschrittenes Glykosylierungsendprodukt
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CD 31	<i>Cluster of differentiation 31</i>
Ct-Wert	<i>Cycle threshold</i> -Wert
DAPI	4, 6-Diamidin-2-Phenylidol
DCFH-DA	Dichlorodihydrofluorescein Diacetat
Db/db	die <i>diabetic</i> Mutation in der Leptin-Rezeptor Isoform <i>Ob-Rb</i> homozygot aufweisend
DFO	Deferoxamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cDNA	komplementäre DNA
dsDNA	doppelsträngige DNA
DNP	2,4-Dinitrophenylhydrazon
DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Eth-D1	Ethidium homodimer-1
FCS	fötales Kälberserum
FeNTA	Nitrioltriessigsäure gemischt mit Fe <sup>3+</sup>
FPN	Ferroportin
GPx	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase
GSH	Reduziertes Glutathion
GSSG	Oxidiertes Glutathion
HbA1c	Hämoglobin A1c
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
Keap1	<i>Kelch ECH associating protein 1</i>

NADPH	Nicotinamidadeninukleotidphosphat
NF- $\kappa$ B	Nuklearer Faktor $\kappa$ B
Nrf2	<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
Nox	NADPH Oxidase
M	Monat
MCO	Metall-katalysierte Oxidation
mRNA	<i>Messenger</i> Ribonukleinsäure
PAS-Reaktion	<i>Periodic acid – Schiff</i> Reaktion
PBS(T)	Phosphat-gepufferte Salzlösung (mit Tween20)
PCR	Polymerase Kettenreaktion
qRT-PCR	quantitative <i>real-time</i> PCR
PDGFRB	<i>Platelet-derived growth factor receptor <math>\beta</math></i>
PECAM-1	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule 1</i>
PFA	Paraformaldehyd
Prx	Peroxiredoxin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPMI-Medium	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> -Medium
SBP1	Selen-Bindungsprotein 1
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulphat Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SOD	Superoxid-Dismutase
SV40	<i>Simian virus 40</i>
STZ	Streptozotocin
TBS(T)	Tris-gepufferte Salzlösung (mit Tween20)
TF	Transkriptionsfaktor
TfR 1	<i>Transferrin Receptor 1</i>
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i>
Wt	Wildtyp
wt-1	Wilm's Tumorprotein 1

### 7.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Zeichnung des glomerulären Feinbaus (modifiziert nach (22)).	8
Abb. 2: Schema der GPx-Reaktion (modifiziert nach (72)).	16
Abb. 3: Arbeitshypothese.	17
Abb. 4: Differenzierung der Podozyten Zelllinie E11.	21
Abb. 5: Derivatisierung von Carbonylgruppen mit 2,4- Dinitrophenolhydrazin (DNPH).	27
Abb. 6: Nachweis der Spezifität der DNP-Färbung in der Niere diabetischer Mäuse.	28
Abb. 7: Effekt von Eisenchelation oder Steigerung der Eisenkonzentration auf die Vitalität kultivierter Podozyten.	33
Abb. 8: Erhöhter Blutzuckerspiegel und HbA1c-Anteil bei unterschiedlich alten <i>Ins2<sup>Akita</sup></i> -Mäusen.	37
Abb. 9: Nachweis der gesteigerten Proteincarbonylierung in Homogenaten des Nierenkortex von diabetischen <i>Ins2<sup>Akita</sup></i> -Mäusen.	38
Abb. 10: Histologischer Nachweis einer gesteigerten Proteincarbonylierung in den Glomeruli von <i>Ins2<sup>Akita</sup></i> -Mäusen.	39
Abb. 11: Nachweis von carbonylierten Proteinen in Podozyten und Mesangiumszellen in Nierengewebeschnitten diabetischer <i>Ins2<sup>Akita</sup></i> -Mäuse.	40
Abb. 12: Lokalisation von GPx-1 und GPx-4 in unterschiedlichen glomerulären Zelltypen in Nierendünnschnittpräparaten diabetischer <i>Ins2<sup>Akita</sup></i> -Mäuse.	41
Abb. 13: Die Menge von GPx-1 und GPx-4 in Nierenkortexhomogenaten diabetischer <i>Ins2<sup>Akita</sup></i> -Mäuse ist altersabhängig deutlich erhöht.	42
Abb. 14: Gesteigerte GPx-Aktivität und GPx-1-Carbonylierung in Nierenkortexhomogenaten diabetischer <i>Ins2<sup>Akita</sup></i> -Mäuse verschiedenen Alters.	43
Abb. 15: Erhöhtes Körpergewicht und HbA1c-Anteil in 18 Wochen alten db/db-Mäusen.	44
Abb. 16: Nachweis vergleichbarer Mengen carbonylierter Proteine in Homogenaten des Nierenkortex von 18 Wochen alten Wildtyp und db/db-Mäusen.	44
Abb. 17: Unveränderte GPx-Expression und Aktivität in Nierenkortexhomogenaten von 18 Wochen alten nicht-diabetischen und Typ II diabetischen Mäusen.	45
Abb. 18: Erhöhtes Körpergewicht und HbA1c-Anteil in 26 Wochen alten db/db-Mäusen.	46
Abb. 19: Quantifizierung der Proteincarbonylierung in Homogenaten des Nierenkortex von 26 Wochen alten db/db, wt/db und Wildtyp-Mäusen.	47

Abb. 20: Tendenziell reduzierte GPx-Expression und Aktivität in Nierenkortexhomogenaten von 26 Wochen alten db/db, wt/db und Wildtyp-Mäusen.	48
Abb. 21: Veränderte Nierenmorphologie in 26 Wochen alten db/db, wt/db und Wildtyp-Mäusen.	49
Abb. 22: Erhöhtes Körpergewicht und erhöhter Blutzuckerspiegel in 10 Wochen alten db/db-Mäusen.	50
Abb. 23: Gesteigerte Proteincarbonylierung in den Glomeruli 10 Wochen alter db/db-Mäuse.	50
Abb. 24: Gesteigerte GPx-Expression in der Niere von 10 Wochen alten db/db-Mäusen bei unveränderter GPx-Aktivität.	51
Abb. 25: Lokalisation von GPx-1 in glomerulären Podozyten von 10 Wochen alten db/db-Mäusen.	52
Abb. 26: Nachweis morphologischer Nierenschäden, ausgelöst durch Hämochromatose, in 30 Wochen alten diabetischen db/db-Mäusen mittels PAS-Reaktion.	53
Abb. 27: Gleichbleibende Expression von GPx und Prx II in der Niere von 30 Wochen alten hämochromatotischen db/db-Mäusen bei gleichzeitig erhöhter GPx-Aktivität und GPx-1-Carbonylierung.	54
Abb. 28: Gesteigerte Proteincarbonylierung in den Glomeruli von 30 Wochen alten db/db-Mäusen.	56
Abb. 29: Die gesteigerte Proteincarbonylierung in Glomeruli von 18 Wochen alten db/db-Mäusen ist durch Sul121-Behandlung unbeeinflusst.	57
Abb. 30: Die GPx-Expression in den Glomeruli 8 Wochen alter diabetischer db/db-Mäuse ist durch Sul121-Behandlung unbeeinflusst.	58
Abb. 31: Erhöhte intrazelluläre Glucose- und Methylglyoxal-Konzentrationen in kultivierten Podozyten nach Zugabe dieser Metabolite in das Kulturmedium.	59
Abb. 32: Reduzierte GSH-Konzentrationen und erhöhter oxidativer Stress in Podozyten nach Inkubation mit Glucose oder Methylglyoxal.	60
Abb. 33: Verstärkte GPx-1 aber nicht CuZnSOD oder MnSOD-Expression in Podozyten durch Hyperglykämie für 7 Tage.	62
Abb. 34: Verstärkte GPx-1 aber nicht CuZnSOD oder MnSOD-Expression in Podozyten nach Methylglyoxal-Exposition.	63

Abb. 35: Verringerte GPx-Aktivität und Carbonylierung in Podozyten Glucose-Exposition für 7 Tage.	64
Abb. 36: Der Proteasom-Inhibitor Bortezomib hat nur einen geringen Einfluss auf das Ausmaß der Proteincarbonylierung in kultivierten Podozyten.	65
Abb. 37: Nachweis der GPx-1-Depletion in Podozyten.	66
Abb. 38: Einfluss der GPx-1-Depletion in kultivierten Podozyten auf GPx-4 und Prx II-Expression.	67
Abb. 39: Abhängigkeit der TfR1 und Ferroportin-Expression von der intrazellulären Eisenkonzentrationen in kultivierten Podozyten.	69
Abb. 40: Einfluss von Eisenmangel bzw. Überschuss auf die GPx und Prx II-Expression sowie Proteincarbonylierung in kultivierten Podozyten.	70
Abb. 41: Mögliche Auswirkungen einer Carbonylierung auf die GPx-Aktivität.	78

## 8 Danksagung

Viele Menschen standen mir in den letzten Jahren hilfreich zur Seite und ermöglichten so die Anfertigung dieser Arbeit.

Ich danke Prof. Markus Hecker für die Betreuung des Forschungsprojektes, die Erstellung des Erstgutachtens und dafür, dass ich die Möglichkeit hatte, diese Arbeit in seiner Abteilung zu erstellen. Das Feedback während unserer regelmäßigen Team-Meetings war unverzichtbar für das Gelingen des Projektes.

Herzlich danken möchte ich auch PD Dr. Andreas Wagner für die dauerhafte Unterstützung und für die vielen Ideen zur Arbeit an diesem Projekt. Seine ständige Erreichbarkeit bei Schwierigkeiten und sofortige Hilfsbereitschaft erleichterten die Arbeit ungemein und waren überaus wertvoll für den Erfolg dieser Arbeit.

Prof. Marc Freichel bin ich sehr dankbar für seinen Input während unserer TAC-Meetings, die Erstellung des Zweitgutachtens zu dieser Arbeit und die Gabe von Nierenproben zur Analyse.

Ich möchte meinen Kooperationspartnern sehr für die gute Zusammenarbeit danken: Dr. Thomas Fleming, für die Messung von HbA1c, Glucose- sowie Methylglyoxal-Konzentrationen und dem zur Verfügung stellen von Methylglyoxal für meine Versuche; Prof. Hans-Peter Hammes für die Gabe von zahlreichen Nieren von *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäusen und, zusammen mit Sigrid Englert, der Organisation des GRK1874 und der vielen schönen Spring oder Autumn Schools. Prof. Martina Muckenthaler danke ich für ihre hilfreichen Vorschläge und Ideen in TAC-Meetings sowie die Gabe von db/db Mäusen für dieses Projekt; Dr. Sandro Altamura für den Beistand bei Versuchen zu Effekten von Eisen-Konzentrationen, die Gabe der Reagenzien, Durchführung der PCRs und das freundliche Überlassen zahlreicher Mäuse-Nieren.

Prof. Rob Henning und Dr. Leo Deelman vom UMCG bin ich dafür dankbar, dass sie mir den Aufenthalt in Groningen ermöglichten und für ihren Einsatz und ihre Bemühungen während meiner Zeit dort. Auch den Labor-Kollegen aus Groningen danke ich für die freundliche Aufnahme und Hilfsbereitschaft.

Am Institut für Physiologie möchte ich allen Kollegen aus den letzten 3 Jahren für die nette Arbeitsatmosphäre und bereitwillige Hilfeleistungen danken. Besonders erwähnen möchte ich Franziska Mohr und Nadine Scholz für die gute Organisation des Labors und fortwährende Bereitschaft zur Unterstützung und Mithilfe, wann immer ich Hilfe benötigte. Außerdem danke ich ausdrücklich Andrea Saackel und Cheryl Sultan für die schöne und freundliche Zusammenarbeit am GPx-Projekt sowie allen Mitarbeitern der AG Wagner.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie dafür, dass sie mir in meinem Leben vieles ermöglicht hat und mich dabei immer unterstützte. Besonders danke ich auch Marc<sup>1</sup>. Deine Unterstützung und dein Rückhalt in den letzten Jahren und ganz besonders während dem Schreiben dieser Arbeit sind alles andere als selbstverständlich und waren für mich unverzichtbar.

---

<sup>1</sup> Vielen Dank!