

# **INAUGURAL – DISSERTATION**

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich – Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht – Karls – Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom – Biologin Katja Wagenblaß

aus Eberbach

Tag der mündlichen Prüfung:.....



# **Der Einfluss von LXR auf die Entwicklung der diabetischen Nephropathie**

Gutachter: Prof. Dr. med. Hermann – Josef Gröne  
PD Dr. rer. nat. Tobias Dick



Diese Dissertation wurde von 2010 – 2013 in der Abteilung „Zelluläre und Molekulare Pathologie“ am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg unter Anleitung von Prof. Dr. med. H. – J. Gröne angefertigt.

Diese Arbeit wurde unterstützt von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) im Rahmen des europäischen Graduiertenkollegs GRK 880/3 „Vascular Medicine“ der Ruprecht – Karls – Universität Heidelberg und der Rijksuniversiteit Groningen, Niederlande.

### **Eidesstattliche Versicherung**

Ich erkläre hiermit, dass ich diese vorgelegte Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Diese Dissertation wurde in dieser oder anderer Form weder bereits als Prüfungsarbeit verwendet, noch einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt. An keiner anderen Stelle ist ein Prüfungsverfahren beantragt.

Heidelberg, den 10.01.2013

Katja Wagenblaß



# Inhalt

ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	IV
TABELLENVERZEICHNIS .....	V
ZUSAMMENFASSUNG .....	VI
SUMMARY .....	VII
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1. AUFBAU UND FUNKTION DER NIERE .....	1
1.1.1. <b>Das Nephron und die Bildung des Primärharns</b> .....	<b>2</b>
1.1.2. <b>Tubuläre Filtration</b> .....	<b>4</b>
1.2. DIABETISCHE NEPHROPATHIE .....	5
1.2.1. <b>Pathogenese</b> .....	<b>6</b>
1.2.3. <b>Klinischer Verlauf</b> .....	<b>7</b>
1.3. TIERMODELLE ZUR DIABETISCHEN NEPHROPATHIE .....	8
1.3.1. <b>Defizienz der endothelialen Stickstoffmonoxid – Synthase (eNOS)</b> .....	<b>9</b>
1.3.2. <b>Hyperglykämie in LDL – Rezeptor defizienten Mäusen (LDLR-/-)</b> .....	<b>10</b>
1.4. LEBER – X – REZEPTOREN (LXR) .....	10
1.4.1. <b>Endogene und exogene Liganden von LXR</b> .....	<b>12</b>
1.4.2. <b>Funktion von LXR</b> .....	<b>13</b>
1.5. ZIELSETZUNG .....	14
<b>2. MATERIAL .....</b>	<b>15</b>
2.1. BIOLOGISCHE MATERIALIEN .....	15
2.1.1. <b>Eukaryotische Zelllinien</b> .....	<b>15</b>
2.1.2. <b>Versuchstiere</b> .....	<b>15</b>
2.2. MOLEKULARBIOLOGISCHE MATERIALIEN .....	15
2.2.1. <b>Oligonukleotide für die Genotypisierung von Versuchstieren</b> .....	<b>15</b>
2.2.2. <b>Oligonukleotide für Genexpressionsanalysen</b> .....	<b>15</b>
2.2.3. <b>Antikörper</b> .....	<b>16</b>
2.2.4. <b>Arbeiten mit Versuchstieren</b> .....	<b>16</b>
2.3. KULTURMEDIEN UND LÖSUNGEN .....	17
2.3.1. <b>Kultur eukaryotischer Zelllinie HK-2</b> .....	<b>17</b>
2.3.2. <b>Material für molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>17</b>
2.3.3. <b>Arbeiten mit Versuchstieren</b> .....	<b>20</b>
2.3.4. <b>Histologie</b> .....	<b>20</b>
2.4. CHEMIKALIEN, ENZYME UND KITS .....	21
2.5. VERBRAUCHSMATERIALIEN .....	22
2.6. GERÄTELISTE .....	22
2.7. CHEMIKALIEN .....	24
2.8. SOFTWARE .....	24
<b>3. METHODEN .....</b>	<b>25</b>
3.1. ZELLKULTUR .....	25
3.1.1. <b>Kultivierung von HK-2 Zellen</b> .....	<b>25</b>
3.1.2. <b>Kryokonservierung von Zellen</b> .....	<b>25</b>
3.1.3. <b>Bestimmung der Zelldichte und Vitalität</b> .....	<b>25</b>
3.2. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN .....	26

# Inhaltsverzeichnis

3.2.1.	<i>Isolation von RNA aus Nierengewebe und HK-2 Zellen</i> .....	26
3.2.2.	<i>Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren</i> .....	26
3.2.3.	<i>Qualitätskontrolle von isolierten RNA – Präparationen</i> .....	27
3.2.4.	<i>Reverse Transkription isolierter RNA</i> .....	27
3.2.5.	<i>Quantitative Real – Time PCR (qRT – PCR)</i> .....	27
3.2.6.	<i>Isolierung von DNA aus Schwanzgewebe</i> .....	28
3.2.7.	<i>PCR – Protokoll zur Genotypisierung von Versuchstieren</i> .....	28
3.2.8.	<i>Horizontale Agarose – Gelelektrophorese</i> .....	29
3.2.9.	<i>Proteinbestimmung nach Bradford</i> .....	30
3.2.10.	<i>Denaturierende Polyacrylamid – Gelelektrophorese (SDS – PAGE)</i> .....	30
3.2.11.	<i>Western – Blot Analyse</i> .....	31
3.2.12.	<i>Generierung von Lipidtröpfchen und LXR – Aktivierung mittels GW3965 in HK-2 Zellen</i> .....	31
3.2.13.	<i>Fettrotfärbung von Lipid – beladenen HK-2 Zellen</i> .....	32
3.2.14.	<i>Quantifizierung von ROS (reactive oxygen species) und Superoxid in HK-2 Zellen</i> .....	32
3.2.15.	<i>Bestimmung der Mitochondrienaktivität in HK-2 Zellen</i> .....	33
3.2.16.	<i>Histochemische und immunohistochemische Färbungen an Nierengewebeschnitten</i> .....	34
3.2.17.	<i>Elektronenmikroskopie</i> .....	34
3.2.18.	<i>Auswertung von gefärbten Gewebeschnitten</i> .....	35
3.3.	ARBEITEN MIT VERSUCHSTIEREN .....	36
3.3.1.	<i>STZ – Injektion von Versuchstieren</i> .....	36
3.3.2.	<i>Blutzuckerkontrolle von Versuchstieren</i> .....	36
3.3.3.	<i>Retrobulbäre Blutentnahme bei Versuchstieren</i> .....	36
3.3.4.	<i>Stoffwechsellkäfig – Untersuchung von Versuchstieren</i> .....	37
3.3.5.	<i>Analyse von Blut– und Urinproben</i> .....	37
3.3.6.	<i>Berechnung von Nierenfunktionsparametern</i> .....	37
3.3.7.	<i>Durchführung und Aufbau des Tierversuchs A (Versuchsnummer 74/06) mit LDLR-/- Mäusen</i> .....	38
3.3.8.	<i>Durchführung und Aufbau des Tierversuchs B (Versuchsnummer 104/10) mit eNOS-/- Mäusen</i> .....	39
3.4.	STATISTISCHE ANALYSEN .....	40
4.	ERGEBNISSE .....	41
4.1.	MODELL 1: LIPID – VERSTÄRKTEN HYPERGLYKÄMIE IN LDL – REZEPTOR DEFIZIENTEN MÄUSEN .....	41
4.1.1.	<i>LXR-Aktivierung durch GW3965 wirkt sich positiv auf den Allgemeinzustand von diabetischen und/oder hyperlipidämischen Versuchstieren aus</i> .....	41
4.1.2.	<i>Die Nierenfunktion kann durch LXR – Aktivierung bei fortschreitender Erkrankung erhalten werden</i> .....	43
4.1.3.	<i>Morphologische Veränderungen der Nieren werden durch LXR-Aktivierung bei hyperglykämischen und/oder hyperlipidämischen LDLR-/- Mäusen gemildert</i> .....	45
4.1.4.	<i>Auch ultrastrukturell kann ein positiver Effekt auf die Integrität des Nierengewebes durch die Aktivierung von LXR nachgewiesen werden</i> .....	49
4.1.5.	<i>LXR-Aktivierung durch GW3965 vermindert Lipidablagerungen und moduliert Gene des Fettstoffwechsels im Nierengewebe von hyperlipidämischen und hyperglykämischen Mäusen</i> .....	52
4.1.6.	<i>Hyperlipidämie und Hyperglykämie bei LDLR-/- Mäusen ist mit erhöhtem oxidativem Stress assoziiert und konnte durch LXR-Aktivierung gemildert werden</i> .....	55
4.1.7.	<i>LXR-Aktivierung mittels GW3965 hat anti-inflammatorische und anti-fibrotische Wirkung und senkt die Expression inflammatorischer/fibrotischer Zytokine in hyperlipidämischen und hyperglykämischen LDLR-/- Mäusen</i> .....	57
4.2.	MODELL 2: LIPID – VERSTÄRKTEN HYPERGLYKÄMIE BEI ENOS – DEFIZIENTEN MÄUSEN .....	59



## Inhaltsverzeichnis

---

4.2.1.	<i>Die Aktivierung von LXR führte zu einer Verbesserung des Allgemeinzustands in eNOS – defizienten Mäusen</i> .....	59
4.2.2.	<i>Die Aktivierung von LXR mittels GW3965 erhält die Nierenfunktion bei fortschreitender Erkrankung</i> .....	61
4.2.3.	<i>Die Morphologie des Nierengewebes von GW3965 – behandelten eNOS-/- Mäusen zeigt, im Vergleich zu unbehandelten Versuchstieren, weniger pathologische Veränderungen. ....</i>	63
4.2.4.	<i>Die Aktivierung von Fettstoffwechsel regulierenden Genen überprüft die Effektivität der Therapie durch LXR – Aktivierung mittels GW3965 – Behandlung</i> .....	65
4.2.5.	<i>Die Gabe von GW3965 führt zur Minderung entzündlicher und fibrotischer Prozesse im Nierengewebe von hyperglykämischen und hyperlipidämischen eNOS-/- Mäusen</i> .....	66
4.3.	<i>IN VITRO</i> MODELL: ANALYSE DER LIPIDDEGENERATION IN IMMORTALISIERTEN, HUMANEN, PROXIMALEN TUBULUSEPITHELZELLEN (HK-2).....	70
4.3.1.	<i>HK-2 Zellen exprimieren beide Isoformen von LXR und reagieren auf Stimulation mit dem LXR – Agonisten GW3965</i> .....	70
4.3.2.	<i>Die Bildung von Lipidtröpfchen in HK-2 Zellen kann durch LXR – Aktivierung verringert werden</i> .....	71
4.3.3.	<i>Die Bildung von Lipidtröpfchen erhöht den zellulären oxidativen Stress, welcher durch Aktivierung von LXR verringert werden konnte.</i> .....	73
4.3.4.	<i>Die Aktivierung von LXR reduziert die gesteigerte Mitochondrienaktivität in Lipid – beladenen HK-2 Zellen</i> .....	74
5.	<b>DISKUSSION</b> .....	76
5.1.	DIE NIERENFUNKTION KONNTE DURCH AKTIVIERUNG VON LXR IN HYPERLIPIDÄMISCHEN UND HYPERGLYKÄMISCHEN MÄUSEN ERHALTEN WERDEN. ....	76
5.2.	DIE AKTIVIERUNG VON LXR DURCH GW3965 VERHINDERT DIE AKKUMULATION VON LIPIDEN IM NIERENGeweBE.....	77
5.3.	ENTZÜNDUNGEN UND FIBROSE KONNTEN DURCH AKTIVIERUNG VON LXR VERMINDERT WERDEN .....	78
5.4.	ROS – VERMITTELTE VERSTÄRKUNG VON LIPID – ASSOZIIERTEN UND ENTZÜNDUNGSBEDINGTEN NIERENGeweBSSCHÄDEN KÖNNEN DURCH LXR – AKTIVIERUNG REDUZIERT WERDEN.....	79
5.5.	EIN ÜBERANGEBOT VON LIPIDEN INDUZIERT IN HK2 – ZELLEN VERMEHRT OXIDATIVEN STRESS.....	80
6.	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	82
	<b>ABKÜRZUNGEN</b> .....	89
	<b>DANKSAGUNG</b> .....	91
	<b>PUBLIKATIONEN</b> .....	92



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Aufbau der Niere und des Nephrons.....	2
Abbildung 2	Glomeruläre Kapillare und Filtrationsbarriere.....	3
Abbildung 3	Übersicht von Transportprozessen in Tubulusabschnitten zur Bildung des Endharn.....	5
Abbildung 4	Renale Pathomorphologie bei diabetischer Nephropathie.....	7
Abbildung 5	Vernarbung in der Niere von eNOS-/- Mäusen.....	10
Abbildung 6	Struktur, Genregulationsmechanismen und Liganden von LXR.....	11
Abbildung 7	Spezifität von GW3965.....	12
Abbildung 8	Kreatinin – Clearance in LDLR-/- Mäusen als Maß für die Nierenfunktion.....	44
Abbildung 9	Albuminkonzentration im Urin von LDLR-/- Mäusen.....	44
Abbildung 10	Zusammenstellung repräsentativer Ausschnitte von PAS-gefärbten Gewebeschnitten.....	46
Abbildung 11	Quantifizierung der mesangialen Matrixvermehrung und Schaumzellbildung.....	47
Abbildung 12	Die Stimulation von LXR hat einen protektiven Effekt auf Podozyten.....	48
Abbildung 13	Die Aktivierung von Mesangiumszellen konnte durch Gabe von GW3965 verringert werden.....	49
Abbildung 14	Elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigen eine Verringerung von Schäden an der Blut-Harn-Schranke sowie verminderte Lipiddegeneration in glomerulären und tubulären Epithelzellen.....	51
Abbildung 15	Fettrotfärbung neutraler Lipide in hyperlipidämischen und zusätzlich hyperglykämischen LDLR-/- Mäusen.....	52
Abbildung 16	Immunohistochemische Charakterisierung von Lipidtröpfchen – assoziierten Proteinen.....	53
Abbildung 17	LXR – Aktivierung beeinflusst die Expression von Fettstoffwechsel – modulierenden Genen.....	55
Abbildung 18	Lipidakkumulation ist mit gesteigertem oxidativem Stress assoziiert und konnte durch LXR – Aktivierung mittels GW3965 gemindert werden.....	57
Abbildung 19	Die Aktivierung von LXR mittels GW3965 mildert entzündliche und fibrotische Prozesse im Nierengewebe von hyperlipidämischen/hyperglykämischen LDLR-/- Mäusen.....	59
Abbildung 20	Kreatinin – Clearance als Maß für die glomeruläre Filtrationsrate.....	61
Abbildung 21	Albuminurie und Proteinurie bei hyperlipidämischen und hyperglykämischen eNOS-/- Mäusen.....	62
Abbildung 22	Fraktionelle Exkretion von Natrium als Parameter für die Funktion des Tubulusepithels.....	63
Abbildung 23	Repräsentative Ausschnitte von PAS – gefärbten Gewebeproben und Quantifizierung pathologischer Veränderungen wie mesangiale Matrixvermehrung und Schaumzellbildung in eNOS-/- Mäusen.....	65
Abbildung 24	Analyse der mRNA – Expression von Fettstoffwechsel – modulierenden Genen <i>ABCA1</i> und <i>ABCG1</i> mittels quantitativer Real – Time PCR.....	66
Abbildung 25	Die Aktivierung von LXR zeigte im Nierengewebe von hyperlipidämischen und hyperglykämischen eNOS-/- Mäusen anti – inflammatorische Wirkung.....	68
Abbildung 26	Analyse fibrotischer Parameter in hyperlipidämischen und hyperglykämischen eNOS-/- Mäusen.....	69
Abbildung 27	Western Blot Analyse der Proteinexpression von LXR $\alpha$ und LXR $\beta$ in HK-2 Zellen.....	70
Abbildung 28	Expression von LXR – Zielgenen in HK – Zellen.....	71
Abbildung 29	Die Aktivierung von LXR konnte die Bildung von Lipidtröpfchen in HK-2 Zellen Vermindern.....	72

Abbildung 30	Die Aktivierung von LXR konnte die Bildung von oxidativen Radikalen in HK-2 Zellen reduzieren.....	73
Abbildung 31	GW3965 senkt die Enzymaktivität von Komplex II der Atmungskette in Lipid – behandelten HK-2 Zellen.....	75

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Klassifizierung des klinischen Verlaufs der diabetischen Nephropathie nach DDG.....	8
Tabelle 2	Versuchsaufbau und Gruppenübersicht des Tierversuches 74/06 mit LDLR-/- Mäusen.....	39
Tabelle 3	Versuchsaufbau und Gruppenübersicht des Tierversuches 104/10 mit eNOS-/- Mäusen.....	40
Tabelle 4	Gruppenübersicht und Aufstellung biologischer und biochemischer Parameter von Versuchstieren.....	42
Tabelle 5	Gruppenübersicht und Aufstellung biologischer und biochemischer Parameter von eNOS-/- Versuchstieren.....	60

## Zusammenfassung

Diabetes mellitus ist eine Stoffwechselkrankheit mit weltweit zunehmender Prävalenz. Etwa ein Drittel der Betroffenen entwickelt eine renale Manifestation im Sinne einer diabetischen Nephropathie. Es wird vermutet, dass Veränderungen im Fettstoffwechsel sowie die Akkumulation von Lipiden in der Niere zu einer beschleunigten Progression der diabetischen Nephropathie beitragen. In dieser Promotionsarbeit wird die Hypothese aufgestellt, dass die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Leber – X – Rezeptor (LXR), ein Schlüsselregulator des Fettstoffwechsels und des Immunsystems, den Ausprägungsgrad einer diabetischen Nephropathie verringern kann. Um dies zu prüfen, wurde an zwei Tiermodellen, hyperglykämische sowie hyperlipidämische Mäuse mit einer Defizienz des LDL – Rezeptors (LDLR-/-) oder der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS-/-), der Effekt der Aktivierung von LXR durch den synthetischen Liganden GW3965 untersucht.

Die Behandlung der diabetischen und hyperlipidämischen Versuchstiere mit GW3965 reduzierte die renale Lipidakkumulation und verbesserte die Nierenfunktion sowie die Nierenmorphologie. Regulatorische Gene, welche am reversen Cholesterintransports beteiligt sind (ABCA1, ABCG1), wurden hochreguliert, während die Expression proinflammatorischer und profibrotischer Zytokine (TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ ) gehemmt wurde. Des Weiteren wurden Parameter für Lipid – assoziierten oxidativen und nitrosativen Stress (Xanthin – Oxidoreduktase, 3 – Nitrotyrosin) durch LXR – Aktivierung mittels GW3965 reduziert. Durch ergänzende *in vitro* – Versuche konnten die Ergebnisse aus dem Tierversuch bestätigt werden. In HK-2 Zellen bewirkte die Behandlung mit GW3965 ebenfalls die Hochregulierung von Genen des reversen Cholesterintransports und verminderte die Bildung von Lipidtröpfchen bei Stimulation mit oxidiertem LDL. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von LXR durch GW3965 die mitochondriale Aktivität und die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale reduziert. Dies erlaubt einen Einblick in den Mechanismus der Bildung renaler Läsionen, die durch Akkumulation von Lipiden hervorgerufen werden, und welcher mittels LXR umfassend reguliert werden kann.

Die Ergebnisse veranschaulichen die umfassenden regulatorischen Effekte von LXR bei der Vermeidung von Nierenschäden bei Diabetes mellitus. Die Aktivierung von LXR verbesserte in signifikantem Maße die Lipid – akzellerierte diabetische Nephropathie in Mäusen. Synthetische Liganden für LXR sind vielversprechende therapeutische Substanzen bei der Prävention renaler Beteiligung bei diabetischen Patienten und sind im Fokus aktueller Forschung.

## Summary

Diabetes mellitus is a metabolic disease with a worldwide increasing prevalence. Approximately one third of affected patients develop a renal manifestation as defined by diabetic nephropathy. Abnormal lipid metabolism and renal accumulation of lipids are thought to contribute to diabetic nephropathy. The hypothesis for this PhD thesis is that activation of the nuclear transcription factors Liver – X – receptors, as key regulators of lipid metabolism and immune system, are able to ameliorate diabetic nephropathy. To test this hypothesis, the effect of LXR activation by the synthetic ligand GW3965 was evaluated in animal models of hyperglycemic and hyperlipidemic LDL receptor knockout mice (LDLR<sup>-/-</sup>) or mice deficient for endothelial nitrogen monoxide synthase (eNOS<sup>-/-</sup>).

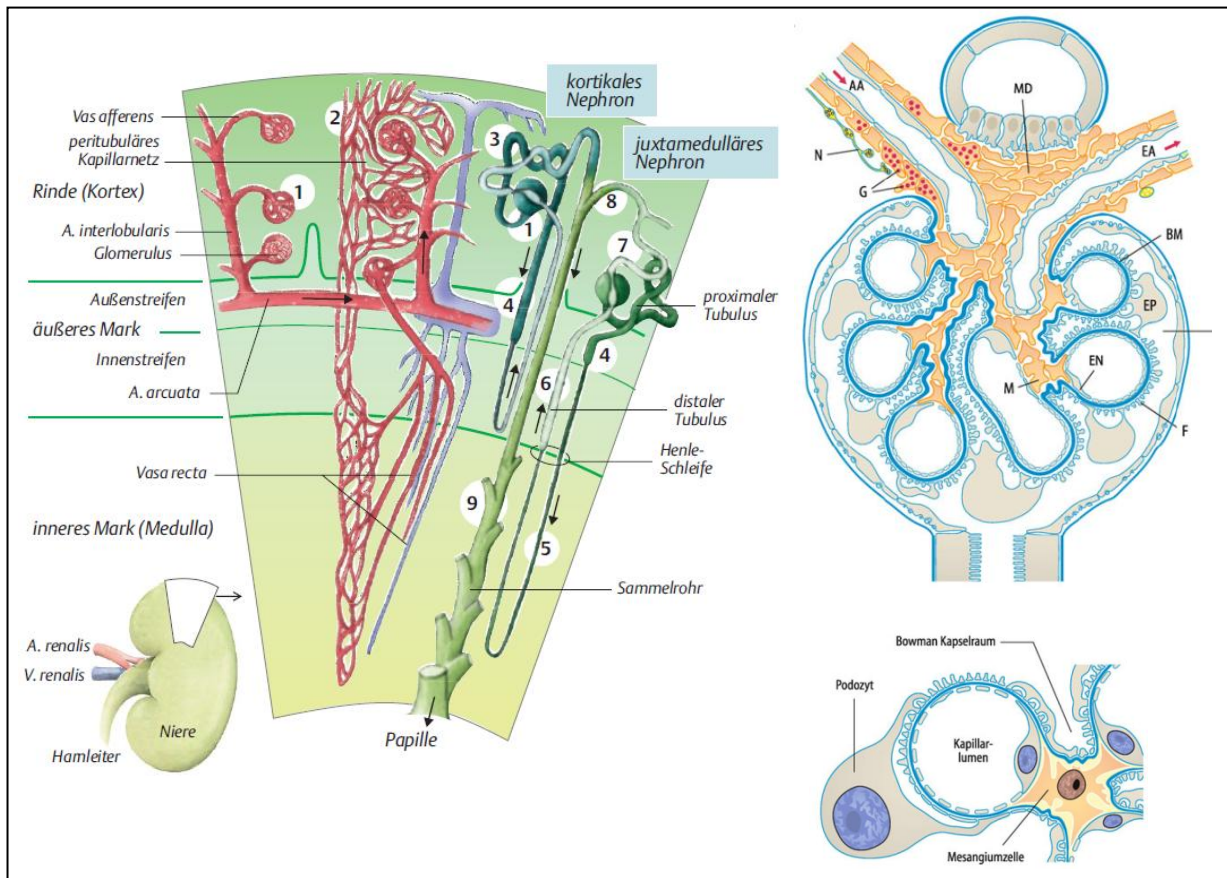
Treatment of diabetic and hyperlipidemic experimental animals with the LXR agonist GW3965 reduced renal lipid accumulation and improved renal function and morphology. Genes involved in cholesterol efflux (ABCA1, ABCG1) were upregulated with concomitant downregulation of proinflammatory and profibrotic cytokines (TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ ). In addition, LXR activation through GW3965 reduced parameter of lipid associated oxidative and nitrosative stress (xanthin – oxidoreductase, 3 – nitrotyrosine). Complementary *in vitro* experiments could confirm the results of the animal studies. GW3965 treatment in HK-2 cells stimulated with oxLDL lead to upregulation of genes involved in cholesterol efflux and reduced lipid droplet formation. Furthermore, it could be shown that LXR activation decreased mitochondrial activity and the production of reactive oxygen species. These data provide insight into the mechanisms of intracellular lipid accumulation mediated renal lesions, which can be effectively regulated by LXRs.

These results demonstrate potent regulatory effects of LXR in preventing renal damage in diabetes mellitus. Activation of LXR improved significantly lipid – aggravated diabetic nephropathy in mice. Therefore, synthetic ligands of LXR are promising therapeutic agents in preventing renal participation in diabetic patients and are focused by current research.

# 1. Einleitung

## 1.1. Aufbau und Funktion der Niere

Die Nieren bilden den funktionellen Teil des Harnwegssystems und regulieren den Elektrolyt- und Säuren/Basen-Haushalt sowie die Ausscheidung von Stoffwechselendprodukten (harnpflichtige Substanzen). Sie werden durch die Aorta über die Nierenarterien mit Blut versorgt und sind umgeben von einer Bindegewebsschicht, der Nierenkapsel. Urin fließt vom Nierenbecken in den Harnleiter (Ureter) und sammelt sich in der Blase. Das Nierengewebe kann in verschiedene Zonen eingeteilt werden (Abb. 1). Direkt an der Nierenkapsel liegt der Mantel, darunter das dunklere Gewebe des pyramidenförmigen Nierenmarks. Das Nierenmark selbst kann in das äußere und innere Mark unterteilt werden. Des Weiteren teilt sich das äußere Mark in einen äußeren und inneren Streifen. Die Spitze des inneren Marks formt die Papille, welche frei in den Hohlraum der Nierenkelche hineinragt und diese sich schließlich zum Nierenbecken vereinen. Menschliche Nieren wiegen im Durchschnitt 120g – 200g und zeigen 7 – 9 Papillen (multipapillär/multipyramidal), wohingegen sich bei Mäusen nur eine einzige Papille tief in das Nierenbecken zieht [1].



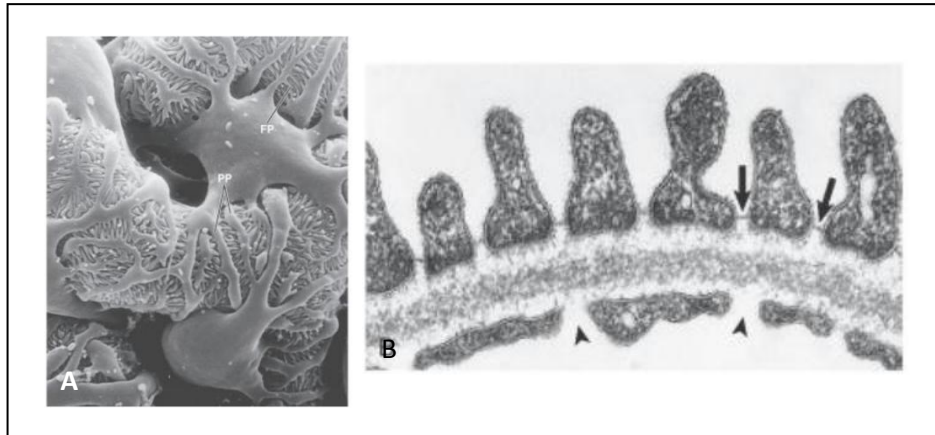
### **Abb. 1 Aufbau der Niere und des Nephrons.**

Struktur der Niere und Aufbau des Nephrons (A) mit Glomerulus (1), periglomerulären Kapillaren (2), proximalem Tubulus (3, dunkelgrün), dickem absteigender Ast der Henle-Schleife (4), Henle-Schleife (5), dickem aufsteigender Ast der Henle-Schleife (6), distalem Tubulus (7, grau), Verbindungstubulus (8) und Sammelrohr (9, grün). (B) Aufbau des Glomerulus mit afferenter (AA) und efferenter Arteriole (EA), sympathische Nervenfasern (N), Mesangiumszellen (M), Kapillarendothelzellen (EN), glomerulärer Basalmembran (BM), Podozyten (EP) und deren Fußfortsätze (F). Das extraglomeruläre Mesangium bildet zusammen mit dem hohen Epithel des distalen Tubulus und den Gefäßmuskelzellen der AA die Macula densa (MD); Granula (G) der Gefäßmuskelzellen enthalten Renin. (C) räumliche Anordnung von Podozyten und Mesangiumszellen an Kapillaren. Modifiziert nach [2] und [3].

### **1.1.1. Das Nephron und die Bildung des Primärharns**

Die funktionelle Einheit der Niere ist das Nephron (Abb. 1). Es besteht aus dem Nierenkörper – chen (Glomerulus, Abb. 1B) und dem damit verbundenem Tubulusapparat. Zusammen mit den fenestrierten Kapillaren (1C) des Glomerulus bilden Podozyten mit ihren Fußfortsätzen und die glomeruläre Basalmembran (GBM) die Blut – Harn – Schranke, eine Filtrationsbarriere, welche für die Ultrafiltration des Blutplasmas verantwortlich ist (Abb. 2). Mesangiumszellen zwischen den Kapillarschleifen haben stützende und phagozytische Eigenschaften und bilden die mesangiale Matrix (extrazelluläre Matrixproteine, Proteoglykane und Glykoproteine), welche den gesamten Raum zwischen Mesangiumszellen und der glomerulären Basalmembran ausfüllt. Die negativ geladene GBM besteht aus einem Netzwerk von Kollagenen Typ IV, Laminin und polyanionische Proteoglykane und wird von Podozyten gebildet [4, 5]. Nach Abschluss der Organogenese können ausdifferenzierte Podozyten keine mitotische Zellteilung mehr durchführen und so macht sich eine Schädigung dieser Zellen bei renalen Erkrankungen besonders deutlich bemerkbar [6, 7]. Die gegenseitig verzahnten Fußfortsätze der Podozyten bedecken die gesamte Oberfläche der Kapillarschleifen und sind leicht in der GBM eingebettet. Zwischen den Membranausläufern liegt eine dünne Schlitzmembran [8, 9]. Der Aufbau dieser Membran ist recht gut charakterisiert und besteht u.a. aus Proteinen wie Nephrin, Fat1, P – Cadherin und Podozin [10, 11]. An der Schlitzmembran findet die Filtration des Blutplasmas statt, wobei die GBM und die Fenestrae des Endothels eine gröÙenselektive Barriere darstellen (max. 50kDa). Die negative Ladung von GBM, der Zellmembran von Podozyten und des Kapillarendothels bilden eine ladungsselektive Barriere für Komponenten des Blutplasmas [12].





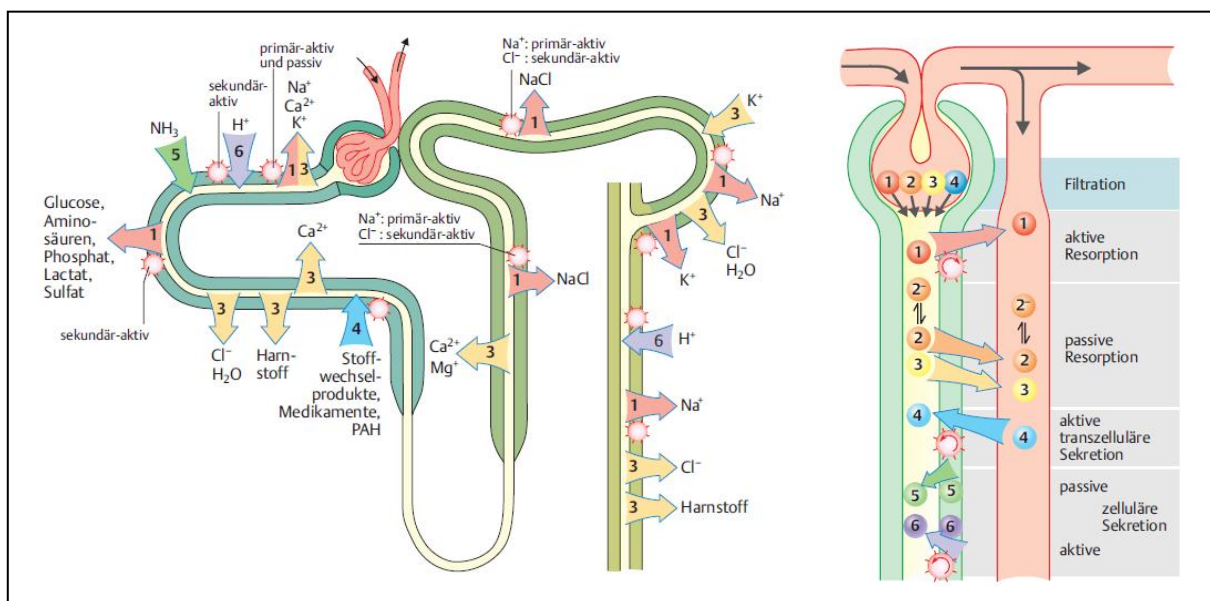
**Abb. 2 Glomeruläre Kapillare und Filtrationsbarriere.**

(A) Podozyten mit ihren primären Fortsätzen (PP) und interdigitierenden Fußfortsätzen (FP) bedecken die Blut-abgewandte Seite der glomerulären Kapillaren; rasterelektronenmikroskopische Aufnahme, Vergrößerung x2.200. (B) Die Blut-Harn-Schranke setzt sich aus der Schlitzmembran zwischen den Fußfortsätzen (Pfeil), der GBM und dem, durch Fenestrae (Pfeilspitze) unterbrochenem, Endothel der Kapillaren zusammen. Bei der GBM kann die Lamina densa von den sie umgebenden Lamina rara externa und interna unterschieden werden; Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme, Vergrößerung x50.440. Modifiziert nach [13].

Die Bowman'sche Kapsel umschließt das Kapillarknäuel und leitet den Primärharn weiter in den proximalen Tubulus (Abb. 1(3)). Dieser ist über die Henle – Schleife (Abb. 1(5)) mit dem distalen Tubulus (Abb. 1(7)) verbunden, welcher über den Verbindungstubulus (Abb. 1(8)), wie viele andere Nephrone, in ein Sammelrohr (Abb. 1(9)) mündet und die letztlich zu Urin gewordene Tubulusflüssigkeit in das Nierenbecken entlässt. Das Ende der Henle Schleife (Abb. 1(6)) läuft unmittelbar am Vas afferens desselben Nephrons vorbei und zeigt an dieser Stelle ein hohes Tubulusepithel, die Macula densa. Die anliegenden Gefäßmuskelzellen sezernieren das Enzym Renin. Zusammen mit dem extraglomerulären Mesangium bilden diese drei Strukturen den juxtaglomerulären Apparat, welcher durch Modulation des Renin – Angiotensin – Aldosteron – Systems den Elektrolyt- und Wasserhaushalt sowie den Blutdruck reguliert (Abb. 1B). Je nach Lage des Glomerulus im Cortex können oberflächliche, midkortikale und juxtamedulläre Nephrone unterschieden werden. Dabei zeigen die juxtamedullären Nephrone sehr lange Henle – Schleifen, die tief in das innere Mark reichen. In Mäusen liegt ein höherer Anteil juxtamedullärer Nephrone im Vergleich zum Menschen vor, was die Produktion von hoch konzentriertem Urin ermöglicht. Die Tubuli der Nephrone werden durch geringe Mengen Bindegewebe und Lymphe voneinander getrennt, das Interstitium. Es wird von residenten Fibroblasten sezerniert und bildet ein Gerüst für das Nierengewebe und Blutgefäße. Des Weiteren befinden sich dendritische Zellen im Interstitium [2, 13, 14].

**1.1.2. Tubuläre Filtration**

Tubuli und Sammelrohre bestehen aus einem einlagigen, polaren Epithel, wobei die Tubuli komplett von einer Basalmembran umgeben sind. Dabei haben die Epithelzellen in den unterschiedlichen Nephronsegmenten eine charakteristische histologische Ausprägung und spezifische Transporteigenschaften. Die Bildung von Urin aus dem Primärharn findet durch Reabsorption verschiedener Stoffe (Wasser, Salze, Metabolite) aus den Tubuli in peritubuläre Kapillaren und Sekretion verschiedener Substanzen (organische Ionen, körperfremde Substanzen, Ammonium) aus den Tubulusepithelzellen statt. Dabei werden letztendlich ca. 99% des filtrierten Wassers und ca. 95% der im Filtrat gelösten Substanzen rückresorbiert [14]. Das Epithel in proximalen Tubuli hat auf der luminalen Seite durch einen ausgeprägten Bürstensaum aus Mikrovilli eine enorme Oberflächenvergrößerung und gegenüberliegend tiefe Membraneinfaltungen, das basolaterale Labyrinth. Dieses steht in engem Kontakt mit zahlreichen Mitochondrien, welche die Energie für aktive Transportprozesse bereitstellen, vor allem für die  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase. Der Bürstensaum erleichtert die Resorption der großen Stoffmenge im proximalen Tubulus. Da die zu resorbierende Stoffmenge von proximal nach distal hin stark abnimmt, benötigen postproximale Tubuluszellen keinen Bürstensaum mehr. Abb. 3 zeigt eine Übersicht der im Tubulussystem stattfindenden Prozesse zur Bildung des Endharns. Eine starke Konzentration der Tubulusflüssigkeit wird durch hohe transepitheliale chemische und elektrische Gradienten erreicht. Im aufsteigenden Teil der Henle Schleife werden Elektrolyte aus der Tubulusflüssigkeit in das Interstitium transportiert, ohne dass Wasser folgen kann. Dadurch entsteht zur Schleifenspitze hin eine Hyperosmolarität, welche zur Wasserresorption aus dem absteigenden Teil der Henle Schleife und, vor allem, dem Sammelrohr führt (Gegenstrom – Prinzip).



### **Abb. 3 Übersicht von Transportprozessen in Tubulusabschnitten zur Bildung des Endharn.**

(A) Übersicht der Tubulussegmente und der dort stattfindenden Transportprozesse von Kationen, Chlorid-Anionen, Ammonium, Harnstoff, Metaboliten, körperfremden Stoffen und Wasser. Durch den Aufbau von chemischen und elektrischen Gradienten, mittels aktiven und passiven Transportprozessen sowie unterschiedlich durchlässigen Epithelien der Tubulussegmente, wird der Urin aus dem, im Glomerulus abfiltrierten, Primärharn gebildet. (B) Legende für die in (A) beschriebenen Transportprozesse. Modifiziert nach [2].

## **1.2. Diabetische Nephropathie**

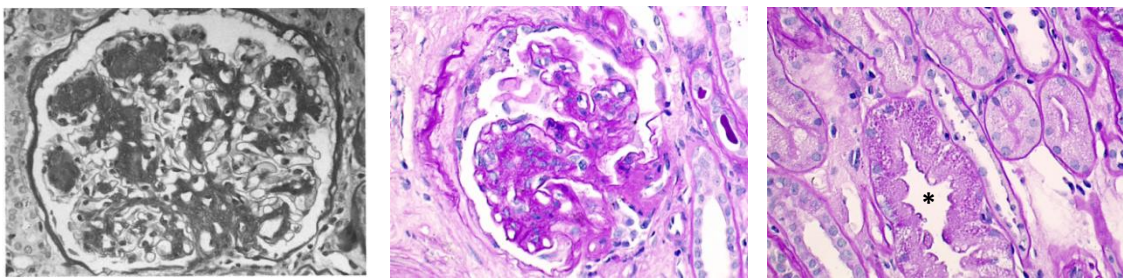
Die diabetische Nephropathie ist eine häufige Ursache der terminalen Niereninsuffizienz [15]. Etwa ein Drittel dialysepflichtiger Patienten erleiden den Verlust der Nierenfunktion als Folge einer Diabetes mellitus (DM) – Erkrankung. Gründe hierfür sind, unter anderem, eine Zunahme der Inzidenz für Diabetes mellitus (Typ II) [16], verlängerte Überlebensdauer diabetischer Patienten durch verbesserte kardiologische Therapiemöglichkeiten aber auch schlechte DM – Führung durch falsche Insulinhandhabung [17, 18]. Als Grunderkrankung bei diabetischer Nephropathie kann sowohl ein Diabetes mellitus vom Typ I oder Typ II ursächlich sein [19]. Insulin ist ein Peptidhormon und bewirkt im Organismus die zelluläre Aufnahme von Glukose, Aminosäuren und Fettsäuren. Bei DM Typ I kommt es im Kindes- und Jugendalter zur progredienten Zerstörung der insulinproduzierenden  $\beta$  – Zellen des endokrinen Pankreas, meist aufgrund einer Autoimmunreaktion. Der absolute Insulinmangel und die daraus resultierende Hyperglykämie und ketoazidotische Stoffwechsellage bedingt für die Betroffenen eine lebensnotwendige Behandlung mit Insulin. Dagegen ist die Ursache bei DM Typ II eine gestörte Insulinsekretion sowie eine Resistenz von Insulin – sensitivem Gewebe, vor allem in der Leber, der Muskulatur und dem Fettgewebe. Das heißt, die Wirkung von Insulin im Körper, auch von gespritztem Insulin, ist reduziert. Es kommt dadurch zur vermehrten Ausschüttung von Insulin um die geringere Wirkung zu kompensieren. Dies resultiert allerdings in einer verminderten Expression von Insulinrezeptoren an sensitiven Zellen, wodurch eine negative Rückkopplung entsteht. Bei relativem Insulinmangel überwiegt als Folge die Hyperglykämie, da die Wirkung auf den Fett- und Proteinstoffwechsel geringere Konzentrationen des Hormons erfordern [3]. Im Verlauf der Erkrankung kann durch Schädigung der  $\beta$  – Zellen auch ein absoluter Insulinmangel folgen. Die Ursachen für eine Insulinresistenz bzw. DM Typ II sind vielfältig und immer noch im Fokus aktueller Forschung. Sie entwickelt sich u.a. durch Übergewicht/Hyperlipidämie auf Grund einer gesteigerten Konzentration von freien gesättigten Fettsäuren im Blut, welche die Glukoseverwertung im Muskel- und Fettgewebe senkt [20]. Des Weiteren kommt es bei

Übergewicht zu einem chronischen Entzündungszustand im Körper. Dadurch werden Zytokine exprimiert, welche die Wirkung von Insulin im Gewebe unterbinden. Bei starkem Übergewicht kommt es zu Veränderungen des Fettstoffwechsels und lipotoxischen Effekten, die ebenfalls die Insulinsensitivität von Geweben reduziert [21]. Wird ein DM nicht ausreichend behandelt, kommt es im Laufe mehrerer Jahre zu einer progredienten Schädigung großer und kleiner Blutgefäße (Mikro-/Makroangiopathie). In der Niere kommt es durch die vaskulären Veränderungen und der Hyperglykämie zu glomerulären und tubulointerstitiellen Schäden und schließlich zu einem fortschreitenden Verlust der Nierenfunktion.

### **1.2.1. Pathogenese**

Diabetische Nephropathie ist eine Manifestation der diabetischen Mikroangiopathie und zeigt sich in der Ablagerung extrazellulärer Matrix in Glomeruli (Glomerulosklerose) und Arterien (Arteriosklerose) der Niere [22]. Bereits 1936 haben Kimmelstiel und Wilson erstmals die pathomorphologischen Veränderungen in der Niere von diabetischen Patienten beschrieben [23]. Hyperglykämie führt zu glomerulärer Hyperfiltration sowie zu Hypertrophie und dadurch zu starker Beanspruchung der glomerulären Gewebestrukturen [24, 25]. Der mechanische Stress durch erhöhten Kapillardruck führt bei Podozyten zu einer Zellschädigung und bei Mesangiumszellen zur Ausschüttung proinflammatorischer und profibrotischer Zytokine, welche ebenfalls schon früh die Podozyten schädigen [26, 27]. Ebenso wird diskutiert, dass durch die vaskulären Veränderungen die Entwicklung von Epithelzellen zu Myofibroblasten induziert wird (EMT, *epithelial – mesenchymal transition*) [28, 29]. Darüber hinaus kommt es durch Hyperglykämie zur Bildung von zytotoxischen reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) und vollständig glykosylierten Endprodukten (*advanced glycation end products*, AGE). AGE entstehen ubiquitär durch eine irreversible, nichtenzymatische Glykosylierung freier Aminogruppen von Proteinen bzw. von Gewebestrukturen [30-32]. Sie können in Blutgefäßen die Einlagerung von Bindegewebsproteinen (z.B. Kollagen) in die Basalmembran fördern und in Kapillaren zum Gefäßverschluss beitragen. In Epithel- und Mesangiumszellen bewirkt der Überschuss von Glukose, über einen Mechanismus mittels Diacylglycerin und der Stimulation von Proteinkinase C, eine Manifestation von Fibrose durch Expression von Wachstumsfaktoren (TGF- $\beta$ , PDGF, EGF) Bindegewebsproteinen und extrazellulärer Matrix (Kollagen,  $\alpha$ -Glattmuskelaktin, Desmin) [20]. Durch die Stimulation von Makrophagen durch AGEs, der Einwanderung von weiteren Immunzellen und deren Expression von Zytokinen [27] wird die Fibrose und Sklerotisierung weiter vorangetrieben, es kommt schließlich in der Niere zu Glomerulosklerose,

interstitieller Fibrose und Tubulusatrophie [33, 34]. Ein Mangel an Heparansulfat und die Einlagerung von AGEs führt in der GBM zu ungleichmäßigen Verdickungen und einem Verlust negativer Ladung. Dies führt zur Filtration kleiner, negativ geladener Eiweiße wie Albumin. Mit voranschreitender Schädigung wird die Durchlässigkeit der GBM immer unselektiver und es kommt schließlich zur Makroalbuminurie/Proteinurie. Nicht alle Diabetiker, ca. 20–40%, erleiden im Krankheitsverlauf eine renale Beteiligung [35-37]. Dies hängt von Risikofaktoren wie Hyperglykämie, Bluthochdruck (Hypertonie), familiäre Prädisposition, Hyperlipidämie oder Nikotinabusus ab [22, 38].



**Abb. 4 Renale Pathomorphologie bei diabetischer Nephropathie.**

PAS gefärbte Gewebeschnitte der menschlichen Niere. (A) Noduläre Glomerulosklerose (Kimmelstiel – Wilson Läsion, Abbildung in schwarz – weiß), (B) global vernarbter Glomerulus, (C) Tubuli, z.T. atrophisch (Stern) mit verdickter Basalmembran. Modifiziert nach [39, 40].

### **1.2.3. Klinischer Verlauf**

Der klinische Verlauf einer diabetischen Nephropathie kann nach den Praxisleitlinien der Deutschen Diabetes – Gesellschaft (DDG) in 2 Stadien mit weiteren Unterklassifizierungen eingeteilt werden (Tab. 1). Im Vergleich zur früher üblichen Klassifizierung nach Mogensen [41] wird heute die Kreatinin – Clearance zur genaueren Beurteilung der Nierenfunktion mit einbezogen. Dadurch können Stadien mit und ohne Niereninsuffizienz unterschieden werden. Zu Beginn verläuft eine diabetische Nephropathie trotz morphologischer Veränderungen asymptomatisch, bis eine Mikroalbuminurie als klinisches Zeichen einer Nierenschädigung messbar ist. Diese entwickelt sich durch den chronischen Schaden zur Makroalbuminurie und es kommt zu einem Abfall der Nierenfunktion. Durch die asymptomatische Phase zu Beginn der Nierenschädigung kann es vorkommen, dass die Diagnose einer diabetischen Nephropathie recht spät gestellt wird und nur ein relativ kleines therapeutisches Fenster bis zum Verlust der Nierenfunktion bleibt. Daher sind Untersuchungen zur Nierenfunktion und Albuminurie bei Diabetikern nicht zu vernachlässigen [42, 43].

Stadium/Beschreibung	Albumin-ausscheidung (mg/L)	Glomeruläre Filtration <sup>1</sup> (ml/min/1,73m <sup>2</sup> KO)	Assoziierte Begleiterkrankungen
Nierenschädigung mit normaler Nierenfunktion		> 90	<ul style="list-style-type: none"> <li>• S-Kreatinin im Normbereich,</li> <li>• Blutdruck im Normbereich steigend oder Hypertonie,</li> <li>• Dyslipidämie, Progression von Koronarer Herzkrankheit (KHK), Arterieller Verschlusskrankheit (AVK), Retinopathie und Neuropathie</li> </ul>
1a. Mikroalbuminurie	20-200		
1b. Makroalbuminurie	> 200		
Nierenschädigung mit Niereninsuffizienz (NI)			<ul style="list-style-type: none"> <li>• S-Kreatinin grenzwertig oder erhöht, häufigere Progression von KHK, AVK, Retinopathie und Neuropathie,</li> <li>• Anämieentwicklung, Störung des Knochenstoffwechsels</li> </ul>
2. leichtgradige NI	> 200	60-89	
3. mässiggradige NI	abnehmend	30-59	
4. hochgradige NI	unterschiedlich	15-29	
5. terminale NI	unterschiedlich	< 15	

**Tabelle 1 Klassifizierung des klinischen Verlaufs der diabetischen Nephropathie nach DDG [43].**

Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) wird, mit Bezug auf Kreatinin als Indikatorsubstanz, auch als Kreatinin-Clearance bezeichnet und ist ein Maß für die Nierenfunktion. In der Klinik wird sie mittels Cockcroft-Gault-Formel oder MDRD-Formel berechnet.

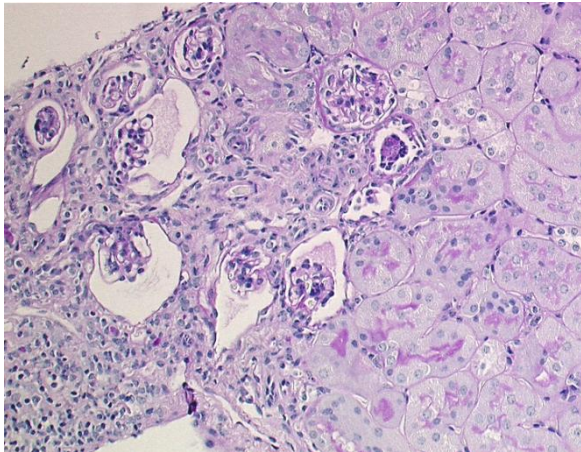
### 1.3. Tiermodelle zur diabetischen Nephropathie

Zur Untersuchung und Erforschung von Krankheiten sind Versuche an geeigneten Tiermodellen unerlässlich. Am häufigsten werden Modelle an Mäusen etabliert. Allerdings ist die Wahl des genetischen Hintergrundes der Mäuse bei der Wahl des Tiermodelles nicht zu vernachlässigen. Zum Beispiel zeigen C57/Bl6J Mäuse, im Vergleich zu DBA/2J Tieren, geringere physiologische und morphologische Veränderungen in der Niere bei induzierter Hyperglykämie [44]. Trotzdem wurden viele Modelle zu Diabetes mellitus und diabetischer Nephropathie in der Maus an C57/Bl6 Mäusen etabliert. Im Dezember 2009 veröffentlichte das AMDCC (*Animal Models of Diabetic Complications Consortium*) Kriterien für experimentelle, progressive Mausmodelle zur diabetischen Nephropathie [45]. Diese umfassen einen um mind. 50% Rückgang der Kreatinin – Clearance innerhalb der Lebensspanne des Tieres und einen mind. 10 – fachen Anstieg der Albuminausscheidung im Vergleich zu gleichgeschlechtlichen Kontrolltieren desselben Alters und Stammes. Des Weiteren sollen morphologische Nierenveränderungen wie fortgeschrittene mesangiale Matrixvermehrung, Sklerose und Mesangiolyse, arterielle Hyalinose, tubulointerstitielle Fibrose und Verdickung der GBM um ca. 50% auftreten. Bis heute gibt es kein Tiermodell, welches alle pathophysiologischen und histopathologischen Veränderungen von Patienten mit diabetischer Nephropathie rekapituliert. Häufig verwendete Modelle für Diabetes

mellitus Typ II sind die *db/db* Maus mit Leptin Defizienz [46], die *New Zealand Obese* Maus, auch in Kombination mit der *NON/LtJ* Maus [45] oder die hypoinsulinämische *non – obese* Maus [47]. Für Modelle mit Diabetes mellitus Typ I stehen die *Ins2<sup>Akita</sup>* – Maus, die *non – obese diabetic* (NOD) Maus und der durch Streptozotozin – Injektion induzierte Diabetes in Mäusen mit beliebigen genetischen Hintergründen, durch Zerstörung der insulinproduzierenden  $\beta$  – Zellen des Pankreas, zur Verfügung [48]. Die in dieser Arbeit untersuchten Modelle sind in den folgenden Abschnitten näher beschrieben.

### **1.3.1. Defizienz der endothelialen Stickstoffmonoxid – Synthase (eNOS)**

Schäden am Endothel sind ein Kennzeichen bei Diabetes mellitus und tragen zur Entwicklung einer terminalen Nierenerkrankung bei. Die Synthese des endothelialen Vasodilators NO (Stickstoffmonoxid) ist bei Patienten mit Diabetes oder bei funktionellen Polymorphismen des *NOS3* – Gens durch verminderte Aktivität der eNOS reduziert und ist mit der Entstehung einer Nephropathie in Patienten mit Diabetes mellitus Typ I/Typ II assoziiert. Für ein Modell zur diabetischen Nephropathie wurde durch Injektion des Inselzelltoxins Streptozotozin (STZ) bei eNOS – defizienten Mäusen (eNOS<sup>-/-</sup>) mit genetischem Hintergrund C57/Bl6J Hyperglykämie induziert [49]. Die Tiere zeigen verschiedene Kriterien der AMDCC wie vermehrte Albuminurie, mesangiale Matrixvermehrung, Glomerulosklerose und tubulointerstitielle Schäden [45, 50]. Durch die verminderte NO – Synthese zeigen die Mäuse generell Hypertonie und können morphogenetische Veränderungen der Bildung von Blutgefäßen aufweisen. Dadurch kann es in der Niere dieser Tiere zur Narbenbildung auf Grund von abgestorbenen Glomeruli kommen (Abb. 5). Diese sind von pathologischen Veränderungen, welche durch die induzierte Nephropathie hervorgerufen werden, zu unterscheiden [51, 52].



**Abb. 5 Vernarbung in der Niere von eNOS-/- Mäusen.**

PAS-gefärbter Gewebeschnitt der Niere einer männlichen eNOS-/- Maus im Alter von 6 Monaten. Im linken Bildausschnitt ist ein vernarbtes Areal mit atrophischen Glomeruli und Tubuli sowie infiltrierenden Immunzellen zu erkennen. (Vergrößerung 20x Objektiv)

### **1.3.2. Hyperglykämie in LDL – Rezeptor defizienten Mäusen (LDLR-/-)**

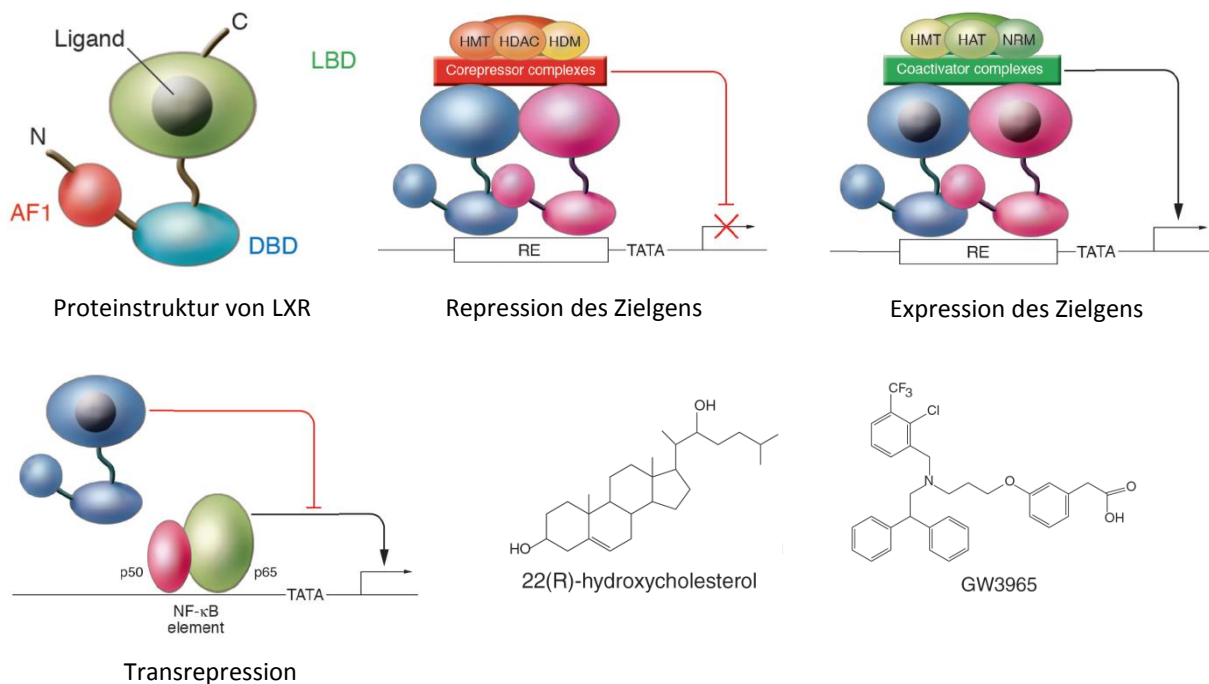
Durch die Defizienz des LDL – Rezeptors und die daraus resultierende Hypercholesterinämie sind diese Mäuse anfällig für Arteriosklerose [53, 54]. Die Schädigung der Gefäße durch Dyslipidämie und Hypertonie bedingt in STZ – induzierten hyperglykämischen Mäusen eine Manifestation der diabetischen Nephropathie. Das Modell lehnt an Patienten mit metabolischem Syndrom oder Übergewicht in Verbindung mit Diabetes mellitus an. Wie bereits zuvor erwähnt, ruft die Induktion eines Diabetes mellitus Typ I durch Injektion von STZ in C57/Bl6 – Mäusen, im Vergleich zu anderen Stämmen mildere physiologische und histopathologische renale Veränderungen hervor. Durch Hyperglykämie in LDLR-/- Mäusen, vor allem in Verbindung mit einer fett- und cholesterinreichen Ernährung kann eine diabetische Nephropathie in diesem Stamm induziert werden [55, 56].

### **1.4. Leber – X – Rezeptoren (LXR)**

Nukleäre Rezeptoren sind Transkriptionsfaktoren, welche die Expression von Genen als Reaktion auf eine Vielzahl verschiedener, physiologischer Stimuli regulieren. Die Proteinstruktur von nukleären Rezeptoren ist hochkonserviert und umfasst eine aminoterminalen Aktivierungsdomäne, eine Zinkfinger – Domäne zur DNA – Bindung, eine carboxyterminale Domäne zur Bindung von Liganden (Agonisten) sowie eine zweite Aktivierungsdomäne (Abb. 5) [57, 58]. Leber – X – Rezeptoren gehören zur Familie der Liganden – aktivierten Transkriptionsfaktoren [59, 60]. Es gibt zwei Isoformen, LXR $\alpha$  und LXR $\beta$ , welche entsprechend



von den Genen *NR1H3* und *NR1H2* kodiert werden [61, 62]. Die Proteine LXR $\alpha$  und LXR $\beta$  teilen eine beträchtliche Sequenzhomologie und werden von denselben Liganden aktiviert. In Abwesenheit von Liganden sind LXR als Heterodimere mit dem Retinoid – X – Rezeptor (RXR) an spezifischen Sequenzelementen (LXRE) in regulatorischen DNA – Abschnitten der inaktiven Zielgene gebunden und mit Co – Repressoren, Histon – Deacetylasen und Chromatin modifizierenden Faktoren assoziiert. Die Bindung eines Liganden führt zur Konformationsänderung des LXR/RXR – Heterodimers und zum Austausch von Co – Repressoren durch Co – Aktivatoren. Dadurch wird die Expression des Zielgens initiiert [58]. Ein indirekter Mechanismus zur transkriptionellen Regulation von Zielgenen ist die Transrepression. Hierbei wird die Expression des Zielgens nicht durch Bindung von LXR an die DNA aktiviert, sondern durch Interaktion von Liganden – aktivierten LXR mit Co – Repressoren oder anderen Transkriptions – faktoren, welche dadurch an der Promotorregion des entsprechenden Gens gebunden bleiben [63]. Während LXR $\beta$  ubiquitär exprimiert wird, ist die Expression von LXR $\alpha$  auf Niere, Leber, Fettgewebe, Nebennieren, Intestinum, Lunge und myeloide Zellen beschränkt [60, 64].



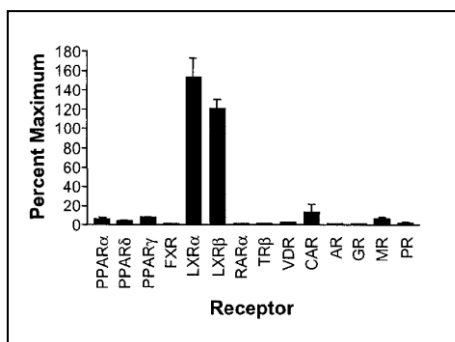
**Abb. 6 Struktur, Genregulationsmechanismen und Liganden von LXR.**

Die Proteinstruktur von LXR gliedert sich in eine aminoterminal (N) Aktivierungsdomäne (AF1, rot), eine DNA – Bindungsdomäne (DBD, blau) und eine Domäne zur Ligandenbindung (LBD, grün) am Carboxyterminus (C). Bei Abwesenheit von Liganden ist LXR (blau) als Heterodimer mit RXR (pink) an spezifische Sequenzelemente (RE, *responsive element*) in der Promotorregion des Zielgens gebunden und mit Co-Repressoren assoziiert, das Gen wird nicht exprimiert. Nach Ligandenbindung findet ein Austausch von Co-Repressoren durch Co-Aktivatoren statt und das Gen wird exprimiert. Bei der indirekten Transrepression interagiert Liganden-aktivierter LXR mit

anderen genregulatorischen Elementen um die Expression des Zielgens zu unterbinden, z.B. NF $\kappa$ B. 22R-Hydroxycholesterin ist ein körpereigener Ligand von LXR, GW3965 ein synthetischer Ligand. HMT – Histonmethyltransferase, HDAC – Histondeacetylase, HDM – Histodemethylase, HAT – Histonacetyltransferase, NRM – *nucleosome remodeling protein*. Modifiziert nach [65, 66].

### 1.4.1. Endogene und exogene Liganden von LXR

Als funktionelles Heterodimer mit RXR, wird die Aktivierung von LXR $\alpha$  und LXR $\beta$  durch Liganden (Agonisten) für beide nukleären Rezeptoren vermittelt. Einziger bekannter endogener, d.h. im Organismus gebildeter, Ligand für RXR ist 9 – *cis* – Retinsäure. Synthetische Liganden für RXR, auch Rexinoide genannt, sind LG100268 und LGD1069 [67]. Endogene Liganden für LXR sind oxidativ modifizierte Derivate von Cholesterin, sogenannte Oxysterine. Sie dienen als Transportform von Cholesterin, da sie leichter Zellmembrane und die Blut – Hirn – Schranke passieren können und sind in Lipoproteinpartikeln enthalten. Des Weiteren sind Oxysterine Intermediär– sowie Endprodukte des Cholesterinabbaus bei der Bildung von Gallensäure in der Leber. Sie entstehen durch Oxygenierung von Cholesterin durch Cytochrom P450 – Mono – oxygenasen, durch Lipidperoxidation oder Autooxidation und sind ubiquitär [68]. Ein starker Agonist für LXR ist 22R – Hydroxycholesterin. Neben anderen Hydroxysterinen konnten auch 20S – Hydroxycholesterin, 20,22 – di – Hydroxycholesterin, 24S – Hydroxycholesterin, 24 – keto – Cholesterin und 24S,25 – epoxy – Cholesterin als Agonisten für LXR identifiziert werden [69]. In diversen Studien an Mäusen wurden auch synthetische LXR – Agonisten eingesetzt. Am häufigsten wurde GW3965 verwendet. Diese Substanz wirkt recht spezifisch auf LXR, ohne andere nukleäre Rezeptoren zu aktivieren [70]. Weitere synthetische Agonisten sind T0901317 und WAY252623 [71]. Hinsichtlich zukünftiger therapeutischer Ansätze und der auftretenden Nebenwirkungen der bekannten unselektiven LXR – Agonisten (Hypertriglyzeridämie) wird auch die Entwicklung von neuen und Isoform – spezifischen Agonisten, z.B. für LXR $\alpha$ , vorangetrieben [72-74].



**Abb. 7 Spezifität von GW3965.**

Der synthetische Ligand GW3965 aktiviert spezifisch die Leber-X-Rezeptoren LXR $\alpha$  und LXR $\beta$ , ohne andere nukleäre Transkriptionsfaktoren in relevantem Maße zu stimulieren. PPAR $\alpha$ - $\gamma$  – Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren, FXR – Farnesoid-X-Rezeptor, RAR $\alpha$  – Retinsäurerezeptor, TR $\beta$  – Schilddrüsenhormonrezeptor, VDR – Vitamin D-Rezeptor, CAR – Konstitutiver Androstanrezeptor, AR – Androgenrezeptor, GR – Glukokortikoidrezeptor, MR – Mineralkortikoidrezeptor, PR – Progesteronrezeptor. Modifiziert nach [70].

### **1.4.2. Funktion von LXR**

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass durch LXR umfassende Stoffwechselwege beeinflusst und reguliert werden. Die wesentliche Funktion von LXR ist die Aufrechterhaltung der Sterin – Homöostase des Körpers. Um dies zu erreichen, werden durch LXR gewebespezifisch Genexpressionsprogramme koordiniert. In Makrophagen bewirkt die Aktivierung von LXR die Expression der Cholesterin – Effluxtransporter ABCA1 und ABCG1, der Apolipoproteine ApoC und ApoE und des Phospholipid – Transferproteins (PLTP). Damit wird der reverse Cholesterin – transport gesteigert, durch welchen überschüssige Sterine aus den Zellen auf Apolipoproteine übertragen und in HDL – Partikeln zur Leber transportiert werden [75]. In der Leber werden bei LXR – Aktivierung Gene zum Cholesterin – Abbau und zur Gallensäure – Bildung aktiviert, wodurch überschüssiges Cholesterin über den Darm aus dem Körper ausgeschieden wird. Im Darm selbst beeinflusst LXR durch Expression der Transporter ABCG5 und ABCG8 die Aufnahme von Sterinen und reguliert so die enterohepatische Rezirkulation von Cholesterin [76, 77]. Ein weiterer Aspekt der Regulation des Fettstoffwechsels durch LXR ist Degradation des LDL – Rezeptors durch IDOL (*inducible degrader of LDLR*) als Zielgen von LXR [78].

LXR beeinflussen auch das Immunsystem. Durch Studien an LXR $\alpha$  – und/oder LXR $\beta$  – defizienten Mäusen, sowie mit Hilfe synthetischer Liganden, konnte beobachtet werden, dass LXR bei einer Reihe von metabolischen, entzündlichen, infektiösen und autoimmunen Erkrankungen die Immunreaktion moduliert [79-83]. Makrophagen können Liganden von LXR durch Internalisierung von modifiziertem LDL oder durch Efferozytose von apoptotischen oder nekrotischen Zellen aufnehmen [84]. Sie bilden eine Schnittstelle für Regulationswege von LXR zwischen dem Lipidstoffwechsel und Entzündungsreaktionen [85]. Zum Beispiel tragen LXR durch Modulation von Makrophagen zur Homöostase von neutrophilen Immunzellen bei, unterdrücken die Expression von Entzündungsmediatoren und beeinflussen die Proliferation von T – Lymphozyten [86, 87].

Des Weiteren konnte in diabetischen Tiermodellen an Nagern durch LXR – Aktivierung eine Verbesserung des Gesundheitszustandes durch Verminderung der Insulinresistenz veranschaulicht werden. Interessanterweise ist die renale Expression von LXR in Versuchstieren bei diabetischen Modellen zum DM Typ I im Vergleich zu gesunden Tieren reduziert [88]. Diese Ergebnisse zeigen eine Beteiligung von LXR am Glukosemetabolismus mit Aussicht auf einen therapeutischen Nutzen für LXR bei Diabetes mellitus [89, 90]. Allerdings sind noch keine Details zu Mechanismen bekannt, auf welche Weise LXR den Glukosestoffwechsel beeinflusst [71].

Durch die umfassenden regulatorischen Mechanismen, mit welchen eine Aktivierung von LXR in den Fettstoffwechsel und das Immunsystem des Körpers eingreifen kann, sind LXR – Agonisten vielversprechende therapeutische Faktoren zur zukünftigen Behandlung komplexer Erkrankungen, wie z.B. der diabetische Nephropathie.

### **1.5. Zielsetzung**

Ziel dieser Promotionsarbeit ist die Untersuchung der Effekte einer LXR – Aktivierung mittels des synthetischen Liganden GW3965 auf die Entwicklung einer Lipid – verstärkten diabetischen Nephropathie. Die Ausgangshypothese war, dass durch die umfassenden regulatorischen Mechanismen von LXR, welche auf die Modulation des Lipidstoffwechsels, des Immunsystems und des Kohlenhydratstoffwechsels Einfluss nehmen, eine Manifestation der diabetischen Nephropathie verzögert werden kann und der Krankheitsverlauf trotz zusätzlicher Belastung durch Hyperlipidämie gemildert wird. Zur Prüfung dieser Hypothese wurden 2 Tiermodelle zur diabetischen Nephropathie eingesetzt. Zum einen wurde in LDL – Rezeptor defizienten Mäusen eine diabetische Stoffwechsellage durch Streptozotocin – Injektion sowie eine ausgeprägte Hyperlipidämie durch fett- und cholesterinreiche Diät induziert. Ein zweites Modell wurde für denselben Versuchsansatz jedoch an Mäusen mit einer Defizienz der endothelialen Stickstoffmonoxid – Synthase angewandt. Die Aktivierung von LXR mittels GW3965 in den Mäusen erfolgte durch Beimischung des Liganden in das Versuchsfutter. Nach 6 monatiger Versuchsdauer wurden die Folgen der diabetischen Stoffwechsellage in Kombination mit Hyperlipidämie und Aktivierung von LXR auf die Ausprägung der diabetischen Nephropathie hin untersucht. Zur Ergänzung wurden *in vitro* an Lipid – stimulierten immortalisierten Tubuluszellen (HK-2) Versuche durchgeführt, um Einblicke in den Mechanismus der Lipid – assoziierten Schädigung im Tubulussystem der Niere zu erhalten. Hierzu wurden HK-2 Zellen mit oxidiertem LDL stimuliert und der Effekt einer LXR – Aktivierung durch GW3965 auf den Zellmetabolismus untersucht.

## 2. Material

### 2.1. Biologische Materialien

#### 2.1.1. Eukaryotische Zelllinien

HK-2 Zelllinie aus adulten, humanen proximalen Tubuluszellen, immortalisiert mit HPV16 E6/E7 – Genen [91] (ATCC, Manassas, USA).

#### 2.1.2. Versuchstiere

Männliche LDLR – defiziente Mäuse (LDLR<sup>-/-</sup>; The Jackson Laboratory, Stock Nr. 002207) wurden im Alter von 9 Wochen und männliche eNOS-defiziente Mäuse (eNOS<sup>-/-</sup>; The Jackson Laboratory, Stock Nr. 002684) wurden im Alter von 4 Wochen in den Versuch genommen. Die Tiere wurden unter SPF-Bedingungen im Tierstall des Uniklinikums Mannheim gehalten und durch Standard-Diät und Trinkwasser ad libitum ernährt. Je nach Einteilung der Tiere in diverse Versuchsgruppen wurden Spezialdiäten ad libitum bereitgestellt (2.3.3.).

### 2.2. Molekularbiologische Materialien

#### 2.2.1. Oligonukleotide für die Genotypisierung von Versuchstieren

LDLR <sup>-/-</sup>	Wildtyp – Primer:	5'-GCG ATG GAT ACA CTC ACT GC-3'	Produkt: 167bp
	KO – Primer:	5'-AAT CCA TCT TGT TCA ATG GCC GAT-3'	Produkt: 350bp
	Revers – Primer:	5'-CCA TAT GCA TCC CCA GTC TT-3'	
eNOS <sup>-/-</sup>	Wildtyp – Primer:	5'-AGG GGA ACA AGC CCA GTA GT-3'	Produkt: 337bp
	KO – Primer:	5'-AAT TCG CCA ATG ACA AGA CG-3'	Produkt: 258bp
	Revers – Primer:	5'-CTT GTC CCC TAG GCA CCT CT-3'	

#### 2.2.2. Oligonukleotide für Genexpressionsanalysen

ABCA1	Vorwärts – Primer	5'- CCAGACAGTTGTGGATGTGG -3'
	Revers – Primer	5'- GACCTCGCTCTTCCTTCCTT -3'
ABCG1	Vorwärts – Primer	5'- CTTGCAGTAGGGGCTTTCAG -3'
	Revers – Primer	5'- GCAAGGCTAGAGGTGTGGAG -3'
GAPDH	Vorwärts – Primer	5'- ACTCCCACTCTTCCACCTTC -3'
	Revers – Primer	5'- GGTCCAGGGTTTCTTTACTCC -3'

## Material

---

MCP-1	Vorwärts – Primer	5`- ACCAAGCTCAAGAGAGAGAGG -3`
	Revers – Primer	5`- ACATTCAAAGGTGCTGAAGAC -3`
RAGE	Vorwärts – Primer	5`- CCATCCTACCTTCTCCTG -3`
	Revers – Primer	5`- AGCGACTATTCCACCTTC -3`
SCD1	Vorwärts – Primer	5`- CTAAGGATGGGACCTGACGA -3`
	Revers – Primer	5`- TCTGCTGTGAGCGTCTGTCT -3`
SR-A1	Vorwärts – Primer	5`- GCACAGGATGCAGACAGAAA -3`
	Revers – Primer	5`- TGGTCCATCTTGGTGACAGA -3`
TGFβ	Vorwärts – Primer	5`- TCAGCTCCACAGAGAAGAAC -3`
	Revers – Primer	5`- CTTGCTGTACTGTGTGTCC -3`
TNFα	Vorwärts – Primer	5`- GCTTTCCGAATTCCTGGAG -3`
	Revers – Primer	5`- TTGCACCTCAGGGAAGAATC -3`

### 2.2.3. Antikörper

LXRα	Sigma-Aldrich, St Luis, USA
LXRβ	Sigma-Aldrich, St Luis, USA
Aktin	Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA
3-Nitrotyrosin	Millipore, Merck Darmstadt
CD3	Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA
Desmin	GeneTex Inc., Irvine, USA
F4/80	Serotec, Oxford, UK
Mac-2	Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen
Perilipin	Progen, Heidelberg
Tip47	Progen, Heidelberg
WT1 (C19)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA
Xanthin – Oxidoreduktase	Progen, Heidelberg
Ziege anti-Kaninchen, Peroxidase gekoppelt	Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA
Esel anti-Ziege, Peroxidase gekoppelt	Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA

### 2.2.4. Arbeiten mit Versuchstieren

#### Narkose bei unilat. Nephrektomie, Injektion von STZ/Citratpuffer und retrobulbärer Blutentnahme

Isofluran, inhalativ	Abbott, Illinois, USA
----------------------	-----------------------

#### unilaterale Nephrektomie

Buprenorphin (Temgesik®), subkutan, 0.03mg/kg	Essex Pharma, München
Novaminsulfon, 4 Tr./100ml im Trinkwasser	Ratiopharm, Ulm
Gewebekleber (Surgibond®)	SMI, St. Vith, Belgien

## 2.3. Kulturmedien und Lösungen

### 2.3.1. Kultur eukaryotischer Zelllinie HK-2

DMEM	ATCC, Manassas, USA
Keratinocyte – SFM	Life Technologies (Gibco), Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies, (Gibco)Darmstadt
FCS (hitzeinaktiviert: 56°C/60 min)	PAA, Pasching, Österreich
0.25 % Trypsin-EDTA – Lösung	Life Technologies (Gibco), Darmstadt
Trypanblau – Lösung	Fluka, Gaiberg
DMSO	Genaxxon Biosciences, Ulm

#### Zusammensetzung kompletter Kulturmedien

DMEM	10 %	FCS (hitzeinaktiviert)
	1 %	Penicillin/Streptomycin
Keratinocyte – SFM	1 %	Penicillin/Streptomycin
HK-2 Kulturmedium	1/5 (v/v)	komplettes DMEM
	4/5 (v/v)	komplettes Keratinocyte-SFM
Kryokonservierungslösung	60 %	komplettes DMEM (v / v)
	30 %	FCS (v/v), hitzeinaktiviert
	10 %	DMSO (v / v)

### 2.3.2. Material für molekularbiologische Methoden

#### Standard – Lösung

1 x PBS	140 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	8,1 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
		in H <sub>2</sub> O; pH 7,4

#### Agarose – Gelelektrophorese

1 x TAE – Laufpuffer	40 mM	Tris
	5,71 %	Essigsäure (v/v)
	10 %	0,5 M EDTA pH 8 (v/v)
		in H <sub>2</sub> O

## Material

---

DNA – Ladepuffer (6x)	20	mM	Tris – HCl pH 7,5
	0,001	%	Xylencyanol (w/v)
	50	%	Glyzerin (v/v) in H <sub>2</sub> O

### Isolation von RNA

Sarcosin – Lösung	20	%	N – Lauroylsarcosin (w/v) in H <sub>2</sub> O
Citrat – Puffer	25	mM	Natriumcitrat
	0,5	%	Sarcosin (v/v) in H <sub>2</sub> O, pH 7,5 mit Essigsäure einstellen steril filtrieren
GTC – Puffer	10	g	Guanidinthiocyanat
	20	ml	Citrat – Puffer
	350	µl	β – Mercaptoethanol
Natriumacetat	2	M	Natriumacetat in H <sub>2</sub> O, pH 4,0 mit Essigsäure einstellen
CIA			Chloroform – Isoamylalkohol Gemisch 24:1

### Verdau von Schanzgewebe von Versuchstieren

Verdau – Puffer (Luckow – Puffer) für eNOS-/-	50	mM	KCl
	10	mM	Tris – HCl pH 8,3
	2,5	mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,01	%	Gelatine (w/v)
	0,45	%	Nonidet P40 (v/v)
	0,45	%	Tween 20
Isolierungspuffer (Tail – Puffer) für LDLR-/-	50	mM	Tris – HCl pH 8
	100	mM	EDTA
	100	mM	NaCl
	1	%	SDS (w/v)
gesättigte NaCl – Lösung	6	M	NaCl in H <sub>2</sub> O



## Material

---

### Polyacrylamid – Gelelektrophorese

1 x TGS – Laufpuffer	25	mM	Tris
	1,45	%	Glyzin
	0,1	%	SDS in H <sub>2</sub> O, pH 8,3
Tris – Puffer pH 6,8	1	M	Tris
	0,03	%	Bromphenolblau in H <sub>2</sub> O, pH 6,8
Tris – Puffer pH 8,8	1	M	Tris in H <sub>2</sub> O, pH 8,8
3 x Proteinladepuffer	30	%	Glycerin
	6	%	SDS
	15	%	β-Mercaptoethanol
	0,03	%	Bromphenolblau (Natriumsalz)
	187,5	mM	Tris in H <sub>2</sub> O, pH 6,8

### Ansätze für Polyacrylamidgele (5x):

	Sammelgel (3 % PAA)	Trenngel (10 % PAA)
Acrylamidlg.(30 %)	1 ml	10 ml
Tris-Puffer	1,25 ml (pH 6,8)	11,25 ml (pH 8,8)
H <sub>2</sub> O	7,5 ml	3,15 ml
10 % SDS	100 µl	300 µl
10 % APS	100 µl	300 µl
TEMED	15 µl	15 µl

### Western – Blot Analyse

EMBL – Puffer:	40	mM	Tris – HCl pH 10,4
	39	mM	Glyzin
	1,3	mM	SDS
	20	%	Methanol (v/v)
PBST	0,3	%	Tween20
	10	%	10 x PBS (v/v) in H <sub>2</sub> O
	3-5	%	Magermilchpulver (w/v) in PBST

## Material

---

### Analyse der Mitochondrienaktivität

Mitochondrienpuffer	20	mM	Tris – HCl pH 7,4
	250	mM	Saccharose
	50	mM	KCl
	5	mM	MgCl <sub>2</sub>

### **2.3.3. Arbeiten mit Versuchstieren**

#### STZ – Injektion von Versuchstieren

Citratpuffer	100	mM	Di – Natriumcitrat in H <sub>2</sub> O, pH 4,5
--------------	-----	----	---

#### Experimentaldiäten für Versuchstiere

Standardfutter R/M-H (Chow) 19% Protein, 3,3% Fett			Ssniff Experimentaldiäten GmbH, Soest
Experimentalfutter nach TD88173 (Western Diät) 17,3% Protein, 21,2% Fett, 0,2% Cholesterin			Ssniff Experimentaldiäten GmbH, Soest
Chow + GW3965 Standardfutter mit 170mg GW3965/kg Futter			Ssniff Experimentaldiäten GmbH, Soest
Western Diät (WD) + GW3965 Experimentalfutter mit 170mg GW3965/kg Futter			Ssniff Experimentaldiäten GmbH, Soest

### **2.3.4. Histologie**

#### Färbung von HK-2 Zellen

Fettrot 7B Stammlösung	0,25	g	Fettrot 7B Pulver in 50 ml Isopropanol
Gebrauchslösung	6	Teile	Stammlösung
	4	Teile	H <sub>2</sub> O
			24h reifen lassen, vor Gebrauch filtrieren

#### Färbung von Gewebeschnitten

Schiffsches – Reagenz	0,5	%	basisches Fuchsin (w/v)
	0,5	%	Kaliumdisulfit (w/v)
	0,15	M	HCl

## Material

---

Trichrom – Färbung (nach Masson – Goldner)			Weigerts Eisenhämatoxylin – Lösung Ponceau-Säurefuchsin – Lösung Phosphorwolframsäure - Orange G – Lösung Lichtrgrün SF
Karnovsky – Fixativ	2	%	Paraformaldehyd (w/v)
	2,5	%	25 % Glutaraldehyd – Lösung (v/v)
	0,2	M	Kakodylsäure
Zink – Fixativ	0,5	g	Calciumacetat
	5	g	Zinkacetat
	5	g	Zinkchlorid
	0,1	M	Tris pH 7,4 ; auf 1L auffüllen

### 2.4. Chemikalien, Enzyme und Kits

100bp Marker DNA – Ladder	Life Technologies (Invitrogen), Darmstadt
$\alpha$ -Glattmuskelaktin-spez. Aszitesflüssigkeit (Maus)	Sigma-Aldrich, St Luis, USA
Acrylamidlösung, gebrauchsfertig	Roth, Karlsruhe
Agarose	AppliChem, Darmstadt
Agilent RNA6000 Nano Kit	Agilent Technologies, Böblingen
Alkaline Phosphatase Detektionssystem für IHC	Dako, Hamburg
Aquatex® Eindeckmedium	Merck, Darmstadt
Avidin/Biotin Detektionssystem für IHC	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Bradford – Reagenz	BioRad, München
Taq-DNA – Polymerase	5Prime, Hamburg
dNTP-Mix (2,5 mM je Nukleotid)	Life Technologies (Invitrogen), Darmstadt
ECL Detektionskit	Applichem, Darmstadt
Eindeckmedium Vitro – Clud® für Gewebeschnitte	Langenbrink, Emmendingen
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Roth, Karlsruhe
Fettrot 7B	WALDECK GmbH & Co (Chroma), Münster
Hämalaun – Lösung nach Mayer	Roth, Karlsruhe
LightCycler® Capillaries (20 $\mu$ l)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
MgCl <sub>2</sub> -Lösung (25 mM)	5Prime, Hamburg
PageRuler prestained Proteinmarker	Thermo Scientific (Fermentas), USA
Proteinase K	Sigma-Aldrich, St Luis, USA
Oligo(dT) <sub>12-18</sub> Primer	Life Technologies (Invitrogen), Darmstadt
Ölsäure gekoppelt an Albumin	Sigma-Aldrich, St Luis, USA
oxLDL (kupferoxidiert), human	Forschungsgruppe Prof. Malle, Graz [92]
Reverse Transkriptase SuperScriptII®	Life Technologies (Invitrogen), Darmstadt
Streptozotizin	Sigma-Aldrich, St Luis, USA
TEMED	Sigma, Deisenhofen
Tissue Tek®	Sakura Finetek GmbH, Staufen

Turbo DNA-free™ Kit	Life Technologies (Ambion), Darmstadt
GW3965 (in DMSO gelöst)	Chess GmbH, Mannheim
ROS/Superoxide Detection Kit	ENZO Lifesciences, Farmingdale, USA

### 2.5. Verbrauchsmaterialien

6-, 12-, 24-Lochplatten (Zellkultur)	Costar, Corning, USA
96-Lochplatte für Fluoreszenz, schwarz	Greiner Bio-One, Frickenhausen
96-Lochplatte für Spektrophotometer	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Akku-Chek Compact Teststreifen	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Blutprobenröhrchen (Microvette 500LH)	Sarstedt, Nümbrecht
Einfrierröhrchen, 2 ml	Thermo Scientific, USA
Einwegpipetten, steril	Falcon, Becton Dickinson, USA
Filterpapier, Whatman 3MM-Papier	Schleicher & Schuell, Dassel
Gewebekulturschalen (6, 10 cm)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Kanülen (23G, 30G)	Becton Dickinson, USA
Kapillaren (20µl, Glas)	Brand GmbH, Wertheim
Nahtmaterial Vicryl 5-0	Johnson & Johnson GmbH, Norderstedt
Nitrozellulose-Membranen	Schleicher & Schuell, Dassel
Objektträger	Thermo Scientific, USA
Pasteurpipetten, Glas	WU, Mainz
Parafilm M Amer.	National Can, Chicago, USA
Pipettenspitzen (Fa. Rainin)	Steinbrenner Laborsysteme, Wiesenbach
Rasierklingen	Wilkinson Sword, Solingen
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml	Falcon, Becton Dickinson, USA
Reaktionsgefäße 13ml	Sarstedt, Nümbrecht
Röntgenfilme, Hyperfilm ECL	Amersham, München
Röntgenfilmkassetten	Kodak, Stuttgart
Spritzen und Kanülen	Terumo, Leuven, Belgien
Sterilfilter, Zelluloseacetat 0,2 µm	Renner, Dannstadt
Untersuchungshandschuhe	Meditrade, Kiefersfelden
Zellkulturflaschen (75, 175 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht

### 2.6. Geräteliste

Agarosegel-Elektrophoresekammer	Roth, Karlsruhe
Agarosegel-Gießkammer	Roth, Karlsruhe
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Böblingen
AKKU-Chek Compact Plus	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Autoanalyzer Hitachi 9-17-E	Hitachi, Frankfurt am Main
Cryostat Microm HM500	Thermo Scientific, USA
Dewar Stickstoffbehälter	KGW-Isotherm, Karlsruhe

## Material

---

Elektrotransfer Blotapparatur	BioRad, München
Entwicklermaschine Agfa Curix 60	Agfa, München
Eppendorf Tischkühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Eismaschine AF20	Scotsman, Vernon Hills, USA
Fluoreszenz Plate Reader Fluostar	BMG Labtech, Offenbach
Geldokumentation Geldoc™ 2000	Bio-Rad, München
Inversionsmikroskop für Zellkultur, Wilorat S	Hund, Wetzlar
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr, Biberach an der Riss
Kryoeinfrierbox	Thermo Scientific, USA
Laborwaage	Ohaus, Pine Brook, USA
Laborfeinwaage	Sartorius, Göttingen
Light Cycler® 2.0 System	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Magnetrührer MR 3002	Heidolph, Schwabach
Mehrkanalpipette, manuell	Thermo Scientific, USA
Mikrotom Microm HM355S	Thermo Scientific, USA
Mikrowellengerät	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe
Minifuge RF (Kühlzentrifuge)	Heraeus, Hanau
Narkosemittelverdampfer	Dräger, Lübeck
Neubauer-Zählkammer	Precicolor HBG, Gießen
PCR System 2720 Thermal Cycler	Perkin Elmer, Norwalk, USA
pH-Meter	Schott, Mainz
Pipetten (Rainin)	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Pipettierhilfen, manuell	Gilson, Middleton, USA
Pipettierhilfen Pipetboy	Integra Bioscience, Fernwald
Polyacrylamidgel-Elektrophoresekammer	Bio-Rad, München
Rotor Beckman J25.50	Beckman Coulter, Krefeld
SlowScan CCD Kamera für Elektronenmikroskop	Carl Zeiss, Oberkochen
Spectrophotometer Spectramax Plus 384	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Sterilbank BioGard Hood	The Baker Company, Sanford, USA
Stickstofftank Cronos Biosafe	Messer Griesheim, Griesheim
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Transmissionselektronenmikroskop EM9000	Carl Zeiss, Oberkochen
Ultramicrotom Leica Ultracut	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Ultra Turrax Homogenisierer	IKA Labortechnik, Staufen
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Wärmeofen (56°C)	Heraeus, Hanau
Vortex	IKA Labortechnik, Staufen
Zellkulturinkubatoren Forma	Thermo Scientific, USA
Zentrifuge Beckman Avanti J-25	Beckman Coulter, Krefeld

## 2.7. Chemikalien

Chemikalien wurden in p.A. Qualität von den Firmen Applichem (Darmstadt), Sigma Aldrich (Deisenhofen), Serva (Heidelberg), Life Technologies (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Fluka (Neu-Ulm) und Gerbu (Gaiberg) bezogen.

## 2.8. Software

Endnote X1	ISI Research Software, Berkeley, USA
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, Inc., USA
Q600 QWin	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Microsoft Office 2007	Microsoft Corp., Redmont, USA
Microsoft Windows Vista	Microsoft Corp., Redmont, USA

### **3. Methoden**

#### **3.1. Zellkultur**

##### ***3.1.1. Kultivierung von HK-2 Zellen***

Die Kultivierung von HK-2 Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> in einer wassergesättigten Atmosphäre mit geeignetem supplementiertem Medium (2.3.1.). Die Zellen wurden abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit alle 3 – 4 Tage subkultiviert. Dazu wurde das verbrauchte Medium entfernt, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und anschließend mit 3 – 5 ml Trypsin-EDTA – Lösung abgelöst. Ein Teil der Zellen wurde verworfen und die verbleibenden Zellen nach Zugabe frischen Mediums weiterkultiviert.

##### ***3.1.2. Kryokonservierung von Zellen***

HK-2 Zellen wurden für die Kryokonservierung wie unter 3.1.1. beschrieben in Lösung gebracht und anschließend in 15 ml Reaktionsgefäße transferiert und durch Zentrifugation (1.200 UpM, 5 min) geerntet. Das entstandene Zellpellet wurde in 5 ml Kryokonservierungslösung (2.3.1.) resuspendiert und je 1 ml in ein Einfrierröhrchen überführt, so dass ca. 1 – 2 Mio Zellen pro Röhrchen konserviert werden. Dieses wurde dann in einer Kryoeinfrierbox kontinuierlich mit 1°C/min bis auf eine Temperatur von -80°C abgekühlt und zur Lagerung über einen längeren Zeitraum in flüssigen Stickstoff transferiert.

Bei Bedarf wurden die Einfrierröhrchen zügig in einem 37°C Wasserbad aufgetaut und die Zellsuspension in einem 15 ml Reaktionsgefäß mit 10 ml supplementiertem Medium vermischt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (1.800 UpM, 5 min), in frischem Medium resuspendiert und für die weitere Kultivierung in Zellkulturflaschen ausgesät.

##### ***3.1.3. Bestimmung der Zelldichte und Vitalität***

Um definierte Zellzahlen für Experimente nutzen zu können, wurde die Zelldichte und Vitalität durch Mischen der Zellen mit Trypanblau und Nutzung einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Trypanblau dringt selektiv in tote Zellen ein und färbt diese blau, was eine Unterscheidung toter und lebender Zellen im Lichtmikroskop ermöglicht. HK-2 Zellen wurden wie unter 3.1.1. beschrieben in Lösung gebracht und ein Aliquot der Zellen 1:1 mit Trypanblau verdünnt. 10 µl des Gemisches wurde in eine Neubauer – Zählkammer gegeben und im Lichtmikroskop die Zahl lebender Zellen in 16 Zählquadraten (entspricht einem Volumen von 0,1 µl) bestimmt. Durch

Multiplikation des Ergebnisses mit dem Faktor  $10^4$  und dem Verdünnungsfaktor konnte die Zahl lebender Zellen pro Milliliter errechnet werden.

### **3.2. Molekularbiologische Methoden**

#### **3.2.1. Isolation von RNA aus Nierengewebe und HK-2 Zellen**

Die Isolation von RNA [93] ermöglicht eine Analyse der Genexpressionsmuster der Zellen im Gewebe bzw. aus *in vitro* – Kultur. Mit Hilfe spezifischer Primer kann die Menge an mRNA nach reverser Transkription von entsprechenden Genen mittels quantitativer Real – Time PCR ermittelt werden. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Mit einem sterilen Skalpell wurde ein ca.  $2\text{ cm}^3$  großes Stück Nierengewebe einer Gefrierprobe entfernt und in 3 ml GTC – Puffer auf Eis gegeben. Die übrige Probe wurde sofort wieder in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Gewebe wurde mit dem Ultra Turrax 5 – 8 mal für einige Sekunden bei 13.000 UpM homogenisiert.

HK-2 Zellen wurden trypsiniert und 5 min bei 1.200 UpM abzentrifugiert (3.1.1.). Das Zellpellet wurde durch Schnippen gelöst und durch Zugabe von 2 ml GTC – Puffer sowie wiederholtem auf– und abpipettieren homogenisiert.

Die Proben wurden nun in flüssigem Stickstoff eingefroren, bei RT wieder aufgetaut und sofort auf Eis gestellt. In einem 13 ml Reaktionsgefäß wurde das Homogenat nach Zugabe von 1/10 Volumen 2M Natriumacetat (v/v), 1 Volumen Wasser-gesättigtes Phenol (v/v) und 2/10 Volumen CIA (v/v) gemischt und für 15 min inkubiert, anschließend bei 4°C für 30 min bei 11.000 UpM zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und 1:1 mit Isopropanol gemischt und für 30 min bei 4°C und 13.000 UpM zentrifugiert. Das RNA – Pellet wurde mit eiskaltem 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Nachdem das Pellet kurz an der Luft getrocknet hat wurde die RNA in 30  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O aufgenommen und bei -80°C gelagert.

#### **3.2.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentration und Reinheit von RNA – Präparationen wurde durch spektrophotometrische Analyse bestimmt. Dazu wurden die RNA – Lösungen 1:80 in H<sub>2</sub>O verdünnt und in eine Quarzküvette (d=10 mm) transferiert. In einem UV-Spektrometer wurde die Absorption der Lösung bei 260 bzw. 280 nm gemessen. Als Referenzwert diente die Absorption von H<sub>2</sub>O bei den entsprechenden Wellenlängen. Die RNA-Konzentration wurde gemäß folgender Formel bestimmt:



$$c = \text{Abs}_{260 \text{ nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

Anhand des Quotienten  $\text{Abs}_{260 \text{ nm}} / \text{Abs}_{280 \text{ nm}}$  lässt sich die Reinheit der RNA bestimmen: Während Werte zwischen 1,8 und 2 auf eine hohe Reinheit der RNA hindeuten, sind Werte unter 1,8 ein Zeichen für Proteinkontaminationen.

### **3.2.3. Qualitätskontrolle von isolierten RNA – Präparationen**

Um kontaminierende DNA aus den RNA – Präparationen zu entfernen wurde ein DNase – Verdau mit Hilfe des Turbo DNA-free™ Kit (2.4.) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurden von jeder Präparation 3  $\mu\text{g}$  RNA eingesetzt.

Die Qualität der RNA wurde anschließend mit dem RNA6000 Nano Kit (2.4.) am Bioanalyzer (Agilent) nach Angaben des Herstellers überprüft (Modus *RNA 6000 nano assay, eukaryotes total RNA assay*). Die ermittelte RNA – Integritäts – Nummer (RIN) gibt die Qualität der RNA – Präparation an, wobei eine RIN von 10 und ein Quotient der 28S/18S Einheiten der ribosomalen RNA von 2 die höchste RNA – Qualität beziffert.

### **3.2.4. Reverse Transkription isolierter RNA**

Mittels reverser Transkription wurde die RNA in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. 3  $\mu\text{g}$  DNA – freie RNA wurden in 12  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt und mit je 1  $\mu\text{l}$  Oligo(dT)<sub>12-18</sub> Primer und dNTPs gemischt. Als Kontrolle wurde ein Ansatz nur mit Wasser pipettiert. Die Proben wurden für 5 min bei 65°C erhitzt und auf Eis abgekühlt, bevor 4  $\mu\text{l}$  Synthesepuffer und 2  $\mu\text{l}$  DTT zugegeben wurden. Die Ansätze wurden nun für 2 min bei 42°C erwärmt, dann 1  $\mu\text{l}$  SuperScriptII® dazupipettiert und anschließend für 50 min bei 42°C inkubiert. Nach Inaktivierung bei 70°C für 15 min wurden die Proben auf Eis gekühlt. Zuletzt wurde verbliebene RNA durch Verdau mit 1  $\mu\text{l}$  RNase H (2U/ $\mu\text{l}$ ) für 20 min bei 37°C entfernt und die cDNA bei -20°C gelagert.

### **3.2.5. Quantitative Real – Time PCR (qRT – PCR)**

Durch Analyse mittels qRT – PCR kann die Genaktivität anhand der Menge exprimierter mRNA bestimmt werden. Es wurde das System Light Cycler® 2.0 mit dazugehörigem Kit (2.4.) nach Angaben des Herstellers verwendet. Für die Synthese wurde eine 1:10 Verdünnung des Ansatzes der cDNA – Synthese (auch die  $\text{H}_2\text{O}$  – Kontrolle) in  $\text{H}_2\text{O}$  eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen für verschiedene Primer wurden ausgetestet und zur Überprüfung des korrekten Amplifikationsproduktes durch Agarose – Gelelektrophorese überprüft. Die Ansätze wurden in

Glaskapillaren pipettiert und die Synthese sofort gestartet. Zur Quantifizierung wurden die ermittelten  $C_T$  – Werte gegen die  $C_T$  –Werte von GAPDH als Haushaltsgen normalisiert und die mRNA – Expression anhand der  $\Delta\Delta C_T$  –Methode [94] berechnet.

qRT – PCR Programm:

Initiale Denaturierung	94°C	10min
35x {	Denaturierung	94°C 5s
	Hybridisierung	60°C 10s
	Synthese	72°C 10s
Abschließende Synthese	72°C	5min
Lagerung	4°C	∞

### **3.2.6. Isolierung von DNA aus Schwanzgewebe**

Ein ca. 3 mm langes Stück Schanzgewebe wurde mit einer heißen Schere (250°C) vom Schwanzende des Tieres entfernt und in einem 2 ml – Reaktionsgefäß mit 250 µl Luckow –Puffer (eNOS-/-) bzw. 750 µl Tail – Puffer (LDLR-/-) gemischt (2.3.2.). Nach Zugabe von 15 µl Proteinase K wurden die Ansätze 6 h – 16 h bei 56°C im Wärmeschrank inkubiert. Für die Genotypisierung des Stammes eNOS-/- wurde direkt 1 µl des Verdauungsansatzes zur PCR – Reaktion pipettiert. Für den Stamm LDLR-/- wurde die DNA wie folgt aus dem Gewebe isoliert. Nach der Inkubation im Wärmeschrank wurden die Proben auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 300 µl gesättigter 6 M NaCl – Lösung für 30 min bei 4°C und 13.000 UpM zentrifugiert. Die oberste klare Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml Isopropanol gemischt. Die dadurch ausfallende DNA wurde für 30 min bei 4°C und 13.000 UpM pelletiert, der Überstand verworfen. Das DNA – Pellet wurde mit 60% Ethanol gewaschen, für 10 min bei 4°C und 13.000 UpM erneut zentrifugiert und anschließend an der Luft getrocknet. Zuletzt wurde die DNA in 30 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### **3.2.7. PCR – Protokoll zur Genotypisierung von Versuchstieren**

Mit Hilfe der PCR werden DNA – Fragmente amplifiziert, welche durch die Wahl spezifischer Primerpaare den Verlust des entsprechenden Genes eines KO – Tieres anzeigen und so der Genotyp (Wt, heterozygot, KO) des Tieres bestimmt werden kann.

## Methoden

Pipettierschema:	10x Polymerase – Puffer	2,5µl
	dNTPs (10mM)	0,5µl
	MgCl <sub>2</sub> (25mM)	0,5µl
	Vorwärts – Primer (10µM)	2µl
	Revers – Primer (10µM)	2µl
	DNA	1µl
	Taq – Polymerase	0,25µl
	dest. Wasser	<u>16,25µl</u>
		Σ 25µl

PCR – Programm:		eNOS-/-	LDLR-/-
Initiale Denaturierung	94°C	2min	2min
35x {	Denaturierung	94°C	30s
	Hybridisierung	63°C	45s
	Synthese	72°C	45s
Abschließende Synthese	72°C	2min	1min
			2min

Die Proben wurden bei 4°C gelagert und zur Analyse auf ein 1% Agarosegel aufgetragen.

### **3.2.8. Horizontale Agarose – Gelelektrophorese**

DNA – Moleküle bewegen sich aufgrund ihrer durch die Phosphatgruppen bedingten negativen Ladung im elektrischen Feld in Richtung der Anode. Im Molekülgerüst eines auspolymerisierten Agarosegels ist die Migrationsgeschwindigkeit der DNA – Fragmente abhängig von ihrer Länge und somit können Nukleinsäuremoleküle, z.B. PCR – Produkte, mittels horizontaler Agarose – Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt werden.

Um 1 %ige Agarosegele herzustellen wurden 3 g Agarose in 300 ml 1x TAE – Puffer durch Aufkochen in einer Mikrowelle gelöst. Der durch Verdunstung entstandene Flüssigkeitsverlust wurde durch Zugabe von H<sub>2</sub>O ausgeglichen. Die Agaroselösung wurde bis auf ca. 60°C abgekühlt, mit Ethidiumbromid im Verhältnis 1:10.000 versetzt und luftblasenfrei in eine Gelkammer mit Kamm gefüllt. Das nach ca. 10 – 20 min erstarrte Gel wurde in eine mit 1x TAE – Puffer gefüllte horizontale Elektrophorese – Kammer überführt und nach Entfernen des Kamms mit 5 µl DNA – Marker sowie den mit 6x Ladepuffer versetzten DNA – Proben beladen. Der Gellauf erfolgte bei 180 V. Anschließend wurden die Gele unter kurzwelligem UV – Licht (254 nm) fotografiert und die Größe der Fragmente durch Vergleich mit den Markerbanden bestimmt.

### **3.2.9. Proteinbestimmung nach Bradford**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford beruht auf der Verwendung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue, welcher mit sauren Seitenketten von Proteinen reagieren, wodurch sich sein Absorptionsmaximum von 465 nm (ohne Protein) zu 595 nm (mit Protein) verschiebt.

Um die Proteinkonzentration zu bestimmen, wurden die Proben bei Bedarf verdünnt und dann je 5 µl in ein 1,5 ml – Reaktionsgefäß pipettiert. Parallel dazu wurde eine Standardreihe generiert, indem eine BSA (bovines Serumalbumin) – Stocklösung (1 mg/ml) in H<sub>2</sub>O verdünnt wurde um Standardlösungen mit 15, 10, 5, 2, 1, 0,5 µg/µl zu erhalten und davon ebenfalls je 5 µl in 1,5 ml – Reaktionsgefäße pipettiert wurden. Als Referenz wurden 5 µl H<sub>2</sub>O im Ansatz verwendet. Danach wurden je 700 µl Bradford Reagenz zugegeben. Nach einer Inkubation von 5 – 30 min wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Anhand der erhaltenen Daten wurde mit Microsoft Excel eine BSA – Standardkurve (quadratisch polynomische Funktion) erstellt und durch Vergleich der Absorption der Proben mit der Standardkurve der Proteingehalt der Proben berechnet.

### **3.2.10. Denaturierende Polyacrylamid – Gelelektrophorese (SDS – PAGE)**

In Polyacrylamidgelen können denaturierte Proteine, ähnlich zu dem Verhalten von DNA in Agarosegelen, der Größe nach aufgetrennt werden.

Die Denaturierung der Proteine erfolgt durch 10 – minütigem Erhitzen auf 95°C in Proteinladepuffer. Um eine bessere Auftrennung größerer Volumina von Proteingemischen zu erreichen, wurde die diskontinuierliche Polyacrylamid – Gelelektrophorese angewandt [95]. Das obere Viertel der Gele (Sammelgel) enthält 3% Polyacrylamid, während für den unteren Teil (Trenngel) 10% Polyacrylamid verwendet wurden. An der Phasengrenze kommt es zur Fokussierung der Proteine, welche anschließend im Trenngel der Größe nach aufgetrennt werden. Die zwei Polyacrylamidgel – Phasen (2.3.2) wurden nacheinander zwischen zwei Glasplatten gegossen. Die auspolymerisierten Gele wurden in eine mit 1x TGS – Puffer gefüllte Elektrophorese – Kammer eingespannt und 20 µl der mit Ladepuffer versetzten Proteinproben sowie 5 µl Proteinmarker in die Taschen geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 100 – 120 V. Nach Beendigung des Gellaufs wurden die aufgetrennten Proteine mittels Western – Blot Analyse detektiert.

### **3.2.11. Western – Blot Analyse**

Mit Hilfe der Western – Blot Analyse, auch Immunoblot genannt, können auch geringe Mengen (im Nanogramm – Bereich) eines Proteins spezifisch detektiert werden.

Die zunächst elektrophoretisch aufgetrennten Proteingemische wurden dazu auf eine Nitrozellulose – Membran übertragen. In einer Wanne wurden auf den Träger zur Anode hin nacheinander 1 Schwamm, 3 Whatmann – Papiere (7 x 10 cm), eine Nitrozellulose – Membran (6 x 9 cm), das Trenngel (6 x 9 cm), weitere 3 Whatmann – Papiere (7 x 10 cm) und 1 weiterer Schwamm in EMBL –Puffer getränkt, luftblasenfrei übereinander geschichtet und der Träger geschlossen. Dieser wurde in die Blotapparatur eingehängt und die Kammer komplett mit EMBL – Puffer gefüllt. Der Elektrotransfer erfolgte für 60 min bei 150 – 200 mA pro Gel mit Eiskühlung. Um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern, wurde die Membran nach dem Proteintransfer für 30 min bei Raumtemperatur oder alternativ über Nacht bei 4°C in 5 % Blockmilch (2.3.2.) geschwenkt. Anschließend wurde die Membran mit 2 ml einer Verdünnung des Primärantikörpers in 3 % Blockmilch in eine Plastikfolie eingeschweißt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Als Primärantikörper wurden je nach Bedarf LXR $\alpha$ , LXR $\beta$  oder Aktin (1:1000) verwendet. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Membrane 3x für 10 min in PBST (2.3.2.) gewaschen bevor sie mit 5 ml Sekundärantikörper in eine frische Folie eingeschweißt und für 1 – 2 h bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Als Sekundärantikörper wurden Meerrettich – Peroxidase konjugierte Ziege anti-Kaninchen bzw. Esel anti-Ziege Antikörper in einer 1:3000 Verdünnung in 5 % Blockmilch eingesetzt. Nach erneutem Waschen der Membranen für 3x 10 min in PBST und 1x mit PBS erfolgte der Proteinnachweis mit Hilfe einer Chemilumineszenz – Reaktion. Dazu wurden Luminol und Enhancer – Lösung im Verhältnis 1:1 vermischt und die Membran in 1,5 ml der Entwicklerlösung unter leichtem Schwenken für 30-60 s inkubiert. Anschließend wurden die Membranen mit einem Papiertuch abgetrocknet und zwischen Folie in eine Röntgenkassette gelegt. In der Dunkelkammer wurden Röntgenfilme für eine Dauer von 5 s bis 20 min mit den Membranen belichtet und anschließend entwickelt.

### **3.2.12. Generierung von Lipidtröpfchen und LXR – Aktivierung mittels GW3965 in HK-2 Zellen**

In 6-Lochplatten wurden Glasplättchen ausgelegt und darauf je 200.000 HK-2 Zellen in 2 ml Medium ausgesät. Nachdem die Zellen adhärirten wurden sie für 16 Stunden mit 5  $\mu$ M GW3965 oder 5  $\mu$ M DMSO zur Kontrolle, durch Zugabe ins Kulturmedium, behandelt. Anschließend wurde zur Bildung von Lipidtröpfchen für weitere 24 Stunden entweder 50  $\mu$ g/ml

oxLDL oder 0,15  $\mu\text{M}$  Ölsäure ins Kulturmedium zugegeben. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen, für 10 min in 4% Formalin in PBS fixiert und zur Darstellung der Lipidtröpfchen mit Fettrot gefärbt (3.2.13.). Durch die Kultivierung auf Glasplättchen konnten die Zellen leicht mit Aquafix auf Objektträgern fixiert werden und am Lichtmikroskop betrachtet werden.

### **3.2.13. Fettrotfärbung von Lipid – beladenen HK-2 Zellen**

HK-2 Zellen wurden wie unter 3.2.5. auf Glasplättchen ausgesät, behandelt und mit 4% Formalin fixiert. Anschließend wurden die Glasplättchen aus der Kulturschale entnommen und mit der bewachsenen Seite nach oben in 12-Lochplatten überführt. Die Zellen wurden 1x mit PBS gewaschen und mit je 300  $\mu\text{l}$  gebrauchsfertiger Fettrot – Lösung für 15 min bei RT gefärbt (2.3.4.). Anschließend wurden die Zellen 3 – 5 mal mit vollentsalztem Wasser gewaschen und danach eine Kernfärbung mit Hämalaun durchgeführt. Die Zellen wurden für 5 min in 300  $\mu\text{l}$  Hämalaun – Lösung inkubiert. Dann wurden die Zellen 3 – 5 mal über einen Zeitraum von 30 min mit Leitungswasser gewaschen und nach gründlichem Abtropfen mit Aquafix auf Objektträgern fixiert und am Lichtmikroskop betrachtet.

### **3.2.14. Quantifizierung von ROS (reactive oxygen species) und Superoxid in HK-2 Zellen**

Die Analyse von ROS in HK-2 Zellen wurde mit dem *ROS/Superoxide – Detection Kit* von ENZO Lifesciences im 96-Lochplatten Format nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Am Vortag wurden 5.000 Zellen/Loch in 200  $\mu\text{l}$  Medium auf schwartrandigen 96-Lochplatten ausgesät. Nachdem die Zellen adhärten wurden sie mit 5  $\mu\text{M}$  GW3965 oder 5  $\mu\text{M}$  DMSO für 16h behandelt. Danach wurden die Zellen mit 50  $\mu\text{g/ml}$  oxLDL oder mit 0,15  $\mu\text{M}$  Ölsäure stimuliert. Etwa 30 min vor Ende der Inkubationszeit wurden entsprechende Mengen der Detektionsreagenzien in Medium verdünnt und zu den Zellen gegeben, damit die Radikal – sensitiven, fluoreszenten Stoffe bereits von den Zellen aufgenommen werden konnten. Nach der Inkubationszeit wurde 2x mit Waschpuffer gewaschen und anschließend 100  $\mu\text{l}$  Detektionslösung auf die Zellen gegeben. Die Messung der Fluoreszenzintensität wurde unmittelbar durchgeführt. Die grüne Fluoreszenz für ROS wurde mit einem Filterpaar bei Ex485/Em520 bestimmt, das rote Signal spezifisch für Superoxid mit dem Filterpaar Ex485/Em580. Um die Autofluoreszenz der Zellen und den Hintergrund der Messung von den ermittelten Werten abziehen zu können, wurden Zellen ohne Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffs

nur in Waschpuffer immer mit gemessen (blank). Des Weiteren wurden die Messungen durch Verwendung von 0,1 mM Wasserstoffperoxid als Positivkontrolle und 5 mM N – Acetyl – L – Cystein als Negativkontrolle zur Zellstimulation validiert. Die Stimulationen wurden in Quadruplikaten durchgeführt.

### **3.2.15. Bestimmung der Mitochondrienaktivität in HK-2 Zellen**

Die Versuche fanden im Forschungslabor der Abteilung Kinderheilkunde I: Allgemeine Pädiatrie, Stoffwechsel, Gastroenterologie unter Anleitung und mit der Hilfe von Dr. S. Sauer statt. Die Messung ermittelt die Übertragung von Elektronen in der Atmungskette von Komplex I (NADH – Dehydrogenase) über Komplex III (Cytochrom C – Reduktase) bzw. Komplex II (Succinat – Dehydrogenase) über Komplex III auf den Elektronenüberträger Cytochrom C. Die Übertragung der Elektronen von Komplex III auf Cytochrom C ist messbar, da die Reduktion von Cytochrom C einen Farbumschlag von karminrot zu himbeerrot erzeugt. Diese Farbänderung wird mit einem Rechner – gesteuerten und Temperatur – regulierten Spektrophotometer über einen gewissen Zeitraum aufgezeichnet. Durch das angewendete duale Wellenlängen – Verfahren kann die Kinetik der Elektronenübertragung anhand des Zeitverlaufes der Reduktion von Cytochrom C, und damit die Aktivität der Mitochondrien, eindeutig bestimmt werden. Die Weitergabe der Elektronen von Cytochrom C auf Komplex IV (Cytochrom C – Oxidase) und die damit einhergehende Oxidierung von Cytochrom C wird durch den Inhibitor Natriumcyanid verhindert. Je 1.5 Mio HK-2 Zellen wurden in 10 cm<sup>2</sup> – Schalen in 10 ml Medium ausgesät. Nach Adhäsion der Zellen wurde für 16 h entweder 5 µM GW3965 oder 5 µM DMSO ins Kulturmedium zugegeben und anschließend für weitere 24h je 50 µg/ml oxLDL oder 0,15 µM Ölsäure. Danach wurden die Zellen mehrmals mit PBS gewaschen, mit einem Zellspatel in 1.5 ml PBS abgeschabt und in 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Nachdem die Zellen bei 3000 UpM für 5 min zentrifugiert hatten, wurden sie auf Eis gelagert und für die Messung in Mitochondrienpuffer mit 0,015% Digitonin für 30 min auf Eis permeabilisiert. Die permeabilisierten Zellen wurden für die Messung von Komplex I und Komplex II entsprechend mit 0,5 mM NADH und 20 mM Natrium – Succinat sowie dem Inhibitor Natriumcyanid (5 mM) und 40 µM oxidiertem Cytochrom C in einem Volumen von 300µl in Mitochondrienpuffer inkubiert und bei 37°C für 15 – 30 min vermessen. Die Ergebnisse wurden auf die Proteinkonzentration der Zellsuspension normalisiert [96, 97]. Die Bestimmung von ATP wurde von Dr. Sven Sauer mit dem CellTiter Glo Assay (Promega, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Messung wurde 2 mal in Duplikaten durchgeführt.

### **3.2.16. Histochemische und immunohistochemische Färbungen an Nierengewebeschnitten**

2 mm dicke Gewebeschnitte der entkapselten Nieren wurden direkt nach der Entnahme in je 4% Formalin in PBS und Zinkfixativ über Nacht immersionsfixiert oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Die fixierten Gewebeproben wurden in Paraffin eingebettet und davon 3 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt. Paraffinschnitte wurden durch sequenzielle Immersion in Xylol, Ethanol (100%, 96%, 80%, 70%) und Wasser entparaffiniert. Für die PAS – Reaktion wurden die Proben für 5 min in 1% Periodsäure inkubiert, mit H<sub>2</sub>O gespült und anschließend 5 – 10 min in Schiff – Lösung inkubiert. Nach mehrmaligem Spülen mit H<sub>2</sub>O und Trocknen folgt die Färbung mit Hämalun (nach Mayer). Für die Trichromfärbung nach Masson – Goldner wurden die entparaffinierten Schnitte mit Eisenhämatoxylin – Lösung (nach Weigert) gefärbt und mit H<sub>2</sub>O gespült. Danach folgte die Färbung mit Säurefuchsin, Phosphorwolframsäure – Orange G und Lichtgrün SF, zwischen der Färbung wurde mit 1% Essigsäure gespült. Nach der Färbung wurden die Schnitte generell durch eine Alkoholreihe (70% – 100%) und Xylol dehydriert und mit Eindeckmedium konserviert. Für Immunohistochemie wurden Formalin – fixierte und Zink – fixierte (F4/80 bei eNOS-/- Mäusen) entparaffinierte Schnitte mit Citratpuffer pH 6,0 bei 98°C für 20 min in der Mikrowelle oder mit Tris pH 9,0 für 5 min im Druckgarer behandelt, um Antigene nach der Paraffineinbettung wieder herzustellen. Danach folgte ein Block unspezifischer Bindestellen mit 10% Kälberserum in PBST für 30 min. Die Antikörperfärbung von F4/80, Mac-2, CD3, WT1, Desmin und α-Glattmuskelaktin wurden mit Antikörper – Verdünnungslösung und einem auf Alkaline Phosphatase – basierendem Detektionssystem durchgeführt. Für Antikörperfärbungen von Tip47, Perilipin, XOR und 3-Nitrotyrosin wurde ein Avidin/Biotin – Detektionssystem verwendet. Als Kontrolle wurde die Färbung jeweils ohne Primärantikörper durchgeführt. Gefrierproben wurden am Cryostat in Tissue Tek® eingebettet und 5 µm Schnitte hergestellt welche mit 4% Formalin fixiert wurden. Die Fettrot – Färbung erfolgte gemäß 3.2.13.

Gewebeschnitte und deren weitere Behandlung wie Antikörperfärbungen, PAS-Reaktion (Periodic Acid Schiff) [98], Masson`s Trichrom und Fettrot – Färbung sowie das Ansetzen der Fixative, wurden von Mitarbeitern der Histologie – Abteilung der Arbeitsgruppe von Prof. Gröne durchgeführt; Claudia Schmidt, Gabi Schmidt und Anna-Lena Weiss.

### **3.2.17. Elektronenmikroskopie**

2 mm dicke Gewebeschnitte der entkapselten Nieren wurden direkt nach der Entnahme bei RT in Karnovsky – Lösung fixiert. Nach 3h wurde das Fixativ erneuert und die Probe bis zur weiteren



Aufbereitung bei 4°C gelagert. 70 nm Ultradünnschnitte wurden mit Eisencitrat und Uranylacetat gefärbt. Die Aufbereitung der Probe sowie die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden von Silvia Kaden aus der Histologie – Abteilung der Arbeitsgruppe von Prof. Gröne angefertigt. Die Beurteilung der Aufnahmen und die Messung der Dicke der glomerulären Basalmembran wurden von Dr. Eva Kiss durchgeführt.

### **3.2.18. Auswertung von gefärbten Gewebeschnitten**

Die quantitative Auswertung von Gewebefärbungen (WT1, Desmin, F4/80, CD3,  $\alpha$ -Glattmuskelaktin) wurde bei einer Vergrößerung mit 40x Objektiv durchgeführt. Es wurden positive Zellen in 20 zufälligen Gewebeausschnitten im Bereich der Nierenrinde und des äußeren Streifens des Nierenmarks oder in 50 Glomeruli gezählt. Die semiquantitative Auswertung (Tip47, 3-Nitrotyrosin, Xanthin – Oxidoreduktase, Schaumzellen) wurde bei einer Vergrößerung mit 40x Objektiv an 30 – 50 Gewebeausschnitten der Nierenrinde und des äußeren Streifens des Nierenmarks, bzw. an mind. 50 Glomeruli, durchgeführt. Anhand der Intensität und Verteilung der Färbung wurde mit folgender Klassifikation, negativ = 0; wenig = 0,5; moderat = 1; viel = 2; sehr viel = 3, ein Messwert (Score) berechnet: Aufsummierung der Teilergebnisse aus der Multiplikation des Prozentteils der Werte mit dem entsprechenden Wert der Klassifikation. Z.B.  $[(X/30) \times 0,5 + (Y/30) \times 1 + (Z/30) \times 2 \dots] \times 100\% = \text{Score für 30 Gewebeausschnitte}$ . Bei Schaumzellen wurde eine Skala für deren Ausbreitung in Glomeruli verwendet, keine Schaumzelle = 0; weniger als 25% = 0,5; 26 – 50% = 1; 51 – 75% = 2 und mehr als 75% = 3, die Berechnung ist entsprechend [99]. Die Auswertung wurde an PAS – gefärbten Gewebeschnitten durchgeführt. Die morphometrische Auswertung interstitieller Fibrose wurde an Masson`s Trichrom gefärbten Gewebeschnitten mit Hilfe eines halbautomatischen Bildanalyseprogramms (Leica Q600 QWin) bei hundertfacher Vergrößerung durchgeführt. Fibrotische Areale in 10 zufällig gewählten Gewebeausschnitten der Nierenrinde und des äußeren Streifens des Nierenmarks wurden als Prozent der interstitiellen Fläche, nach Ausschluss von Glomeruli, angegeben. Die morphometrische Quantifizierung der mesangialen Matrix wurde mit Hilfe der gleichen Software anhand der Point – Counting Methode berechnet [99]. Hierzu wurden 50 Glomeruli in PAS – gefärbten Gewebeschnitten ausgewertet. Das Ergebnis wird als Anteil der glomerulären Schnittoberfläche angegeben.

### **3.3. Arbeiten mit Versuchstieren**

#### **3.3.1. STZ – Injektion von Versuchstieren**

Zur Induktion von Hyperglykämie als Modell für Diabetes mellitus bekamen Versuchstiere das Inselzelltoxin Streptozotocin (STZ) intraperitoneal (i.p.) unter Isofluran – Narkose injiziert nachdem sie 4h gefastet hatten. Es wurden 2 Mal an 5 konsekutiven Tagen je 40 mg/kg Körpergewicht verabreicht mit einer 7 – tägigen Pause dazwischen. Das STZ wurde in Citratpuffer gelöst und innerhalb von 30 min verwendet. In Kontrollgruppen wurde nur Citratpuffer gespritzt.

#### **3.3.2. Blutzuckerkontrolle von Versuchstieren**

Diese Untersuchung erfordert keine Narkose mit Isofluran und somit wurde der Blutzuckerspiegel dadurch nicht beeinflusst. Des Weiteren wurden die Tiere 4h vor der Messung entfüttert, um Schwankungen des Blutzuckerspiegels durch unregelmäßige Futteraufnahme zu minimieren. Im Falle der hyperglykämischen Tiere wurde 1 Mal wöchentlich der Blutzuckerspiegel aller Versuchstiere mit dem AKKU – Chek System überprüft. Des Weiteren wurde mit diesem System bei allen Versuchstieren 1 Mal monatlich direkt vor der retrobulbären Blutentnahme der Blutzuckerspiegel bestimmt. Zunächst wurde mit einer sterilen Kanüle eine kleine Wunde am Schwanzende appliziert und ein Tropfen Blut durch Ausstreichen des Schwanzes zur Spitze hin herausgedrückt. Der Blutstropfen wurde auf einem Analysestreifen mit dem dazugehörigen AKKU – Chek Gerät ausgewertet und die Glukosekonzentration in mg/dl auf dem Display angezeigt.

#### **3.3.3. Retrobulbäre Blutentnahme bei Versuchstieren**

Die Tiere wurden vor der Blutentnahme 4h entfüttert. Nachdem mit Isofluran narkotisiert wurde konnten mit Hilfe einer Glaskapillare am rechten Auge der Maus ca. 300 µl Blut entnommen werden. Dazu wurde die Kapillare parallel entlang der Schnauze an den vorderen Augenwinkel geführt und dann mit leichtem Druck in einer Drehbewegung zwischen Auge und Augenhöhle durch die Bindehaut Richtung gegenüberliegendem Kiefergelenk gedrückt und so der Venenplexus punktiert. Über die Kapillare wurden die Blutstropfen in Lithium-Heparin – Röhrchen auf Eis gesammelt. Nach der Entnahme wurden mit leichtem Druck die Lider des Tieres zusammengedrückt um mögliche Nachblutungen zu unterbinden. Die Proben wurden für 5 – 10min bei 4°C und 3.000 UpM zentrifugiert und das Plasma in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C eingefroren.

### **3.3.4. Stoffwechselfäfig – Untersuchung von Versuchstieren**

Mäuse wurden zu Versuchsbeginn und in der letzten Woche vor Versuchsende einzeln in Stoffwechselfäfigen ohne Futter bei Wasser ad libitum gehalten. Bei einer Dauer von 15 Stunden wurden Urin und Kot der Mäuse gesammelt und das Volumen gemessen. Die Tiere wurden vor und nach der Untersuchung gewogen. Des Weiteren wurde die Menge an getrunkenem Wasser ermittelt.

### **3.3.5. Analyse von Blut- und Urinproben**

Blut- und Urinproben wurden in der Abteilung von Prof. N. Gretz in Mannheim an einem Hitachi 917 Autoanalyzer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) von Frau Seelinger analysiert und folgende Parameter bestimmt: Plasmawerte von Glukose, Harnstoff, Natrium, Kalium, Gesamtcholesterin, Triglyzeride, Alanintransaminase, Aspartattransaminase, Alkaline Phosphatase sowie Urinparameter von Albumin, Glucose, Harnstoff, Natrium und Kalium. Kreatinin wurde mittels einer enzymatischer Bestimmungsmethode (Crea Plus Kit, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) ermittelt.

### **3.3.6. Berechnung von Nierenfunktionsparametern**

Die Kreatinin – Clearance ( $C_{Cr}$ ) wird mit der Formel

$$C_{Cr} = (U_{Cr} \cdot V_U) / (S_{Cr} \cdot \text{Zeit} \cdot \text{Gewicht})$$

berechnet und lässt sich auch bei Mäusen anwenden. Dabei sind  $U_{Cr}$  und  $S_{Cr}$  die Kreatinin – konzentrationen aus Urin und Blutplasma in mg/dl und  $V_U$  das Harnvolumen in Milliliter. Das Körpergewicht wird in Gramm angegeben, die Zeit in Minuten und bezeichnet die Spanne über die der Urin gesammelt wurde. Da Kreatinin tubulär nicht rückresorbiert wird und nur bei Männern sezerniert wird, kann man von der Näherung ausgehen dass jedes Molekül Kreatinin letztlich im Harn erscheint. Damit ist es eine zuverlässige Indikatorsubstanz für die Filtrationsleistung der Niere [14].

Die fraktionale Exkretion gibt den Anteil der Ausscheidung von Elektrolyten im Verhältnis zur Kreatinin – Clearance über den Harn an und wird mit der Formel

$$FE = [(U_E / S_E) \cdot (S_{Cr} / U_{Cr})] \cdot 100\%$$

angegeben.  $U_E$  und  $S_E$  sind die Konzentrationen der Elektrolyte (z.B. Natrium, Kalium oder Phosphat) in mMol/ml im Urin und im Blutplasma und  $S_{Cr}$  sowie  $U_{Cr}$  die Kreatinin – Konzentrationen in mg/dl im Blutplasma und im Urin.

### **3.3.7. Durchführung und Aufbau des Tierversuchs A (Versuchsnummer 74/06) mit LDLR-/- Mäusen**

Die Durchführung dieses Versuches wurde von Frau Dr. Eva Kiss geleitet und im Tierstall des Universitätsklinikums Mannheim unter der Leitung von Frau Dr. Kränzlin und Mitarbeitern durchgeführt. Ich habe mich selbst an diesem Versuch durch Probenentnahmen von Blut und Urin sowie durch Auswertung von Versuchsdaten und Gewebeschnitten beteiligt.

Im Alter von 9 Wochen wurden männliche LDLR-/- Mäuse in den Versuch genommen und auf 8 Versuchsgruppen verteilt.

In Lebenswoche (LW) 9 und LW11 bekamen die Tiere STZ – Injektionen von 40 mg/kg Körpergewicht an 5 konsekutiven Tagen oder Citratpuffer i.p. (3.3.1.). Zur Erhebung von Ausgangsparameter über die Physiologie der Tiere wurde in LW12 unter Isofluran – Narkose retrobulbär Blut entnommen und am Folgetag über 15h in metabolischen Käfigen Urin gesammelt. Daraufhin wurden die Tiere von Normaldiät auf die ihrer Versuchsgruppe entsprechende Versuchsdiät umgestellt (Tab. 2). Bei Tieren mit Hyperglykämie wurde im Laufe des gesamten Versuches 1 Mal wöchentlich der Blutzucker mittels ACCU – Check ermittelt (3.3.2.). Jeweils in LW17, LW22 und bei Versuchsende in LW27 wurden die retrobulbäre Blutentnahme (3.3.3.) und eine Untersuchung im metabolischen Käfig durchgeführt (3.3.4.). Wenige Tage nach der letzten Untersuchung im Stoffwechsellkäfig wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und über den rechten Ventrikel mit PBS perfundiert. Beide Nieren wurden, nach Entfernen der Nierenkapsel, mit einer Rasierklinge in koronare, ca. 2 mm dicke Scheiben geschnitten und für histologische und immunhistologische Analysen jeweils in 4% Formaldehyd und Zinklösung, sowie für elektronenmikroskopische Aufnahmen in Karnovsky – Lösung fixiert. Des Weiteren wurde für die Isolierung von RNA je eine Scheibe in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Blut- und Urinproben wurden in der Abteilung von Prof. Gretz in Mannheim an einem Hitachi Autoanalyzer analysiert (3.3.5.).

## Methoden

Gruppe	Behandlung	Anzahl der Tiere	Dauer Experimentaldiät
1 a	Chow	6	15 Wochen
1 b	Western Diät (WD)	6	15 Wochen
1 c	Chow + STZ	8	15 Wochen
1 d	Western Diät + STZ	6	15 Wochen
2 a	Chow + GW3965	4	15 Wochen
2 b	Western Diät + GW3965	6	15 Wochen
2 c	Chow + GW3965 + STZ	5	15 Wochen
2 d	WD + GW3965 + STZ	6	15 Wochen

**Tab. 2** Versuchsaufbau und Gruppenübersicht des Tierversuches 74/06 mit LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen

### **3.3.8. Durchführung und Aufbau des Tierversuchs B (Versuchsnummer 104/10) mit eNOS<sup>-/-</sup> Mäusen**

Die Durchführung des Versuches wurde von mir geleitet und zum Großteil auch selbst durchgeführt. Der Tierversuch hat im Tierstall des Universitätsklinikums Mannheim unter Leitung von Frau Dr. Kränzlin und Mitarbeitern stattgefunden.

Im Alter von 3 Wochen wurden die Tiere genotypisiert und mit 4 Wochen wurden männliche eNOS<sup>-/-</sup> Mäuse in den Versuch genommen und auf 8 Versuchsgruppen verteilt.

In Lebenswoche (LW) 4 wurde allen Tieren durch unilaterale Nephrektomie die linke Niere entfernt. Die Operation wurde von Viktoria Skude und Elisabeth Wühl im Tierstall Mannheim durchgeführt. In LW7 und LW9 bekamen die Tiere STZ – Injektionen von 40 mg/kg Körpergewicht, oder Citratpuffer zur Kontrolle, an 5 konsekutiven Tagen i.p. (3.3.1.). Bei hyperglykämischen Tiere wurde einmal pro Woche über den gesamten Versuchszeitraum der Blutzuckerspiegel mittels AKKU – Check überprüft (3.3.2.). Um die Ausgangsparameter für die Physiologie der Tiere zu erfassen wurde in LW11 retrobulbär Blut entnommen (3.3.3.) und am Folgetag über 15h ohne Futter in metabolischen Käfigen Urin gesammelt (3.3.4.). Direkt im Anschluss wurde das Futter von Normaldiät, entsprechend der Versuchsgruppe, auf eine von 4 Experimentaldiäten umgestellt (Tab. 3). Jeweils in LW16, LW20 und bei Versuchsende in LW24 wurde retrobulbär Blut entnommen und eine Untersuchung im Stoffwechsellkäfig durchgeführt. Wenige Tage nach der letzten Untersuchung wurden die Tiere durch Genickbruch getötet und die verbliebene rechte Niere entnommen, die Nierenkapsel entfernt und mit einer Rasierklinge

## Methoden

ca. 2 mm dicke, koronare Scheiben geschnitten. Für histologische und immunohistologische Analysen wurde je eine Scheibe in 4% Formaldehyd und Zinklösung, sowie für elektronenmikroskopische Aufnahmen in Karnovsky – Lösung, fixiert. Des weiteren wurden für die Isolation von RNA die Nierenpole in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Eine Übersicht der Versuchsgruppen ist in Tabelle 3 zusammengefasst.

Gruppe	Behandlung	Anzahl der Tiere	Dauer Experimentaldiät
1 a	Chow	4	12 Wochen
1 b	Western Diät (WD)	8	12 Wochen
1 c	Chow + STZ	6	12 Wochen
1 d	Western Diät + STZ	7	12 Wochen
2 a	Chow + GW3965	6	12 Wochen
2 b	Western Diät + GW3965	8	12 Wochen
2 c	Chow + GW3965 + STZ	7	12 Wochen
2 d	WD + GW3965 + STZ	8	12 Wochen

**Tab. 3** Versuchsaufbau und Gruppenübersicht des Tierversuches 104/10 mit eNOS<sup>-/-</sup> Mäusen.

### 3.4. Statistische Analysen

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardfehler des arithmetischen Mittels (SEM) angegeben. Zwei Gruppen wurden mit dem nichtparametrischen Wilcoxon – Mann – Whitney Test verglichen. Bei einem  $p$  – Wert  $<0,05$  wurde das Ergebnis als statistisch signifikant erachtet.

## 4. Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Leber-X-Rezeptor – Aktivierung (LXR) durch den synthetischen Agonisten GW3965 auf die Entwicklung der in diabetischen Patienten auftretenden diabetischen Nephropathie in zwei verschiedenen Tiermodellen untersucht. Hierzu wurden charakteristische metabolische Störungen in LDLR-/- Mäusen (4.1.) bzw. in eNOS-/- Mäusen (4.2.) induziert. Hyperglykämie wurde durch Injektion von Streptozotocin verursacht, welches die  $\beta$  – Zellen des Pankreas zerstört und damit ein Model für Diabetes mellitus Typ I darstellt. Durch Fütterung mit einer fett- und cholesterinreichen Diät konnte in den Tieren ein hyperlipidämischer Zustand erreicht werden, welcher im ersten Modell durch die Defizienz von LDLR noch verstärkt wurde. Nach Beenden des Versuches wurde den Tieren Blut und Urin entnommen, um funktionelle Parameter zu ermitteln. Des Weiteren wurde an Nierengewebe die Morphologie und damit der Grad der Gewebeschädigung untersucht. Mit Hilfe der *in vitro* Experimente an humanen immortalisierten proximalen Tubuluszellen konnte ein Einblick in den Mechanismus der Zellschädigung gewonnen werden, der durch die Bildung von Lipidtröpfchen ausgelöst werden könnte. Diese treten in den Tubuluszellen bei Patienten mit diabetischer Nephropathie sowie bei den entsprechenden Tiermodellen auf.

### 4.1. Modell 1: Lipid – verstärkte Hyperglykämie in LDL – Rezeptor defizienten Mäusen

Gemäß des Versuchsaufbaus (3.3.7.) wurde der Effekt einer Aktivierung von LXR durch den Agonisten GW3965 anhand normalernährter LDLR-/- Kontrolltiere (Chow), hyperlipidämischer (WD), hyperglykämischer (STZ) und kombiniert hyperlipidämischer/hyperglykämischer (WD + STZ) LDLR-/-Mäuse untersucht werden. Nach 4 Monaten wurden die Tiere am Ende des Experimentes entnommen. Anhand von Blut-, Urin- und Gewebeproben konnten die Effekte der LXR-Stimulation auf die Entwicklung einer diabetischen Nephropathie untersucht werden.

#### 4.1.1. *LXR-Aktivierung durch GW3965 wirkt sich positiv auf den Allgemeinzustand von diabetischen und/oder hyperlipidämischen Versuchstieren aus*

Nach Beenden des Experimentes wurden die LDLR-/- Mäuse gewogen und nach zervikaler Dislokation die Nieren der Tiere entnommen und ebenfalls gewogen. Des Weiteren wurden von

den gewonnenen Blutproben biochemische Parameter wie u.a. Blutzucker, Cholesterin- und Triglyzeridwerte bestimmt.

Tabelle 4 zeigt eine Übersicht der Ergebnisse aus allen Versuchsgruppen. Durch die fettreiche Ernährung (*Western Diet*, WD) erreichten die Tiere aus Gruppe 1b bei konstanter Gewichtszunahme ein signifikant höheres Körpergewicht im Vergleich zu allen anderen Versuchsgruppen. Im Gegensatz dazu waren die Tiere aus Gruppe 1d durch die zusätzliche Hyperglykämie und damit verbundenen metabolischen Veränderungen viel stärker belastet und verloren zum Versuchsende hin deutlich an Gewicht, waren geschwächt und lethargisch. Bei allein hyperglykämischen Tieren war dieser Effekt weniger stark ausgeprägt. Die Aktivierung von LXR durch GW3965 verhinderte einen Gewichtsanstieg bei WD ernährten Tieren (Gruppe 2b) und verbesserte die allgemeine Konstitution der hyperglykämischen und hyperlipidämischen Mäuse, sie waren agiler und kräftiger. Bei normal ernährten Tieren hatte GW3965 wie erwartet keinen Effekt auf das Körpergewicht. Ebenso wurde der Blutzuckerspiegel sowohl von normoglykämischen, als auch von diabetischen Tieren durch GW3965 nicht signifikant beeinflusst.

Versuchsgruppe	Körpergewicht [g]	Niere/KG [%]	Glukose [mg/dl]	Cholesterin [mg/dl]	Triglyzeride [mg/dl]
<b>1. LDLR-/-</b>					
<b>1a</b> Chow (n=6)	30.8 ± 1.5	0.59 ± 0.01	196.7 ± 8.2	456.5 ± 52.2	192.7 ± 15.7
<b>1b</b> WD (n=6)	39.1 ± 1.9* vgl. 1a	0.62 ± 0.06	229.8 ± 17.3	1075.0 ± 128.8** vgl. 1a	277.3 ± 92.5
<b>1c</b> STZ (n=8)	27.1 ± 0.6* vgl. 1a, ** vgl. 1b	0.68 ± 0.02** vgl. 1a	410.7 ± 55.9** vgl. 1a, 1b	602.2 ± 59.9	205.0 ± 20.3
<b>1d</b> WD + STZ (n=6)	24.1 ± 0.9* vgl. 1a, 1b	0.83 ± 0.10** vgl. 1a	403.6 ± 55.6** vgl. 1a, 1b	1514.0 ± 182.7** vgl. 1a, 1c	377.0 ± 103.7* vgl. 1a
<b>2. LDLR-/- + GW3965</b>					
<b>2a</b> Chow (n=4)	31.4 ± 0.6	0.60 ± 0.01	234.8 ± 11.5	438.5 ± 21.7	468.3 ± 45.6** vgl. 1a
<b>2b</b> WD (n=6)	31.6 ± 1.3* vgl. 1b	0.57 ± 0.02	233.7 ± 15.9	971.2 ± 268.6* vgl. 2a	279.4 ± 75.8
<b>2c</b> STZ (n=5)	24.9 ± 1.2* vgl. 2a, ** vgl. 2b	0.69 ± 0.03	492.0 ± 71.7* vgl. 2a, 2b	445.5 ± 52.1	346.8 ± 90.4
<b>2d</b> WD + STZ (n=6)	25.5 ± 1.2** vgl. 2a, * vgl. 2b	0.59 ± 0.03	403.0 ± 64.9* vgl. 2a, 2b	1205.0 ± 275.0** vgl. 2a, 2c	361.7 ± 52.1

**Tabelle 4** Gruppenübersicht und Aufstellung biologischer und biochemischer Parameter von Versuchstieren.

MW ± SEM, p\* = 0,05; p\*\* = 0,01

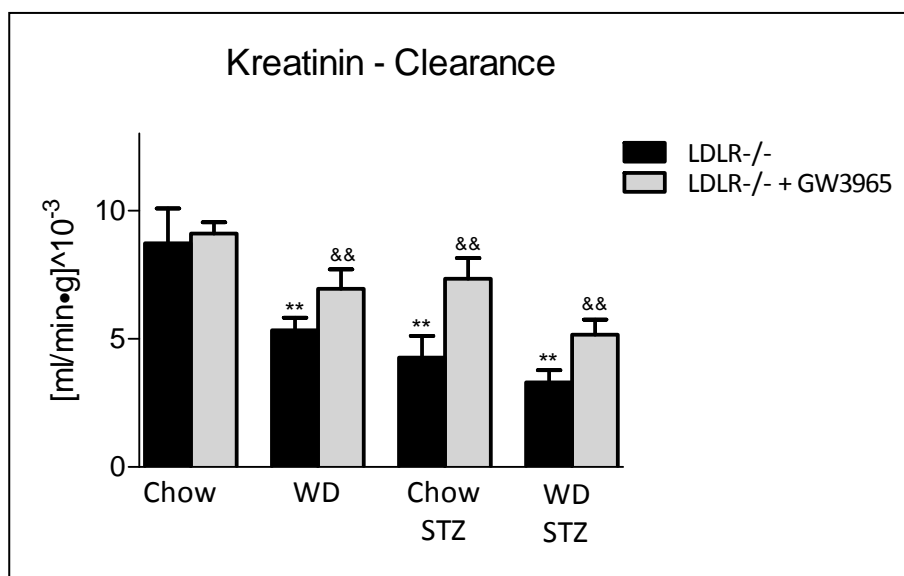
Durch die Defizienz des LDL – Rezeptors zeigten alle Tiere von Grund auf einen sehr viel höheren Cholesterinspiegel und höhere Plasma – Triglyzeridwerte im Vergleich zu C57/Bl6 Kontrolltieren. Dennoch kommt es bei der Ernährung mit WD zur signifikanten Erhöhung des Cholesterin- und



Triglyzeridspiegels, wobei dieser Effekt noch stärker ausgeprägt war, wenn die Mäuse zusätzlich hyperglykämisch waren. Die Aktivierung von LXR verhinderte zwar den Anstieg des Körpergewichtes dieser Tiere, beeinflusst aber nicht signifikant den Cholesterinspiegel oder die Triglyzeridwerte im Plasma bei fett- und cholesterinreicher Ernährung. Bei normal ernährten Tieren führt GW3965 zu einem Anstieg des Triglyzeridspiegels. Als indirekter Hinweis auf entzündliche Prozesse war das relative Gewicht der Niere im Verhältnis zum Körpergewicht bei diabetischen und diabetischen/hyperlipidämischen Tieren höher als von Versuchstieren mit Normaldiät (Gruppe 1c, 1d).

#### 4.1.2. Die Nierenfunktion kann durch LXR – Aktivierung bei fortschreitender Erkrankung erhalten werden

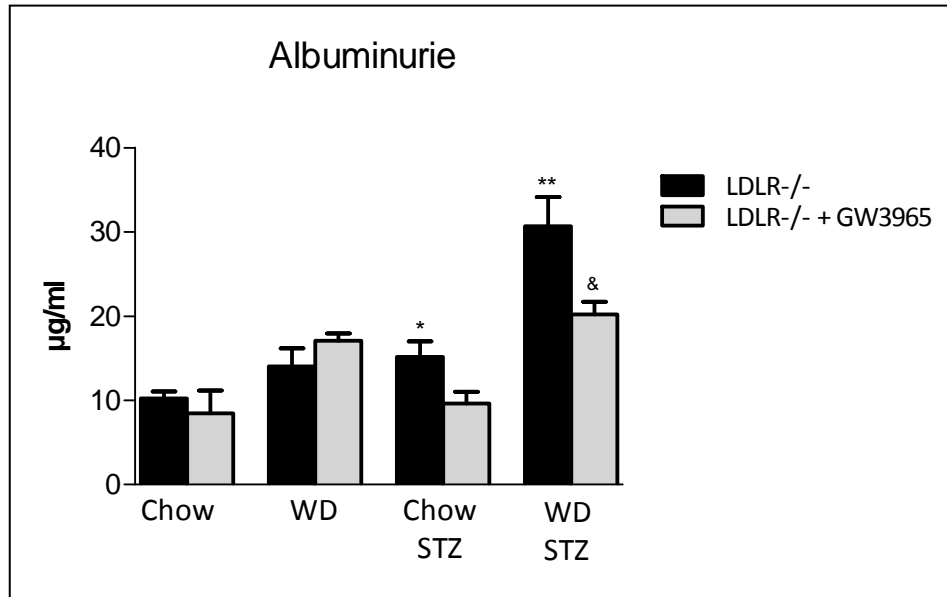
Durch die Analyse von Urinproben konnten zusammen mit Daten aus der Blutuntersuchung einige Aspekte der Nierenfunktion untersucht werden. Die Bestimmung der Kreatinin - Clearance ist dabei von zentraler Bedeutung (3.3.6.). Ein Absinken der Kreatinin – Clearance deutet auf eine eingeschränkte Filtrationsleistung der Niere hin und damit auf eine Verringerung der Nierenfunktion. Wie in Abb. 8 dargestellt, nahm die Kreatinin – Clearance mit zunehmender Belastung durch Hyperlipidämie und Hyperglykämie ab. Durch die Aktivierung von LXR über die Gabe von GW3965 konnte die Nierenfunktion bis auf ein leichtes Absinken erhalten werden. Im Vergleich zu den entsprechenden Versuchsgruppen ohne GW3965 – Therapie zeigen die behandelten Tiere eine signifikant höhere Kreatinin – Clearance.



**Abb. 8 Kreatinin – Clearance in LDLR-/- Mäusen als Maß für die Nierenfunktion.**

Die Versuchstiere wurden für 15h in metabolischen Käfigen gehalten und der Urin währenddessen gesammelt. Die Abbildung zeigt die Kreatinin-Clearance von normal ernährten Tieren (Chow), hyperlipidämischen (WD), hyperglykämischen (STZ) sowie hyperlipidämischen/hyperglykämischen (WD + STZ) Mäusen mit und ohne Zugabe von GW3965 über das Futter. Die Aktivierung von LXR mittels GW3965 verminderte ein Absinken der Kreatinin-Clearance bei hyperlipidämischen und/oder hyperglykämischen LDLR-/- Mäusen. MW ± SEM, n = 4-8; p\*\*= 0,01 im Vergleich zu LDLR-/- + Chow und p<sup>&&</sup>= 0,01 im Vergleich zwischen der Versuchsgruppe mit und ohne GW3965.

Ein weiterer Parameter zur Untersuchung der Nierenfunktion ist die erhöhte Konzentration von Albumin im Urin. Werden die Nieren in ihrer strukturellen Integrität geschädigt, können auch größere Moleküle die Blut – Harn – Schranke passieren, welche zuvor nicht hindurch gelangten. Sie wird als Albuminurie bezeichnet. Wie aus Abbildung 9 hervorgeht, verursachte eine fettreiche Ernährung oder Hyperglykämie eine leicht erhöhte Ausscheidung von Albumin im Vergleich zu normal ernährten LDLR-/- Mäusen. Hyperlipidämische und diabetische Tiere dagegen zeigen einen dreifachen Anstieg der Albuminkonzentration im Urin. Durch die Gabe von GW3965 war die Albuminurie bei diesen Mäusen in signifikantem Maße verringert. Somit konnte durch Aktivierung von LXR die Nierenfunktion im Vergleich zu Versuchsgruppen ohne GW3965 – Zusatz zu einem beachtlichen Anteil erhalten werden.

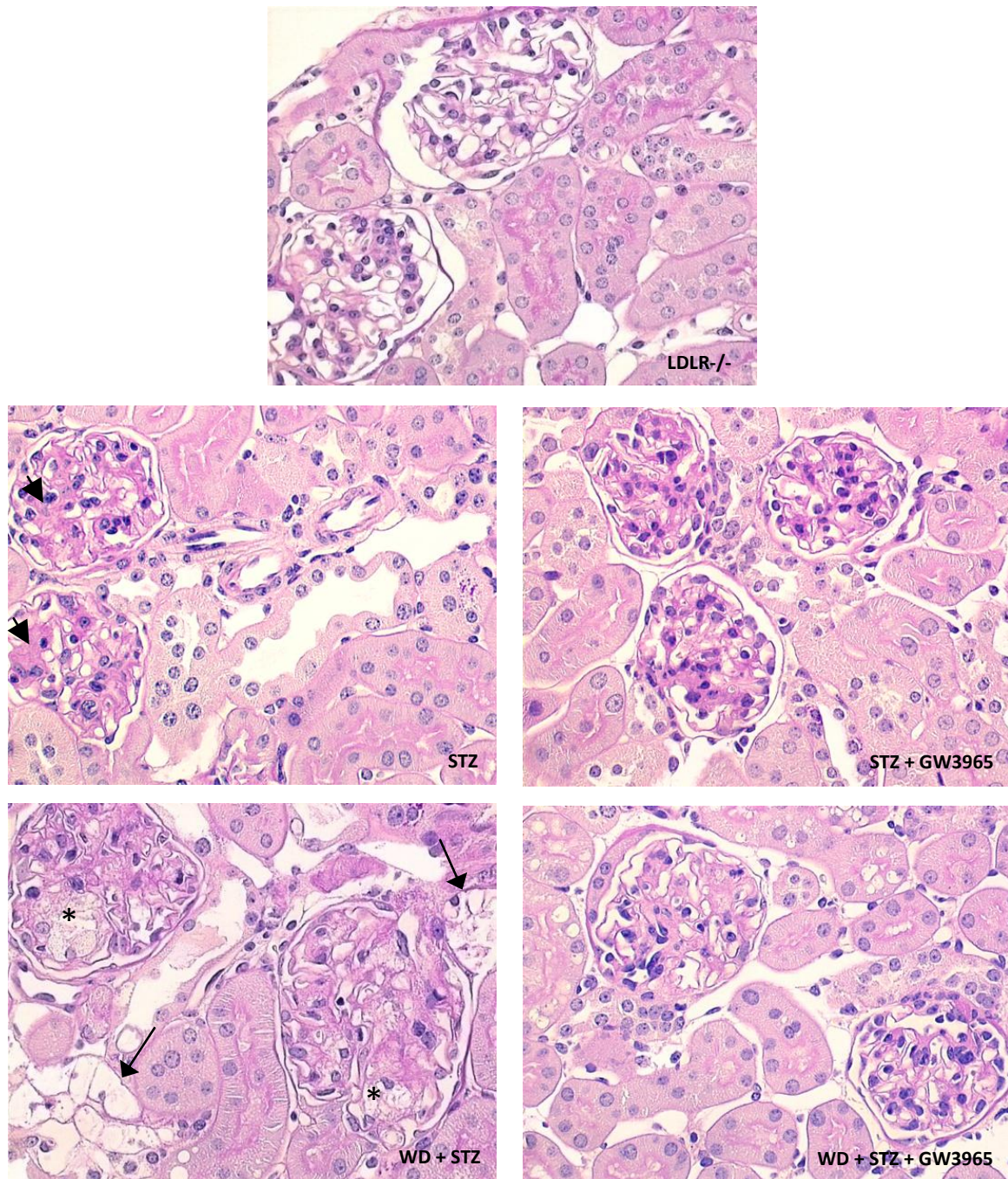


**Abb. 9 Albuminkonzentration im Urin von LDLR-/- Mäusen.**

Die Versuchstiere wurden für 15h in metabolischen Käfigen gehalten und der Urin währenddessen gesammelt. Die Abbildung zeigt die Albuminkonzentration im Urin von normal ernährten Tieren (Chow), hyperlipidämischen (WD), hyperglykämischen (STZ) sowie hyperlipidämischen/hyperglykämischen (WD + STZ) Mäusen mit und ohne Zugabe von GW3965 über das Futter. Durch LXR-Aktivierung mittels GW3965 konnte die Albuminurie in hyperlipidämischen und hyperglykämischen LDLR-/- Mäusen verhindert werden. MW ± SEM, n = 4-8; p\*= 0,05; p\*\*= 0,01 im Vergleich zu LDLR-/- + Chow und p<sup>&</sup>= 0,05 Vergleich zwischen der Versuchsgruppe mit und ohne GW3965.

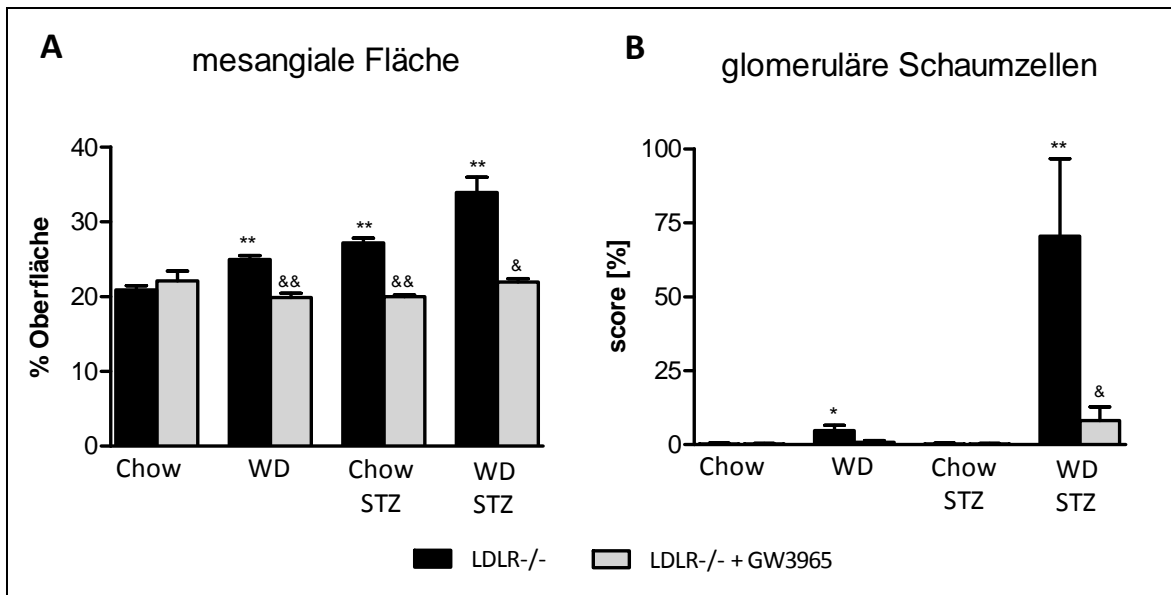
#### **4.1.3. Morphologische Veränderungen der Nieren werden durch LXR-Aktivierung bei hyperglykämischen und/oder hyperlipidämischen LDLR-/- Mäusen gemildert**

Um die Veränderungen, welche durch die verschiedenen Versuchsbedingungen hervorgerufen wurden, zu erfassen und auszuwerten, wurden Gewebeschnitte der entnommenen und fixierten Nieren angefertigt und gefärbt. Abbildung 10 zeigt eine Zusammenstellung repräsentativer Ausschnitte von PAS – gefärbten Nierenproben (3.2.16.). Im Vergleich zu normalernährten LDLR-/- Mäusen zeigten diabetische oder hyperlipidämische Tiere leichte morphologische Veränderungen. Bei allein hyperglykämischen LDLR-/- Mäusen kam es vermehrt in Glomeruli zu mesangialer Matrixvermehrung (Abb. 10 Pfeilspitzen), die bei LXR – Aktivierung in reduziertem Maße aufgetreten war. Bei Versuchstieren mit fettreicher Ernährung bildeten sich vereinzelt Schaumzellen in Glomeruli und Lipidablagerungen in den Tubuluszellen, welche ebenfalls bei Gabe von GW3965 in viel geringerem Maße beobachtet werden konnten. Ausgeprägte Veränderungen zeigten sich bei diabetischen und hyperlipidämischen LDLR-/- Tieren. Es bildeten sich in der Mehrzahl der anzutreffenden Glomeruli Schaumzellen (Abb. 10 Stern) und ebenso vermehrt wurden sie im Interstitium vorgefunden. Darüber hinaus kam es in den Tubuli zu, teils massiven, Lipidablagerungen und der Bildung von Lipidtröpfchen unter Degeneration der Tubuluszellen (Abb. 10 Pfeil). Durch die Aktivierung von LXR konnten diese ausgeprägten morphologischen Veränderungen deutlich verringert werden. Um die beobachteten pathologischen Auffälligkeiten genauer beurteilen zu können, wurde die mesangiale Matrixvermehrung und die Schaumzellbildung an PAS – gefärbten Gewebeschnitten quantifiziert. Die Ergebnisse wurden in Abb. 11 zusammengefasst. Glomeruläre Schaumzellen wurden hinsichtlich Häufigkeit und Ausmaß des Befalls von Glomeruli semiquantitativ evaluiert und als prozentualer Schadenswert angegeben (3.2.18.). Die mesangiale Matrixvermehrung wurde als Anteil der glomerulären Oberfläche im Gewebeschnitt morphometrisch ausgewertet. Wie bei Abb. 10 bereits dargestellt, führte die Stimulation von LXR zu einem Ausbleiben von vermehrter Matrixbildung im Mesangium und nur zu einem minimalem Anstieg der Schaumzellbildung bei hyperglykämischen und hyperlipidämischen Versuchstieren im Vergleich zu nicht GW3965 – behandelten LDLR-/- Mäusen.



**Abb. 10 Zusammenstellung repräsentativer Ausschnitte von PAS-gefärbten Gewebeschnitten.**

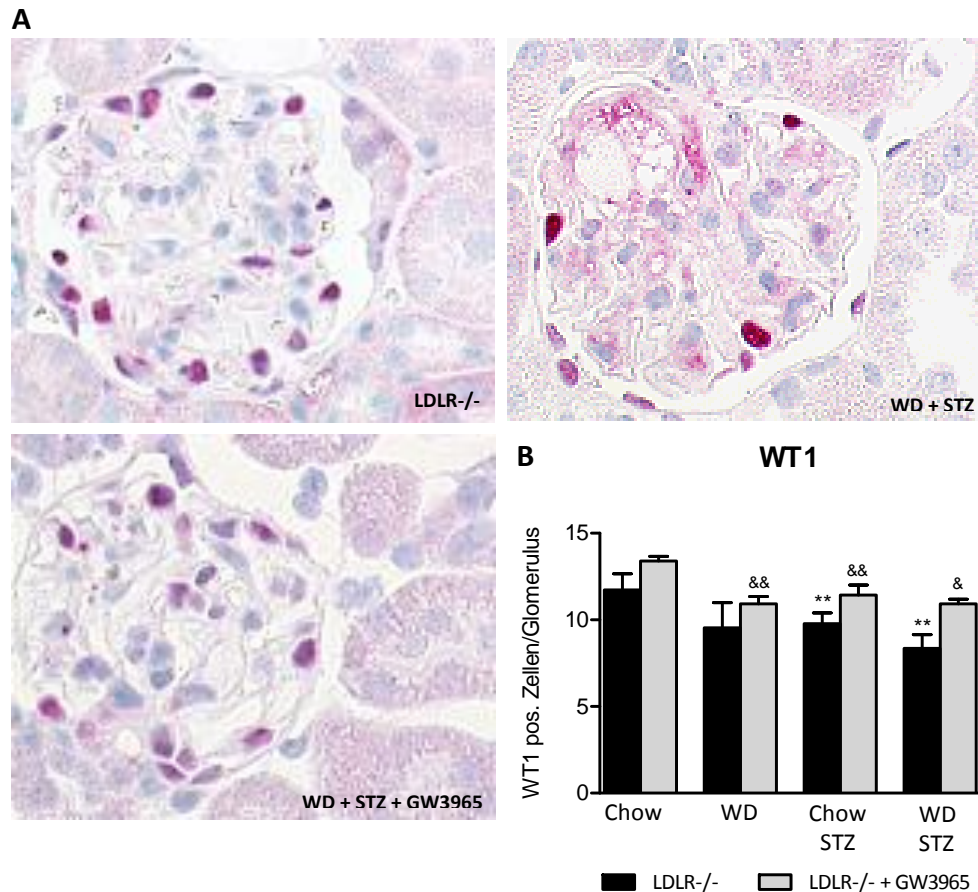
Formalin-fixierte Gewebeproben der Nieren von LDLR<sup>-/-</sup>-Tieren wurden in Paraffin eingebettet, 3 µm dick geschnitten, entparaffiniert und PAS-gefärbt. Die morphologische Evaluation wurde am Mikroskop bei 200-facher Vergrößerung durchgeführt. Normalernährte Versuchstiere zeigten eine unauffällige Nierenmorphologie (LDLR<sup>-/-</sup>), bei diabetischen Mäusen (STZ) trat eine mesangiale Matrixvermehrung (Pfeilspitze) auf und bei kombiniert diabetischen und hyperlipidämischen LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen (WD + STZ) zusätzlich Schaumzellen in Glomeruli (Stern) und Lipiddegeneration in Tubuli (Pfeil). Bei Gabe von GW3965 (STZ + GW3965 und WD + STZ + GW3965) hatten sich diese pathologischen Veränderungen nur sehr moderat entwickelt.



**Abb. 11 Quantifizierung der mesangialen Matrixvermehrung und Schaumzellbildung.**

PAS-gefärbte, 3 µm dicke Nierengewebschnitte von LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen wurden auf glomeruläre Veränderungen hin untersucht (3.2.18.). (A) Morphometrische Evaluation der mesangialen Matrixvermehrung im Verhältnis zur glomerulären Oberfläche mit der Point-Counting-Methode. Die Verabreichung von GW3965 verminderte in hyperlipidämischen (WD), diabetischen (STZ) und hyperlipidämischen/hyperglykämischen (WD + STZ) Mäusen die Bildung extrazellulärer Matrix im Mesangium im Vergleich zu Kontrolltieren (Chow). (B) Semiquantitative Auswertung der Schaumzellbildung in Glomeruli. Die LXR-Aktivierung durch GW3965 unterbindet die massive Bildung von Schaumzellen in hyperlipidämischen und hyperglykämischen Mäusen (WD + STZ). MW ± SEM, n = 4-8; p\* = 0,05; p\*\* = 0,01 im Vergleich zu LDLR<sup>-/-</sup> + Chow und p<sup>&</sup> = 0,05; p<sup>&&</sup> = 0,01 im Vergleich zwischen der Versuchsgruppe mit und ohne GW3965.

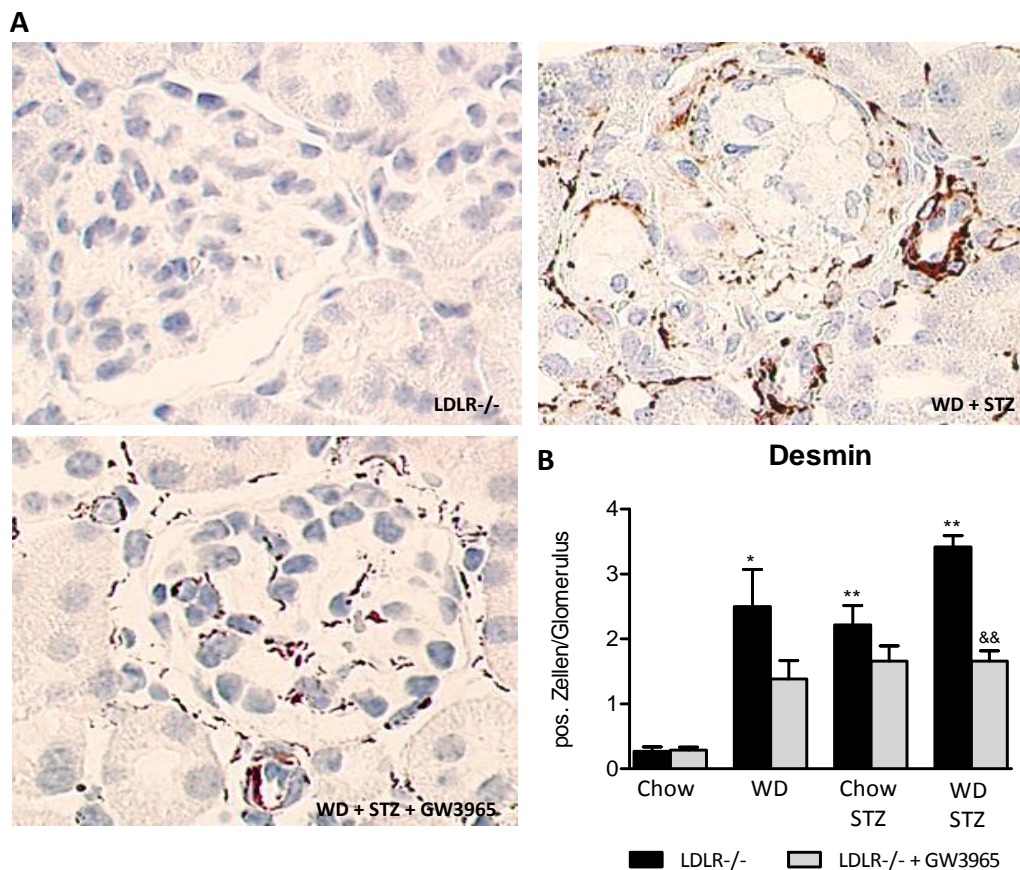
Patienten mit diabetischer Nephropathie zeigen in Glomeruli einen Verlust von Podozyten sowie geschädigte Podozyten [100]. Um die Nierenmorphologie der Versuchstiere dahingehend genauer zu untersuchen, wurden zunächst immunohistochemische Färbungen für WT-1 (Wilms Tumor 1) zur Darstellung der Podozyten und von Desmin, einem Typ III Intermediärfilament, welches unter pathophysiologischen Bedingungen in der Niere von Podozyten exprimiert wird, untersucht. Bei normalernährten LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen konnten zwischen 11 und 12 Podozyten pro Glomerulusschnittfläche gezählt werden (Abb. 12 A und D). Im Vergleich dazu kam es bei hyperlipidämischen oder hyperglykämischen Tieren zu einem Verlust von Podozyten, welcher sich bei kombiniertem Stress noch verstärkte (Abb. 12 B und D). Die Aktivierung von LXR durch den Agonisten hatte einen protektiven Effekt auf die Podozyten und so fanden sich deutlich mehr positive Zellen pro Glomerulus in GW3965 – behandelten LDLR<sup>-/-</sup> Tieren als bei Mäusen aus der entsprechenden Versuchsgruppe ohne Agonist (Abb. 12 D).



**Abb. 12 Die Stimulation von LXR hat einen protektiven Effekt auf Podozyten.**

Gewebeschnitte aus Paraffin-fixierten Nierenproben wurden mit podozytenspezifischem WT1-Antikörper durch alkaline Phosphatase-Detektion purpur gefärbt und 50 zufällig gewählte Glomeruli pro Schnitt ausgezählt (3.2.18.). Durch einen positiven Effekt sank die Anzahl von Podozyten durch LXR-Stimulation mittels GW3965, im Vergleich zur entsprechenden unbehandelten Versuchsgruppe, nur leicht ab. (A) Repräsentative Darstellung von gefärbten Glomeruli von LDLR<sup>-/-</sup> Kontrolltieren (LDLR<sup>-/-</sup>), hyperlipidämischen und hyperglykämischen Mäusen (WD + STZ) sowie von entsprechend GW3965 – behandelten Tieren (WD+ STZ + GW3965). (B) Quantifizierung von WT1 – positiven Zellen pro Glomerulus. MW ± SEM, n = 4-8; p<sup>\*\*</sup> = 0,01 im Vergleich zu LDLR<sup>-/-</sup> + Chow und p<sup>&</sup> = 0,05; p<sup>&&</sup> = 0,01 im Vergleich zwischen der Versuchsgruppe mit und ohne GW3965.

Diese Tendenz zeichnete sich auch bei der Auswertung der Desminfärbung ab (Abb. 13). In normalernährten Tieren konnte keine Desminexpression von Podozyten nachgewiesen werden. Bei fettreicher Diät oder Hyperglykämie stieg die Zahl von Desmin – exprimierenden Podozyten an. Durch Gabe von GW3965 konnte der Anstieg der Desminexpression abgemildert werden. Im Vergleich zu hyperglykämischen und hyperlipidämischen LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen nahm die Anzahl von Desmin – exprimierenden Podozyten in GW3965 behandelten Tieren hoch signifikant ab.



**Abb. 13 Die Aktivierung von Mesangiumszellen konnte durch Gabe von GW3965 verringert werden.**

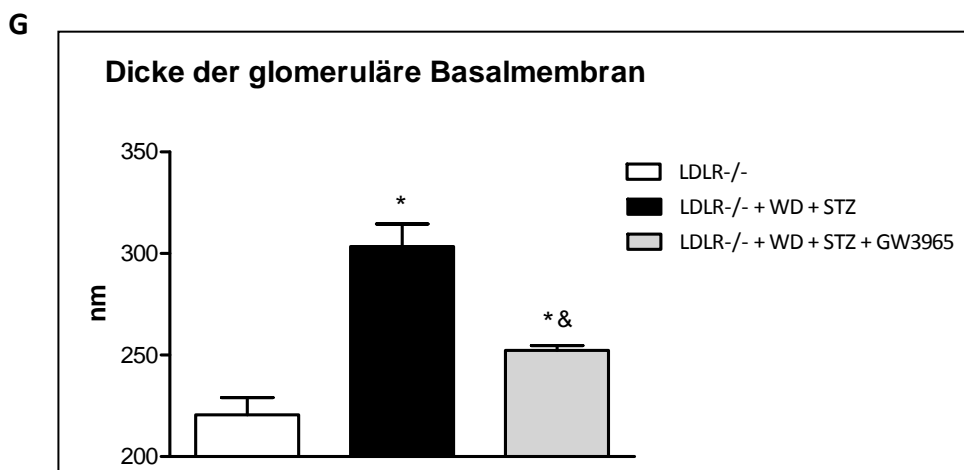
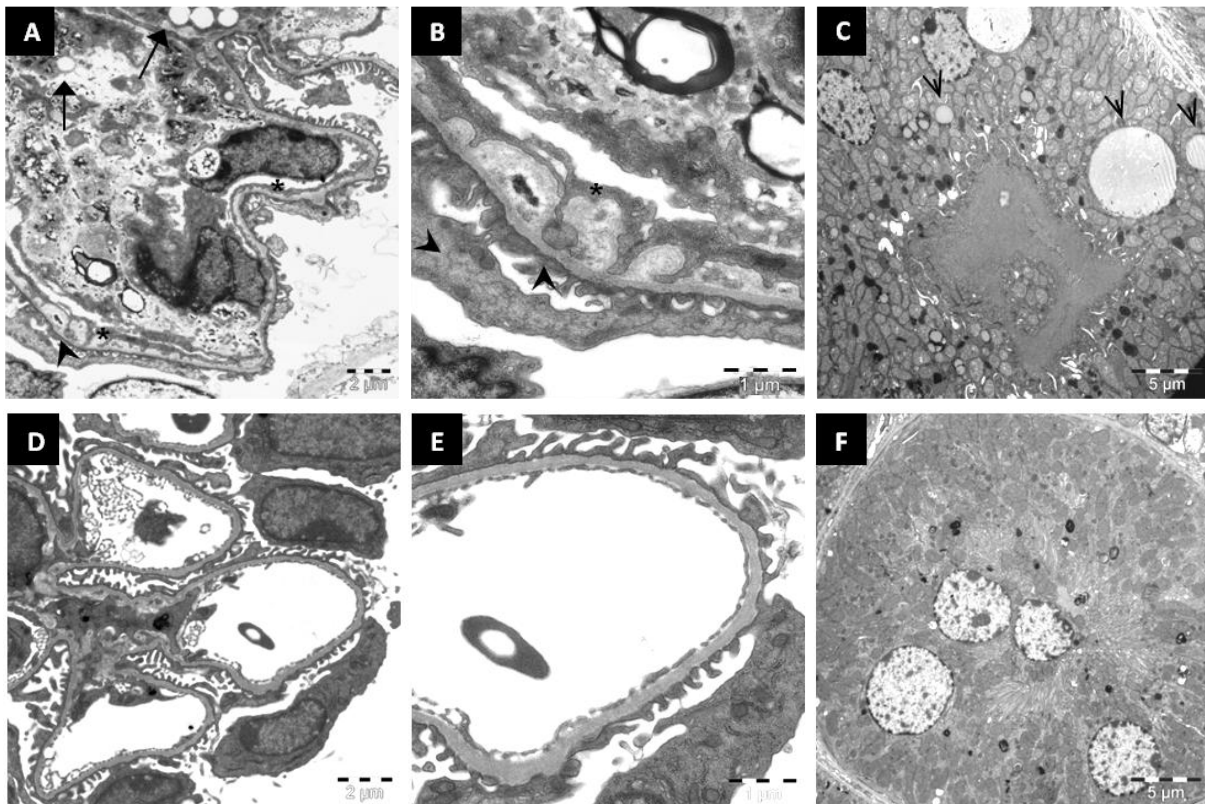
Gewebeschnitte aus Paraffin-fixierten Nierenproben wurden mit Desmin-spezifischem Antikörper durch alkaline Phosphatase-Detektion braun gefärbt und Desmin-positive Podozyten in 50 zufällig gewählten Glomeruli pro Schnitt ausgezählt (3.2.18.). Durch den protektiven Effekt auf die glomeruläre Struktur sank die Anzahl Desmin-exprimierender Podozyten durch LXR-Stimulation mittels GW3965, im Vergleich zur entsprechenden unbehandelten Versuchsgruppe, hoch signifikant ab. (A) Repräsentative Darstellung von gefärbten Glomeruli von LDLR<sup>-/-</sup> Kontrolltieren (LDLR<sup>-/-</sup>), hyperlipidämischen und hyperglykämischen Mäusen (WD + STZ) sowie von entsprechend GW3965-behandelten Tieren (WD + STZ + GW3965). (B) Quantifizierung von Desmin-positiven Podozyten pro Glomerulus. MW ± SEM, n = 4-8; p\* = 0,05; p\*\* = 0,01 im Vergleich zu LDLR<sup>-/-</sup> + Chow und p<sup>&&</sup> = 0,01 im Vergleich zwischen der Versuchsgruppe mit und ohne GW3965.

#### **4.1.4. Auch ultrastrukturell kann ein positiver Effekt auf die Integrität des Nierengewebes durch die Aktivierung von LXR nachgewiesen werden**

Bei diabetischer Nephropathie kommt es, je nach Stadium, bei Patienten zur Verdickung der glomerulären Basalmembran, zum Verlust der Fußfortsätze an Podozyten sowie zum Verlust der Fenestrae in Endothelzellen. Diese drei Strukturen bilden die Blut – Harn – Schranke und können nur anhand ultrastruktureller Aufnahmen untersucht werden. Um schließlich beurteilen zu

können, in welcher Weise die zellulären Veränderungen bei diabetischer Nephropathie in LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen die Filtrationsleistung des Glomerulus eingeschränkt hatten, wurden ultrastrukturelle Aufnahmen der Komponenten der Blut – Harn – Schranke analysiert. Darüber hinaus wurden auch proximale Tubuluszellen untersucht. Anhand der elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnten die glomeruläre Basalmembran, die Fußfortsätze von Podozyten und die Fenestrae der kapillären Endothelzellen dargestellt und z.T. morphologisch ausgewertet werden (3.2.17.). Wie in Abbildung 14 zusammengefasst, konnte in hyperlipidämischen und hyperglykämische LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen das Verschwinden von Fußfortsätzen an Podozyten (Abb. 11 dicke Pfeilspitze), eine irreguläre Verdickung der glomerulären Basalmembran und der Verlust von Fenestrae in der Zellmembran von Endothelzellen (Abb. 14 Stern) beobachtet werden. Abbildung 14 (G) zeigt die morphometrische Quantifizierung der Dicke der glomerulären Basalmembran. Allen pathologischen Veränderungen ist gemeinsam, dass sie bei LDLR<sup>-/-</sup> Tieren mit LXR – Stimulation durch GW3965 nur in geringem Maße auftreten und die Glomeruli dieser Mäuse ein ultrastrukturell unauffälligeres Erscheinungsbild haben. Auch die Ablagerung von Lipidtröpfchen in Mesangiumszellen (Abb. 14 Pfeil) und in Epithelzellen des proximalen Tubulus (Abb. 14 dünne Pfeilspitze) wurde durch GW3965 deutlich verringert. Diese Ergebnisse bestätigten erneut die protektive Wirkung von LXR auf das Nierengewebe und die erhöhte Nierenfunktion in hyperlipidämischen und hyperglykämischen LDLR<sup>-/-</sup> Mäuse bei GW3965 – Behandlung im Vergleich zu Mäusen mit zunehmender diabetischen Nephropathie ohne Therapie.



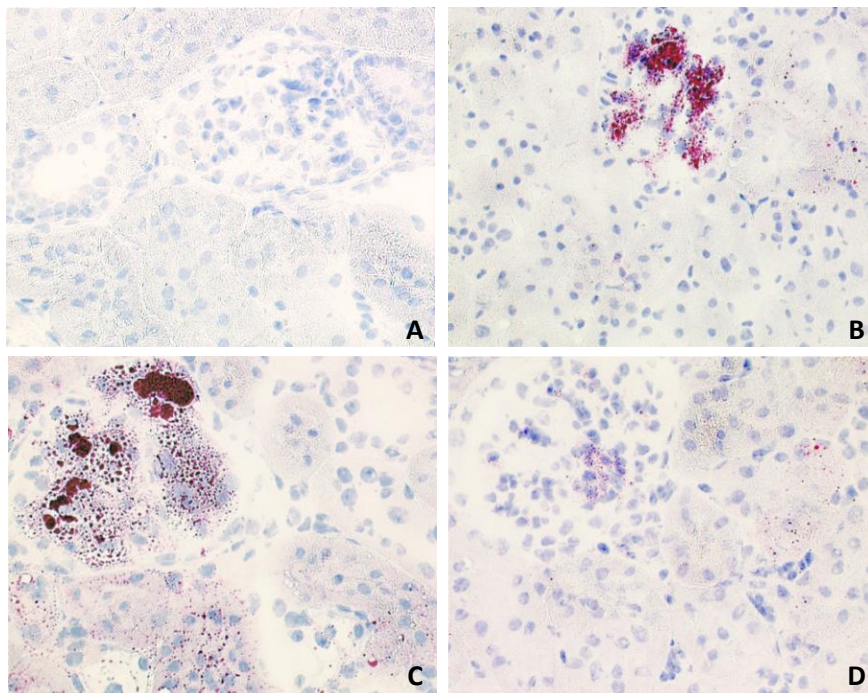


**Abb. 14 Elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigen eine Verringerung von Schäden an der Blut-Harn-Schranke sowie verminderte Lipiddegeneration in glomerulären und tubulären Epithelzellen.**

Der Ausschnitt einer glomerulären Kapillarschleife zeigt bei (A B C) hyperlipidämischen und hyperglykämischen LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen eine Verdickung der glomerulären Basalmembran, den Verlust von Fußfortsätzen an Podozyten (dicke Pfeilspitze) sowie von Fenestrae bei Endothelzellen (Stern) und die Ablagerung von Lipidtröpfchen in Mesangiumszellen (Pfeil) und Epithelzellen (dünne Pfeilspitze) des proximalen Tubulus (C). (D E F) Nahezu normale Ultrastruktur bei hyperlipidämischen/ hyperglykämischen LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen bei LXR-Aktivierung durch GW3965 in glomerulären Kapillaren (D E) und Tubulusepithelzellen (F). (G) Quantifizierung der Vermessung der glomerulären Basalmembran (3.2.17.). MW ± SEM; p\* = 0,05 im Vergleich zu LDLR<sup>-/-</sup> + Chow und p<sup>&</sup> = 0,05 im Vergleich zwischen der Versuchsgruppe mit und ohne GW3965.

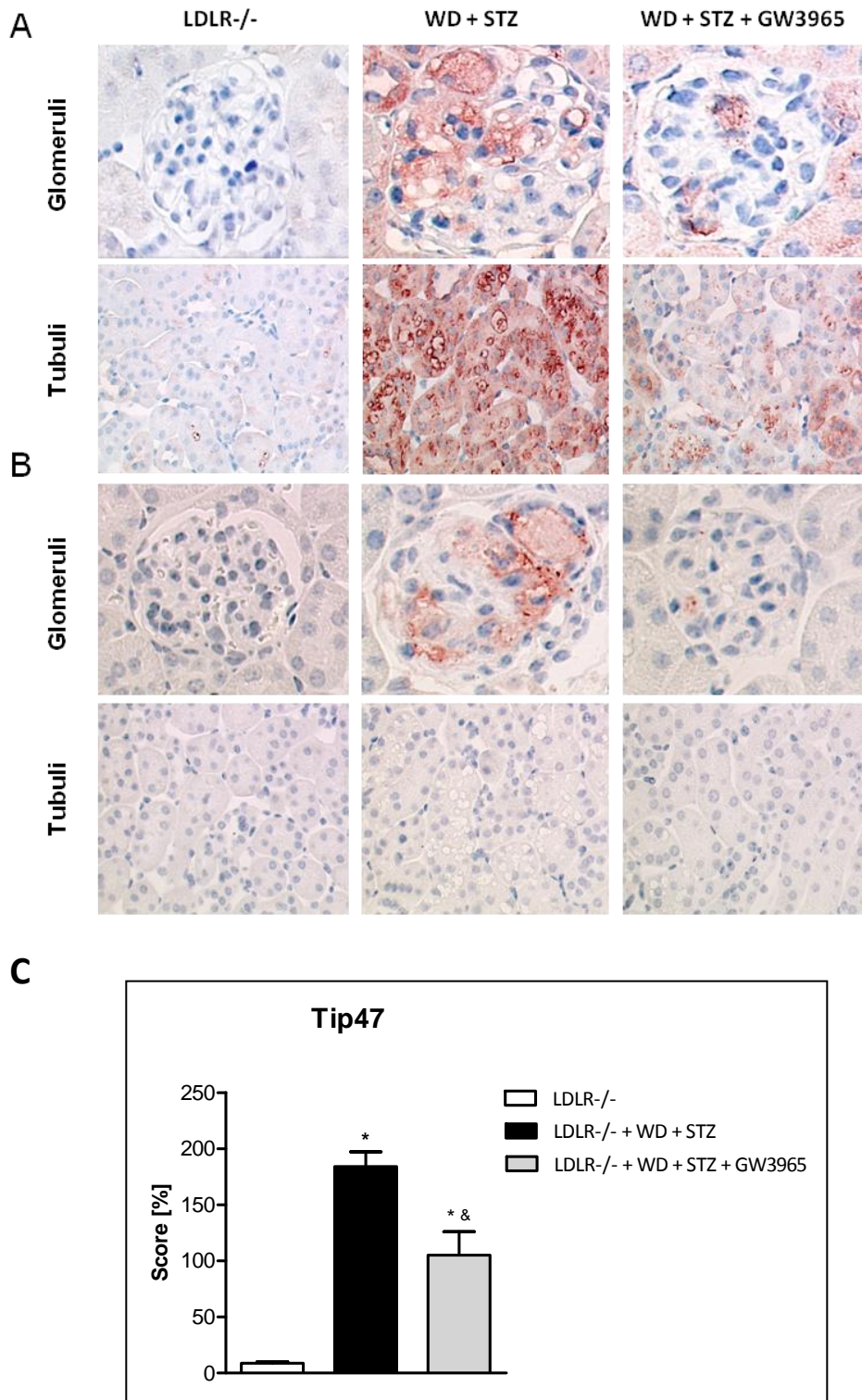
**4.1.5. LXR-Aktivierung durch GW3965 vermindert Lipidablagerungen und moduliert Gene des Fettstoffwechsels im Nierengewebe von hyperlipidämischen und hyperglykämischen Mäusen**

Im Nierengewebe allein hyperlipidämischer und zusätzlich hyperglykämischer LDLR<sup>-/-</sup> Mäuse konnten, wie bereits unter 4.1.1. gezeigt, Lipidablagerungen in Glomeruli und vor allem in Tubulusepithelzellen beobachtet werden. Für eine bessere quantitative Einschätzung der Lipidablagerungen wurde die Lipid – spezifische Fettrot – Färbung durchgeführt, mit welcher sich neutrale Fette/Lipidtröpfchen im Gewebe rot anfärben lassen. Um einen Einblick in die Interventionsebene von LXR in den Fettstoffwechsel zu erlangen, wurde auch die mRNA – Expression von Schlüsselgenen des Lipidmetabolismus untersucht. Die Aktivierung von LXR durch GW3965 führte in hyperlipidämischen und diabetischen Versuchstieren zu einer erheblichen Minderung der Bildung von Lipidablagerungen in allen Kompartimenten der Niere (Abb. 15).



**Abb. 15 Fettrotfärbung neutraler Lipide in hyperlipidämischen und zusätzlich hyperglykämischen LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen.**

Gefrierschnitte von -80°C gelagerten Nierenproben wurden fixiert und mit Fettrot angefärbt. In normalernährten LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen konnten keine Lipidablagerungen nachgewiesen werden (A). In hyperlipidämischen (B) und diabetischen (C) Mäusen wurden größere Lipidablagerungen in Glomeruli und Lipidtröpfchen in Tubulusepithelzellen beobachtet, welche bei LXR-Aktivierung mit GW3965 deutlich verringert wurden (D). Vergrößerung 40x Objektiv.

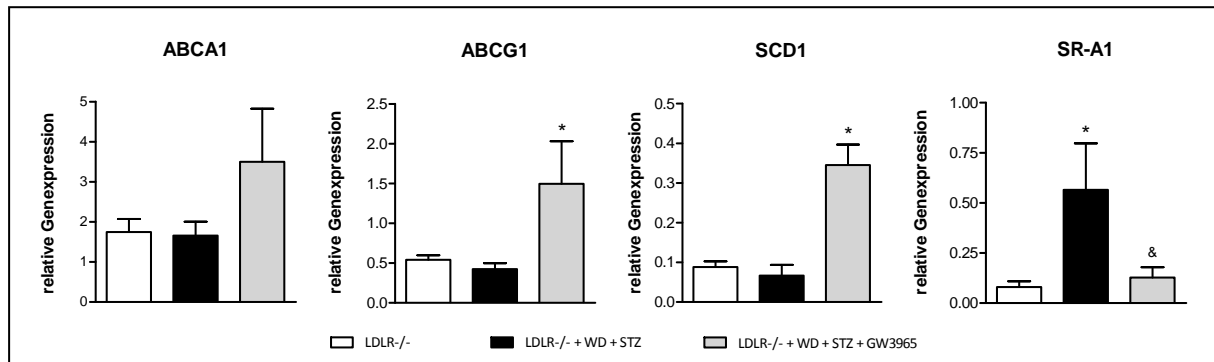


**Abb. 16 Immunohistochemische Charakterisierung von Lipidtröpfchen – assoziierten Proteinen.**

Immunohistochemie mit spezifischen Antikörpern für die Lipidtröpfchen – assoziierten Proteine Tip47 (tail-interacting protein of 47kDa) und Perilipin an Formalin – fixierten Gewebeschnitten mittels. Die Expression von Tip47 (A) in Mesangiumszellen und Tubulusepithelzellen und von Perilipin (B) in Schaumzellen der Glomeruli ist in hyperlipidämischen und hyperglykämischen LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu entsprechend GW3965-behandelten Tieren viel höher, wobei die Expression von Perilipin auf glomeruläre Schaumzellen beschränkt ist (B). (C) Quantifizierung der Expression von Tip47 (3.2.18.). MW ± SEM, n = 4-8; p\* = 0,05 im Vergleich zu LDLR<sup>-/-</sup> + Chow und p<sup>&</sup> = 0,05 im Vergleich zwischen der Versuchsgruppe mit und ohne GW3965.

Weitere Marker zur Darstellung von Lipidablagerungen sind die Lipidtröpfchen – assoziierten Proteine der PAT – Familie. Diese Proteine, z.B. Perilipin und Tip47, sitzen in der einlagigen Membran, welche die Lipidtröpfchen umgibt. Ihre Expression korreliert direkt mit Menge und Größe der Lipidtröpfchen in der Zelle. Die immunohistochemische Analyse von Lipidtröpfchen-assoziierten Proteinen bestätigte dieses Ergebnis (Abb. 16). Die hohe Positivität der Färbung in hyperlipidämischen und hyperglykämischen LDLR-/- Mäusen bei signifikant geringerer Intensität in GW3965 – behandelten Tieren korreliert direkt mit dem Ergebnis der Fettrotfärbung. Dabei konnte beobachtet werden, dass Perilipin nur in Lipidablagerungen in Schaumzellen in Glomeruli nachzuweisen war und nicht an Lipidtröpfchen in Tubulusepithelzellen. Eine Akkumulation von Lipiden im Zellinneren kann durch eine veränderte Lipidaufnahme oder Fettsäuresynthese entstehen sowie durch gestörtes Ausschleusen von Lipiden aus der Zelle heraus. Deshalb wurden Gene, welche diese Prozesse beeinflussen und bekannte Zielgene von LXR sind, anhand ihrer mRNA – Expression auf die Genaktivität hin untersucht. Hierzu wurde aus Gefrierproben des Nierengewebes RNA isoliert und die Genexpression mittels quantitativer Real – Time PCR analysiert. In Abbildung 17 wurden diese Ergebnisse zusammengefasst. Die Proteine ABCA1 und ABCG1 sitzen in der Zellmembran von Makrophagen und Epithelzellen und sind daran beteiligt Phospholipide und Cholesterin aus der Zelle auszuschleusen und auf HDL zu übertragen. Die mRNA beider Gene war im Gewebe von GW3965 – behandelten LDLR-/- Tieren hochreguliert. Eine gesteigerte Expression von ABCA1 und ABCG1 in der Zellmembran erhöht den Cholesterin – Efflux und konnte Lipidansammlungen verhindern, wie sie bei hyperlipidämischen und hyperglykämischen Versuchstieren zu sehen waren (Abb. 8 und 15). Die gesteigerte Expression von Scavenger Rezeptoren, hier Scavenger Rezeptor A1 (SR-A1), erhöht die Aufnahme von Lipiden und Cholesterin. Diese ununterbrochene Akkumulation von Lipiden führt bei Makrophagen zu einer Aktivierung und schließlich zur Umwandlung in Schaumzellen. Die hohe mRNA – Expression von SR-A1 in hyperlipidämischen und hyperglykämischen LDLR-/- Mäusen spiegelte die hohe Anzahl an glomerulären und interstitiellen Schaumzellen, sowie die Bildung von Lipidtröpfchen im Tubulusepithel des Nierengewebes dieser Tiere wieder. Durch die Aktivierung von LXR mittels GW3965 gab es keine Hochregulierung der Genexpression von SR-A1 und deutlich verminderte Schaumzellbildung. Das Gen für Stearoyl – CoA Desaturase 1 (SCD1) wurde durch Gabe von GW3965 hochreguliert und blieb in hyperlipidämischen und diabetischen LDLR-/- Mäusen unverändert. SCD1 synthetisiert einfach ungesättigte Fettsäuren, meist Ölsäure und Palmitoleinsäure, welche ein Hauptbestandteil von Phospholipiden, Cholesterinestern und Triglyzeriden sind [101]. Die transkriptionelle Hochregulierung von SCD1 könnte die Ursache

einer Hypertriglyzeridämie sein, welche häufig bei unspezifischen LXR – Agonisten vorkommt und hier bei normalernährten LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen beobachtet wurde (Tab. 4).



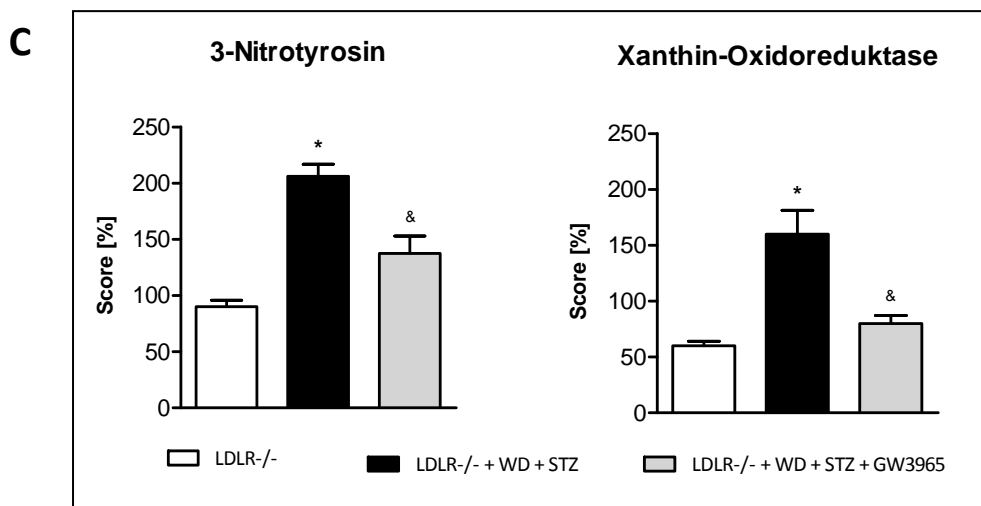
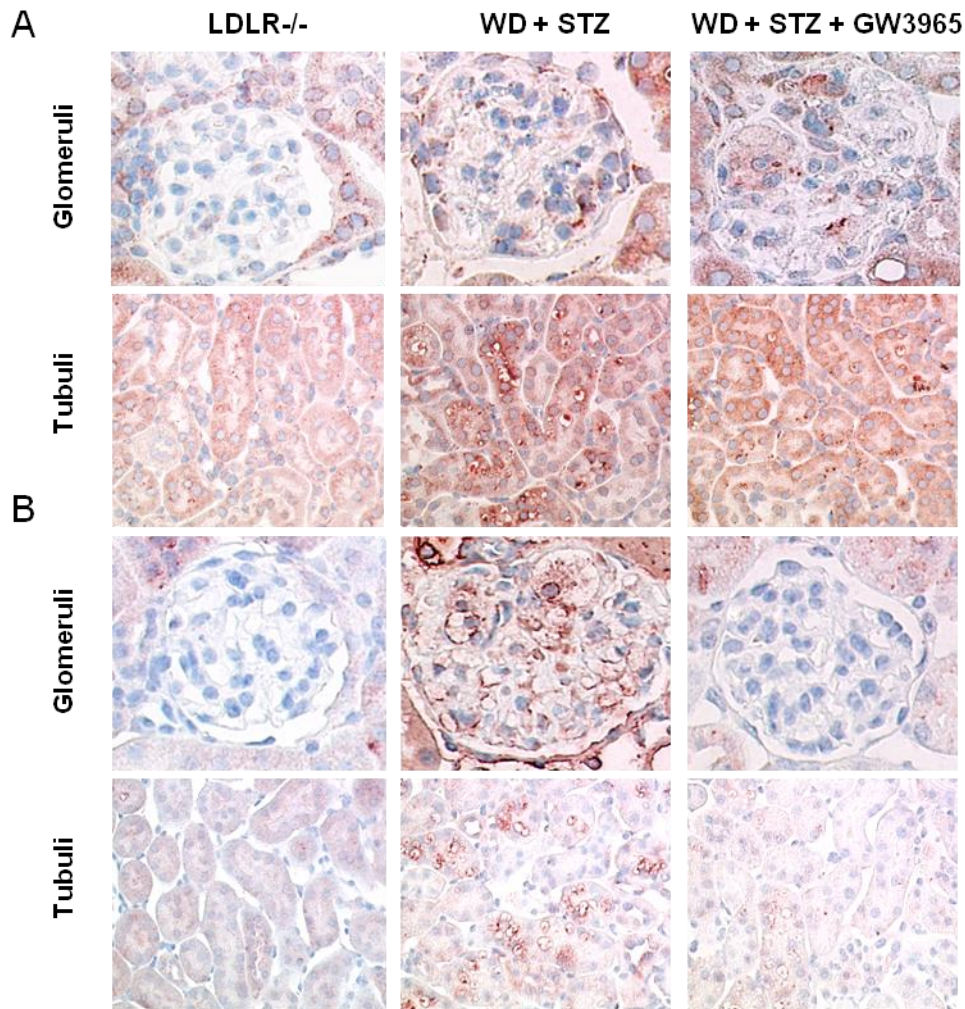
**Abb. 17 LXR – Aktivierung beeinflusst die Expression von Fettstoffwechsel – modulierenden Genen.**

Aus vollen Nierenhomogenaten wurde RNA isoliert und auf die Expression der mRNA von Genen des Fettstoffwechsels wie ABCA1, ABCG1, SCD1 und SR-A1 mittels quantitativer Real-Time PCR untersucht (3.2.5.). Die Expression der untersuchten Gene wurde gegen die Expression von Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert. MW  $\pm$  SEM, n = 4-6; p\* = 0,05 im Vergleich zu LDLR<sup>-/-</sup> + Chow und p<sup>&</sup> = 0,05 im Vergleich zwischen der Versuchsgruppe mit und ohne GW3965.

#### **4.1.6. Hyperlipidämie und Hyperglykämie bei LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen ist mit erhöhtem oxidativem Stress assoziiert und konnte durch LXR-Aktivierung gemildert werden**

Es ist bekannt, dass bei fortschreitendem Diabetes mellitus und diabetischer Nephropathie vermehrt oxidativer und nitrosativer Stress in Form von Peroxidation von Lipiden, Nitrosylierung von Proteinen und Störungen der Atmungskette beobachtet werden konnte [102, 103]. Zwei Parameter zur Beurteilung dieses zellulären Stresslevels sind 3 – Nitrotyrosin und Xanthin – Oxidoreduktase (XOR). 3 – Nitrotyrosin entsteht durch Reaktion von Peroxynitrit mit Tyrosin und ist ein Marker für die Nitrosylierung von Proteinen. XOR ist ein Enzym zur Produktion von Harnsäure unter Bildung von Wasserstoffperoxid. Unter pathologischen LXR Bedingungen kommt es auch zur Bildung von Superoxid – Anionen. XOR konnte bereits als wichtiges Enzym bei der Bildung reaktiver oxidativer Radikale (ROS) bei Hyperlipidämie – assoziiertem Nierenschaden in Ratten identifiziert werden [104]. Die spezifische immunohistochemische Antikörperfärbung beider Proteine im Nierengewebe von hyperlipidämischen und hyperglykämischen Mäusen zeigte eine deutliche Zunahme der Expression von 3 – Nitrotyrosin und Xanthin – Oxidoreduktase in glomerulären Schaumzellen und Tubulusepithelzellen im Vergleich zu normalernährten LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen (Abb. 18). Die Aktivierung von LXR durch GW3965 führte in

diesen Mäusen nur zu einer geringen Zunahme der Expression beider Proteine und deckt sich daher mit der beobachteten geringeren Bildung von Lipidtröpfchen im Nierengewebe behandelter Tiere (4.1.5.). Diese Wirkung von GW3965 deutete auf einen Lipid-bezogenen oxidativen Mechanismus hin, welcher zum protektiven Effekt von LXR beitragen könnte.



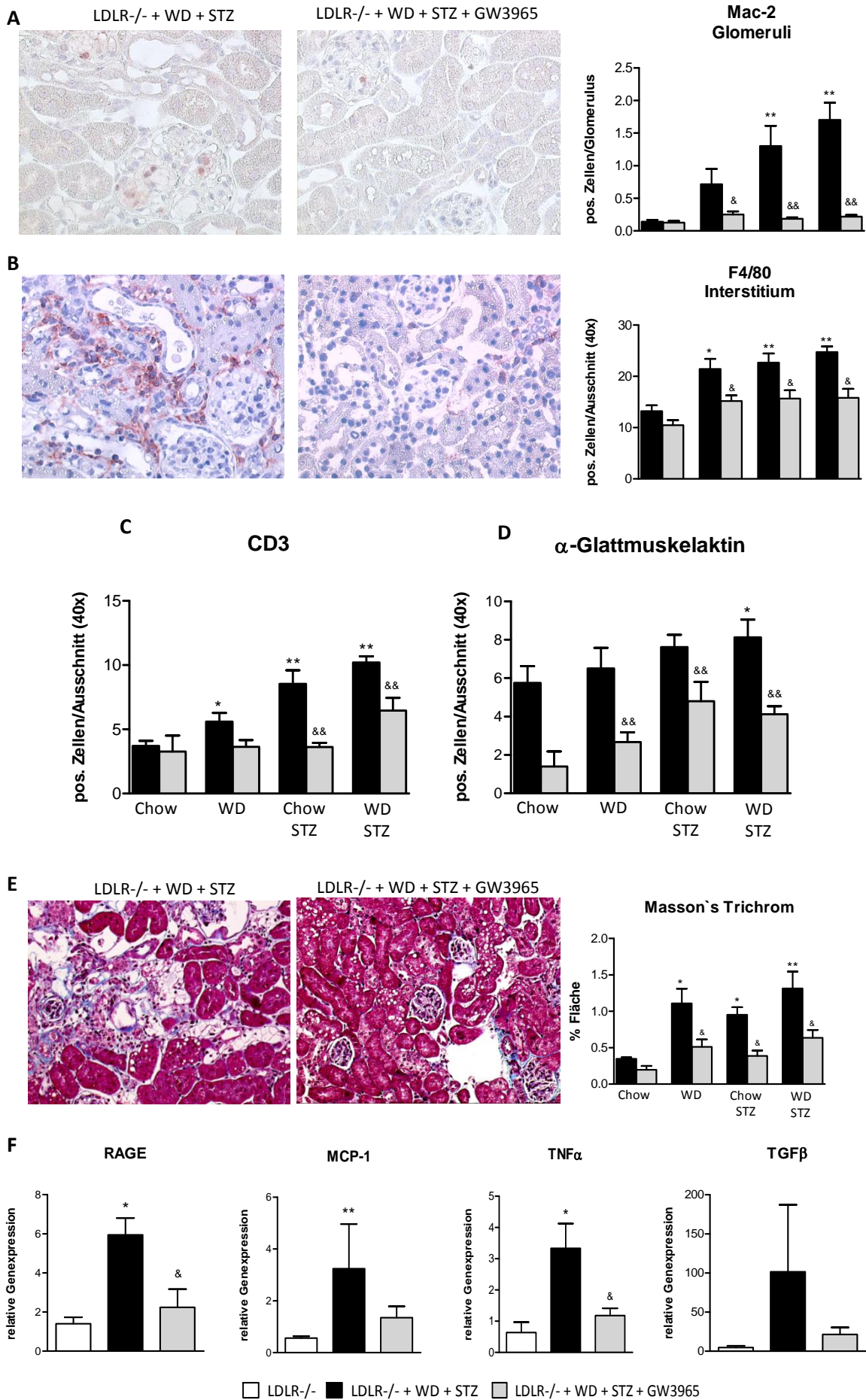
**Abb. 18 Lipidakkumulation ist mit gesteigertem oxidativem Stress assoziiert und konnte durch LXR – Aktivierung mittels GW3965 gemindert werden.**

Immunohistochemie mit spezifischen Antikörpern für 3-Nitrotyrosin (A) und Xanthin-Oxidoreduktase (XOR) (B) an Formalin-fixierten Gewebeschnitten. In hyperlipidämischen und hyperglykämischen LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen kam es zu einem deutlichen Anstieg der Expression von 3-Nitrotyrosin und XOR in glomerulären Schaumzellen und Tubulusepithelzellen. In entsprechend GW3965-behandelten Tieren gab es dagegen nur einen geringen Anstieg der mRNA-Expression beider Proteine. (C) Quantifizierung der immunohistochemischen Färbung für 3-Nitrotyrosin und XOR. MW ± SEM, n = 4-5; p\* = 0,05 im Vergleich zu LDLR<sup>-/-</sup> + Chow und p<sup>&</sup> = 0,05 im Vergleich zwischen der Versuchsgruppe mit und ohne GW3965.

**4.1.7. LXR-Aktivierung mittels GW3965 hat anti-inflammatorische und anti-fibrotische Wirkung und senkt die Expression inflammatorischer/fibrotischer Zytokine in hyperlipidämischen und hyperglykämischen LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen**

Ein weiterer Aspekt bei diabetischer Nephropathie ist die Einwanderung von Entzündungszellen und eine sich daraus entwickelnde Fibrose des Nierengewebes. Abbildung 19 veranschaulicht, dass es in hyperlipidämischen und/oder hyperglykämischen LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen zu einer erhöhten Anzahl von Makrophagen in Glomeruli (A, Mac-2) und im Interstitium (B, F4/80) kam. Auch das Ausmaß an CD3 – positivem lymphozytischem Infiltrat war deutlich erhöht (D). Die Zahl CD3 – positiver Lymphozyten stieg in hyperglykämischen und/oder hyperlipidämischen LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen signifikant an. Damit einhergehend bildeten sich stellenweise fibrotische Areale von Bindegewebsansammlungen im Interstitium (C, blau) und es kam zur Bildung von  $\alpha$ -Glattmuskelaktin – positiven Myofibroblasten (E), wie durch immunohistochemische Färbungen gezeigt werden konnte. Auch die Expression pro – fibrotischer und pro – inflammatorischer Zytokine war in diabetischen/hyperlipidämischen Mäusen deutlich erhöht (F). Durch die Aktivierung von LXR konnte die Zahl von Entzündungszellen und die Bildung von Myofibroblasten und fibrotischer Areale deutlich gesenkt werden. Auch die Expression pro – inflammatorischer Zytokine wurde durch Gabe von GW3965 verringert.

Die erzielten Ergebnisse veranschaulichen den umfassenden Effekt der Aktivierung von LXR auf die diabetische Nephropathie, der auf den Fettstoffwechsel und das Immunsystem Einfluss nimmt. Dadurch konnte im Tiermodell einer so komplexen Erkrankung wie diabetische Nephropathie, eine ganzheitliche protektive Wirkung in der Niere erreicht werden.





### **Abb. 19 Die Aktivierung von LXR mittels GW3965 mildert entzündliche und fibrotische Prozesse im Nierengewebe von hyperlipidämischen/hyperglykämischen LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen.**

In Paraffin eingebettete Formalin-fixierte Nierengewebeschnitte wurden immunohistochemisch gefärbt für (A) Mac-2 positive Makrophagen in Glomeruli (40x Objektiv) und (B) F4/80-positive Makrophagen im Interstitium (20x Objektiv), (C) CD3-positive Lymphozyten, (D)  $\alpha$ -Glattmuskelaktin-positive Myofibroblasten und (E) Masson's Trichrom zur Darstellung fibrotischer Areale (3.2.18). Die Anzahl infiltrierender Immunzellen (A B C) und das Ausmaß an Fibrose (D E) konnte durch LXR-Aktivierung in hyperlipidämischen und/oder hyperglykämischen LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen signifikant gesenkt werden. (F) Quantifizierung der mRNA-Expression von Genen in Nierenhomogenaten, welche an Entzündungsreaktionen und Fibrose beteiligt sind; ermittelt durch quantitative Real-Time PCR (3.2.5.). Die Expression der untersuchten Gene wurde gegen die Expression von Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert. MW  $\pm$  SEM, n = 4-6; p\* = 0,05; p\*\* = 0,01 im Vergleich zu LDLR<sup>-/-</sup> + Chow und p<sup>&</sup> = 0,05; p<sup>&&</sup> = 0,01 im Vergleich zwischen der Versuchsgruppe mit und ohne GW3965.

## **4.2. Modell 2: Lipid – verstärkte Hyperglykämie bei eNOS – defizienten Mäusen**

Ein zweites Tiermodell zur diabetischen Nephropathie beim Menschen ist die induzierte Hyperglykämie in Verbindung mit Hyperlipidämie bei Mäusen mit einer Defizienz der endothelialen Stickstoffmonoxid – Synthase (eNOS). Männliche eNOS<sup>-/-</sup> Mäuse wurden im Alter von 4 Wochen einer linksseitigen, unilateralen Nephrektomie unterzogen (3.3.8.). Durch die erhöhte Funktionsbelastung in der verbliebenen rechten Niere und der Hyperlipidämie sollte der Krankheitsverlauf der induzierten diabetischen Nephropathie beschleunigt werden. In Lebenswoche (LW) 7 und 9 bekamen die Versuchstiere STZ – Injektionen zur Induktion von Hyperglykämie. Durch Fütterung mit einer fett- und cholesterinreichen Spezialdiät wurden die eNOS<sup>-/-</sup> Mäuse hyperlipidämisch. Nach 5 Monaten war der Versuch beendet und die Tiere wurden entnommen. Mittels Gewebeproben, sowie Blut- und Urinproben konnte der Effekt von GW3965 – vermittelter LXR – Aktivierung in normalernährten (Chow), hyperlipidämischen (WD), hyperglykämischen (STZ), und hyperglykämischen/hyperlipidämischen (WD + STZ) eNOS<sup>-/-</sup> Mäusen untersucht werden.

### **4.2.1. Die Aktivierung von LXR führte zu einer Verbesserung des Allgemeinzustands in eNOS – defizienten Mäusen**

Die Analyse physiologischer Parameter aus Blut- und Urinproben zeigte bei eNOS<sup>-/-</sup> Mäusen einen positiven Effekt bei Tieren unter LXR – Aktivierung mittels GW3965 – angereicherterem Futter im Vergleich zu unbehandelten eNOS<sup>-/-</sup> Mäusen. In Tabelle 5 sind biologische und biochemische Parameter aller Versuchsgruppen zusammengefasst. Das Körpergewicht bei

## Ergebnisse

hyperlipidämischen eNOS<sup>-/-</sup> Mäusen (1b) ist in signifikantem Maße höher als bei anderen Versuchsgruppen. Dagegen liegt das Körpergewicht von hyperlipidämischen und hyperglykämischen Versuchstieren (1d) auf dem Niveau von normalernährten Tieren. Durch Hyperlipidämie und Hyperglykämie waren die eNOS<sup>-/-</sup> Mäuse mit zunehmender Versuchsdauer geschwächt, sie waren lethargisch und verloren zum Versuchsende hin an Gewicht. Bei entsprechend GW3965 – behandelten Mäusen kam es bei der Ernährung mit Western Diet (WD) nicht zu einem Anstieg des Körpergewichtes (2b, 2d). Der Blutzuckerspiegel stieg bei STZ – behandelten Mäusen deutlich an (1c, 1d) und wurde bei LXR – Aktivierung durch GW3965, auch bei normoglykämischen Mäusen, nicht beeinflusst (2c, 2d). Parallel dazu kam es bei fett ernährten eNOS<sup>-/-</sup> Mäusen zu einem Anstieg des Cholesterinspiegels im Blutplasma, welcher von GW3965 nicht beeinflusst wurde. Auch der Triglyzeridspiegel stieg bei fettreicher Ernährung und kombinierter Hyperglykämie deutlich an (1d). Durch die Aktivierung von LXR durch GW3965 kam es bei fett ernährten und hyperglykämischen eNOS<sup>-/-</sup> Mäusen zu keinem Anstieg des Triglyzeridspiegels.

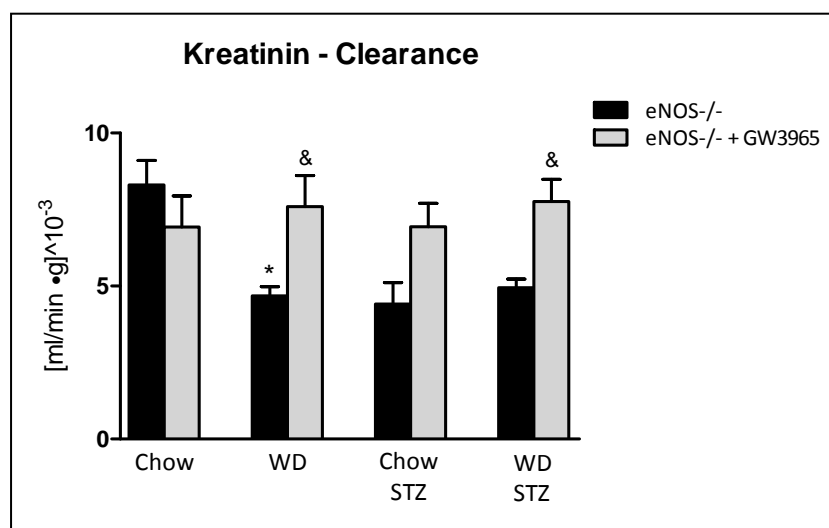
Versuchsgruppe	Körpergewicht [g]	Niere/KG [%]	Glukose [mg/dl]	Cholesterin [mg/dl]	Triglyzeride [mg/dl]
<b>1. eNOS<sup>-/-</sup></b>					
1a Chow (n=4)	26.8 ± 0.9	0.57 ± 0.03	203 ± 10	120.5 ± 13.5	80.3 ± 3.8
1b WD (n=8)	35.0 ± 2.0	0.56 ± 0.04	246 ± 9.4	251.1 ± 25.2* vgl. 1a	90.7 ± 3.1* vgl. 1d
1c STZ (n=6)	24.9 ± 0.8** vgl. 1b	0.81 ± 0.09	409.7 ± 74* vgl. 1a, ** vgl 1b	123.6 ± 17.6* vgl. 1b	87.8 ± 8.7
1d WD + STZ (n=7)	26.0 ± 0.5* vgl. 1b	0.95 ± 0.02* vgl. 1b	417 ± 65.5** vgl. 1b	292.8 ± 33.3* vgl. 1a, **vgl. 1c	143.5 ± 15.5* vgl. 1a
<b>2. eNOS<sup>-/-</sup> + GW3965</b>					
2a Chow (n=6)	26.4 ± 0.6* vgl. 1b	0.65 ± 0.02	191.4 ± 11.5	139.8 ± 10.4	68.4 ± 2.9* vgl. 1d
2b WD (n=8)	27.9 ± 1.3** vgl. 1b	0.66 ± 0.03	207 ± 9.5	228.8 ± 11.8** vgl. 1a, 2a	69,9 ± 3.4** vgl. 1d
2c STZ (n=7)	23.1 ± 1.0** vgl. 1b	0.82 ± 0.06** vgl. 1b	512.6 ± 53.9* vgl. 1a, ** vgl 1b	138.8 ± 3.8* vgl. 1a, ***vgl. 2b	89.6 ± 3.0
2d WD + STZ (n=8)	23.2 ± 0.6* vgl. 1a, ** vgl. 1b	0.87 ± 0.1* vgl. 1a, 1b	527 ± 46.2** vgl. 1a, 1b, 2a	330.3 ± 51.2** vgl. 2a, 2c	83.0 ± 5.4* vgl. 1d

**Tabelle 5** Gruppenübersicht und Aufstellung biologischer und biochemischer Parameter von eNOS<sup>-/-</sup> Versuchstieren.

MW ± SEM, p\* = 0,05; p\*\* = 0,01; p\*\*\* = 0,001

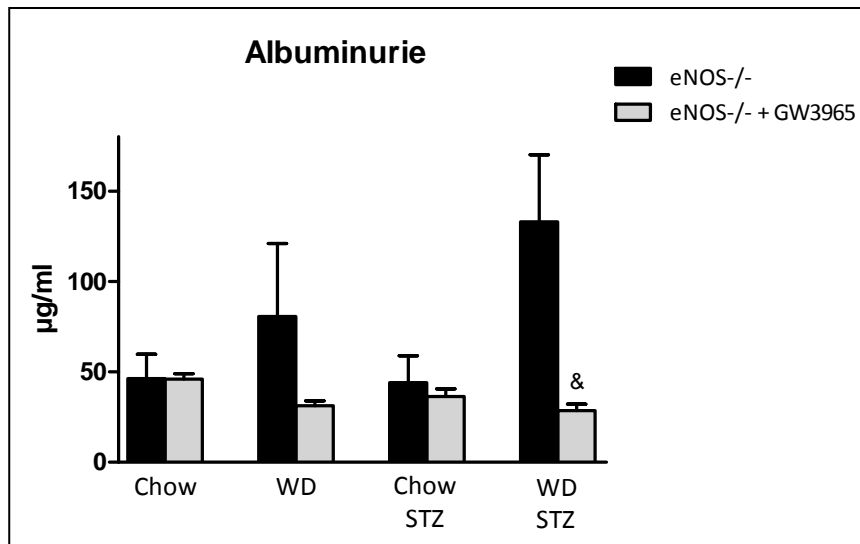
#### 4.2.2. Die Aktivierung von LXR mittels GW3965 erhält die Nierenfunktion bei fortschreitender Erkrankung

Mit Hilfe der Blut- und Urinproben konnten wesentliche physiologische Parameter erfasst werden und anhand derer, die Nierenfunktion der Versuchstiere beurteilt werden. Die Berechnung der Kreatinin – Clearance gibt Aufschluss über die Filtrationsleistung der Niere (3.3.6.). Des Weiteren korreliert die vermehrte Exkretion von Proteinen, auch im speziellen von Albumin, mit einer Schädigung der strukturellen und funktionellen Integrität der Niere. Abbildung 20 zeigt die Kreatinin – Clearance der eNOS<sup>-/-</sup> Mäuse aller Versuchsgruppen. Bei hyperlipidämischen und/oder hyperglykämischen Versuchstieren sank die Kreatinin – Clearance deutlich ab. Bei Aktivierung von LXR durch Gabe von GW3965 blieb die Kreatinin – Clearance bei hyperlipidämischen (WD), hyperglykämischen (STZ) und hyperlipidämischen/hyperglykämischen (WD + STZ) eNOS<sup>-/-</sup> Mäusen konstant auf dem Niveau von normalernährten Kontrolltieren (Chow). Parallel dazu stieg auch die Albuminurie bei hyperlipidämischen und hyperglykämischen (WD + STZ) Versuchstieren an. Abbildung 21 veranschaulicht, dass die Gabe von GW3965 und damit die Aktivierung von LXR bei hyperlipidämischen (WD) und hyperglykämischen (WD + STZ) Mäusen einen Anstieg der Proteinurie und Albuminurie verhindert. Bei allein diabetischen eNOS<sup>-/-</sup> Mäusen (STZ) stieg die Ausscheidung von Proteinen im Harn nicht an. Die Integrität und Funktionalität des Tubulusepithels kann anhand der fraktionellen Exkretion (FE) verschiedener Elektrolyte beurteilt werden (3.3.6.).



**Abb. 20** Kreatinin – Clearance als Maß für die glomeruläre Filtrationsrate.

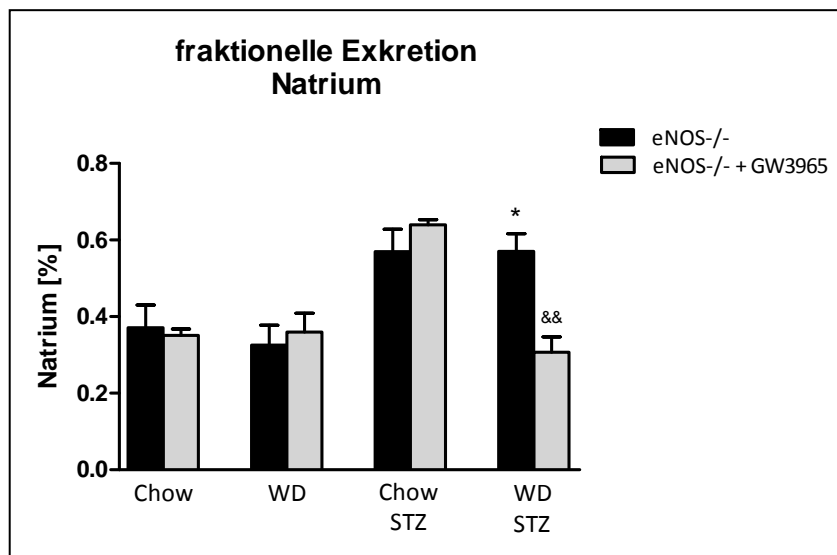
Die eNOS<sup>-/-</sup> Tiere wurden am Versuchsende für 15h in Stoffwechselkäfigen gehalten und der Urin gesammelt. Die Abbildung zeigt die Kreatinin – Clearance (3.3.6.) von normalernährten Mäusen (Chow), hyperlipidämischen (WD), hyperglykämischen (STZ) und hyperlipidämischen/hyperglykämischen (WD + STZ) Versuchstieren. Die Kreatinin – Clearance konnte im Gegensatz zu unbehandelten hyperlipidämischen (WD) und/oder hyperglykämischen (STZ) Mäusen, bei LXR – Aktivierung mit GW3965 erhalten werden. MW ± SEM, n = 4-8; p\* = 0,05 im Vergleich zu eNOS<sup>-/-</sup> + Chow und p<sup>&</sup> = 0,05 im Vergleich zwischen der Versuchsgruppe mit und ohne GW3965.



**Abb. 21 Albuminurie und Proteinurie bei hyperlipidämischen und hyperglykämischen eNOS-/- Mäusen.**

Bei eNOS-/- Mäusen kam es bei fettreicher Ernährung (WD) und Hyperglykämie (WD + STZ) zur, teils signifikant hohen, Ausscheidung von Albumin über den Harn. Durch die Behandlung mit GW3965 konnte sowohl die Albuminurie in hyperlipidämischen und hyperglykämischen eNOS-/- Mäusen verhindert werden. MW  $\pm$  SEM, n = 4-8;  $p^* = 0,05$  im Vergleich zu eNOS-/- + Chow und  $p^{\&} = 0,05$  im Vergleich zwischen der Versuchsgruppe mit und ohne GW3965.

Eine steigende FE spiegelt einen Schaden des Tubulusepithels, welches zur Rückresorption von Natriumionen nur noch unzureichend in der Lage ist. In Abbildung 22 wurden die Ergebnisse aus allen Versuchsgruppen zusammengefasst. Hyperlipidämische Tiere (WD) zeigten keine Veränderung der FE im Vergleich zu normalernährten eNOS-/- Mäusen (Chow). Bei diabetischen eNOS-/- Mäusen (STZ) konnte der Anstieg der FE durch LXR – Aktivierung mittels GW3965 nicht beeinflusst werden. In hyperglykämischen und hyperlipidämischen Mäusen (WD + STZ) stieg die FE ebenfalls deutlich an, konnte allerdings in GW3965 – behandelten eNOS-/- Mäusen in hoch signifikantem Maße gesenkt werden.



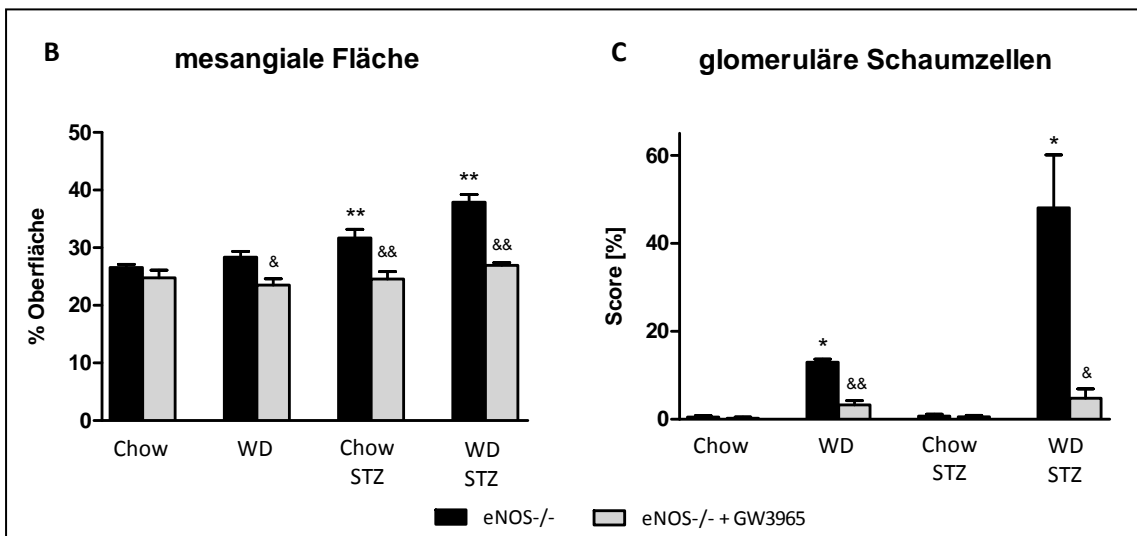
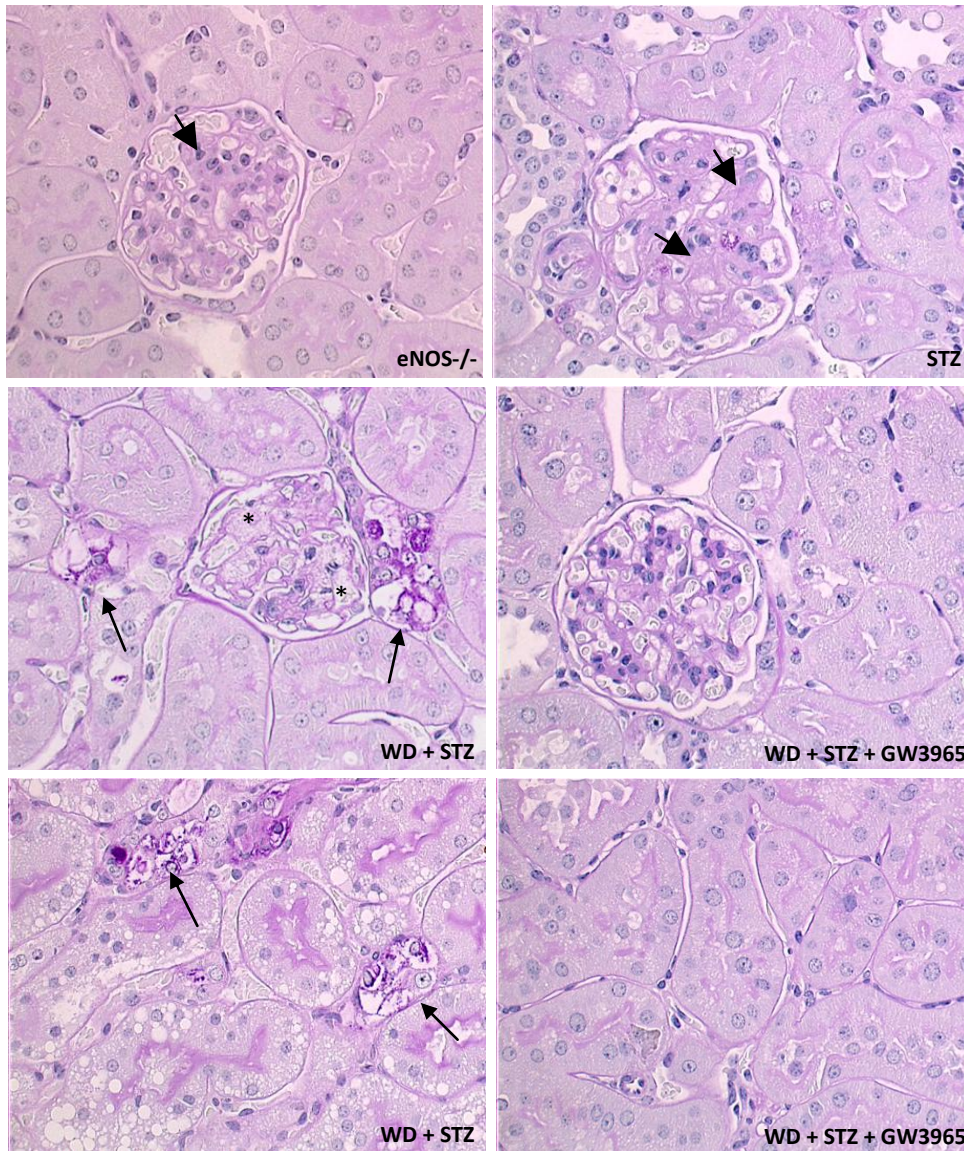
### **Abb. 22 Fraktionelle Exkretion von Natrium als Parameter für die Funktion des Tubulusepithels.**

Die Abbildung zeigt die fraktionelle Exkretion (FE) (3.3.6.) von normalernährten (Chow), hyperlipidämischen (WD), diabetischen (STZ) und hyperlipidämischen/hyperglykämischen eNOS<sup>-/-</sup> Mäusen (WD + STZ). Hyperlipidämische Mäuse zeigten keine Veränderung der FE im Vergleich zu normalernährten Tieren. In hyperglykämischen Versuchstieren dagegen, kam es zu einer erhöhten FE und damit zur vermehrten Ausscheidung von Natrium, welche durch die Behandlung von GW3965 nicht beeinflusst wurde. Bei hyperlipidämischen und diabetischen eNOS<sup>-/-</sup> Mäusen konnte der Anstieg der FE, durch LXR – Stimulation mittels GW3965 stark gesenkt werden. MW ± SEM, n = 4-8; p\* = 0,05 im Vergleich zu eNOS<sup>-/-</sup> + Chow und p<sup>&</sup> = 0,05; p<sup>&&</sup> = 0,01 im Vergleich zwischen der Versuchsgruppe mit und ohne GW3965.

### **4.2.3. Die Morphologie des Nierengewebes von GW3965 – behandelten eNOS<sup>-/-</sup> Mäusen zeigt, im Vergleich zu unbehandelten Versuchstieren, weniger pathologische Veränderungen.**

Die sinkende Kreatinin – Clearance und steigende fraktionelle Exkretion von Natrium, zusammen mit der beobachteten Albuminurie und Proteinurie, deuten auf einen Nierenschaden mit Verlust der strukturellen Integrität des Nierengewebes bei hyperlipidämischen und hyperglykämischen eNOS<sup>-/-</sup> Mäusen hin. Mit Hilfe von PAS – gefärbten Gewebeschnitten konnte die Morphologie der verbliebenen rechten Niere beurteilt werden (Abb. 23 A). Normalernährte eNOS<sup>-/-</sup> Mäuse manifestierten eine leichte Sklerose (eNOS<sup>-/-</sup>). Die Glomeruli zeigten vermehrt mesangiale Matrixbildung (Abb. 23 Pfeilspitze), welche auf den Phänotyp der eNOS<sup>-/-</sup>-Defizienz zurückzuführen ist [105]. Durch Hyperglykämie wurde die mesangiale Matrixvermehrung verstärkt (STZ). Bei hyperlipidämischen und hyperglykämischen Versuchstieren (WD + STZ) zeigten sich Schaumzellen in den Glomeruli und im Interstitium (Abb. 23 Stern), Lipidtröpfchenbildung in Tubulusepithelzellen sowie Lipiddegeneration von Tubuli (Abb. 23 Pfeil). Ebenso kam es zu mesangialer Matrixvermehrung. Die Aktivierung von LXR durch GW3965 verhinderte die Bildung ektopischer Lipidablagerungen und minderte die Schaumzellbildung in allen Kompartimenten der Niere. Die Beobachtungen an den Gewebeschnitten konnten durch Quantifizierung der pathologischen Parameter bestätigt werden. Abbildung 23 (B C) zeigt die morphometrische Auswertung der mesangialen Matrixvermehrung und die semiquantitative Analyse der Schaumzellbildung in Glomeruli (3.1.18.). Die Aktivierung von LXR durch Gabe von GW3965 verminderte bei hyperlipidämischen (WD), hyperglykämischen (STZ) und hyperlipidämischen/hyperglykämischen (WD + STZ) eNOS<sup>-/-</sup> Mäusen in signifikantem Maße die Zunahme extrazellulärer Matrix im Mesangium. Ebenso konnte durch LXR – Aktivierung die Bildung von Schaumzellen in Glomeruli von hyperlipidämischen und zusätzlich diabetischen Versuchstieren (WD + STZ) verhindert werden.

A

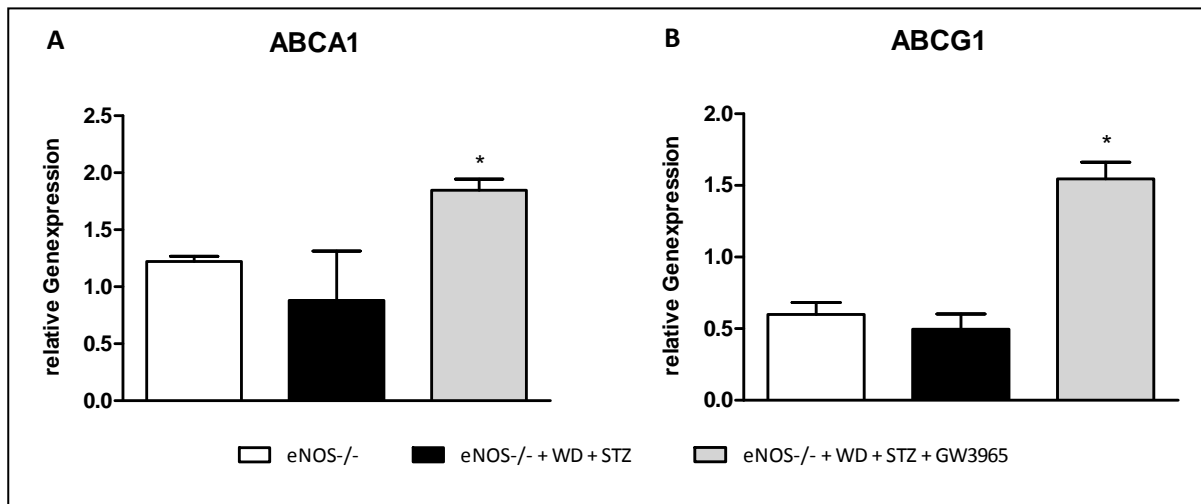


### **Abb. 23 Repräsentative Ausschnitte von PAS – gefärbten Gewebeproben und Quantifizierung pathologischer Veränderungen wie mesangiale Matrixvermehrung und Schaumzellbildung in eNOS-/- Mäusen.**

Formalinfixierte Gewebeproben der Nieren von eNOS-/- Tieren wurden in Paraffin eingebettet, 3 µm dick geschnitten, entparaffiniert und PAS-gefärbt. (A) Die morphologische Evaluation wurde am Mikroskop bei 200-facher Vergrößerung durchgeführt. Normalernährte Versuchstiere zeigten eine gesunde Nierenmorphologie mit vermehrter mesangialer Matrix (eNOS-/-), bei diabetischen Mäusen (STZ) trat eine zusätzlich gesteigerte mesangiale Matrixvermehrung (Pfeilspitze) auf. Bei kombiniert diabetischen und hyperlipidämischen LDLR-/- Mäusen (WD + STZ) wurden darüber hinaus Schaumzellen in Glomeruli (Stern) und Lipiddegeneration in Tubuli (Pfeil) beobachtet. Bei Gabe von GW3965 (WD + STZ + GW3965) hatten sich diese pathologischen Veränderungen nicht entwickelt. Die hyperlipidämischen und hyperglykämischen Mäuse zeigten bei LXR-Aktivierung eine nahezu gesunde Nierenmorphologie. (B) Morphometrische Auswertung der mesangialen Matrixvermehrung und semiquantitative Analyse der Schaumzellbildung in Glomeruli (C). Durch die Aktivierung von LXR konnte die Zunahme extrazellulärer Matrix im Mesangium und die Bildung von Schaumzellen in Glomeruli verhindert werden. MW ± SEM, n = 4-8; p\* = 0,05; p\*\* = 0,01 im Vergleich zu eNOS-/- + Chow und p<sup>&</sup> = 0,05; p<sup>&&</sup> = 0,01 im Vergleich zwischen der Versuchsgruppe mit und ohne GW3965.

### **4.2.4. Die Aktivierung von Fettstoffwechsel regulierenden Genen überprüft die Effektivität der Therapie durch LXR – Aktivierung mittels GW3965 – Behandlung**

Um zu untersuchen, inwiefern die Lipidablagerungen und die Schaumzellbildung im Nierengewebe hyperlipidämischer und hyperglykämischer eNOS-/- Mäuse durch Gabe von GW3965 verringert werden konnte, wurde die Expression von Genen untersucht, welche den Fettstoffwechsel modulieren und aktivieren. Die Membranproteine ABCA1 und ABCG1 schleusen Phospholipide aus den Zellen heraus und sind am reversen Cholesterintransport beteiligt, wodurch überschüssiges Cholesterin durch die Galle aus dem Organismus entfernt werden kann. Es ist bekannt, dass die Genaktivität von ABCA1 und ABCG1 direkt durch die Bindung von LXR an die Promotorregion hochreguliert wird. Durch die Analyse der Genexpression konnte deshalb ebenso gezeigt werden, dass die Herstellung des Spezialfutters mit GW3965 – Zusatz den Agonisten nicht inaktiviert hatte und den Fettstoffwechsel der eNOS-/- Mäuse beeinflusste. Wie aus Abbildung 24 hervorgeht, war die Expression der mRNA von ABCA1 und ABCG1 in hyperlipidämischen und hyperglykämischen eNOS-/- Mäusen (WD + STZ) im Vergleich zu normalernährten Tieren (eNOS-/-) unverändert. Bei Gabe von GW3965, und damit Aktivierung von LXR, stieg die Expression beider Gene signifikant an (WD + STZ + GW3965). Die gesteigerte mRNA – Expression von ABCA1 und ABCG1 korrelierte mit der verminderten Bildung von Schaumzellen in Glomeruli und im Interstitium, sowie von ektopischen Lipidtröpfchen in Tubulusepithelzellen (4.2.3.). Die Modulation der Expression von ABCA1 und ABCG1 konnte auch schon bei LDLR-/- Mäusen gezeigt werden (4.1.5.).



**Abb. 24 Analyse der mRNA – Expression von Fettstoffwechsel – modulierenden Genen *ABCA1* und *ABCG1* mittels quantitativer Real – Time PCR.**

Ergebnis der quantitativen Real-Time PCR für mRNA von ABCA1 und ABCG1 nach RNA-Isolation aus vollen Nierenhomogenaten (2.3.5.). In hyperglykämischen und hyperlipidämischen eNOS<sup>-/-</sup> Mäusen lag die Expression der mRNA von ABCA1 und ABCG1 auf dem Niveau von normalernährten Kontrolltieren und stieg bei LXR-Aktivierung durch GW3965 signifikant an. Die Expression der untersuchten Gene wurde gegen die Expression von Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert. MW ± SEM, n = 4-5; p\* = 0,05 im Vergleich zu eNOS<sup>-/-</sup>.

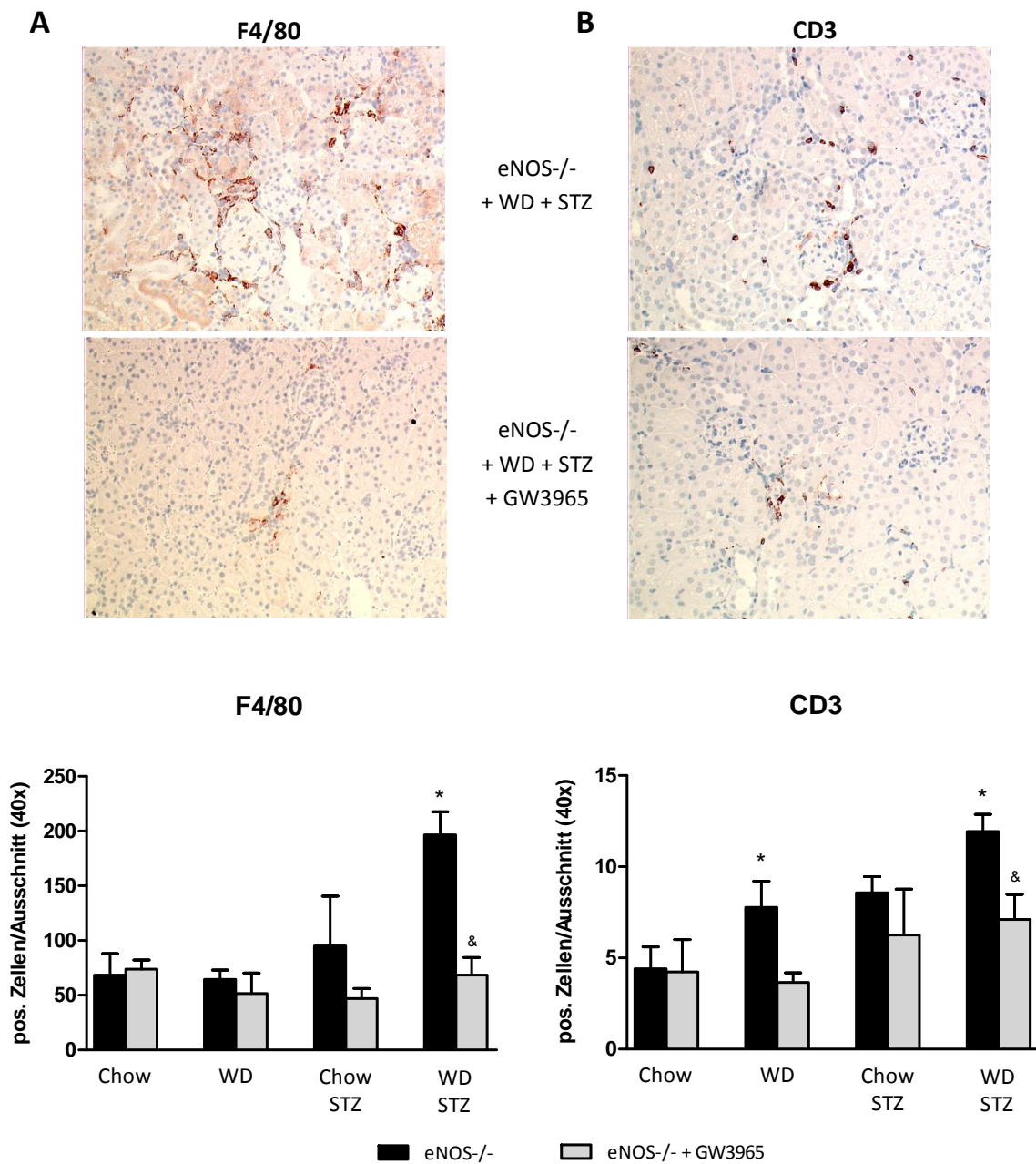
#### **4.2.5. Die Gabe von GW3965 führt zur Minderung entzündlicher und fibrotischer Prozesse im Nierengewebe von hyperglykämischen und hyperlipidämischen eNOS<sup>-/-</sup> Mäusen**

Bei Patienten mit diabetischer Nephropathie kommt es zur Infiltration von Immunzellen und zu Fibrose. Mit Hilfe von histochemischen und immunohistochemischen Färbungen an Gewebeschnitten wurden die Infiltration von Immunzellen und das Ausmaß fibrotischer Areale in der Niere der eNOS<sup>-/-</sup> Mäuse untersucht. Abbildung 25 zeigt die Quantifizierung von eingewanderten F4/80 – positiven Makrophagen im Interstitium (A) und das Ausmaß von CD 3 – positivem, T – Zell Infiltrat (B) sowie repräsentative Gewebeausschnitte der immunohistochemischen Reaktionen. In normalernährten Mäusen (Chow) lag die Zahl infiltrierter Makrophagen (68 F4/80 – positive Zellen) bereits höher als in normalernährten LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen (13 F4/80 – positive Zellen; 4.1.7.), was auf den Phänotyp der eNOS<sup>-/-</sup> – Defizienz zurückzuführen ist [106]. Die Einwanderung von Makrophagen in das Nierengewebe nahm in hyperglykämischen eNOS<sup>-/-</sup> Mäusen (STZ) zu und steigerte sich signifikant in hyperlipidämischen und hyperglykämischen Versuchstieren (WD + STZ). Durch Aktivierung von LXR mittels des Agonisten GW3965 konnte eine Infiltration von Makrophagen verringert werden. Bei allein hyperlipidämischen eNOS<sup>-/-</sup> Mäusen (WD) kam es nicht zu einer vermehrten Einwanderung von



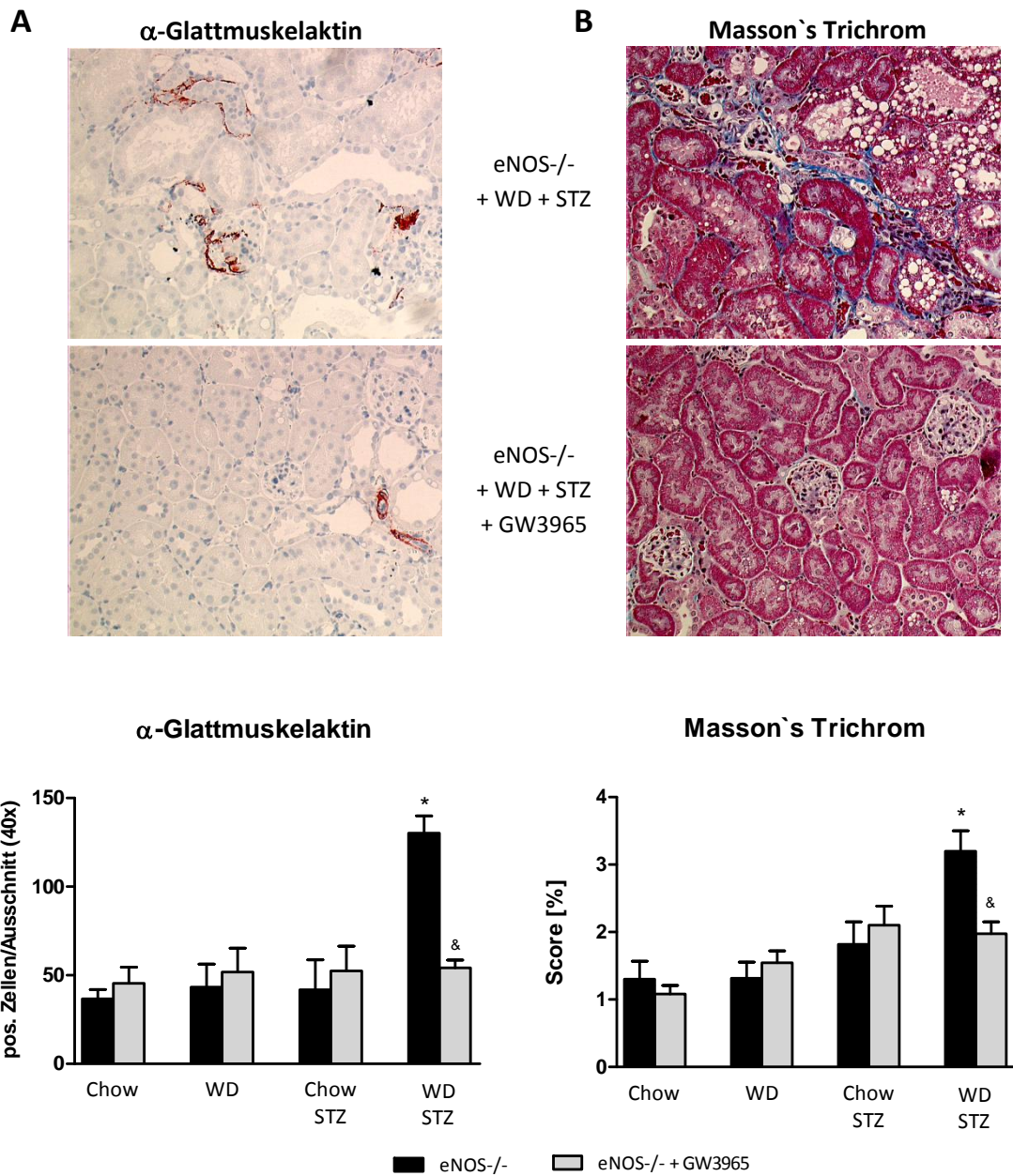
Makrophagen. Die Anzahl infiltrierter Lymphozyten stieg sowohl in hyperlipidämischen (WD) als auch in hyperlipidämischen/hyperglykämischen (WD + STZ) Versuchstieren signifikant an und konnte bei Behandlung mit GW3965 gesenkt werden. Entzündliche Prozesse gehen bei anhaltender Dauer mit der Bildung von Myofibroblasten und fibrotischer Areale einher. Mittels immunohistochemischer Färbungen wurden beide Parameter im Nierengewebe von eNOS<sup>-/-</sup>-Mäusen untersucht. Aus Abbildung 26 geht eindeutig hervor, dass ein Anstieg der Zahl  $\alpha$ -Glattmuskelaktin positiver Myofibroblasten in hyperlipidämischen und hyperglykämischen eNOS<sup>-/-</sup>-Mäusen (WD + STZ) durch Gabe von GW3965 signifikant gemindert werden konnte. In hyperlipidämischen (WD) oder diabetischen (STZ) Versuchstieren stieg die Anzahl von Myofibroblasten im Vergleich zu Kontrolltieren (Chow) nicht an. Die Bildung fibrotischer Areale (blau) stieg in hyperlipidämischen und hyperglykämischen eNOS<sup>-/-</sup>-Mäusen (WD + STZ) signifikant an und konnte bei Versuchstieren mit GW3965 – Behandlung nur in geringem Maße beobachtet werden. Auch bei hyperlipidämischen (WD) oder hyperglykämischen (STZ) eNOS<sup>-/-</sup>-Mäusen kommt es zu einem leichten Anstieg von Fibrose, welcher durch Aktivierung von LXR nicht beeinflusst wurde.

Zusammengefasst, konnte durch die verringerte Anzahl von eingewanderten Immunzellen und die deutlich weniger ausgeprägte Fibrose in GW3965 – behandelten eNOS<sup>-/-</sup>-Mäusen, eine sowohl antiinflammatorische als auch antifibrotische Wirkung durch die Aktivierung von LXR beobachtet werden.



**Abb. 25 Die Aktivierung von LXR zeigte im Nierengewebe von hyperlipidämischen und hyperglykämischen eNOS<sup>-/-</sup> Mäusen anti – inflammatorische Wirkung.**

Repräsentative Gewebeschnitte und Quantifizierung (40x Objektiv) von immunohistochemischen Färbungen für Makrophagen (A) und Lymphozyten (B) in normalernährten (Chow), hyperlipidämischen (WD), hyperglykämischen (STZ) und kombiniert belasteten eNOS<sup>-/-</sup> Mäusen (WD + STZ). Die Aktivierung von LXR mittels GW3965 verhinderte vollständig eine gesteigerte Einwanderung von Makrophagen in das Tubulointerstitium und konnte auch einen Anstieg von lymphozytischem Infiltrat in hyperlipidämischen (WD) und ebenso hyperglykämischen (WD + STZ) Mäusen verringern. MW ± SEM, n = 4-6; p\* = 0,05 im Vergleich zu eNOS<sup>-/-</sup> + Chow und p<sup>&</sup> = 0,05 im Vergleich zwischen der Versuchsgruppe mit und ohne GW3965.



**Abb. 26 Analyse fibrotischer Parameter in hyperlipidämischen und hyperglykämischen eNOS<sup>-/-</sup> Mäusen.**

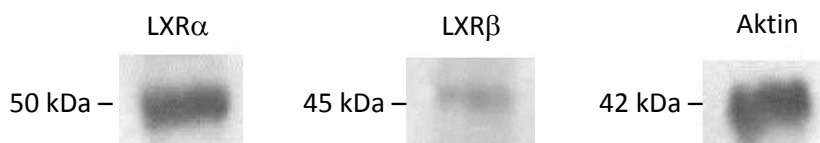
Morphometrische Analyse von fibrotischen Arealen in Masson's Trichrom-gefärbten Gewebeschnitten (40x Objektiv) (A) und quantitative Auswertung von  $\alpha$ -Glattmuskelaktin positiven Zellen (B) in normalernährten (Chow), hyperlipidämischen (WD), hyperglykämischen (STZ) und hyperlipidämischen/ hyperglykämischen (WD + STZ) eNOS<sup>-/-</sup> Mäusen. In hyperlipidämischen, diabetischen Versuchstieren konnte der enorme Anstieg an Fibrose und an der Bildung von Myofibroblasten durch LXR-Aktivierung mittels GW3965 signifikant gesenkt bzw. verhindert werden. MW  $\pm$  SEM, n = 4-6; p\* = 0,05 im Vergleich zu eNOS<sup>-/-</sup> + Chow und p<sup>&</sup> = 0,05 im Vergleich zwischen der Versuchsgruppe mit und ohne GW3965.

### 4.3. *In vitro* Modell: Analyse der Lipiddegeneration in immortalisierten, humanen, proximalen Tubulusepithelzellen (HK-2)

Die Bildung ektopischer Lipidtröpfchen im Organismus, z.B. bei Übergewicht oder wie unter 4.1. und 4.2. in der Niere beobachtet wurde, geht mit vermehrtem oxidativem Stress einher und führt zu einer Schädigung der betroffenen Zelle, so dass diese letztendlich daran zu Grunde gehen kann [107]. Allerdings ist wenig darüber bekannt, inwiefern Lipotoxizität im Tubulusepithel den Krankheitsverlauf der diabetischen Nephropathie beeinflussen könnte. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Auswirkung von Lipidablagerungen auf Tubulusepithelzellen und ein möglicher protektiver Effekt durch LXR – Aktivierung mittels GW3965 im Zellkulturmodell mit immortalisierten, humanen, proximalen Tubulusepithelzellen (HK-2) untersucht. Da bereits gezeigt werden konnte, dass die Bildung von Lipidtröpfchen mit erhöhtem oxidativem Stress im betroffenen Gewebe korreliert (4.1.6.), wurde für die Untersuchungen im Zellkulturmodell darauf der Schwerpunkt gesetzt.

#### 4.3.1. *HK-2 Zellen exprimieren beide Isoformen von LXR und reagieren auf Stimulation mit dem LXR – Agonisten GW3965*

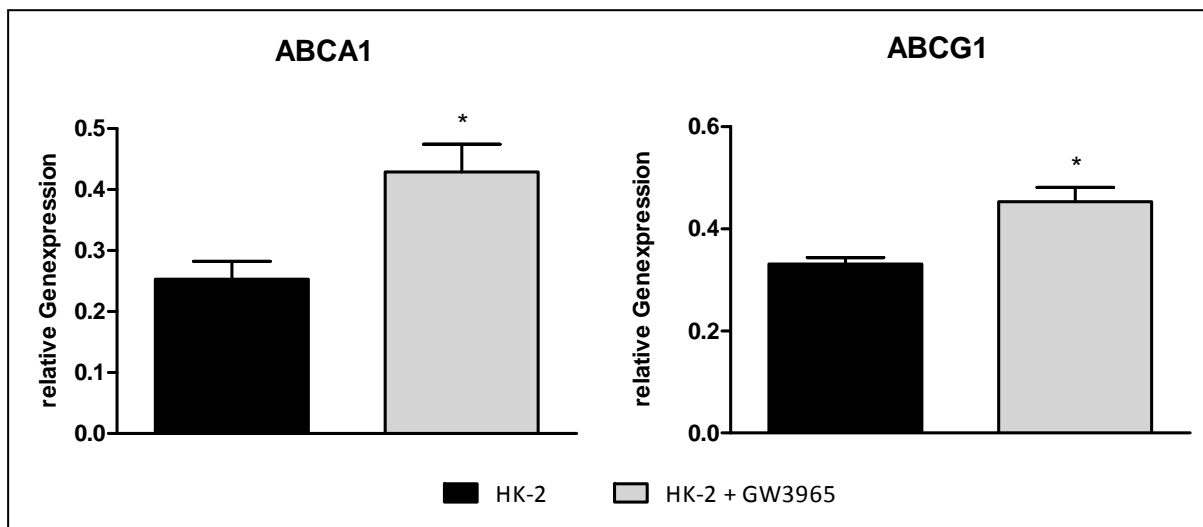
Zur Verifizierung, ob das gewählte Zellkulturmodell zur Untersuchung des Effekts von LXR auf Lipidtröpfchen geeignet ist, wurde die Expression von LXR $\alpha$  und LXR $\beta$  in HK-2 Zellen untersucht. Abbildung 27 zeigt eine repräsentative Abbildung von Western Blot Analysen der Expression beider Isoformen von LXR.



**Abb. 27** Western Blot Analyse der Proteinexpression von LXR $\alpha$  und LXR $\beta$  in HK-2 Zellen.

4  $\mu$ g einer HK-2 Zellsuspension wurden in Lämmli-Puffer lysiert und die Expression von LXR $\alpha$  und LXR $\beta$  mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht (3.2.11.). Als Ladekontrolle wurde die Expression von Aktin dargestellt. Hier gezeigt sind repräsentative Ergebnisse aus 3 Experimenten.

Darüber hinaus wurde die Expression der mRNA bekannter Zielgene von LXR analysiert, um zu zeigen, ob in HK-2 Zellen die Gabe von GW3965 eine Aktivierung von LXR bewirkte. Die Ergebnisse sind in Abbildung 28 zusammengefasst. Die mRNA – Expression der Phospholipid- und Cholesterintransporter ABCA1 und ABCG1 konnte mittels Aktivierung von LXR durch Gabe von GW3965 ins Zellkulturmedium gesteigert werden. Beide Proteine sind am Transport von Phospholipiden und Cholesterin aus der Zelle beteiligt. Es konnte somit auch nachgewiesen werden, dass im Zellkulturmodell die Aktivierung von LXR die Expression von Genen des Fettstoffwechsels beeinflusst.



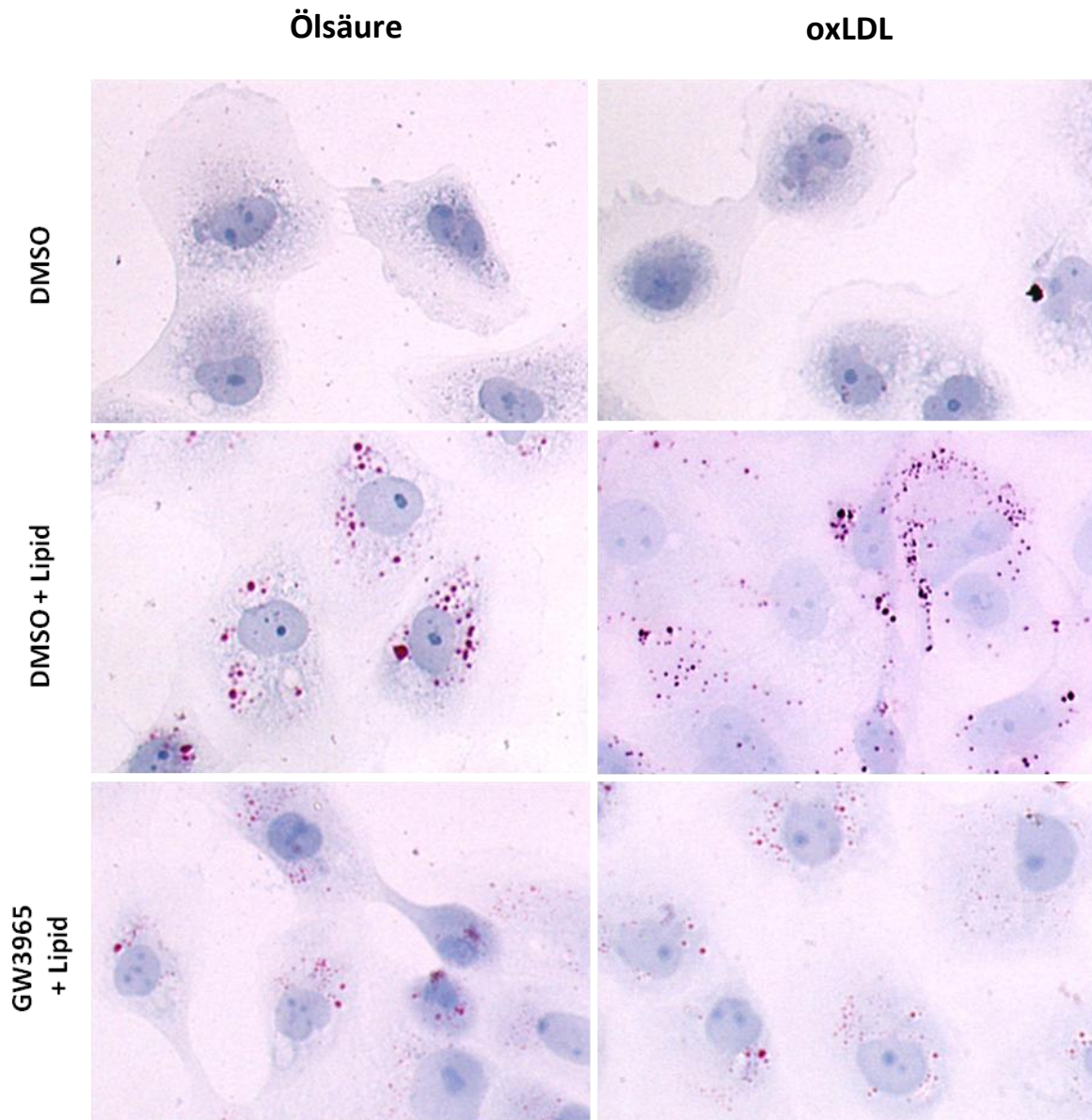
**Abb. 28 Expression von LXR – Zielgenen in HK – Zellen.**

Quantitative Real-Time PCR Analyse der mRNA-Expression von ABCA1 (A) und ABCG1 (B). HK-2 Zellen wurden für 16h mit 5 µM DMSO oder 5 µM GW3965 behandelt und anschließend RNA isoliert. Durch Aktivierung von LXR durch GW3965 konnte die Expression der mRNA beider Zielgene gesteigert werden. Auch im Zellkulturmodell konnte somit der Einfluss von LXR auf den zellulären Lipidstoffwechsel gezeigt werden. Die Expression der untersuchten Gene wurde gegen die Expression von Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert. MW ± SEM, n = 3; p\* = 0,05

#### **4.3.2. Die Bildung von Lipidtröpfchen in HK-2 Zellen kann durch LXR – Aktivierung verringert werden**

Um die pathologischen Bedingungen in Tubuli von hyperlipidämischen und hyperglykämischen Mäusen zu imitieren, wurden HK-2 Zellen zur Bildung von Lipidtröpfchen mit Ölsäure oder modifiziertem LDL behandelt (3.2.12.). Um die Zusammensetzung ektopischer Lipidtröpfchen möglichst natürlich zu gestalten wurde hierzu oxidiertes, humanes LDL verwendet. Wie die repräsentativen Aufnahmen einer Fettrot – Färbung in Abbildung 29 deutlich zeigen, kam es in Lipid – behandelten HK-2 Zellen zur Bildung von Lipidtröpfchen. Durch die Aktivierung von LXR

bei Gabe von GW3965 konnte eine Akkumulation von Lipiden in den Zellen vermindert werden. Beim Betrachten der präparierten HK-2 Zellen konnte kein Unterschied in der Menge der Lipidtröpfchen nach Behandlung mit Ölsäure im Vergleich zu oxLDL – behandelten Zellen festgestellt werden.



**Abb. 29 Die Aktivierung von LXR konnte die Bildung von Lipidtröpfchen in HK-2 Zellen vermindern.**

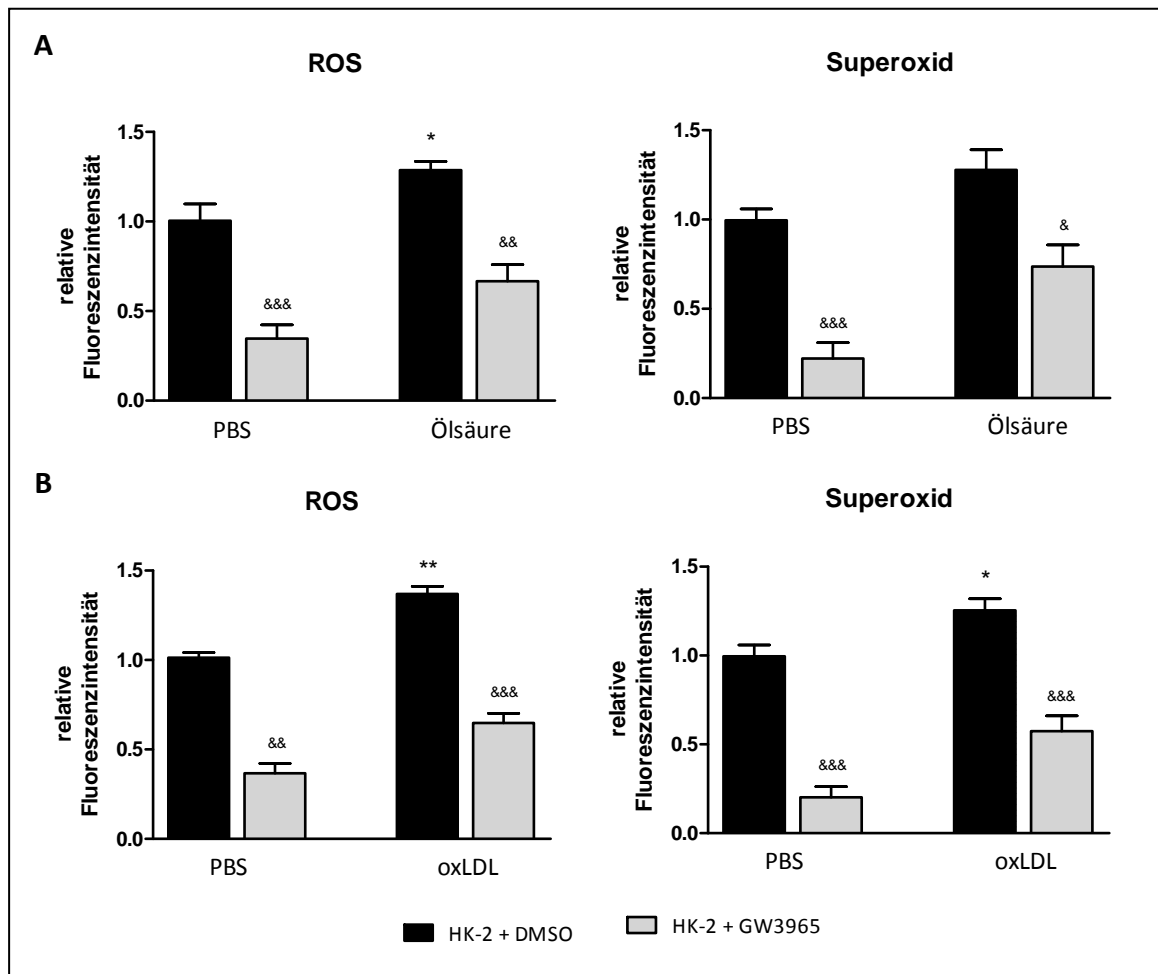
HK-2 Zellen wurden je mit 5  $\mu$ M DMSO oder GW3965 vorbehandelt und anschließend für 24h mit 0,15 mM Ölsäure oder 50 $\mu$ g/ml oxLDL inkubiert. Repräsentative Aufnahmen von Fettrot-gefärbten HK-2 Zellen (3.2.13.) nach Behandlung mit DMSO, DMSO und Lipidbeladung sowie GW3965 und Lipidbeladung. HK-2 Zellen zeigen Lipidtröpfchen (rot) nach Inkubation mit Ölsäure und oxLDL. Die Vorbehandlung mit GW3965, und damit die Aktivierung von LXR, bewirkte eine Verringerung der Lipidtröpfchenbildung. n = 4

**4.3.3. Die Bildung von Lipidtröpfchen erhöht den zellulären oxidativen Stress, welcher durch Aktivierung von LXR verringert werden konnte.**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine Aktivierung von LXR die Bildung von Lipidtröpfchen verringerte, wurde nun untersucht, in wieweit die Akkumulation von Lipiden oxidativen Stress in HK-2 Zellen beeinflusst. Ein Parameter zur Bestimmung von oxidativem Stress ist die Quantifizierung von oxidativen Radikalen (ROS/*reactive oxygen species*), wie Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), Hydroxyl – Radikale ( $OH^\cdot$ ), Alkoxy – Radikale ( $RO^\cdot$ ), Hydroperoxid (ROOH) und Superoxid ( $O_2^\cdot$ ). Sie entstehen unter anderem bei der Energieproduktion in Mitochondrien durch Elektronentransport der Atmungskette oder in aktivierten Entzündungszellen und können mit Proteinen und Lipiden reagieren und diese schädigen. Unter pathophysiologischen Bedingungen ist die Bildung von ROS erhöht [103]. Aufgrund des verwendeten Nachweisverfahrens für diverse oxidative Radikale wurde Superoxid separat detektiert (3.2.14.). Abbildung 30 veranschaulicht deutlich, dass sich in Lipid – behandelten HK-2 Zellen mehr ROS und Superoxid gebildet haben als in Kontrollzellen. Der Effekt der Behandlung mit oxLDL (Abb. 30 B) war ausgeprägter als bei Zugabe von Ölsäure (Abb. 30 A). Die Vorbehandlung mit GW3965, und damit die Aktivierung von LXR, bewirkte eine hoch signifikante Abnahme von ROS und Superoxid sowohl in kontrollbehandelten (PBS) als auch in Lipid – beladenen Zellen. Wie bereits unter 4.1.6. in hyperlipidämischen und hyperglykämischen LDLR-/-Mäusen zu beobachten war, konnte auch im Zellkultursystem gezeigt werden, dass die Aktivierung von LXR einen positiven Effekt auf das Ausmaß von oxidativem Stress in Lipid – beladenen Zellen hatte.

**Abb. 30 Die Aktivierung von LXR konnte die Bildung von oxidativen Radikalen in HK-2 Zellen reduzieren.**

HK-2 Zellen wurden je mit 5  $\mu$ M DMSO oder GW3965 vorbehandelt und anschließend für 24h mit 0,15 mM Ölsäure oder 50 $\mu$ g/ml oxLDL inkubiert. Mittels ROS-sensitiver Fluoreszenzmarker wurde die Menge von diversen ROS-Spezies und Superoxid bestimmt (3.2.14.). In HK-2 Zellen nahm die Produktion von ROS und Superoxid-Anionen bei Gabe von Ölsäure (A) und, noch ausgeprägter, von oxLDL (B) zu. Bei Aktivierung von LXR mittels GW3965 konnte eine hoch signifikante Abnahme der ROS-Produktion bei Kontrollbehandelten (PBS) und bei Lipid-behandelten HK-2 Zellen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse wurden gegen die Werte von DMSO-behandelten HK-2 Zellen normalisiert. MW  $\pm$  SEM, n = 4; p\* = 0,05; p\*\* = 0,01 im Vergleich zu HK-2 + DMSO und p<sup>&</sup> = 0,05; p<sup>&&</sup> = 0,01; p<sup>&&&</sup> = 0,001 im Vergleich zwischen HK-2 Zellen mit und ohne GW3965-Behandlung.



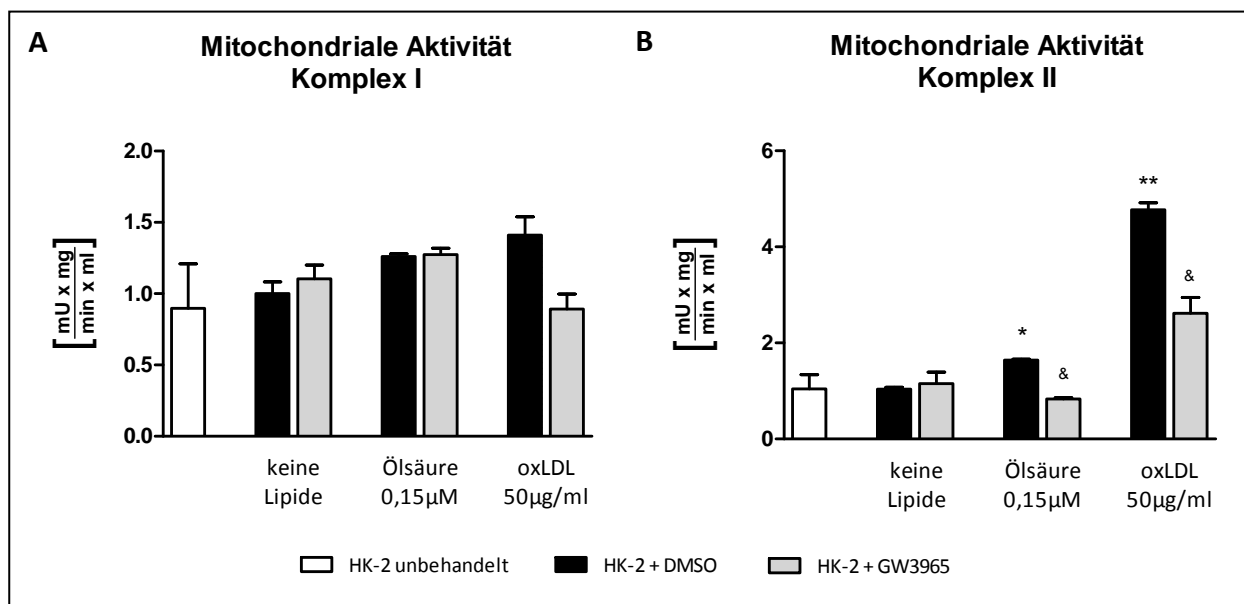
#### 4.3.4. Die Aktivierung von LXR reduziert die gesteigerte Mitochondrienaktivität in Lipid – beladenen HK-2 Zellen

Die Bildung von ROS läuft, auch in gesunden Zellen, u.a. bei der Elektronenübertragung der Atmungskette in Mitochondrien ab. Um zu untersuchen, ob die Bildung von ROS mit der Aktivität von Mitochondrien korreliert, wurde die Enzymaktivität der Atmungskette untersucht. Mit Hilfe eines neu entwickelten Enzym – Assays (3.2.15.) konnte die Aktivität der Enzymkomplexe anhand der Kinetik der Elektronenübertragung in der Atmungskette bestimmt werden. Dazu wurde die Übertragung von Elektronen von NADH – Dehydrogenase (Komplex I) oder Succinat – Dehydrogenase (Komplex II) auf Cytochrom C gemessen. Abbildung 28 veranschaulicht, dass die Behandlung von HK-2 Zellen mit Ölsäure oder oxLDL auf die Elektronenübertragung von Komplex I keinen eindeutigen Effekt hatte (Abb. 31 A). Die Behandlung von HK-2 Zellen mit oxLDL zeigte eine tendenziell erhöhte Elektronenübertragung von Komplex I. Dagegen führte die Gabe von Lipiden zu einer gesteigerten Aktivität der mitochondrialen Atmungskette bei Komplex II (Abb. 31 B). oxLDL hatte dabei auf die Aktivität von Komplex II einen stärkeren Effekt



als Ölsäure. Bei Aktivierung von LXR, durch Behandlung von HK-2 Zellen mit GW3965, sank die mitochondriale Aktivität ab. Die Elektronenübertragung bei Komplex II wurde durch LXR – Aktivierung signifikant verringert.

Der Effekt von GW3965, bzw. der LXR – Aktivierung, auf die Aktivität der mitochondrialen Atmungskette korreliert direkt mit der verminderten ROS – Produktion, wie unter 4.3.3. bereits dargestellt wurde. Der Einfluss von LXR auf Mitochondrien könnte zum besseren Gesundheitszustand des Tubulusepithels in GW3965 – behandelten hyperlipidämischen und hyperglykämischen Mäusen beitragen (4.1.5/4.1.6.). Eine Veränderung der Menge an Adenosintriphosphat (ATP) in den Zellen konnte bei Behandlung mit Lipiden oder GW3965 nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 31 GW3965 senkt die Enzymaktivität von Komplex II der Atmungskette in Lipid – behandelten HK-2 Zellen.**

HK-2 Zellen wurden mit DMSO oder GW3965 vorbehandelt und anschließend mit Ölsäure oder oxLDL inkubiert (3.2.12.). Mittels eines Enzymkinetik-Assays (3.2.15.) wurde die Aktivität der mitochondrialen Atmungskette anhand der Elektronenübertragung der Enzymkomplexe I (A) und Komplex II (B) untersucht. Die Inkubation von HK-2 Zellen mit Ölsäure oder oxLDL führte zu einer erhöhten Aktivität von Komplex II. Bei Vorinkubation mit GW3965 war die Enzymaktivität von Komplex II in Lipid – beladenen HK-2 Zellen in signifikantem Maße verringert. Auf die Aktivität von Komplex I hatte die Lipid-Stimulation oder die Aktivierung von LXR keinen deutlichen Effekt. MW ± SEM, n = 3; p\* = 0,05; p\*\* = 0,01 im Vergleich zu HK-2 + DMSO und p<sup>&</sup> = 0,05 im Vergleich zwischen HK-2 Zellen mit und ohne GW3965-Behandlung.



## 5. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Leber-X-Rezeptor – Aktivierung (LXR) durch den synthetischen Agonisten GW3965 auf die Entwicklung der diabetischen Nephropathie in zwei verschiedenen Tiermodellen untersucht. Hierzu wurden die funktionellen, morphologischen und pathophysiologischen Veränderungen in der Niere von hyperlipidämischen und hyperglykämischen LDLR<sup>-/-</sup> und eNOS<sup>-/-</sup> Mäusen, im Vergleich zu Versuchstieren mit GW3965 – Behandlung, analysiert. Darüber hinaus, wurde *in vitro* an HK-2 Zellen beobachtet, welche Auswirkungen die Akkumulation von ektopischen Lipidtröpfchen auf Tubulusepithelzellen hat.

### 5.1. Die Nierenfunktion konnte durch Aktivierung von LXR in hyperlipidämischen und hyperglykämischen Mäusen erhalten werden.

Beobachtungen an Patienten deuten darauf hin, dass Hyperlipidämie das Fortschreiten von Diabetes – bedingten Nierenerkrankungen begünstigt. [108, 109] Experimentell konnte an Mäusen beobachtet werden, dass Hyperlipidämie und Hyperglykämie bei der Entstehung und dem Fortschreiten von diabetischer Nephropathie synergistisch wirken [110]. Die Tiere zeigen glomeruläre Veränderungen wie mesangiale Matrixvermehrung, Zellproliferation, Podozytenverlust und Schädigung von Podozyten sowie die Bildung von glomerulären und tubulären Lipidablagerungen. Des Weiteren kam es zur Schaumzellbildung und einer hohen Infiltration des Interstitiums mit Makrophagen. Diese pathologischen Veränderungen finden sich häufig in Befunden bei Nierenbiopsien von Patienten mit Diabetes mellitus [23, 111]. In der vorliegenden Arbeit konnten die gleichen Beobachtungen in Diabetes mellitus Typ I – induzierten LDLR<sup>-/-</sup> und eNOS<sup>-/-</sup> Mäusen gemacht werden, welche über Monate mit einer fett– und cholesterinreichen Diät ernährt wurden. Bei Anreicherung der Versuchsdiet mit dem synthetischen, nicht – selektiven LXR – Agonisten GW3965 konnte eine umfangreiche Verringerung glomerulärer und tubulärer Schäden, sowie die Erhaltung der Nierenfunktion erreicht werden. Unter anderem konnte durch Aktivierung von LXR die Ausscheidung von Albumin verringert werden. Da Albumin auf verschiedene Weise die Zellen des Tubulus schädigt und die Bildung von Myofibroblasten fördert, ist die Senkung einer Albuminurie ein wichtiger Aspekt der Wirkung von GW3965 zur Erhaltung der Funktion des

Tubulointerstitiums und der Prophylaxe einer diabetischen Nephropathie [112-114]. Es wurde gezeigt, dass die Behandlung von Mäusen mit Diabetes mellitus Typ II mit LXR – Agonisten, durch Hemmung von Schlüsselenzymen der Glukoneogenese, zu einer Senkung des Blutzuckerspiegels und der hepatischen Glucose – Produktion führt [115]. In den beiden untersuchten Modellen mit LDLR<sup>-/-</sup> und eNOS<sup>-/-</sup> Mäusen konnten keine Unterschiede des Blutzuckerspiegels der entsprechenden Versuchsgruppen mit und ohne GW3965 – Behandlung festgestellt werden, weder bei hyperglykämischen, noch bei normoglykämischen Mäusen. Demnach wurde der positive Effekt der Aktivierung von LXR durch GW3965, auf die Manifestation einer diabetischen Nephropathie, nicht durch Senkung des Blutzuckerspiegels erreicht.

### **5.2. Die Aktivierung von LXR durch GW3965 verhindert die Akkumulation von Lipiden im Nierengewebe**

Die Fett – und Lipidtröpfchenakkumulation im Nierengewebe war in Mäusen mit GW3965 – Behandlung signifikant reduziert. LXR sind direkt an der Expression von Genen beteiligt, welche den Fettstoffwechsel regulieren, indem sie als LXR/RXR – Heterodimer an spezifische Bindestellen in der Promotorregion von Zielgenen binden [88, 116]. Durch Aktivierung von LXR könnte die gesteigerte Expression der bedeutenden Lipid – ausschleusenden Genen *ABCA1* und *ABCG1* zur Prävention der Bildung von Lipidablagerungen in Tubulusepithelzellen und Mesangiumszellen, sowie von Schaumzellen in Glomeruli und im Interstitium, beigetragen haben [117, 118]. Die Relevanz dieses Mechanismus wird von früheren Beobachtungen unterstützt, welche bei verminderter Expression von *ABCA1* in mesangialen und tubulären Epithelzellen eine Akkumulation von Lipiden zeigen [119, 120]. Ein weiterer Grund für die abgeschwächte Lipidtröpfchenbildung im Nierengewebe von GW3965 – behandelten LDLR<sup>-/-</sup> und eNOS<sup>-/-</sup> Mäusen könnte die verminderte Expression von SR – A1 in der Niere sein, einem Scavenger – Rezeptor, der an der Aufnahme von oxidiertem LDL beteiligt ist. Proinflammatorische Zytokine (MCP-1, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ) und Wachstumsfaktoren (TGF $\beta$ , VEGF) tragen zur Dysregulation der zellulären Lipidhomöostase bei, indem sie zu einer gesteigerten Lipidaufnahme, insbesondere über SR – A1 und CD36 führen, und so die intrazelluläre Lipidakkumulation und die Bildung von Schaumzellen dauerhaft aufrecht erhalten [121, 122]. Demnach könnte die Verringerung der zellulären Lipidaufnahme bei

gleichzeitiger Steigerung der Lipid – ausschleusenden Mechanismen [78, 123, 124], die Reduktion von Lipidtröpfchen und Schaumzellen in Glomeruli und im Tubulointerstitium von GW3965 – behandelten Mäusen erklären.

### **5.3. Entzündungen und Fibrose konnten durch Aktivierung von LXR vermindert werden**

Die Modulation des Fettstoffwechsels durch GW3965 ist in weiterer Hinsicht relevant, da in Studien an verschiedenen Spezies gezeigt werden konnte, dass eine Akkumulation von Lipiden in der Niere die Ausprägung interstitieller Fibrose und Glomerulosklerose forcieren kann [125, 126]. Potentielle Mechanismen für die Vernarbung des Gewebes sind direkte Effekte von Lipiden, hauptsächlich durch oxidativen Stress auf infiltrierende und residente Nierenzellen und indirekte Auswirkungen durch die Induktion der Expression von pro – inflammatorischen Zytokinen und Wachstumsfaktoren, wie MCP-1 und TGF- $\beta$ 1 [127-129]. In hyperlipidämischen und hyperglykämischen Mäusen konnte bei GW3965 – Behandlung eine Verbesserung der Nierenfunktion erreicht werden, welche mit einer deutlich verminderten Infiltration von mononukleären Zellen sowie einer geringeren Expression pro – inflammatorischer Chemokine und Wachstumsfaktoren (MCP-1, TNF $\alpha$ ) einhergeht. Studien an humanen Nierenbiopsien zeigten, dass die Akkumulation von Makrophagen in der Niere von diabetischen Patienten mit dem Serumkreatininspiegel, der Bildung interstitieller Myofibroblasten und interstitieller Fibrose korreliert [130, 131]. Folglich scheint der von Makrophagen vermittelte Schaden bei der Entwicklung einer diabetischen Nephropathie von großer Bedeutung zu sein und kann durch aktuelle Therapien nicht effektiv unterbunden werden [132]. Da die mRNA von LXR in allen Segmenten des Nephron exprimiert wird [118, 133], können die protektiven Effekte des nicht – selektiven Agonisten GW3965 in der Niere von hyperlipidämischen und hyperglykämischen LDLR-/- und eNOS-/- Mäusen nicht nur dessen Wirkung auf Makrophagen zugeschrieben werden. Vielmehr hat die Aktivierung von LXR positive Effekte durch Suppression der Aktivität infiltrierender mononukleärer Immunzellen und Nierengewebszellen. Der zu Grunde liegende Mechanismus der immunsuppressiven Wirkung von LXR läuft indirekt über die Transrepression von NF- $\kappa$ B – Signalwegen [85, 134] und einer darauffolgend verringerten Transkription von Zytokinen und RAGE, einem Rezeptor für vollständig glykosylierte Endprodukte [135-137], ab. Die Aktivierung von LXR mittels GW3965 konnte die Expression von TGF- $\beta$ 1, die Anzahl

interstitieller Myofibroblasten und das Ausmaß fibrotischer Areale verringern und veranschaulicht so die anti-fibrotische Wirkung von LXR auf die Niere in LDLR<sup>-/-</sup> und eNOS<sup>-/-</sup> Mäusen. Des Weiteren könnte die Aktivierung von LXR durch den Erhalt der Strukturintegrität der Niere, im speziellen der Blut – Harn – Schranke, dazu beitragen, die Filtration von im Plasma gelösten Zytokinen zu mindern. Filtrierbare Zytokine könnten ebenfalls Tubuluszellen aktivieren und so Entzündungen und Nierenfibrose fördern [138-141]. Diese Beobachtungen decken sich ebenfalls mit Ergebnissen aus Transplantationsmodellen von Kollegen, welche zeigten, dass die Aktivierung von LXR die Entstehung eines chronischen, fibrotischen Schadens bei allogener Nierentransplantation verhindern konnte [142]. Auch Beaven und Kollegen konnten den anti-fibrotischen Effekt der Aktivierung von LXR in primären murinen Stellatzellen, anhand der Suppression Fibrose – assoziierter Gene, und in LXR $\alpha\beta$  – defizienten Mäusen, durch vermehrt auftretende Leberfibrose, darstellen [143].

#### **5.4. ROS – vermittelte Verstärkung von Lipid – assoziierten und entzündungsbedingten Nierengewebsschäden können durch LXR – Aktivierung reduziert werden**

Kollegen aus der Forschungsgruppe konnten bereits zeigen, dass Xanthin – Oxidoreduktase (XOR) ein wichtiges Enzym bei der vermehrten Bildung von ROS in Ratten mit Hyperlipidämie – assoziiertem Nierenschaden ist [103, 104]. XOR kann eine produktive Quelle für Superoxid – Radikale sein, welche mit Stickstoffmonoxid zu Peroxynitrit reagieren und die Nitrosylierung von Proteinen bewirkt [144, 145]. In Studien wurde ebenso festgestellt, dass die Plasmakonzentration von XOR in diabetischen Mäusen erhöht war und mit der Bildung von Superoxid korrelierte [146]. Zusätzlich konnte die vermehrte Generierung von Nitrotyrosin und die daraus resultierende Progredienz einer diabetischen Nephropathie festgestellt werden [32, 147]. In dieser Arbeit konnte an hyperlipidämischen und diabetischen LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen, als Zeichen von erhöhtem oxidativem Stress, eine gesteigerte Expression von XOR und Nitrotyrosin – Epitopen im Nierengewebe nachgewiesen werden, welche bei Gabe von GW3965, und damit Aktivierung von LXR, verringert werden konnte. Auch *in vitro* konnte an immortalisierten Tubulusepithelzellen bei Lipidbeladung und GW3965 – Behandlung eine gesteigerte ROS – Produktion vermindert werden. Darüber hinaus wurde in immunohistochemisch gefärbten Gewebeschnitten beobachtet, dass fokal eine Kollokalisierung von Lipidtröpfchen – assoziierten Proteinen (z.B. Tip47, Perilipin) mit XOR

und Nitrotyrosin in glomerulären Schaumzellen, Tubulusepithelzellen und interstitiellen Makrophagen vorliegt. Kiss und Kollegen bestätigten dies durch *in vitro* – Experimente an Lipid – beladenen peritonealen Makrophagen und konnten durch doppelte Immunfluoreszenzfärbung sowie Proximity Ligation Assay, Tip47 und XOR in unmittelbarer Nähe zueinander nachweisen. Auch in Biopsien diabetischer Patienten konnte ein ähnliches Expressionsmuster beobachtet werden [148]. Die in dieser Arbeit dargestellte Verbindung eines oxidativen Enzyms und seiner Produkte, mit Lipidtröpfchen im Nierengewebe sowie infiltrierter Immunzellen, deutet auf einen Mechanismus hin, inwieweit intrazelluläre Lipidablagerungen die Zellen schädigen und diese durch LXR – Aktivierung geschützt werden können. Darüber hinaus konnte hier und in anderen Studien gezeigt werden, dass durch Lipidablagerung und vermehrter ROS – Bildung die Induktion pro – inflammatorischer Zytokine zu einer vermehrten Infiltration von Makrophagen beiträgt. Eine gesteigerte Expression von XOR fördert darüber hinaus die Bildung von Schaumzellen durch Hochregulation der Expression von Scavenger Rezeptoren in Makrophagen [149-151]. Es gibt auch Hinweise, dass ROS in Verbindung mit pro – inflammatorischen Stimuli die Expression von LXR herunter regulieren kann [152].

### **5.5. Ein Überangebot von Lipiden induziert in HK2 – Zellen vermehrt oxidativen Stress**

Die *in vitro* – Experimente an HK-2 Zellen verdeutlichten den Zusammenhang von induziertem oxidativem Stress unter Bildung von ektopischen Lipidtröpfchen und dem positiven Einfluss von LXR auf diese pathophysiologischen Parameter. Es konnte gezeigt werden, dass die Induktion von Lipidtröpfchen direkt mit einer Steigerung der mitochondrialen Aktivität und der Bildung von ROS einhergeht. Die Bildung ektopischer Lipidtröpfchen unterscheidet sich hinsichtlich der assoziierten PAT – Proteine von Lipidablagerung in Adipozyten. Dadurch kann es vermehrt zum Austritt freier Fettsäuren aus den Lipidtröpfchen kommen, welche in der Zelle lipotoxische Schäden hervorrufen und die Bildung von ROS induzieren [153-155]. Da die Aktivierung von LXR das Ausmaß der Lipidakkumulation verringert, könnten dadurch auch lipotoxische Effekte und damit die ROS – Bildung gemildert werden. Die Produktion von Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) in den Mitochondrien ist von einem kontinuierlichen Ausstrom von ROS begleitet [156, 157]. Eine gesteigerte Mitochondrienaktivität kann damit auch eine

vermehrte ROS – Produktion verursachen und durch LXR – Aktivierung gemildert werden. Es bleibt allerdings offen, ob die Modulation der Mitochondrienaktivität durch LXR ein direkter Effekt ist oder indirekt durch die Reduktion von Lipiden als Energiequelle in der Zelle hervorgerufen wurde. Die Proteinkomplexe der Atmungskette sind sensitiv für oxidative Proteinmodifikationen, wobei eine Schädigung zu einer höheren ROS – Produktion führt [156]. Die Experimente an HK-2 Zellen deuten an, dass die Aktivierung von LXR durch Reduktion der mitochondrialen Aktivität und lipotoxischen Effekten, eine weitere Verstärkung der ROS – Produktion im Sinne von oxidativen Proteinmodifikation an Komplexen der Atmungskette verhindern könnte. Die Reduktion der Bildung von Lipidtröpfchen in Tubulusepithelzellen bewahrt somit die Funktion des Tubulussystems und wirkt dem Fortschreiten der diabetischen Nephropathie entgegen.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass Lipid – induzierte oxidative Mechanismen im geschädigten Gewebe diabetischer Nieren ablaufen. Indem die Aktivierung von LXR die pathophysiologische Kaskade, ausgelöst durch einen Lipidüberschuss und entzündlichen Prozessen, unterbricht, kann das Fortschreiten einer diabetischen Nephropathie vermindert werden, selbst wenn sie durch Hyperlipidämie verstärkt wird.





## 6. Literaturverzeichnis

1. Boylan J.W. , D.P., Kramer K., *Niere und Wasserhaushalt*, in *Physiologie des Menschen*, K.K. Gauer O.H., Jung R., Editor. 1970, Urban und Schwarzenberg: München.
2. Silbernagel S., D.A., *Taschenatlas Physiologie*. 2007, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
3. Schmidt R.F., L.F., Heckmann M. , *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. die Niere, ed. F. Lang. Vol. 31. 2011: Springer.
4. Abrahamson, D.R., *Structure and development of the glomerular capillary wall and basement membrane*. Am J Physiol, 1987. **253**(5 Pt 2): p. F783-94.
5. Natori, Y., et al., *Production and polarized secretion of basement membrane components by glomerular epithelial cells*. Am J Physiol, 1992. **262**(1 Pt 2): p. F131-7.
6. Kriz, W., et al., *The role of podocytes in the development of glomerular sclerosis*. Kidney Int Suppl, 1994. **45**: p. S64-72.
7. Rennke, H.G., *How does glomerular epithelial cell injury contribute to progressive glomerular damage?* Kidney Int Suppl, 1994. **45**: p. S58-63.
8. Pavenstadt, H., W. Kriz, and M. Kretzler, *Cell biology of the glomerular podocyte*. Physiol Rev, 2003. **83**(1): p. 253-307.
9. Endlich, K., W. Kriz, and R. Witzgall, *Update in podocyte biology*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2001. **10**(3): p. 331-40.
10. Mundel, P. and W. Kriz, *Structure and function of podocytes: an update*. Anat Embryol (Berl), 1995. **192**(5): p. 385-97.
11. Reiser, J., et al., *The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction*. J Am Soc Nephrol, 2000. **11**(1): p. 1-8.
12. Fogo, A.B., Cohen, Arthur H., Jennette, J. Charles, Bruijn, Jan A, Colvin, Robert B, ed. *Fundamentals of Renal Pathology*. 2006, Springer New York: New York, NY.
13. Floege J., J.R.J., Feehally J., *Comprehensive Clinical Nephrology*. 4 ed. Renal Anatomy, ed. W. Kriz, Elger, M. 2010: Saunders Elsevier.
14. Prof. Dr. Florian Lang, D.P.L., *Basiswissen Physiologie*. Wasser und Elektrolythaushalt, Nierenfunktion, ed. F. Lang. Vol. 2. 2007: Springer.
15. KDOQI, *KDOQI Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations for Diabetes and Chronic Kidney Disease*. Am J Kidney Dis, 2007. **49**(2 Suppl 2): p. S12-154.
16. Zimmet, P., K.G. Alberti, and J. Shaw, *Global and societal implications of the diabetes epidemic*. Nature, 2001. **414**(6865): p. 782-7.
17. Meetoo, D., P. McGovern, and R. Safadi, *An epidemiological overview of diabetes across the world*. Br J Nurs, 2007. **16**(16): p. 1002-7.
18. Shaw, J.E., R.A. Sicree, and P.Z. Zimmet, *Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030*. Diabetes Res Clin Pract. **87**(1): p. 4-14.
19. Cooper, M.E., *Pathogenesis, prevention, and treatment of diabetic nephropathy*. Lancet, 1998. **352**(9123): p. 213-9.
20. Stefan Silbernagel and F. Lang, *Taschenatlas Pathophysiologie* Vol. 3. 2009, Stuttgart: Thieme.
21. Glass, C.K. and J.M. Olefsky, *Inflammation and lipid signaling in the etiology of insulin resistance*. Cell Metab, 2012. **15**(5): p. 635-45.
22. Keller, C.K., *Praxis der Nephrologie*, ed. S.K. Geberth. Vol. 3. 2010, Berlin: Springer.
23. Kimmelstiel, P. and C. Wilson, *Intercapillary Lesions in the Glomeruli of the Kidney*. Am J Pathol, 1936. **12**(1): p. 83-98 7.
24. Mogensen, P.C.a.C.E., ed. *The Diabetic Kidney*. Altered Renal Microvascular Function in Early Diabetes, ed. P. Pamela K. Carmines, Joseph P. Bast, MD, and Naohito Ishii, PhD. 2006, Springer: New York.

25. Mogensen, C.E. and M.J. Andersen, *Increased kidney size and glomerular filtration rate in early juvenile diabetes*. *Diabetes*, 1973. **22**(9): p. 706-12.
26. Kanwar, Y.S., et al., *Diabetic nephropathy: mechanisms of renal disease progression*. *Exp Biol Med* (Maywood), 2008. **233**(1): p. 4-11.
27. Navarro-Gonzalez, J.F. and C. Mora-Fernandez, *The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy*. *J Am Soc Nephrol*, 2008. **19**(3): p. 433-42.
28. Rastaldi, M.P., *Epithelial-mesenchymal transition and its implications for the development of renal tubulointerstitial fibrosis*. *J Nephrol*, 2006. **19**(4): p. 407-12.
29. Kalluri, R. and E.G. Neilson, *Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis*. *J Clin Invest*, 2003. **112**(12): p. 1776-84.
30. Pacher, P., et al., *Role of nitrosative stress and peroxynitrite in the pathogenesis of diabetic complications. Emerging new therapeutical strategies*. *Curr Med Chem*, 2005. **12**(3): p. 267-75.
31. Mogensen, P.C.a.C.E., *Contemporary Diabetes: The Diabetic Kidney*. Oxidative and Glycooxidative Stress in Diabetic Nephropathy, ed. M.a.P.A.C. Frederick R. DeRubertis, PhD, New York: Humana Press Inc.
32. Fujii, H., et al., *Oxidative and nitrosative stress and progression of diabetic nephropathy in type 2 diabetes*. *Am J Nephrol*. **31**(4): p. 342-52.
33. Forbes, J.M., et al., *Role of advanced glycation end products in diabetic nephropathy*. *J Am Soc Nephrol*, 2003. **14**(8 Suppl 3): p. S254-8.
34. Sasai, Y., et al., *Advanced glycation endproducts stimulate renal epithelial cells to release chemokines that recruit macrophages, leading to renal fibrosis*. *Biosci Biotechnol Biochem*. **76**(9): p. 1741-5.
35. Hovind, P., et al., *Predictors for the development of microalbuminuria and macroalbuminuria in patients with type 1 diabetes: inception cohort study*. *BMJ*, 2004. **328**(7448): p. 1105.
36. Adler, A.I., et al., *Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64)*. *Kidney Int*, 2003. **63**(1): p. 225-32.
37. (FDS), F.D.S., *Diabetische Komplikationen. Nephropathie*. 4 ed. 2002, Dresden: FDS.
38. McIntosh A, H.A., Marshall S, *diabetic renal disease: prevention and early management*, in *Clinical guidelines and evidence review for type 2 diabetes*. 2002, University of Sheffield.
39. Cheng, L. and D. Bostwick, *Essentials of Anatomical Pathology*. 2 ed. 2005: Springer Verlag GmbH.
40. Eva Kiss, et al., *Lipid droplet accumulation is associated with an increase in hyperglycemia induced renal damage*. *The American Journal of Pathology*, accepted December 2012.
41. Mogensen, C.E., C.K. Christensen, and E. Vittinghus, *The stages in diabetic renal disease. With emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy*. *Diabetes*, 1983. **32 Suppl 2**: p. 64-78.
42. Friedman, E.A., *Diabetic Nephropathy: Impact of Comorbidity*, in *Atlas of diseases of the kidney*, R. Schrier, Editor. 1999.
43. DDG, D.D.G., *Nierenerkrankungen bei Diabetes im Erwachsenenalter*, in *Nationale Versorgungsleitlinie*. 2011.
44. Qi, Z., et al., *Characterization of susceptibility of inbred mouse strains to diabetic nephropathy*. *Diabetes*, 2005. **54**(9): p. 2628-37.
45. Brosius, F.C., 3rd, et al., *Mouse models of diabetic nephropathy*. *J Am Soc Nephrol*, 2009. **20**(12): p. 2503-12.
46. Sharma, K., P. McCue, and S.R. Dunn, *Diabetic kidney disease in the db/db mouse*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003. **284**(6): p. F1138-44.
47. Allen, T.J., M.E. Cooper, and H.Y. Lan, *Use of genetic mouse models in the study of diabetic nephropathy*. *Curr Diab Rep*, 2004. **4**(6): p. 435-40.
48. Alpers, C.E. and K.L. Hudkins, *Mouse models of diabetic nephropathy*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. **20**(3): p. 278-84.

49. Kanetsuna, Y., et al., *Deficiency of endothelial nitric-oxide synthase confers susceptibility to diabetic nephropathy in nephropathy-resistant inbred mice*. Am J Pathol, 2007. **170**(5): p. 1473-84.
50. Nakagawa, T., et al., *Diabetic endothelial nitric oxide synthase knockout mice develop advanced diabetic nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(2): p. 539-50.
51. Mohan, S., et al., *Diabetic eNOS knockout mice develop distinct macro- and microvascular complications*. Lab Invest, 2008. **88**(5): p. 515-28.
52. Shesely, E.G., et al., *Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(23): p. 13176-81.
53. Knowles, J.W. and N. Maeda, *Genetic modifiers of atherosclerosis in mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(11): p. 2336-45.
54. Zadelaar, S., et al., *Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(8): p. 1706-21.
55. Jandeleit-Dahm, K., et al., *Role of hyperlipidemia in progressive renal disease: focus on diabetic nephropathy*. Kidney Int Suppl, 1999. **71**: p. S31-6.
56. Hirano, T., *Lipoprotein abnormalities in diabetic nephropathy*. Kidney Int Suppl, 1999. **71**: p. S22-4.
57. Giguere, V., *Orphan nuclear receptors: from gene to function*. Endocr Rev, 1999. **20**(5): p. 689-725.
58. Kidani, Y. and S.J. Bensinger, *Liver X receptor and peroxisome proliferator-activated receptor as integrators of lipid homeostasis and immunity*. Immunol Rev, 2012. **249**(1): p. 72-83.
59. Mangelsdorf, D.J. and R.M. Evans, *The RXR heterodimers and orphan receptors*. Cell, 1995. **83**(6): p. 841-50.
60. Apfel, R., et al., *A novel orphan receptor specific for a subset of thyroid hormone-responsive elements and its interaction with the retinoid/thyroid hormone receptor subfamily*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(10): p. 7025-35.
61. Song, C., et al., *Ubiquitous receptor: structures, immunocytochemical localization, and modulation of gene activation by receptors for retinoic acids and thyroid hormones*. Ann N Y Acad Sci, 1995. **761**: p. 38-49.
62. Willy, P.J., et al., *LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway*. Genes Dev, 1995. **9**(9): p. 1033-45.
63. Glass, C.K. and K. Saijo, *Nuclear receptor transrepression pathways that regulate inflammation in macrophages and T cells*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(5): p. 365-76.
64. Bookout, A.L., et al., *Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network*. Cell, 2006. **126**(4): p. 789-99.
65. Glass, C.K., *Going nuclear in metabolic and cardiovascular disease*. J Clin Invest, 2006. **116**(3): p. 556-60.
66. Jakobsson, T., et al., *Liver X receptor biology and pharmacology: new pathways, challenges and opportunities*. Trends Pharmacol Sci. **33**(7): p. 394-404.
67. Boehm, M.F., et al., *Design and synthesis of potent retinoid X receptor selective ligands that induce apoptosis in leukemia cells*. J Med Chem, 1995. **38**(16): p. 3146-55.
68. Bjorkhem, I. and U. Diczfalusy, *Oxysterols: friends, foes, or just fellow passengers?* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(5): p. 734-42.
69. Schroeffer, G.J., Jr., *Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes*. Physiol Rev, 2000. **80**(1): p. 361-554.
70. Collins, J.L., et al., *Identification of a nonsteroidal liver X receptor agonist through parallel array synthesis of tertiary amines*. J Med Chem, 2002. **45**(10): p. 1963-6.
71. Oosterveer, M.H., et al., *The liver X receptor: control of cellular lipid homeostasis and beyond Implications for drug design*. Prog Lipid Res, 2010. **49**(4): p. 343-52.
72. Peng, D., et al., *A novel potent synthetic steroidal liver X receptor agonist lowers plasma cholesterol and triglycerides and reduces atherosclerosis in LDLR(-/-) mice*. Br J Pharmacol, 2011. **162**(8): p. 1792-804.

73. Aoyama, A., et al., *Design, synthesis, and biological evaluation of novel transrepression-selective liver X receptor (LXR) ligands with 5,11-dihydro-5-methyl-11-methylene-6H-dibenz[b,e]azepin-6-one skeleton*. J Med Chem, 2012. **55**(17): p. 7360-77.
74. Salum, L.B., A.D. Andricopulo, and K.M. Honorio, *A fragment-based approach for ligand binding affinity and selectivity for the liver X receptor beta*. J Mol Graph Model, 2012. **32**: p. 19-31.
75. Calkin, A.C. and P. Tontonoz, *Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(4): p. 213-24.
76. Peet, D.J., et al., *Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha*. Cell, 1998. **93**(5): p. 693-704.
77. Repa, J.J., et al., *Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta*. J Biol Chem, 2002. **277**(21): p. 18793-800.
78. Zelcer, N., et al., *LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor*. Science, 2009. **325**(5936): p. 100-4.
79. Aprahamian, T., et al., *Impaired clearance of apoptotic cells promotes synergy between atherogenesis and autoimmune disease*. J Exp Med, 2004. **199**(8): p. 1121-31.
80. Gautier, E.L., et al., *Enhanced immune system activation and arterial inflammation accelerates atherosclerosis in lupus-prone mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(7): p. 1625-31.
81. Arai, S., et al., *A role for the apoptosis inhibitory factor AIM/Spalpa/Api6 in atherosclerosis development*. Cell Metab, 2005. **1**(3): p. 201-13.
82. Hindinger, C., et al., *Liver X receptor activation decreases the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Neurosci Res, 2006. **84**(6): p. 1225-34.
83. McGeachy, M.J., et al., *The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo*. Nat Immunol, 2009. **10**(3): p. 314-24.
84. Fu, X., et al., *27-hydroxycholesterol is an endogenous ligand for liver X receptor in cholesterol-loaded cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(42): p. 38378-87.
85. Joseph, S.B., et al., *Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors*. Nat Med, 2003. **9**(2): p. 213-9.
86. Hong, C., et al., *Coordinate regulation of neutrophil homeostasis by liver X receptors in mice*. J Clin Invest, 2012. **122**(1): p. 337-47.
87. Ogawa, S., et al., *Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors*. Cell, 2005. **122**(5): p. 707-21.
88. Proctor, G., et al., *Regulation of renal fatty acid and cholesterol metabolism, inflammation, and fibrosis in Akita and OVE26 mice with type 1 diabetes*. Diabetes, 2006. **55**(9): p. 2502-9.
89. Grefhorst, A., et al., *Differential effects of pharmacological liver X receptor activation on hepatic and peripheral insulin sensitivity in lean and ob/ob mice*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005. **289**(5): p. E829-38.
90. Solaas, K., et al., *Suggestive evidence of associations between liver X receptor beta polymorphisms with type 2 diabetes mellitus and obesity in three cohort studies: HUNT2 (Norway), MONICA (France) and HELENA (Europe)*. BMC Med Genet, 2010. **11**: p. 144.
91. Ryan, M.J., et al., *HK-2: an immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney*. Kidney Int, 1994. **45**(1): p. 48-57.
92. Malle, E., et al., *Immunologic detection and measurement of hypochlorite-modified LDL with specific monoclonal antibodies*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. **15**(7): p. 982-9.
93. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
94. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
95. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.

96. Kaminski, M.M., et al., *T cell Activation Is Driven by an ADP-Dependent Glucokinase Linking Enhanced Glycolysis with Mitochondrial Reactive Oxygen Species Generation*. Cell Rep, 2012.
97. Sauer, S.W., et al., *Bioenergetics in glutaryl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: a role for glutaryl-coenzyme A*. J Biol Chem, 2005. **280**(23): p. 21830-6.
98. Schroeder, H.E., K. Rossinsky, and W. Muller, *An established routine method for differential staining of epoxy-embedded tissue sections*. Microsc Acta, 1980. **83**(2): p. 111-6.
99. Adams, J., et al., *13-cis retinoic acid inhibits development and progression of chronic allograft nephropathy*. Am J Pathol, 2005. **167**(1): p. 285-98.
100. Diez-Sampedro, A., O. Lenz, and A. Fornoni, *Podocytopathy in diabetes: a metabolic and endocrine disorder*. Am J Kidney Dis. **58**(4): p. 637-46.
101. Ntambi, J.M. and M. Miyazaki, *Recent insights into stearoyl-CoA desaturase-1*. Curr Opin Lipidol, 2003. **14**(3): p. 255-61.
102. Suzuki, D., et al., *Immunohistochemical evidence for an increased oxidative stress and carbonyl modification of proteins in diabetic glomerular lesions*. J Am Soc Nephrol, 1999. **10**(4): p. 822-32.
103. Scheuer, H., et al., *Oxidant stress in hyperlipidemia-induced renal damage*. Am J Physiol Renal Physiol, 2000. **278**(1): p. F63-74.
104. Gwinner, W., et al., *Pivotal role of xanthine oxidase in the initiation of tubulointerstitial renal injury in rats with hyperlipidemia*. Kidney Int, 2006. **69**(3): p. 481-7.
105. Forbes, M.S., et al., *Lack of endothelial nitric-oxide synthase leads to progressive focal renal injury*. Am J Pathol, 2007. **170**(1): p. 87-99.
106. Nakayama, T., et al., *Endothelial injury due to eNOS deficiency accelerates the progression of chronic renal disease in the mouse*. Am J Physiol Renal Physiol, 2009. **296**(2): p. F317-27.
107. Nosadini, R. and G. Tonolo, *Role of oxidized low density lipoproteins and free fatty acids in the pathogenesis of glomerulopathy and tubulointerstitial lesions in type 2 diabetes*. Nutr Metab Cardiovasc Dis. **21**(2): p. 79-85.
108. Abrass, C.K., *Lipid metabolism and renal disease*. Contrib Nephrol, 2006. **151**: p. 106-21.
109. Samuelsson, O., et al., *Lipoprotein abnormalities are associated with increased rate of progression of human chronic renal insufficiency*. Nephrol Dial Transplant, 1997. **12**(9): p. 1908-15.
110. Spencer, M.W., et al., *Hyperglycemia and hyperlipidemia act synergistically to induce renal disease in LDL receptor-deficient BALB mice*. Am J Nephrol, 2004. **24**(1): p. 20-31.
111. Lee, H.S., et al., *Intraglomerular lipid deposition in routine biopsies*. Clin Nephrol, 1991. **36**(2): p. 67-75.
112. Lee, J.Y., et al., *Albumin-induced epithelial-mesenchymal transition and ER stress are regulated through a common ROS-c-Src kinase-mTOR pathway: effect of imatinib mesylate*. Am J Physiol Renal Physiol. **300**(5): p. F1214-22.
113. Arici, M., et al., *Fatty acids carried on albumin modulate proximal tubular cell fibronectin production: a role for protein kinase C*. Nephrol Dial Transplant, 2002. **17**(10): p. 1751-7.
114. Schreiner, G.F., *Renal toxicity of albumin and other lipoproteins*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 1995. **4**(4): p. 369-73.
115. Steffensen, K.R. and J.A. Gustafsson, *Putative metabolic effects of the liver X receptor (LXR)*. Diabetes, 2004. **53 Suppl 1**: p. S36-42.
116. Zhao, C. and K. Dahlman-Wright, *Liver X receptor in cholesterol metabolism*. J Endocrinol. **204**(3): p. 233-40.
117. Larrede, S., et al., *Stimulation of cholesterol efflux by LXR agonists in cholesterol-loaded human macrophages is ABCA1-dependent but ABCG1-independent*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(11): p. 1930-6.
118. Wu, J., et al., *Liver X receptor-alpha mediates cholesterol efflux in glomerular mesangial cells*. Am J Physiol Renal Physiol, 2004. **287**(5): p. F886-95.
119. Johnson, A.C., et al., *Experimental glomerulopathy alters renal cortical cholesterol, SR-B1, ABCA1, and HMG CoA reductase expression*. Am J Pathol, 2003. **162**(1): p. 283-91.

120. Takemura, T., et al., *Apolipoproteins and lipoprotein receptors in glomeruli in human kidney diseases*. *Kidney Int*, 1993. **43**(4): p. 918-27.
121. Abrass, C.K., *Cellular lipid metabolism and the role of lipids in progressive renal disease*. *Am J Nephrol*, 2004. **24**(1): p. 46-53.
122. Spann, N.J., et al., *Regulated accumulation of desmosterol integrates macrophage lipid metabolism and inflammatory responses*. *Cell*. **151**(1): p. 138-52.
123. Costet, P., et al., *Retinoic acid receptor-mediated induction of ABCA1 in macrophages*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(21): p. 7756-66.
124. Venkateswaran, A., et al., *Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(22): p. 12097-102.
125. Grone, H.J., J. Hohbach, and E.F. Grone, *Modulation of glomerular sclerosis and interstitial fibrosis by native and modified lipoproteins*. *Kidney Int Suppl*, 1996. **54**: p. S18-22.
126. Joles, J.A., et al., *Early mechanisms of renal injury in hypercholesterolemic or hypertriglyceridemic rats*. *J Am Soc Nephrol*, 2000. **11**(4): p. 669-83.
127. Chow, F.Y., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 promotes the development of diabetic renal injury in streptozotocin-treated mice*. *Kidney Int*, 2006. **69**(1): p. 73-80.
128. Sun, L., et al., *Role of sterol regulatory element-binding protein 1 in regulation of renal lipid metabolism and glomerulosclerosis in diabetes mellitus*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(21): p. 18919-27.
129. Donadelli, R., et al., *Protein traffic activates NF-kB gene signaling and promotes MCP-1-dependent interstitial inflammation*. *Am J Kidney Dis*, 2000. **36**(6): p. 1226-41.
130. Nguyen, D., et al., *Macrophage accumulation in human progressive diabetic nephropathy*. *Nephrology (Carlton)*, 2006. **11**(3): p. 226-31.
131. Yonemoto, S., et al., *Correlations of tissue macrophages and cytoskeletal protein expression with renal fibrosis in patients with diabetes mellitus*. *Clin Exp Nephrol*, 2006. **10**(3): p. 186-92.
132. Tesch, G.H., *Macrophages and diabetic nephropathy*. *Semin Nephrol*. **30**(3): p. 290-301.
133. Morello, F., et al., *Liver X receptors alpha and beta regulate renin expression in vivo*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(7): p. 1913-22.
134. Hong, C. and P. Tontonoz, *Coordination of inflammation and metabolism by PPAR and LXR nuclear receptors*. *Curr Opin Genet Dev*, 2008. **18**(5): p. 461-7.
135. Li, J. and A.M. Schmidt, *Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(26): p. 16498-506.
136. Fowler, A.J., et al., *Liver X receptor activators display anti-inflammatory activity in irritant and allergic contact dermatitis models: liver-X-receptor-specific inhibition of inflammation and primary cytokine production*. *J Invest Dermatol*, 2003. **120**(2): p. 246-55.
137. Mezzano, S., et al., *NF-kappaB activation and overexpression of regulated genes in human diabetic nephropathy*. *Nephrol Dial Transplant*, 2004. **19**(10): p. 2505-12.
138. Fagerudd, J.A., et al., *Urinary excretion of TGF-beta 1, PDGF-BB and fibronectin in insulin-dependent diabetes mellitus patients*. *Kidney Int Suppl*, 1997. **63**: p. S195-7.
139. Honkanen, E., et al., *Urinary transforming growth factor-beta 1 in membranous glomerulonephritis*. *Nephrol Dial Transplant*, 1997. **12**(12): p. 2562-8.
140. Sato, H., et al., *Increased excretion of urinary transforming growth factor beta 1 in patients with diabetic nephropathy*. *Am J Nephrol*, 1998. **18**(6): p. 490-4.
141. Hirschberg, R., *Bioactivity of glomerular ultrafiltrate during heavy proteinuria may contribute to renal tubulo-interstitial lesions: evidence for a role for insulin-like growth factor I*. *J Clin Invest*, 1996. **98**(1): p. 116-24.
142. Kiss, E., et al., *Suppression of chronic damage in renal allografts by Liver X receptor (LXR) activation relevant contribution of macrophage LXRA*. *Am J Pathol*. **179**(1): p. 92-103.
143. Beaven, S.W., et al., *Liver X receptor signaling is a determinant of stellate cell activation and susceptibility to fibrotic liver disease*. *Gastroenterology*. **140**(3): p. 1052-62.
144. Godber, B.L., et al., *A new route to peroxynitrite: a role for xanthine oxidoreductase*. *FEBS Lett*, 2000. **475**(2): p. 93-6.

145. Li, H., et al., *Characterization of the magnitude and kinetics of xanthine oxidase-catalyzed nitrite reduction. Evaluation of its role in nitric oxide generation in anoxic tissues.* J Biol Chem, 2001. **276**(27): p. 24482-9.
146. Matsumoto, S., et al., *Confirmation of superoxide generation via xanthine oxidase in streptozotocin-induced diabetic mice.* Free Radic Res, 2003. **37**(7): p. 767-72.
147. Zhang, H.M., et al., *Linoleic acid-induced mitochondrial Ca(2+) efflux causes peroxynitrite generation and protein nitrotyrosylation.* PLoS One, 2009. **4**(6): p. e6048.
148. Kiss, et al., *Lipid droplet accumulation is associated with an increase in hyperglycemia induced renal damage.* The American Journal of Pathology, accepted December 2012.
149. Gibbings, S., et al., *Xanthine oxidoreductase promotes the inflammatory state of mononuclear phagocytes through effects on chemokine expression, peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  sumoylation, and HIF-1 $\alpha$ .* J Biol Chem. **286**(2): p. 961-75.
150. Kushiyama, A., et al., *Xanthine oxidoreductase is involved in macrophage foam cell formation and atherosclerosis development.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. **32**(2): p. 291-8.
151. Sun, K., et al., *Role of xanthine oxidoreductase in experimental acute renal-allograft rejection.* Transplantation, 2004. **77**(11): p. 1683-92.
152. Alba, G., et al., *Transcription of Liver X Receptor Is Down-Regulated by 15-Deoxy-Delta(12,14)-Prostaglandin J(2) through Oxidative Stress in Human Neutrophils.* PLoS One. **7**(10): p. e42195.
153. Walther, T.C. and R.V. Farese, Jr., *Lipid droplets and cellular lipid metabolism.* Annu Rev Biochem, 2012. **81**: p. 687-714.
154. Le Lay, S. and I. Dugail, *Connecting lipid droplet biology and the metabolic syndrome.* Prog Lipid Res, 2009. **48**(3-4): p. 191-5.
155. Kuramoto, K., et al., *Perilipin 5, a lipid droplet-binding protein, protects heart from oxidative burden by sequestering fatty acid from excessive oxidation.* J Biol Chem, 2012. **287**(28): p. 23852-63.
156. Musatov, A. and N.C. Robinson, *Susceptibility of mitochondrial electron-transport complexes to oxidative damage. Focus on cytochrome c oxidase.* Free Radic Res, 2012. **46**(11): p. 1313-26.
157. Valko, M., et al., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.* Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(1): p. 44-84.



## Abkürzungen

ABCA1	ATP – binding cassette transporter, Unterfamilie A Mitglied 1
ABCG1	ATP – binding cassette transporter, Unterfamilie G Mitglied 1
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
Chow	Normaldiät für Versuchstiere
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP(s)	Desoxyribonukleosidtriphosphat(e)
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor ( <i>epidermal growth factor</i> )
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid – Synthase
FCS	Serum fötaler Kälber ( <i>fetal calf serum</i> )
GAPDH	Glyzerinaldehyd – 3 – phosphat – Dehydrogenase
GBM	glomeruläre Basalmembran
H	Stunde
HDL	Lipoprotein hoher Dichte ( <i>high density lipoprotein</i> )
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton (Molekülmasse)
KO	Knock – Out (Verlust eines Gens)
LDL	Lipoprotein geringer Dichte ( <i>low density lipoprotein</i> )
LDLR	LDL – Rezeptor
LXR	Leber – X – Rezeptor ( <i>liver-x-receptor</i> )
MCP-1	monozyten-chemotakt. Protein 1 ( <i>monocyte chemotactic protein 1</i> )
mRNA	Boten – RNA ( <i>messenger RNA</i> )
MW	Mittelwert
NF <sub>κ</sub> B	nukleärer Faktor kappa B
oxLDL	oxidiertes LDL (modifiziertes LDL, kupferoxidiert)
PAGE	Polyacrylamid – Gelelektrophorese
PAS	Periodsäure – Schiff Reaktion ( <i>periodic acid Schiff</i> )
PAT	Perilipin – Adipophilin – Tip47 – Proteinfamilie
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase – Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PDGF	von Blutplättchen stammender Wachstumsfaktor ( <i>platelet derived growth factor</i> )

## Abkürzungsverzeichnis

---

RAGE	Rezeptor für vollständig glykosylierte Endprodukte ( <i>receptor of advanced glycation end products</i> )
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	oxidative Radikale ( <i>reactive oxygen species</i> )
RT	Raumtemperatur
RXR	Retinoid – X – Rezeptor ( <i>retinoic-x-receptor</i> )
SCD1	Stearoyl – CoA Desaturase 1
SEM	Standardfehler des arithm. Mittels ( <i>standard error of the mean</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SPF	spezifisch pathogenfrei
SR-A1	<i>Scavenger Receptor A1</i>
STZ	Streptozotozin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethan-1,2-diamin
TGF $\beta$	transform. Wachstumsfaktor $\beta$ ( <i>transforming growth factor <math>\beta</math></i> )
Tip47	<i>tail interacting protein of 47kDa</i>
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UpM	Umdrehungen pro Minute
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor ( <i>vascular endothelial growth factor</i> )
v/v	Volumenprozent ( <i>volume/volume</i> )
w/v	Gewichtsprozent ( <i>weight/volume</i> )
WD	Fett- und cholesterinreiches Tierfutter ( <i>Western Diet</i> )
Wt	Wildtyp (genetisch unverändert)
WT1	Wilms – Tumorsuppressorgen 1
XOR	Xanthin – Oxidoreduktase

### Danksagung

Mein erster Dank gilt Prof. Dr. med. H. – J. Gröne für die Bereitstellung eines faszinierenden Themas für meine Doktorarbeit, die Betreuung sowie für die wertvollen Anregungen und Diskussionen die diese Arbeit ermöglicht haben.

Ebenso möchte ich mich bei meinem Prüfungskomitee bedanken, Prof. Dr. med. Phillip Beckhove, Dr. med. Johannes Backs und insbesondere PD Dr. rer. nat. Tobias Dick für die bereitwillige Übernahme des Erstgutachtens an der Fakultät für Biowissenschaften.

Ein besonderer Dank gilt Dr. med. Eva Kiss für die sehr gute Zusammenarbeit und die zahlreichen wertvollen Ratschläge und Diskussionen.

Prof. Dr. med. Hans – Peter Hammes danke ich für die finanzielle Unterstützung durch den internationalen Graduiertenkolleg GRK880/3 „Vascular Medicine“ und das abwechslungsreiche Doktorandenprogramm.

Ich danke ebenfalls Dr. med. vet. Bettina Kränzlin sowie den Mitarbeitern Viktoria Skude und Elisabeth Wühl am Tierstall des Universitätsklinikums Mannheim für die Hilfe und Unterstützung zur Durchführung der Tierversuche. Elisabeth Seelinger danke ich für die Analysen der Blut- und Urinproben.

Besonders möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Sven Sauer für die Untertützung, Hilfe und Beantwortung zahlloser Fragen zu den mitochondrialen Fluxmessungen bedanken. Hierzu bedanke ich mich ebenso bei Silvana Opp und Thorsten Ruppert.

Dr. Hans Heid danke ich für die Ratschläge und Anregungen zu den verwendeten Antikörpern für Lipidtröpfchen – assoziierte Proteine. Dr. phil. nat. Ina Öhme danke ich für die Einführung und Ratschläge zum Fluorostar und dass ich das Gerät benutzen durfte.

Bei Gabriele Schmidt, Claudia Schmidt und Anna – Lena Weiss möchte ich mich für die Anfertigung der histologischen und immunohistologischen Präparate bedanken sowie bei Sylvia Kaden für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Mein ganz besonderer Dank gilt allen Kolleginnen und Kollegen aus der Arbeitsgruppe für das freundschaftliche Arbeitsklima und dass sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen: Richard, Ulrike, Martina, Wang, Viola, Silke, Sascha, Roger, Benita, Stefan, Mahnaz und Zoran. Trotzdem möchte ich im speziellen diesen Doktoranden und PostDocs für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft, die guten Ratschläge und den Spaß in und außerhalb des Labors meinen Dank aussprechen: Mariona, Nicole, Francesca, Aline, Giuseppina, Federica, Daniel, Paula, Aaron und Alex.

Ohne die Unterstützung und Liebe meiner Eltern und Dominik, die immer für mich da waren und an mich geglaubt haben, wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ich danke euch für alles.



## Publikationen

### Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Eva Kiss, Bettina Kränzlin, **Katja Wagenblaß**, Mahnaz Bonrouhi, Joachim Thiery, Elisabeth Gröne, Viola Nordström, Daniel Teupser, Norbert Gretz, Ernst Malle, Hermann-Josef Gröne  
“Lipid droplet accumulation is associated with an increase in hyperglycemia induced renal damage. Prevention by LXRs” Am J Pathol., accepted November 2012

Vortrag im Rahmen des Cardiovascular Network Retreat, Schloß Rauschholzhausen vom 15. bis 17. März 2012, Deutschland.

Posterpräsentation im Rahmen des Joint Workshops IRTG 1302 und GRK 880, Schloß Maurach am Bodensee vom 14. bis 16. Mai 2012, Deutschland.